

**Universidad Autónoma Metropolitana**

**Unidad Iztapalapa**



**Casa abierta al tiempo**

**División de Ciencias Básicas e Ingeniería**

**Partículas compuestas para liberación de fármacos**

**activada mediante estímulos térmicos**

Tesis que presenta:

**Luis Enrique González Calderón**

Para obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias (Física)**

Asesor:

Dr. Roberto Olayo Valles

Sinodales:

Dr. Mauricio Ortega López

Dr. Pedro Díaz Leyva

Dr. Roberto Olayo Valles

**Ciudad de México, México, julio 2019**

# Agradecimientos

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional.

A Raquel, Leonardo y Alexander por brindarme la motivación necesaria para superar cualquier reto.

Al Dr. Roberto Olayo Valles por todo su esfuerzo, sus enseñanzas y su gran calidad humana.

Al jurado por sus valiosos consejos y sugerencias en este trabajo

A todas aquellas personas que de alguna manera me han acompañado a lo largo de mi trayectoria académica o personal. A la filosofía paysista por sus enseñanzas.

También quiero agradecer las facilidades otorgadas para permitirme utilizar el laboratorio de docencia de química

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de esta tesis.

## **Jurado asignado:**

Presidente. Doctor Mauricio Ortega López

Secretario. Doctor Pedro Díaz Leyva

Vocal. Doctor Roberto Olayo Valles

# Tabla de contenidos

Resumen .....	X
1 Introducción .....	1
2 Objetivos .....	4
2.1 Objetivo General .....	4
2.2 Objetivos Específicos .....	4
3 Revisión de la literatura .....	5
3.1 Nanopartículas magnéticas .....	5
3.1.1 Síntesis.....	5
3.1.2 Propiedades magnéticas .....	9
3.1.3 Funcionalización .....	12
3.1.4 Toxicidad .....	14
3.2 Polimerización por plasma .....	16
3.2.1 Conceptos y principios básicos.....	17
3.2.2 Aplicaciones biomédicas .....	20
4 Nanopartículas magnéticas modificadas mediante polimerización por plasma	
24	
4.1 Introducción .....	24
4.1.1 Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas .....	24
4.2 Experimental .....	28
4.2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas.....	28

4.2.2	Modificación superficial mediante polimerización por plasma .....	30
4.2.3	Interacción con células .....	30
4.2.4	Técnicas de caracterización .....	31
4.3	Resultados .....	37
4.4	Conclusiones .....	42
5	Partículas compuestas con carácter magnético para dosificación de medicamento .....	44
5.1	Introducción .....	44
5.1.1	Liberación de fármaco .....	44
5.1.2	Síntesis de nanocápsulas .....	46
5.2	Experimental .....	54
5.2.1	Preparación de partículas compuestas .....	54
5.2.2	Caracterización.....	59
5.3	Resultados .....	63
5.4	Conclusiones .....	80
6	Bibliografía .....	82

# Índice de figuras

Figura 3-1. En una aproximación simple, el momento magnético total de una nanopartícula puede ser considerado como un momento magnético gigante (flecha grande) compuesto de todos los momentos magnéticos individuales de los átomos que forman la partícula (flechas pequeñas) .....	11
Figura 4-1. Imagen de TEM de las nanopartículas magnéticas sintetizadas (izquierda) e histograma de las partículas magnéticas ajustadas a una curva de distribución log-normal con un promedio de $d_0 = 9$ nm y varianza $\ln \sigma = 0.22$ .	37
Figura 4-2. Distribución de tamaños de nanopartículas magnéticas obtenidas por dispersión de luz dinámica .....	38
Figura 4-3. Foto de la estructura utilizada para polimerizar por plasma a las nanopartículas magnéticas de manera uniforme. La estructura blanca que se observa junto al resorte se mueve rodeando el reactor y por medio de un imán atrae a las partículas hasta el punto más alto donde las suelta.....	39
Figura 4-4. Imágenes de TEM de nanopartículas magnéticas recubiertas con pirrol, donde se observa derretimiento del recubrimiento de pirrol. ....	40
Figura 4-5. Espectro de fluorescencia de las partículas magnéticas cubiertas con pirrol. La longitud de excitación es de 460 nm (curva azul), mientras que la longitud de emisión es de 260 nm (curva roja). ....	40
Figura 4-6. El FTIR de las nanopartículas magnéticas recubiertas con pirrol, alilamina y acetona. Además, se incluye el espectro de nanopartículas sin ningún	

recubrimiento por plasma "nano-oleico" y uno más en donde las partículas fueron puestas en el reactor de plasma, pero sin monómero "nano-oleico-plasma".	41
Figura 4-7. Imágenes de las células en contacto con nanopartículas magnéticas. A la izquierda recubiertas con pirrol y a la derecha recubiertas con acetona.	41
Figura 4-8. Imágenes de las células en contacto con nanopartículas magnéticas. A la izquierda recubiertas con alilamina y a la derecha recubiertas únicamente con el ácido oleico. ....	42
Figura 5-1. A la izquierda se muestra la fase orgánica que generalmente consiste de un solvente orgánico, un polímero y la sustancia activa (y en el caso particular de esta tesis de nanopartículas magnéticas). A la derecha se muestra la fase acuosa que consiste de agua y en algunos casos un tensoactivo. ....	48
Figura 5-2. Muestra el procedimiento de añadir la fase orgánica a la fase acuosa, la agitación puede ser por medio de un agitador magnético o un sonicador. Sin embargo, en este caso se muestra un procesador ultrasónico (parte metálica que se encuentra dentro del agua) para agitar la fase acuosa. ....	48
Figura 5-3. Representación de la ruta que seguimos para sintetizar y funcionalizar las nanocápsulas. Primero se muestra el resultado de la nanoprecipitación, después el resultado de la polimerización por plasma de la capa de pirrol y finalmente se añade el PEG. La parte A representa las distintas pruebas sin fármaco, mientras que en la parte B se añadió el fármaco. ....	55
Figura 5-4. Procesador Ultrasónico Sonics vibra-cell utilizado durante la nanoprecipitación. Es posible ajustar el ciclo de trabajo y la amplitud de la sonicación. ....	57

Figura 5-5. Distribución de tamaños de nanocápsulas hechas por el método de nanoprecipitación con procesador ultrasónico a 60 % de amplitud y utilizando acetona como solvente. ....	66
Figura 5-6. Distribución de tamaños de nanocápsulas hechas por el método de nanoprecipitación con procesador ultrasónico a 100 % de amplitud utilizando acetona como solvente, con 50 mg de partículas magnéticas y sin tensoactivo. ....	68
Figura 5-7. Se muestra el porcentaje de peso perdido como función de la temperatura para la policaprolactona .....	69
Figura 5-8. Se muestra el porcentaje de peso perdido como función de la temperatura para las nanopartículas magnéticas solas.....	70
Figura 5-9. Curva de análisis termogravimétrico de nanocápsulas compuestas de PCL y nanopartículas magnéticas. Las nanocápsulas fueron hechas mediante la técnica de nanoprecipitación con el procesador ultrasónico a 80 % de amplitud con 50 mg de partículas magnéticas sin PVA .....	71
Figura 5-10. Termograma DSC de nacocápsulas compuestas de PCL y nanopartículas magnéticas. El punto de fusión del PCL es de 59.40°C .....	72
Figura 5-11. Curvas de análisis termogravimétrico para las nanocapsulas de PCL con nanopartículas magnéticas solas (curva azul) y recubiertas con alilamina (curva roja). ....	74
Figura 5-12. Imágenes de SEM de nanopartículas hechas por el método de nanoprecipitación donde se observa la morfología de la muestra. ....	75
Figura 5-13. Histograma de las nanocápsulas obtenidas a partir de las imágenes por SEM con una curva de distribución ajustada log-normal con un promedio de $d_0=399$ nm y varianza $\ln \sigma = 0.14$ .....	76



Figura 5-14. Curva de calibración de Indometacina en agua ( $\lambda_{\max}$ 265 nm) .....	77
Figura 5-15. Porcentaje de indometacina liberado como función de la temperatura .....	78
Figura 5-16. Curva de calibración de Indometacina en metanol ( $\lambda_{\max}$ 265 nm).....	79

## Índice de tablas

Tabla 1. Materiales utilizados para la preparación de nanopartículas por el método de nanoprecipitación .....	50
Tabla 2. Tamaños de las capsulas obtenidos al variar el solvente y método de agitación. ....	65
Tabla 3. Distribución de tamaños de nanocápsulas hechas por el método de nanoprecipitación con procesador ultrasónico a 100 % de amplitud utilizando acetona como solvente, con 50 mg de partículas magnéticas y sin tensoactivo. ....	67
Tabla 4. Absorbancia y cantidad de indometacina liberada a distintas temperaturas. ....	78

# Resumen

El siguiente trabajo está dedicado a la preparación y caracterización de nanocápsulas cargadas con Indometacina como fármaco anti-inflamatorio, cuyo contenido puede ser liberado mediante su exposición ante un campo magnético alternante. La combinación adecuada de materiales biocompatibles permitirá formar nanopartículas compuestas con tiempos largos de circulación en el cuerpo. Las nanopartículas compuestas contendrán nanopartículas magnéticas que permitirán la localización dentro del cuerpo mediante imágenes de resonancia magnética y que servirán de agentes de disipación de calor. Así mismo, demostramos la posibilidad de modificar la superficie de las partículas a través de polimerización por plasma con el fin de brindarles una mayor estabilidad.

# 1 Introducción

La nanotecnología es un área de investigación cada vez más activa y con un gran potencial para combatir y tratar enfermedades. El tamaño de los nanomateriales es similar al de moléculas biológicas, en consecuencia, los nanomateriales pueden ser útiles para aplicaciones e investigaciones tanto *in vivo* como *in vitro*. La integración de nanomateriales con la biología ha llevado al desarrollo de dispositivos de diagnóstico, contraste, terapia y de liberación de fármaco.

Existen diversos nanosistemas portadores de fármacos o nanoportadores, por ejemplo, nanopartículas poliméricas, micelas, nanoemulsiones, entre otros. Uno de los principales retos de cualquiera de estos sistemas es prevenir la liberación anticipada de medicamento. En este sentido, una propuesta consiste en lograr que los nanoportadores respondan a un estímulo y en consecuencia liberen el fármaco.

En lo que respecta a la liberación de fármaco, actualmente las medicinas tienen efectos secundarios debido en gran medida a su falta de especificidad, pues no sólo afectan al área deseada sino también al tejido en los alrededores, esto no es algo significativo en muchos casos, sin embargo, en las medicinas más potentes que tienen efectos citotóxicos esto se convierte en un gran inconveniente, como es el caso de los tratamientos de quimioterapia contra el cáncer. Con el objetivo de resolver dicho problema han sido diseñadas nanopartículas que cuentan con un

tamaño óptimo y con una superficie tal que incrementan el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo con el fin de mejorar la biodistribución de un fármaco.

Las nanopartículas magnéticas han atraído un gran interés en la liberación controlada de fármacos debido a que son capaces de responder a estímulos magnéticos y crean contraste de resonancia magnética nuclear por lo que es posible monitorear su localización (Qiao, Yang, & Gao, 2009). También se ha sugerido que es posible guiar a las nanopartículas magnéticas al sitio de interés mediante el uso de campos magnéticos (Cole et al., 2011). Adicionalmente, las nanopartículas magnéticas disipan calor al ser expuestas a un campo magnético alternante, esta característica puede ser detonante para lograr la liberación de fármaco al encapsular tanto a las partículas como el agente activo dentro de un polímero que responda a estímulos térmicos, asimismo el calor disipado puede ser utilizado como terapia (hipertermia) en el caso de cáncer, con el fin de alterar las funciones de las células cancerígenas promoviendo su muerte, combinando así los efectos de la hipertermia con los de la quimioterapia.

En esta tesis mostramos la síntesis y caracterización de nanoportadores con propiedades magnéticas que son de interés por las propiedades mencionadas anteriormente. Debido a la naturaleza del campo de la nanomedicina es necesaria una colaboración interdisciplinaria para lograr tener un mayor entendimiento de los distintos principios y procesos que tienen lugar en la liberación de fármaco. Es por ello que escribir un reporte sobre esta aplicación requiere abarcar una cantidad significativa de conceptos y principios de diversos campos de la ciencia.

El texto está organizado de tal manera que presente los antecedentes y el contexto necesario para entender tanto la motivación como los distintos retos inherentes al uso de la nanotecnología en la liberación de fármaco. A continuación, doy una descripción breve del contenido de cada capítulo.

En el siguiente capítulo se presentan el objetivo general y los objetivos particulares de este trabajo.

El capítulo 3 consiste de una revisión de los conceptos que sustentan el resto del trabajo, y se divide en dos secciones: la primera trata sobre las nanopartículas magnéticas y sus distintas formas de síntesis, además trato de responder las preguntas más comunes que surgen en el contexto de este tema relacionadas con sus propiedades magnéticas y su toxicidad. Por su parte, la segunda sección trata sobre la polimerización por plasma. Ahí, examino las principales características que hacen a esta técnica tan atractiva para recubrir las nanoestructuras que tienen como objetivo la liberación controlada de fármacos.

En el capítulo 4 expongo los resultados de la funcionalización de nanopartículas magnéticas utilizando la técnica de polimerización por plasma y su interacción con células.

Finalmente, en el capítulo 5 presento los resultados de la preparación de nanocápsulas magnéticas que contienen Indometacina, así como la liberación del medicamento ante estímulos térmicos.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

Preparar partículas compuestas que tengan carácter magnético y cuya superficie sea funcionalizada mediante polimerización por plasma para aplicaciones biomédicas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- I. Demostrar la posibilidad de modificar la superficie de nanopartículas magnéticas mediante la técnica de polimerización por plasma.
- II. Determinar si las nanopartículas funcionalizadas interactúan con células.
- III. Preparar partículas magnéticas que permitan acarrear medicamento.
- IV. Establecer el potencial de las partículas para liberar el medicamento mediante activación magnética.

## **3 Revisión de la literatura**

En el presente capítulo se dará un panorama general sobre las nanopartículas magnéticas, que incluyen distintos métodos para su síntesis, su comportamiento superparamagnético, entre otros. Además, se hará una revisión literaria sobre la polimerización por plasma y su uso en la funcionalización de materiales.

### **3.1 Nanopartículas magnéticas**

Las nanopartículas magnéticas han sido extensamente investigadas en las últimas décadas debido a sus distintas aplicaciones. A continuación, haré una síntesis de sus propiedades y características más importantes en relación a su aplicación en los sistemas de liberación de fármaco.

#### **3.1.1 Síntesis**

En las últimas décadas distintos investigadores han desarrollado varias técnicas para sintetizar partículas magnéticas. Todas estas rutas buscan controlar lo mejor posible la composición y el tamaño de las partículas, pues de estas características dependen sus propiedades magnéticas. Los métodos de síntesis más populares incluyen coprecipitación (Massart, 1981), descomposición térmica (Roca, Morales, O'Grady, & Serna, 2006) y ablación laser (Wang, Liu, & Zeng, 2006). Sin embargo, existen otros métodos de síntesis y al lector interesado le recomiendo consultar el

trabajo de Wu et al. (Wu, Wu, Yu, Jiang, & Kim, 2015) como referencia sobre diversos métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas.

### *3.1.1.1 Método de Coprecipitación*

El método de coprecipitación propuesto originalmente por Massart (Massart, 1981) es un procedimiento fácil y conveniente para sintetizar nanopartículas de óxido de hierro, ya sea magnetita ( $Fe_3O_4$ ) o maghemita ( $\gamma - Fe_2O_3$ ). El método consiste en la mezcla de sales férricas y ferrosas en solución acuosa y la posterior adición de una base a temperatura moderada bajo una atmósfera inerte. El tamaño, morfología y composición de las nanopartículas dependen del pH, temperatura, tipo de sales utilizadas y la proporción de  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  (Lu, Salabas, & Schüth, 2007).

Las principales ventajas de este método son su alto rendimiento, el bajo costo tanto de reactivos como de equipo necesario, el tiempo de síntesis relativamente corto y el sencillo post-procesamiento de las nanopartículas (funcionalización y purificación). Sin embargo, la distribución de tamaños que se obtiene por este método es de alta polidispersidad y la forma de las partículas es irregular. Además, dado que la temperatura de bloqueo y la magnetización de saturación de las nanopartículas dependen en gran medida de su tamaño, el reto experimental en la síntesis de óxidos de hierro por el método de coprecipitación recae en el control sobre el tamaño de las partículas. Una distribución de tamaño angosta requiere de una separación bien definida entre los procesos de nucleación y crecimiento (Laurent et al., 2008). En el caso ideal, cuando la concentración de las especies alcanza la saturación crítica se logra una nucleación rápida para que



posteriormente, con la difusión de los solutos sobre la superficie del cristal, se obtenga un crecimiento lento de las partículas.

Con el fin de obtener partículas estables (que no se agreguen), es una práctica común el añadir agentes estabilizadores como el ácido oleico. El ácido oleico es un ligando muy utilizado para proveer estabilidad coloidal y reducir la reactividad química de la superficie en los nanocristales de óxido de hierro (Willis, Turro, & O'Brien, 2005).

### *3.1.1.2 Descomposición Térmica*

A diferencia del método de coprecipitación, el método de descomposición térmica permite obtener nanopartículas con una distribución de tamaño angosta. Además, las nanopartículas que se obtienen mediante este método tienen forma regular. Existen dos estrategias distintas en la descomposición térmica: introducir un precursor organometálico dentro de una mezcla caliente de solvente y surfactantes o bien, calentar la mezcla y el precursor al mismo tiempo. Diversos grupos de investigadores han demostrado que la descomposición de  $Fe(Cup)_3$ , (Cup=N-nitroso-fenilhidroxilamina)  $Fe(Acac)_3$  (acac=acetilacetona) o la descomposición de  $Fe(CO)_5$  seguida de una oxidación, puede llevar a la síntesis de partículas de óxido de hierro altamente monodispersos (Z. Li, Sun, & Gao, 2004). Para poder lograr esto a menudo es necesario incluir estabilizadores en el proceso como oleilamina o ácido oleico.

Una de las limitantes de este método en el contexto de aplicaciones biomédicas es que los productos obtenidos se dispersan en solventes orgánicos, pero no en

soluciones acuosas. Sin embargo, Li et al. (Zhen Li, Chen, Bao, & Gao, 2004) han reportado un método de descomposición térmica para sintetizar directamente nanopartículas magnéticas solubles en agua, al utilizar moléculas con alta polaridad para modificar a las nanopartículas magnéticas. Mediante este método son capaces de obtener nanopartículas magnéticas de baja polidispersidad en una reacción a altas temperaturas de  $Fe(acac)_3$  en 2-pirrolidona, el cual es un compuesto orgánico que tiene una fuerte polaridad y un punto de ebullición alto que les confiere a los cristales nanomagnéticos estabilidad y solubilidad en agua.

Mediante el proceso de descomposición térmica es posible obtener productos de varias formas. Por ejemplo, Amara et al. (Amara, Grinblat, & Margel, 2012) han sintetizado nanocubos y nanoesferas de magnetita monodispersos mediante una mezcla de ferroceno y polivinilpirrolidona (PVP). Al ajustar la proporción de peso en los dos componentes se puede controlar la forma y tamaño de la magnetita mediante un proceso de un sólo paso.

### *3.1.1.3 Ablación laser*

La ablación láser es otro método que ha sido investigado últimamente para producir nanopartículas magnéticas a gran escala y sin el uso de sustancias costosas. Además, en los métodos de síntesis química se requieren varios pasos, lo cual puede causar impurezas en las muestras y, por lo tanto, afectar sus propiedades magnéticas.

Wang et al. (Wang et al., 2006) han reportado síntesis de maghemita con un alto grado de pureza en un sólo paso utilizando la técnica de ablación laser en fase

gaseosa para un alambre de hierro dentro de una combinación de gases  $O_2$  y  $N_2$  a presión atmosférica. Las muestras obtenidas presentan una forma esférica con diámetros que van desde 5 nm hasta 90 nm. El método de ablación laser también se puede aplicar en fase líquida, resultando en partículas con una distribución de tamaño más angosta. Maneeratanasarn et al. (Maneeratanasarn, Van Khai, Kim, Choi, & Shim, 2013) utilizaron dicha técnica para sintetizar óxidos de hierro a partir de magnetita en distintos solventes orgánicos e inorgánicos. La intensidad del láser es un factor crucial en el tamaño final de la muestra, que presentó una distribución de tamaños en diámetro de 3 nm hasta 50 nm. Aunque un punto a considerar respecto al trabajo del grupo de Maneeratanasarn es que no fueron capaces de obtener magnetita sino hematita y maghemita que no presentan propiedades magnéticas tan deseables como las primeras.

### **3.1.2 Propiedades magnéticas**

Las propiedades de un material magnético macroscópico difieren significativamente cuando se reduce drásticamente su tamaño a la escala de nanómetros. Los materiales ferromagnéticos están compuestos de dominios magnéticos. En contraste, las nanopartículas magnéticas cuentan con un sólo dominio magnético, lo que les permite tener una magnetización uniforme. Esta característica se debe a que existe un volumen crítico en los materiales, debajo del cual les es energéticamente más favorable tener un sólo dominio (Lu et al., 2007), pues a medida que las dimensiones de la partícula se reducen cuesta más energía crear nuevos dominios. Es por ello que una nanopartícula magnética con un diámetro comparable al menor tamaño posible de un dominio magnético consiste de un sólo

dominio magnético. Generalmente, las partículas mono-dominio no sobrepasan los 100 nm (Krishnan, 2010).

Otro fenómeno importante que tiene lugar en las nanopartículas magnéticas es el límite superparamagnético. Las nanopartículas magnéticas usualmente presentan un comportamiento superparamagnético lo que significa que el sistema de los momentos atómicos individuales de cada nanopartícula se comporta como si fuera un sólo momento magnético gigante (ver Figura 3-1) y que la energía necesaria para cambiar la dirección de magnetización de la nanopartícula es comparable con la energía térmica. El momento magnético de los materiales superparamagnéticos en presencia de un campo magnético, tiende a alinearse en la dirección del campo. Cuando el campo es removido no hay remanencia de la magnetización en las partículas. Esto es importante, ya que la remanencia puede causar agregación en las partículas. Este tipo de magnetismo tan especial ocurre con materiales ferromagnéticos o ferrimagnéticos de tamaño nanométrico. El tamaño exacto a partir del cual se presenta este comportamiento depende de cada material, pero regularmente no sobrepasa las decenas de nanómetros. Es importante mencionar que todos los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos presentan un comportamiento paramagnético cuando son calentados por encima de cierta temperatura llamada temperatura de Curie. Sin embargo, el comportamiento superparamagnético es distinto pues en este caso los materiales siempre se encuentran por debajo de dicha temperatura.

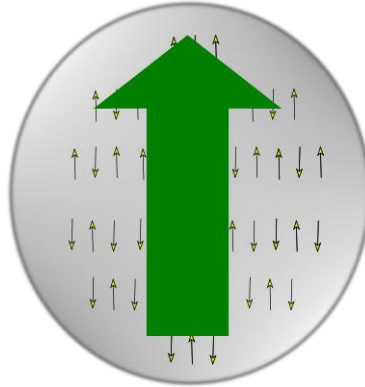


Figura 3-1. En una aproximación simple, el momento magnético total de una nanopartícula puede ser considerado como un momento magnético gigante (flecha grande) compuesto de todos los momentos magnéticos individuales de los átomos que forman la partícula (flechas pequeñas).

Al aplicar un campo magnético alternante, las nanopartículas magnéticas disipan energía, en forma de calor, siempre y cuando la temperatura de Curie no sea sobrepasada. Nanopartículas superparamagnéticas generan calor a través de dos mecanismos diferentes, la relajación de Néel y la relajación Browniana. En la relajación de Néel el momento magnético vence la barrera energética de anisotropía liberando calor. Por su parte, en la relajación Browniana la disipación de calor se debe a la rotación de toda la partícula dentro del líquido portador. Ambos mecanismos están caracterizados por un tiempo de relajación (Ronald E. Rosensweig, 2002) el tiempo de relajación de Néel  $\tau_N$  (Ecuación (3-1)) y el tiempo de relajación de Brown  $\tau_B$  (Ecuación (3-2)).

$$\tau_N = \tau_0 e^{V\kappa/KT} \quad (3-1)$$

donde  $\tau_0$  es el intento de tiempo o intento de periodo,  $\kappa$  es la constante de anisotropía,  $V$  es el volumen magnético,  $K$  la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura absoluta.

$$\tau_B = \frac{4\pi\eta r_h^3}{KT} \quad (3-2)$$

en este caso  $\eta$  denota la viscosidad y  $r_h$  el radio hidrodinámico.

Como podemos notar, ambos procesos de relajación son dependientes del tamaño de las partículas, mientras que  $\tau_N$  crece exponencialmente con el tamaño,  $\tau_B$  lo hace linealmente. Para partículas nanométricas con una distribución de tamaño de alrededor de  $\sim 10$  nm ambos procesos ocurren paralelamente, por lo que es común definir el tiempo de relajación efectivo (Ecuación (3-3)).

$$\frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (3-3)$$

Podemos notar que si se cumple que  $\frac{\tau_N}{\tau_B} \ll 1$  la relajación de Néel predomina, si por el contrario  $\tau_N/\tau_B \gg 1$  la relajación Browniana predomina. En general, la relajación Browniana es más rápida que la de Néel para partículas suficientemente grandes (mayores a 10 nm para el caso de magnetita) (R. E. Rosensweig, 1987).

### 3.1.3 Funcionalización

Interacciones magnéticas y de van der Waals provocan que las nanopartículas se agreguen. Es por ello que es necesario funcionalizar o modificar la superficie de las partículas para evitar la agregación. Generalmente se utilizan sustancias orgánicas que resultan en interacciones iónicas y/o estéricas repulsivas entre las partículas, produciendo una suspensión coloidal estable. Adicionalmente, la funcionalización puede resultar en propiedades químicas y/o biológicas deseables. De esta manera,

se busca mejorar algunas propiedades de la superficie y al mismo tiempo preservar sus propiedades magnéticas.

Una de las sustancias más comunes para funcionalizar nanopartículas magnéticas de óxido de hierro es el ácido oleico, pues éste les brinda una capa protectora que evita la oxidación y al mismo tiempo permite que las nanopartículas sean estables en solventes orgánicos como hexano y tolueno. El ácido oleico aumenta el diámetro de las partículas hasta en 5 nm (Wu, He, & Jiang, 2008). Este tipo de funcionalización con sustancias solubles en aceite son de las más estudiadas y comunes. Ahora lo que se busca es lograr una funcionalización de manera que las partículas puedan dispersarse en agua para que puedan utilizarse en aplicaciones biomédicas.

En la agregación de partículas a escala nano las interacciones energéticas juegan un papel decisivo. Por un lado, se tienen las interacciones dipolares y de van der Waals, ambas atractivas, mientras que por el otro se encuentran las interacciones estéricas, las cuales son repulsivas. Uno de los factores que afecta la fortaleza de dichas interacciones es precisamente la funcionalización de las nanopartículas magnéticas, debido a esto recientemente materiales poliméricos han sido utilizados para favorecer las interacciones estéricas evitando así la agregación de las partículas. Entre los polímeros más utilizados destaca el polietilenglicol (PEG) que brinda a las partículas un aumento en su biocompatibilidad, un incremento en el tiempo de circulación en la sangre y una mayor afinidad a las sustancias acuosas. El PEG es un polímero hidrofílico que ha mostrado excelente biocompatibilidad. Las

partículas funcionalizadas con PEG no son vistas como cuerpos extraños lo que permite aumentar el tiempo de circulación de la sangre.

También el dextrano, quitosano y alginato pueden ser utilizados para estabilizar a las nanoestructuras y mejorar su biocompatibilidad (Hao et al., 2010). Además, otra estrategia de funcionalización interesante tiene como objetivo ligar moléculas a la superficie con el fin de que se puedan adherir selectivamente a otras moléculas o células. De hecho, una manera de lograr alcanzar una alta concentración de medicamentos de quimioterapia es a través de ligandos (Shamay, Paulin, Ashkenasy, & David, 2009) que se adhieren a receptores que se encuentran en grandes concentraciones en las células tumorales.

Es relevante hacer notar que la funcionalización tiene algunos efectos adversos en las propiedades magnéticas de las partículas, pues reduce el momento magnético de los átomos localizados en la superficie y afecta la coercitividad. Esta reducción de las propiedades magnéticas ha sido asociada (Kodama, 1999) a la existencia de una capa inerte, en cuanto a magnetismo se refiere, sobre la superficie de las partículas.

### **3.1.4 Toxicidad**

Las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPION, por sus siglas en inglés) han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso clínico, por lo que representan una gran alternativa en aplicaciones biomédicas. Las SPIONs consisten de un núcleo de magnetita o maghemita recubiertas de polímeros biocompatibles. Sin embargo, a pesar de que materiales como la



maghemita o la magnetita se encuentran naturalmente en el ambiente, existe una preocupación de los riesgos asociados a la exposición de los humanos a estos materiales que debe ser atendida acorde a las distintas aplicaciones.

Es bien conocido que las SPION sin recubrir tienen una solubilidad muy baja lo que puede generar que tiendan a agregarse y por consecuencia impida la libre circulación de la sangre en los vasos sanguíneos durante su aplicación. Debido a esto las partículas de este tipo que se encuentran comercialmente disponibles están recubiertas con distintos materiales que mejoran su biocompatibilidad y evitan su agregación.

Existen estudios que indican que las SPION están asociadas a bajos niveles de toxicidad en el cuerpo humano, incluso se ha argumentado que la toxicidad es dependiente del tamaño de las partículas y que las partículas debajo de los 100 nm de diámetro son más tóxicas que sus versiones micrométricas, sin embargo, si bien esto parece ser cierto para algunos óxidos metálicos como el  $CuO$ , en el caso de óxidos de hierro no se encuentra una clara evidencia en toxicidad entre partículas de diferente tamaño (Karlsson, Gustafsson, Cronholm, & Moller, 2009). La toxicidad de las partículas depende de varios factores, entre ellos su recubrimiento superficial. Por ejemplo, Berry et al (Berry, Wells, Charles, & Curtis, 2003) han demostrado que las nanopartículas de óxido de hierro cubiertas con dextrano inducen muerte celular y reducen la proliferación celular de manera similar a las SPION sin recubrir, por otro lado, con un recubrimiento de albumina a pesar de que aún existe en cierto grado muerte celular también se induce su proliferación.

En cuanto al nivel de toxicidad, el consenso general entre los especialistas es que la toxicidad es altamente dependiente de la dosis administrada y estudios *in vitro* han demostrado que las partículas de óxido de hierro muestran baja o nula toxicidad en dosis menores a  $100 \mu\text{g/ml}$  (Karlsson, Cronholm, Gustafsson, & Moller, 2008). Es importante considerar este hecho, pues en las estrategias de liberación de fármaco se busca concentrar el fármaco en el lugar de acción lo que conlleva una acumulación excesiva de iones libres de  $Fe$ , esto a su vez puede causar lesiones, procesos inflamatorios e incluso dañar el ADN. El exceso de hierro se ha asociado a un incremento en el riesgo de cáncer, en particular a cáncer de hígado. Por esta razón es crucial considerar la dosis que es apropiada administrar en aplicaciones *in vivo*.

Otro punto a tomar en cuenta es el estado de oxidación, pues la magnetita carece de estabilidad y puede sufrir oxidación (de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ ) y convertirse a maghemita. Los iones de  $Fe^{3+}$  son más potentes para inducir daño al ADN que los de  $Fe^{2+}$ . A pesar de que se considera que recubrir las nanopartículas resulta en menos sitios oxidativos es necesario brindar a las SPION con una mayor estabilidad química.

### **3.2 Polimerización por plasma**

En la superficie ocurren la mayor parte de las reacciones en las entidades biológicas, por lo tanto, la modificación de la superficie de un material es de suma importancia. En ese sentido, existen diversas estrategias para modificar la superficie, pero todas comparten un objetivo en común: la introducción de grupos funcionales.

Las estrategias de modificación de la superficie basadas en tratamientos con plasma son atractivas para la creación de superficies que están diseñadas para entrar en contacto con ambientes biológicos. Adicionalmente, este tipo de estrategia ofrece menores tiempos de tratamiento comparado con otros métodos. Es por ello que desde hace más de 30 años la polimerización por plasma es un campo de investigación establecido.

### **3.2.1 Conceptos y principios básicos**

El plasma es un gas parcialmente ionizado que consiste de una mezcla de electrones libres, iones, radicales, átomos y moléculas. Asimismo, el plasma es el estado de la materia más abundante en la naturaleza. Las estrellas están compuestas de plasma, sin embargo, éste es un plasma de altas temperaturas o de equilibrio (la temperatura de todas las especies es la misma) y desde luego este tipo de plasma es diferente al plasma que se utiliza para la modificación de la superficie en el laboratorio, pues se requieren temperaturas excesivamente altas para llegar al plasma de equilibrio y por lo tanto es destructivo para los materiales. En el resto del capítulo cuando me refiera a plasma será exclusivamente al plasma de bajas temperaturas o de no equilibrio. En el plasma de no equilibrio las distintas especies que lo componen tienen temperaturas distintas, mientras que los electrones tienen muy altas temperaturas, las especies con mayor masa (átomos o moléculas) se mantienen a temperaturas mucho más bajas debido a que intercambian su energía por medio de colisiones con el resto del gas.

Generalmente, los plasmas no térmicos son creados al aplicar un campo eléctrico a un gas. El campo eléctrico aplicado es capaz de acelerar los electrones libres en un gas neutro que adquieren suficiente energía para ionizar sus átomos y moléculas (Kortshagen et al., 2016). Usualmente, la manera de aplicar el campo eléctrico es dentro de un reactor con dos electrodos internos de metal posicionados paralelamente, aunque también existen reactores con electrodos externos e incluso sin electrodos que aceleran los electrones por medio de altas frecuencias. A pesar de las distintas variaciones en los tipos de reactores, es posible identificar sus componentes indispensables: una vasija o contenedor, un suministro de energía eléctrica, un sistema para inyectar el gas, un artefacto para acoplar el campo eléctrico al plasma (antenas o electrodos) y un lugar o material sobre el cual depositar la película de polímero. Comúnmente, la modificación de la superficie por medio de la polimerización por plasma se lleva a cabo a bajas presiones pues de esta manera es posible tener descargas eléctricas más estables y se tiene mayor control sobre las reacciones en el plasma.

El plasma es un ambiente altamente reactivo y la polimerización por plasma es un proceso que involucra reacciones entre las diferentes especies del plasma y la superficie del material. En la polimerización por plasma un monómero orgánico es convertido en fragmentos reactivos que van depositándose sobre un substrato con el objetivo de añadirle cierta funcionalidad química. Mientras el material es depositado ocurren varios procesos: la ionización de los gases, la fragmentación de partículas y la recombinación de partículas. La polimerización por plasma es la técnica principal para fabricar películas delgadas de polímero de muchos gases,

pero no todos los gases generan un recubrimiento, sino que algunos únicamente generan radicales libres sobre la superficie del material.

El tratamiento por plasma tiene como consecuencias la introducción de grupos funcionales, un incremento en la afinidad con el agua y un aumento de la dureza del material (Desmet et al., 2009). Las propiedades físicas y químicas del recubrimiento por plasma dependen de varios factores: el tipo de monómero, su tasa de flujo, la posición del sustrato, la presión, el tiempo de la reacción y la potencia de los electrodos. En específico, cuando todos los demás parámetros se mantienen constantes la tasa de deposición del recubrimiento incrementa con la potencia hasta llegar a potencias altas en las que se vuelve independiente de la misma (Biederman, 1987).

Las películas de recubrimiento creadas mediante esta técnica brindan estabilidad mecánica y térmica. Sin embargo, los polímeros formados por la técnica de polimerización por plasma son amorfos pues no tienen las mismas unidades repetitivas ni estructura que la de los polímeros convencionales, de hecho, es común que presenten entrecruzamiento y en muchos casos radicales libres son atrapados dentro de esta red. Una de las grandes limitantes de las técnicas de tratamiento por plasma es la gran diversidad de grupos funcionales que son creados como consecuencia de las múltiples reacciones que ocurren en el plasma.

Otro factor importante y que a menudo es pasado por alto es el *envejecimiento*, pues la química de la superficie del material se modifica con el paso del tiempo. El *envejecimiento* es consecuencia de dos procesos: La oxidación post-plasma y la

adaptación de la superficie. La oxidación post-plasma es resultado de la reacción entre los radicales remanentes que quedan dentro de la red de entrecruzamientos y el oxígeno de la atmosfera. Por su parte la adaptación de la superficie es resultado del movimiento de deslizamiento que tienen algunas cadenas de polímeros desde la superficie hacia el centro del material (Siow, Britcher, Kumar, & Griesser, 2006). El ambiente en el que se almacenan las muestras es fundamental en el proceso de *envejecimiento*, pues distintas condiciones de aire, humedad o temperatura afectan dicho proceso.

### **3.2.2 Aplicaciones biomédicas**

Las películas creadas mediante la polimerización por plasma presentan varias ventajas: el recubrimiento se logra rápidamente, brindan propiedades de barrera y protección, costos bajos de los monómeros, variedad de materiales que pueden utilizarse, biocompatibilidad, entre otras. Además, es posible proporcionar funcionalidad a la superficie de un material por medio del recubrimiento por plasma. Por ejemplo, es posible tener recubrimientos antibacteriales que promuevan el crecimiento celular o sensibles a la temperatura que sirvan como barreras para controlar la liberación de fármacos. Todas estas características hacen de los tratamientos por plasma particularmente atractivos para diversas aplicaciones biomédicas. En los párrafos siguientes abordaré algunas de las aplicaciones biomédicas más destacadas.

### *3.2.2.1 Liberación controlada*

Es importante entender la interacción entre el sistema de liberación y la barrera que lo contiene para poder tener un control sobre la administración de la sustancia activa. En los sistemas porosos de liberación de fármaco, el proceso de difusión juega un papel principal. En la difusión la sustancia activa atraviesa de manera gradual la barrera, sin embargo, en aplicaciones en las que se busca contar con un flujo de liberación estable un problema común es la ráfaga inicial de liberación, donde se libera una cantidad considerable de sustancia. En algunos sistemas de liberación como las magnetomicelas o las magnetosomas las moléculas de fármaco escapan vía difusión antes de que el sistema llegue al sitio de acción. Un recubrimiento de la superficie por medio de un tratamiento por plasma permite contar con una barrera de difusión en este tipo de sistemas.

La liberación de fármaco en materiales porosos depende del diámetro de los poros. Simovic et al. (Simovic, Losic, & Vasilev, 2010) han presentado un método basado en la aplicación de un polímero por plasma, en el cual se modifica la estructura de los poros. Básicamente, un material poroso es cargado con fármaco para posteriormente aplicar una película de polímero por plasma, el recubrimiento puede ser de distinto grosor lo que permite tener un control sobre el diámetro de los poros y, en consecuencia, un control sobre la tasa de liberación. Además, la película de polímero tiene la ventaja de ayudar a las partículas en las aplicaciones biomédicas al mejorar su afinidad al agua.

El perfil de liberación de fármaco de un polímero depende en gran medida de las propiedades de su superficie y de la movilidad de sus cadenas. Como lo mencione anteriormente, el tratamiento por plasma introduce una red entrecruzada del polímero, esta estructura causa que la movilidad de las cadenas se restrinja y por ende la liberación de la sustancia activa disminuya (Yoshida, Hagiwara, Hasebe, & Hotta, 2013).

### *3.2.2.2 Ingeniería de tejidos*

La ingeniería de tejidos busca desarrollar materiales biocompatibles con el fin de reparar o reemplazar un tejido u órgano, para lograrlo es necesario el uso de andamios que permitan el crecimiento de cultivos celulares y guíen su crecimiento. La respuesta y crecimiento de las células dentro del andamio depende de las propiedades físicas y químicas de este último. El tratamiento por plasma del material polimérico utilizado como andamio puede incrementar su afinidad celular y permitir así el crecimiento adecuado del cultivo celular.

Barry et al. (Barry, Silva, Shakesheff, Howdle, & Alexander, 2005) investigaron el efecto de una película polimérica depositada por plasma recubriendo un andamio tridimensional poroso sobre la adhesión y proliferación celular. Ellos estudiaron el crecimiento de un cultivo celular sobre andamios de poli (D, L ácido láctico) y concluyeron que el andamio recubierto por plasma presenta una mayor actividad celular que el del andamio virgen. Lo que representa que esta técnica puede mejorar la respuesta celular a biomateriales sintéticos.



### 3.2.2.3 *Recubrimientos anti-incrustantes*

Un problema común con muchos biomateriales se presenta cuando entran en contacto con los fluidos fisiológicos, pues ocurren adhesiones proteínicas y celulares indeseables. La polimerización por plasma permite modificar la actividad química de la superficie y nos brinda la posibilidad de evitar dichos eventos.

El polietilenglicol (PEG) o PEO es reconocido por evitar la adsorción celular y la adhesión celular. A pesar de que existe una gran variedad de maneras de añadir una capa de PEO a la superficie de un material, la polimerización por plasma ofrece la posibilidad de recubrir una gran cantidad de sustratos de manera rápida. Brétagnol et al. (Bretagnol et al., 2006) han realizado exitosos recubrimientos de PEO aplicando polimerización por plasma con radio frecuencia. Similarmente, utilizando radio frecuencia López et al (Lopez et al., 1992) indujeron la polimerización de tetraetilenglicol dimetileter mostrando una alta resistencia a la adsorción de proteínas y a la adhesión celular.

La polimerización por plasma es una técnica que ha tomado relevancia al ser capaz de generar superficies anti-incrustaciones que pueden ser aprovechadas prácticamente en cualquier ámbito de la nanomedicina. Aunado a esto, la simplicidad inherente del proceso de polimerización por plasma permite prever una gran cantidad de investigación al respecto de estos recubrimientos tan útiles.

## **4 Nanopartículas magnéticas modificadas mediante polimerización por plasma**

### **4.1 Introducción**

Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro cuentan con una superficie grande en relación a su volumen y, consecuentemente, tienen energías superficiales que tienden a agregar a las partículas con el fin de minimizar dicha energía (Mahdavi et al., 2013). Además, las nanopartículas magnéticas sin recubrimiento son propensas a oxidarse, lo cual generalmente resulta en una pérdida de sus propiedades magnéticas. Por las razones anteriormente mencionadas es importante contar con un recubrimiento superficial apropiado y desarrollar estrategias efectivas con el objetivo de brindar estabilidad a las partículas magnéticas

#### **4.1.1 Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas**

Las nanopartículas magnéticas poseen características apropiadas para diversas aplicaciones biomédicas. Adicionalmente, tienen un tamaño adecuado en relación a distintas entidades biológica, que van desde el tamaño de un gen (de 10 a 100

nm de largo) al de una célula (de 10 a 100  $\mu\text{m}$ ). A continuación, abordaré algunas de las aplicaciones más destacadas para estos materiales.

#### *4.1.1.1 Separación magnética*

La separación magnética como su nombre lo indica es un proceso que busca separar materiales magnéticos mediante el uso de imanes, incluso es posible separar moléculas biológicas de su ambiente al etiquetar a las entidades biológicas deseadas con las partículas magnéticas para posteriormente removerlas con la aplicación de un campo magnético. Esta técnica puede ser utilizada en diversas aplicaciones como remover células de tumores, separación de parásitos (que posean propiedades magnéticas), aislar células eucariotas de fluidos como la sangre, separación de proteínas o conteo de células. Por ejemplo, partículas magnéticas con agentes inmunoespecíficos han sido ligados con células rojas de la sangre (Levy, Sahoo, Kim, Bergey, & Prasad, 2002) o células tumorales de pulmón (Kularatne et al., 2002).

Una manera de lograr la separación magnética es recubrir a las nanopartículas magnéticas con materiales que interactúen con las entidades en cuestión y después formar enlaces covalentes entre el recubrimiento y las moléculas. Sin embargo, un inconveniente asociado a este método es el hecho de que posiblemente el recubrimiento lleve a una absorción no específica de otras sustancias, lo cual reduce su selectividad, un factor crucial para las aplicaciones anteriormente mencionadas (Gu, Xu, Xu, & Xu, 2006).

Los materiales etiquetados se pueden separar del fluido que los contiene por medio de un gradiente de campo magnético colocado de tal manera que los inmovilice, mientras que el resto del fluido continúe su camino atravesando dicha región. El diseño más simple del separador magnético involucra la aplicación de un imán permanente en la pared de un tubo de prueba seguido de una remoción del sobrenadante (Pankhurst, Connolly, Jones, & Dobson, 2003), aunque la desventaja de este método es que toma demasiado tiempo antes de que se pueda obtener una cantidad considerable de material etiquetado.

#### *4.1.1.2 Hipertermia*

El tratamiento de hipertermia es un procedimiento terapéutico contra el cáncer utilizado para elevar la temperatura de ciertas células dañadas con el fin de modificar su actividad celular. El calor puede llegar a ser citotóxico para las células mientras que al mismo tiempo inhibe la reparación de las células cuando son afectadas por otro tipo de tratamientos, en este sentido la hipertermia intensifica los efectos de las cirugías, radio o quimioterapias clásicas. Existen muchas técnicas por las cuales se puede generar calor en el área deseada que van desde las más rudimentarias como el uso de toallas calientes o saunas, hasta las más modernas como el uso microondas, ultrasonido o hipertermia magnética.

El tratamiento de hipertermia magnético depende del calor disipado por las partículas magnéticas bajo la aplicación de un campo magnético alternante. El campo magnético debe tener la suficiente frecuencia y magnitud para que el calor generado por las partículas magnéticas exceda ligeramente los 42° C. Además, el

campo debe de tener una duración de por lo menos 30 minutos para lograr debilitar a las células (Pankhurst et al., 2003). Mientras otras técnicas se vuelven problemáticas por su falta de especificidad afectando tejido sano, la ventaja de la hipertermia magnética es que permite restringir la zona de calentamiento al área del tumor.

En general, la tasa de absorción específica (SAR por sus siglas en inglés) es el parámetro por el cual se mide la efectividad de las nanopartículas magnéticas para generar calor. Gonzales-Weimuller et al. (Gonzales-Weimuller, Zeisberger, & Krishnan, 2009) advierten una clara dependencia entre el SAR y el tamaño de las partículas. Encontraron que las tasas de calentamiento más altas se obtienen reduciendo la polidispersidad de las partículas y aumentando ligeramente el tamaño de las partículas, reportan que aumentando el tamaño de las partículas poco más de 1 nm de diámetro (de 11.2 nm a 12.5 nm) se incrementó substancialmente la tasa de calentamiento. Éste punto es fundamental, ya que la otra alternativa para generar el calor necesario para dañar a las células es aumentando la magnitud del campo magnético alternante, pero un campo demasiado alto puede ser dañino para el organismo. Un control riguroso de la temperatura que disipan las partículas depende en gran medida de su tamaño y forma, por lo tanto, el método de síntesis de las partículas magnéticas se vuelve fundamental.

#### *4.1.1.3 Imagen por resonancia magnética*

La Imagen por resonancia magnética (MRI por sus siglas en inglés) es una técnica no invasiva utilizada en tratamientos clínicos para producir imágenes de alta calidad

del interior del cuerpo humano. El objetivo es visualizar procesos biológicos dentro de seres vivos para detectar cualquier cambio en los mismos sin la necesidad de realizar procedimientos invasivos. La MRI está basada en los principios de la resonancia magnética nuclear, es decir, en la medición de los tiempos de relajación de los protones después de que han sido excitados por un pulso de radio frecuencia (Schlady, Schneider, Schild, & Tremel, 2011).

Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro son materiales de contraste utilizados en MRI que cuentan con dos componentes: el núcleo magnético y las moléculas en la superficie para asegurar su integridad y la afinidad a ciertas entidades biológicas. En general, los materiales superparamagnéticos son los agentes de contraste más efectivos porque tienen mayor interacción con los núcleos de hidrógeno y afectan sus tiempos de relajación.

La tecnología de las partículas magnéticas ha demostrado la posibilidad de combinar el diagnóstico con la terapia. Existen diversos métodos que sugieren como combinar la liberación de fármaco con el diagnóstico. Nasongkla et al. (Nasongkla et al., 2006) han desarrollado micelas poliméricas con capacidad de liberar fármaco de manera controlada y además obtener imágenes por resonancia magnéticas.

## **4.2 Experimental**

### **4.2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas**

Para sintetizar las nanopartículas magnéticas utilizadas a lo largo de este trabajo elegimos el método de coprecipitación por su alto rendimiento, bajo costo y tiempo

de síntesis relativamente corto. Por su parte, el ácido oleico se utilizó para prevenir la agregación de las nanopartículas magnéticas y generar una capa protectora uniforme. El procedimiento de la polimerización por plasma resulta ser conveniente pues permite modificar las propiedades superficiales sin afectar las propiedades de bulto originales.

A continuación, se describen las condiciones y reactivos utilizados en cada etapa del proceso de síntesis de las nanopartículas magnéticas y su posterior funcionalización.

El procedimiento de la síntesis de las nanopartículas magnéticas consiste en combinar soluciones de cloruro de hierro (II) ( $FeCl_2$ ) hexahidratado (Sigma Aldrich, 98 %) 0.1 M y cloruro de hierro (III) ( $FeCl_3$ ) tetrahidratado (Sigma Aldrich, 99 %) 0.2 M, en volúmenes iguales de agua desgasificada (100 ml en cada solución). Posteriormente, la solución es agitada mediante unas aspas mecánicas y calentada hasta a 70 °C. En este punto se añade 30 ml de hidróxido de amonio (Monterrey, 28%-30%) hasta llegar a un pH de 8. Finalmente, la reacción se calienta a 80 °C y se mantiene durante 1 h monitoreando constantemente el pH y añadiendo hidróxido de amonio conforme sea necesario para mantener el pH en 8.

Con el objetivo de funcionalizar a las partículas magnéticas, al terminar la reacción se añade una solución de 7 g de ácido oleico (Sigma Aldrich, 90 %) con 80 ml de hexano (Sigma Aldrich), después se centrifuga la nueva solución por 10 minutos a 3000 rpm y se decanta usando un imán, luego se añade 160 ml de etanol (Sigma Aldrich) para remover el exceso de hexano y nuevamente se centrifuga bajo las

mismas condiciones y se decantan. Se dejan secar las NPM magnéticas dentro de una campana de extracción por cuatro días para evaporar el hexano remanente.

#### **4.2.2 Modificación superficial mediante polimerización por plasma**

Por otra parte, la polimerización por plasma fue llevada a cabo bajo un vacío moderado (0.6 bar) en un reactor de vidrio de tipo tubular. En los extremos del tubo de vidrio están acoplados dos electrodos planos de acero inoxidable (cátodo y ánodo) separados a una distancia de 20 cm. Cada electrodo está sujeto a una brida la cual cuenta con dos puertos de entrada al reactor, en uno se conecta una bomba de vacío y en el otro un medidor de presión. Los electrodos se conectan a un generador de potencia (Dressler – RF Power Generator) que mantiene el plasma al generar una diferencia de potencia, en nuestro caso utilizamos una diferencia de 5 watts.

El reactor es conectado a un sistema de vacío que consta de una bomba mecánica y un condensador enfriado por nitrógeno líquido para condensar los vapores que se generan durante la reacción. Por otro lado, el monómero se encuentra conectado a una válvula la cual regulara el flujo del vapor hacia el reactor.

#### **4.2.3 Interacción con células**

La presencia de grupos funcionales es un factor crucial para que una célula se adhiera a la superficie de un biomaterial (Desmet et al., 2009). Con el objetivo de agregar grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas y caracterizar su



interacción con células, las recubrimos con distintos polímeros por el método de polimerización por plasma.

Se prepararon 5 muestras de nanopartículas. Las dos primeras son controles: el control 1 son las nanopartículas con ácido oleico, y el control 2 son nanopartículas con ácido oleico que se metieron al reactor de polimerización sin agregar monómero. Las otras tres muestras son nanopartículas recubiertas por polimerización por plasma utilizando los monómeros: pirrol, alilamina y acetona.

Se analizaron las muestras por espectroscopia infrarrojo (IR) utilizando el instrumento de reflectancia total atenuada (ATR) para conocer la composición química de la superficie de las partículas. Además, las nanopartículas se pondrán en contacto con células beta para caracterizar su interacción.

#### **4.2.4 Técnicas de caracterización**

Las técnicas de caracterización nos sirven para determinar la estructura y composición de un material. Dependiendo de la naturaleza del material a investigar algunas técnicas son más adecuadas que otras. En las siguientes secciones discutiré brevemente los principios y usos de las técnicas utilizadas a lo largo de este trabajo para determinar las distintas características de los materiales.

##### *4.2.4.1 Dispersión de luz dinámica*

La dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés), también conocida como espectroscopia de correlación de fotones, es una técnica comúnmente utilizada para determinar la distribución de tamaños de partículas en suspensiones

coloidales. En el DLS un haz de luz monocromático es enfocado hacia una muestra en suspensión coloidal y la luz dispersada por la muestra es recolectada por un fotomultiplicador colocado a un ángulo  $\theta$  respecto al haz transmitido.

Las partículas suspendidas en un solvente experimentan movimiento browniano, debido a este movimiento las posiciones relativas de las partículas varían constantemente. El DLS está basado en el hecho de que la intensidad de la luz dispersada cuando atraviesa la suspensión coloidal depende de las posiciones de las partículas. Las partículas pequeñas se mueven más rápido y aceleran la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas grandes disminuyen la variación de la intensidad (Cuadros-Moreno, 2014). Es por ello que en las fluctuaciones de la intensidad se encuentra información implícita acerca de la estructura de las moléculas presentes en la muestra.

Es posible obtener información acerca del tamaño de las partículas relacionando las fluctuaciones de la intensidad con el coeficiente de difusión  $D$  por medio de la función de correlación de intensidad. El coeficiente  $D$  se obtiene al ajustar la curva de correlación a una función decaimiento exponencial. Posteriormente haciendo uso de la ecuación de Stokes-Einstein (4.1) es posible obtener el radio de las partículas

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R} \quad (4.1)$$

donde  $K_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura,  $\eta$  la viscosidad y  $R$  el radio hidrodinámico. El radio calculado a través de las propiedades de difusión es un radio aparente del tamaño dinámico de la partícula, es decir, el radio

hidrodinámico. Por último, cabe mencionar que la técnica de dispersión de luz dinámica permite medir tamaños de hasta 1 nm de diámetro.

Para calcular la distribución de tamaños de las nanopartículas magnéticas, éstas fueron suspendidas en tolueno y colocadas de tal manera que formarían un ángulo recto con el haz incidente, el tiempo de medición de las fluctuaciones fue de un minuto.

#### *4.2.4.2 Espectroscopia de fluorescencia*

En la espectroscopia de fluorescencia moléculas de la muestra son excitadas para producir un espectro de emisión que provee información para su análisis cualitativo y cuantitativo. En este caso las moléculas después de absorber un fotón emiten luz, pero de mayor longitud de onda y con tiempos de vida cortos ( $< 10^{-5}s$ ). La energía del haz de excitación sólo puede ser absorbida cuando la molécula se mueve de un estado inferior a otro de superior energía. El posterior retorno de la molécula a su nivel de energía fundamental se produce a través de la emisión de luz. Sin embargo, la luz emitida tendrá una mayor longitud de onda (o lo que es lo mismo una menor energía) ya que parte de la energía absorbida se transforma en energía de vibración y colisiones con otras moléculas.

La molécula excitada no siempre emite fluorescencia. Los factores que afectan la fluorescencia de una muestra son su estructura molecular y su ambiente químico (Skoog, Holler, & Crouch, 1998). Además, también determinan la intensidad de la luz emitida. La fluorescencia es emitida de la muestra en todas las direcciones, pero

se observa de manera más conveniente en ángulos rectos respecto al haz de excitación.

Calculamos el espectro de fluorescencia de las nanopartículas magnéticas recubiertas con pirrol. Con una longitud de onda del haz de excitación de 460 nm, mientras que la longitud de onda de emisión de 260 nm.

#### 4.2.4.3 *Espectroscopia infrarrojo*

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se basa en la interacción entre la radiación infrarroja y un material. Algunas moléculas de un material pueden absorber la luz infrarroja cuando sus modos de vibración son compatibles con la frecuencia de la luz emitida, debido a esto la espectroscopia de infrarrojo permite la identificación de grupos funcionales de un compuesto. La técnica de FTIR emite un haz que contiene muchas frecuencias de luz y analiza la absorción del material a cada frecuencia. Es necesario aplicar la transformada de Fourier para descomponer la señal obtenida en las distintas frecuencias emitidas y de esta manera poder obtener un espectro. El espectro de FTIR muestra los picos correspondientes en los cuales la radiación es absorbida (Xu Zhi-Kang, Xiao-Jung, & Ling-Shu, 2009)

En el caso de muestras sólidas, para la preparación del material es necesario diluir la muestra con bromuro de potasio (KBr), un material que es *transparente* al rango de infrarrojo, y posteriormente presionar la solución hasta tener una pastilla. Sin embargo, los accesorios de reflexión total atenuada (ATR) evitan la necesidad de utilizar las pastillas de bromuro de potasio en materiales sólidos o líquidos. Por lo

tanto, la técnica de ATR-FTIR nos permite analizar materiales de todo tipo de dureza sin una preparación de la muestra.

La espectroscopia de ATR está basada en el fenómeno de reflexión interna total. Un haz de radiación atraviesa un cristal (el diamante es el mejor cristal por su alto índice de refracción) y comienza a tener una reflexión interna total, la reflexión interna total crea una onda evanescente que se extiende a la muestra, que siempre debe estar en contacto íntimo con el cristal (en muchos equipos se utiliza un brazo que ejerce presión sobre la muestra para mantener un buen contacto). El análisis de ATR-FTIR está basado en la interacción entre la onda evanescente y la muestra. Parte de la radiación de la onda evanescente es absorbida por la muestra lo que produce un espectro de absorción.

#### *4.2.4.4 Microscopia electrónica de transmisión*

Debido a las limitaciones de los microscopios ópticos en cuanto a magnificación y resolución, Ernst Ruska y Max Knoll desarrollaron el primer microscopio electrónico. La microscopía electrónica es una técnica utilizada para obtener imágenes de alta resolución. La alta resolución del microscopio electrónico proviene de utilizar electrones como la fuente de radiación para *iluminar* la muestra. Por medio de esta técnica es posible obtener información acerca de la topografía y morfología de una muestra (Voutou, Stefanaki, & Giannakopoulos, 2008).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica de caracterización en la cual electrones altamente energéticos atraviesan una muestra para posteriormente ser enfocados por una serie de lentes magnéticos. En el microscopio

electrónico de transmisión podemos ver la estructura de la muestra e incluso observar sus planos atómicos. A diferencia del microscopio electrónico de barrido (SEM), la preparación de la muestra es complicada pues es necesario obtener muestras muy delgadas.

En el TEM una parte de los electrones son transmitidos sin que ocurra ninguna interacción, la imagen en áreas de la muestra que son más gruesas se verá más oscura pues tendrán menos electrones que puedan llegar a transmitirse, por el contrario, las zonas de la muestra más angostas parecerán más iluminadas (Voutou et al., 2008). La parte restante de los electrones interactúa con la muestra y los electrones son dispersados por el potencial electrostático de los elementos de la muestra. La dispersión puede ser tanto elástica como inelásticamente.

Por medio de los electrones dispersados es posible obtener patrones de difracción de la muestra. La difracción es una parte fundamental del TEM, especialmente para nanomateriales en los cuales la cristalinidad es un aspecto crucial. Adicionalmente, el TEM puede ser útil para estudiar el crecimiento de capas en el material, su composición e incluso defectos que pueda presentar (Williams & Carter, 2009). Finalmente, un punto importante a considerar es que el bombardeo de electrones puede dañar a la muestra, especialmente a materiales orgánicos, por lo que es necesario considerar este daño al momento de interpretar la imagen obtenida por TEM.

### 4.3 Resultados

Las nanopartículas magnéticas sintetizadas por el método de coprecipitación fueron caracterizadas por microscopia electrónica, a partir de ahí se obtuvo un histograma de los tamaños de las partículas y posteriormente se le ajusto una curva de distribución log-normal, como se muestra en la Figura 4-1. Figura 4-1. Imagen de TEM de las nanopartículas magnéticas sintetizadas (izquierda) e histograma de las partículas magnéticas ajustadas a una curva de distribución log-normal con un promedio de  $d_0 = 9 \text{ nm}$  y varianza  $\ln \sigma = 0.22$ .

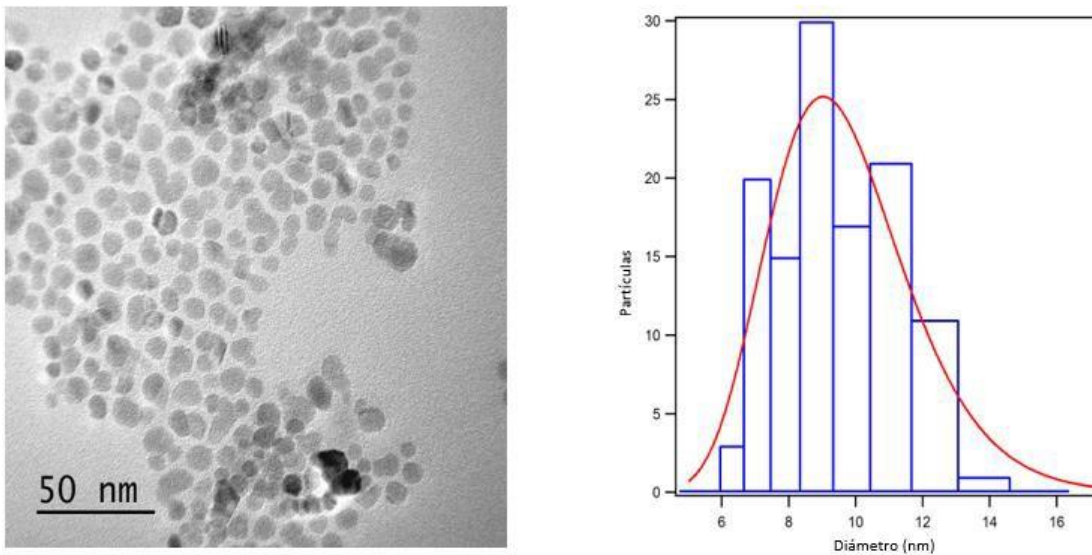


Figura 4-1. Imagen de TEM de las nanopartículas magnéticas sintetizadas (izquierda) e histograma de las partículas magnéticas ajustadas a una curva de distribución log-normal con un promedio de  $d_0 = 9 \text{ nm}$  y varianza  $\ln \sigma = 0.22$ .

En la Figura 4-2 se observa la caracterización por dispersión de luz dinámica de las nanopartículas magnéticas.

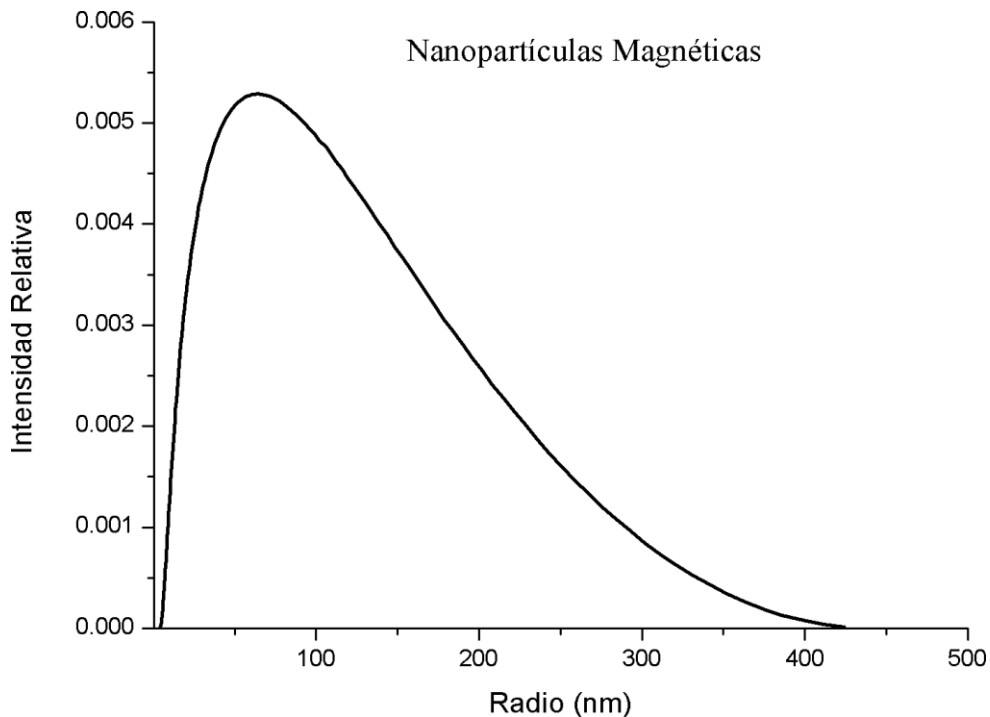
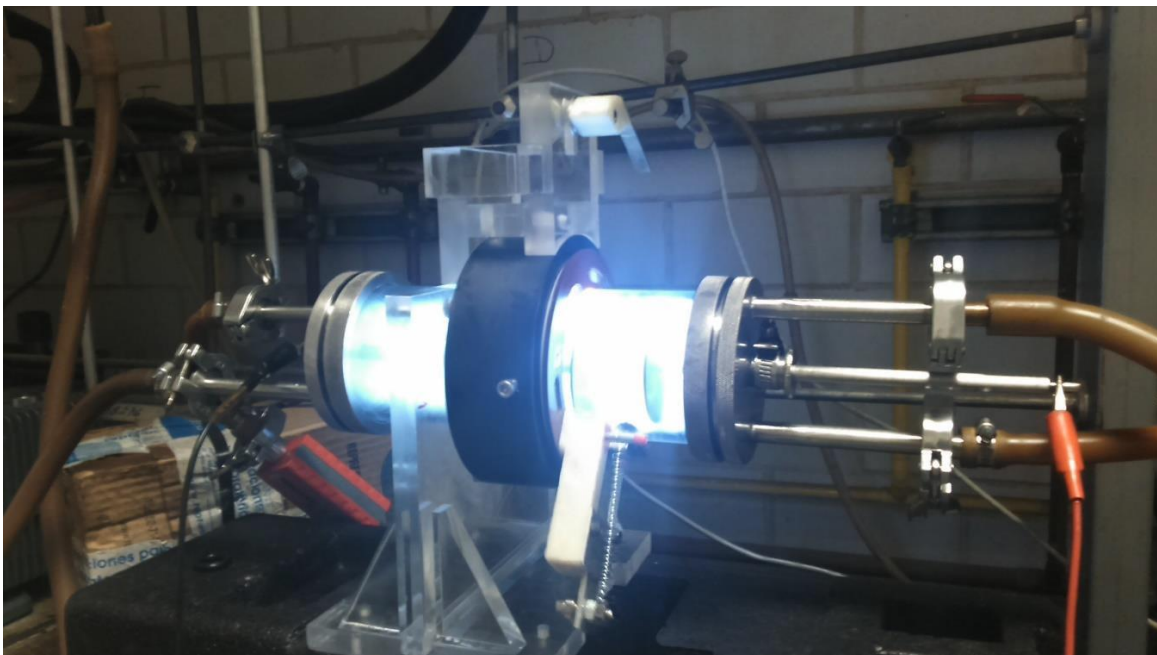


Figura 4-2. Distribución de tamaños de nanopartículas magnéticas obtenidas por dispersión de luz dinámica.

Como lo mencione en el objetivo del trabajo, como un primer paso demostramos que las partículas magnéticas pueden ser recubiertas por el método de polimerización por plasma con pirrol. Uno de los retos al recubrir las nanopartículas magnéticas por el método de polimerización por plasma es lograr recubrir uniformemente a las nanopartículas. En trabajos anteriores han utilizado un agitador magnético dentro del reactor para agitar a las partículas. Sin embargo, en el caso de las nanopartículas magnéticas un agitador magnético no serviría, pues atraería a las partículas y no se podrían recubrir uniformemente. Por lo tanto, aprovechando la naturaleza magnética de las partículas colocamos un imán al exterior del reactor



para poder moverlas, primero de forma manual y después con la estructura<sup>1</sup> que se muestra en la Figura 4-3.



*Figura 4-3. Foto de la estructura utilizada para polimerizar por plasma a las nanopartículas magnéticas de manera uniforme. La estructura blanca que se observa junto al resorte se mueve rodeando el reactor y por medio de un imán atrae a las partículas hasta el punto más alto donde las suelta.*

Las nanopartículas magnéticas recubiertas fueron caracterizadas por TEM (Figura 4-4) y espectroscopia de fluorescencia (Figura 4-5). Los resultados se muestran a continuación

---

<sup>1</sup> Estructura creada por el Dr. Raúl Montiel

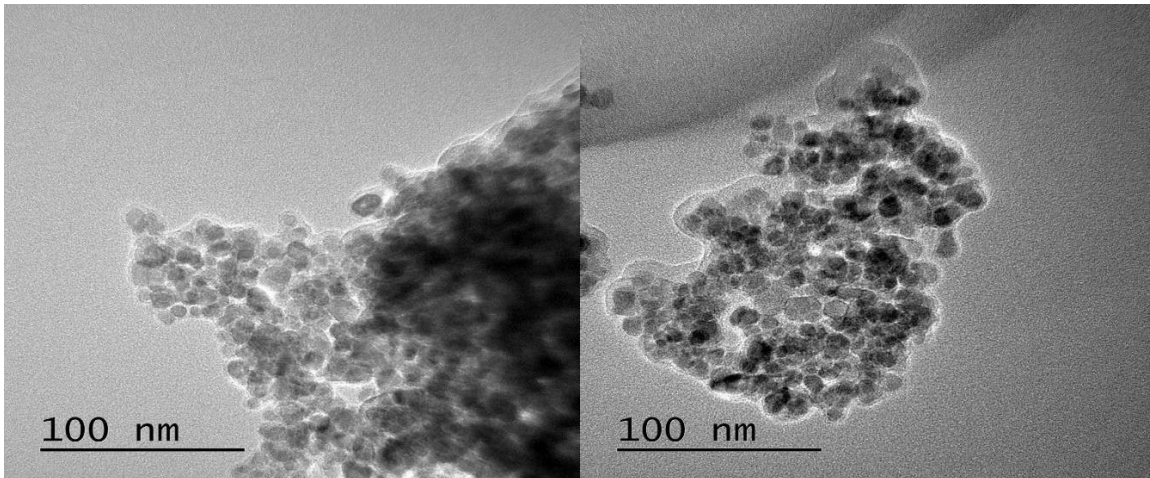


Figura 4-4. Imágenes de TEM de nanopartículas magnéticas recubiertas con pirrol, donde se observa derretimiento del recubrimiento de pirrol.

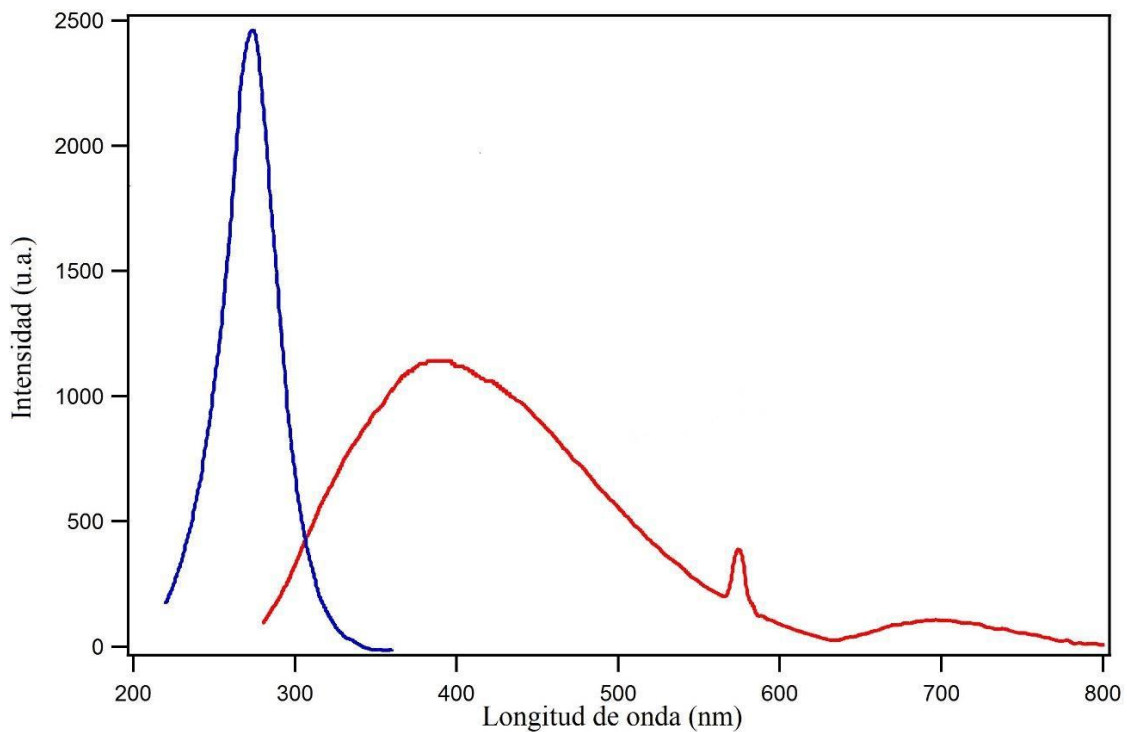


Figura 4-5. Espectro de fluorescencia de las partículas magnéticas cubiertas con pirrol. La longitud de excitación es de 460 nm (curva azul), mientras que la longitud de emisión es de 260 nm (curva roja).

Además del pirrol, otros lotes de nanopartículas magnéticas fueron recubiertas con otros dos monómeros: alilamina y acetona. La caracterización de las muestras con ATR-FTIR se muestra en la Figura 4-6, donde se observa una diferencia en la composición química en cada una de las muestras. Las muestras recubiertas con

cada uno de los polímeros y las partículas que únicamente tenían ácido oleico fueron puestas en contacto con células beta para observar su interacción (Figura 4-7 y Figura 4-8). Utilizando un imán es notorio que es posible mover las células adyacentes a las nanopartículas magnéticas.

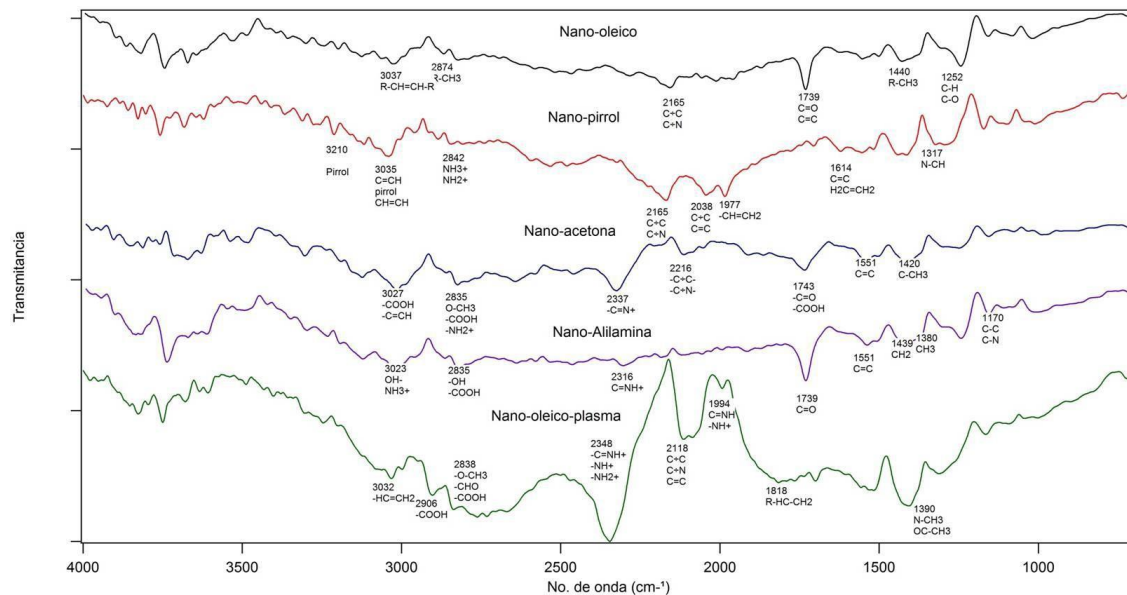


Figura 4-6. El FTIR de las nanopartículas magnéticas recubiertas con pirrol, alilamina y acetona. Además, se incluye el espectro de nanopartículas sin ningún recubrimiento por plasma "nano-oleico" y uno más en donde las partículas fueron puestas en el reactor de plasma, pero sin monómero "nano-oleico-plasma".

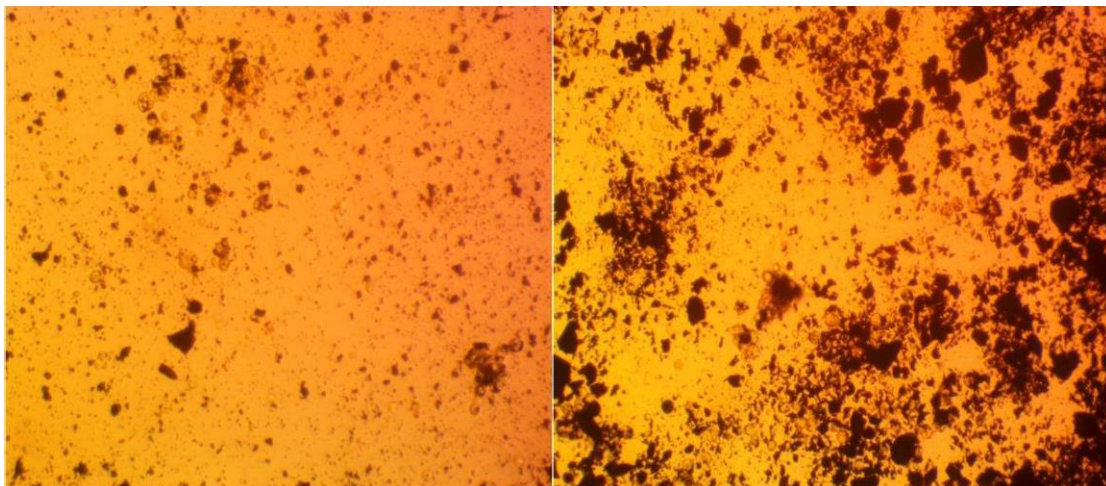


Figura 4-7. Imágenes de las células en contacto con nanopartículas magnéticas. A la izquierda recubiertas con pirrol y a la derecha recubiertas con acetona.

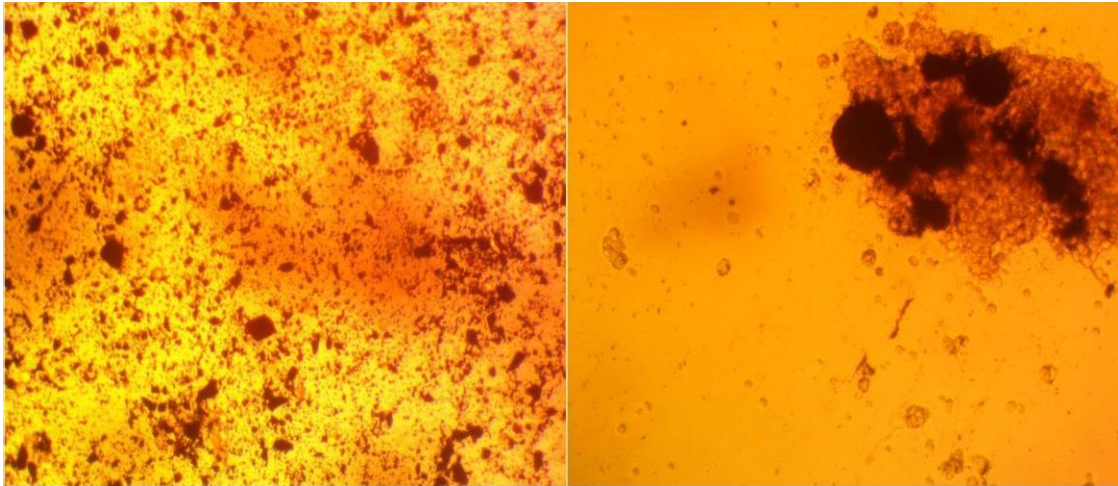


Figura 4-8. Imágenes de las células en contacto con nanopartículas magnéticas. A la izquierda recubiertas con alilamina y a la derecha recubiertas únicamente con el ácido oleico.

#### 4.4 Conclusiones

La distribución de tamaños obtenida por DLS (Figura 4.2) muestra una distribución de tamaños ancha, en contraste con la Figura 4.1, cuya distribución se obtuvo del conteo de partículas individuales a partir de la imagen de TEM, esto se debe a que en el caso del DLS no se distingue entre partículas individuales o agregadas. Sin embargo, las partículas muestran un tamaño adecuado para aplicaciones biomédicas.

Utilizando el reactor de la Figura 4.3 fuimos capaces de recubrir a las nanopartículas con pirrol mediante la técnica de polimerización por plasma. Adicionalmente, pudimos obtener un recubrimiento uniforme aprovechando las propiedades magnéticas de las nanopartículas.

Debido a los electrones de alta energía utilizados en el TEM en la Figura 4.4 se puede observar que el pirrol se derritió por lo que no se puede medir el grosor del recubrimiento. Por otro lado, en la Figura 4.5 se puede observar un pico de emisión

alrededor de los 400 nm, lo cual es consistente con resultados previos de Yanh et al. (Yang, Zhang, & Guo, 2009) para el pirrol.

Posteriormente, recubrimos a las partículas con distintos monómeros y la caracterización de las muestras por FTIR permite observar diferencias entre su composición química, lo que conlleva a una interacción distinta entre cada muestra y las células beta como se aprecia en la Figura 4.7 y en la Figura 4.8 además de su habilidad de dispersarse en el medio celular.

## **5 Partículas compuestas con carácter magnético para dosificación de medicamento**

### **5.1 Introducción**

#### **5.1.1 Liberación de fármaco**

La liberación de fármaco es un campo multidisciplinario que busca liberar una sustancia terapéutica en el sitio y tiempo deseado. Las nanopartículas magnéticas destacan como vehículos para transportar fármaco, ya que debido a su pequeño tamaño pueden generar calor en áreas reducidas de tejidos. Dicho calor puede ser utilizado para liberar el fármaco al dotar a la nanoestructura con materiales termo-sensibles.

Los sistemas de liberación de fármaco magnéticos tienen como objetivo llevar partículas magnéticas cargadas de fármaco al sitio de acción para posteriormente liberar su contenido en respuesta a un gradiente de campo magnético. Desde luego, un requisito indispensable es que las partículas no tengan un momento magnético total neto a menos que un campo magnético externo se encuentre presente, pero como lo mencioné anteriormente, esta característica está presente en partículas

superparamagnéticas lo que hace más atractivo el uso de las nanopartículas de óxido de hierro.

Las ventajas de utilizar partículas magnéticas para liberar fármaco son diversas. Por ejemplo, pueden ser guiadas al sitio de acción por medio de un campo magnético alternante externo. Además, es posible visualizar su localización a través de imagen por resonancia magnética. Finalmente, las partículas magnéticas pueden disipar calor que sirva para un tratamiento de hipertermia y/o detonar la liberación de fármaco.

Las nanoestructuras de liberación magnética usualmente llevan las sustancias terapéuticas ligadas a la superficie o encapsuladas dentro del núcleo. En el primer caso, la sustancia activa se puede unir covalentemente a la superficie de las partículas, mientras que en el segundo caso los nanosistemas que encapsulan el fármaco están compuestas de una estructura típica de núcleo y cascarón, que consisten de un núcleo de óxido hierro encapsulado en un recubrimiento polimérico o inorgánico.

Las limitaciones del uso de la liberación de fármaco magnética están relacionadas con la magnitud y alcance del campo externo aplicado, pues los imanes utilizados actualmente pueden interactuar con SPION a no más de 10 cm de profundidad en el cuerpo. Más aún, es importante notar que la concentración de partículas es a lo largo de la sección transversal entre el sitio de acción y el imán lo cual puede limitar la efectividad del campo magnético (Arruebo, Fernández-Pacheco, Ibarra, & Santamaría, 2007).

### **5.1.2 Síntesis de nanocápsulas**

En los últimos años se ha incrementado el interés en desarrollar nanocápsulas biodegradables que sirvan como vehículos en la liberación de fármaco. En este sentido, varios polímeros han sido utilizados como portadores debido a que este tipo de materiales pueden ser capaces de llevar fármacos hidrofílicos o hidrofóbicos al sitio de acción. La eficacia de dichos portadores de medicamento depende, en gran medida, de la elección adecuada del material que permita entre otras cosas, un nivel alto de encapsulamiento del fármaco, mayor tiempo de circulación en la sangre y una liberación en el momento adecuado como respuesta a un estímulo.

Las nanocápsulas poliméricas biodegradables destacan del resto debido a su baja o nula toxicidad, tamaño adecuado y estabilidad en la sangre que incluso puede incrementarse con una correcta funcionalización. Existen distintos métodos para sintetizarlas, pero al elegir un método se debe tomar en cuenta tanto la aplicación deseada como el tipo de fármaco a encapsular. El medicamento puede ser transportado por la superficie de la nanoestructura por medio de conjugación o bien ser encapsulado dentro del núcleo de la estructura.

De acuerdo a su estructura las nanopartículas poliméricas se pueden clasificar en nanocápsulas o nanoesferas. Las nanoesferas son sistemas en los cuales el fármaco se encuentra disperso dentro de una matriz polimérica (Soppimath, Aminabhavi, Kulkarni, & Rudzinski, 2001). Por su parte, las nanocápsulas se pueden definir como sistemas vesiculares en los cuales el fármaco es atrapado dentro un núcleo que está rodeado por una membrana polimérica (Mora-Huertas, Fessi, &



Elaissari, 2010). El núcleo de la nanocápsula puede llevar medicamentos tanto lipofílicos como hidrofílicos dependiendo del método de preparación utilizado. Existen diversas técnicas para sintetizar este tipo de nanoestructuras como nanoprecipitación, doble emulsión, entre otras. Debido a una mayor relación con el trabajo en esta tesis la sección será dedicado exclusivamente a las nanocápsulas y algunos de los métodos más comunes para sintetizarlas.

#### *5.1.2.1 Nanoprecipitación*

El método de nanoprecipitación o también llamado método de desplazamiento de solvente fue desarrollado por Fessi et al. (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury, & Benita, 1989). Esta técnica involucra un polímero previamente sintetizado y dos fases, una fase acuosa (no solvente) y una fase orgánica (solvente) (Figura 5-1). El solvente en la gran mayoría de los casos es un solvente orgánico miscible en agua (p.ej. acetona, tetrahidrofurano), mientras que el no solvente es agua. Sin embargo, esto no siempre es el caso, lo importante es que ambas fases sean miscibles y que tanto el polímero como el fármaco se disuelvan en una fase, pero no en la segunda. Estas son las condiciones de solubilidad, insolubilidad y miscibilidad que se deben satisfacer en este método. Otro requisito a considerar es que la fase orgánica se pueda evaporar fácilmente, además cabe mencionar, que en algunas ocasiones se añade un tensoactivo a la fase acuosa, aunque su uso no siempre es necesario (Bilati, Allémann, & Doelker, 2005).



Figura 5-1. A la izquierda se muestra la fase orgánica que generalmente consiste de un solvente orgánico, un polímero y la sustancia activa (y en el caso particular de esta tesis de nanopartículas magnéticas). A la derecha se muestra la fase acuosa que consiste de agua y en algunos casos un tensoactivo.

El principio básico en la formación de las nanocápsulas con esta técnica es, entre otras cosas, la variación de la tensión superficial (Quintanar-Guerrero, Allemann, Fessi, & Doelker, 1998). En efecto, la tensión superficial en la fase acuosa es mayor a la tensión superficial en la fase orgánica, lo cual genera turbulencias en la interfase y una rápida difusión del solvente que tiene como consecuencia la formación instantánea de la suspensión coloidal.

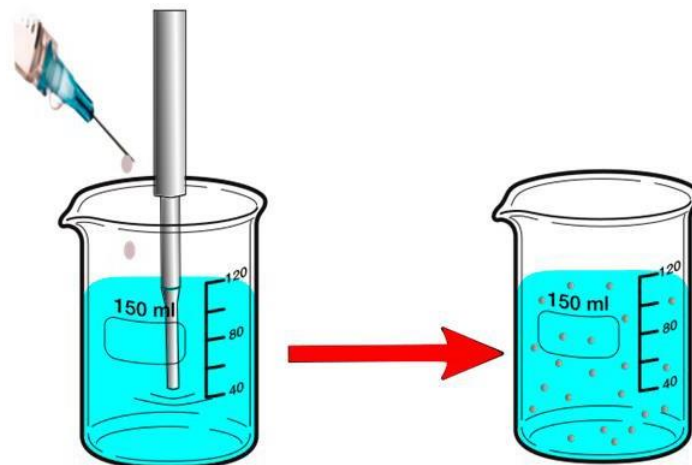


Figura 5-2. Muestra el procedimiento de añadir la fase orgánica a la fase acuosa, la agitación puede ser por medio de un agitador magnético o un sonicador. Sin embargo, en este caso se muestra un procesador ultrasónico (parte metálica que se encuentra dentro del agua) para agitar la fase acuosa.

La formación de las nanocápsulas ocurre cuando la fase orgánica con el polímero disuelto se añade de forma lenta y bajo agitación a la fase acuosa (Figura 5-2); esto se debe a que cuando ambas fases entran en contacto existe un rápido desplazamiento del solvente, lo que genera una precipitación inmediata del polímero con una consecuente encapsulación del fármaco. Es precisamente debido a la naturaleza del procedimiento descrito, que el método de nanoprecipitación es ideal para medicamentos hidrofóbicos como la doxorubicina. Mediante el uso de esta técnica se pueden obtener nanocápsulas pequeñas de 100-300 nm en forma de suspensión coloidal. En la Tabla 1 se muestran algunos materiales comunes en la nanoprecipitación.

#### *5.1.2.2 Emulsión-difusión*

El método de emulsión-difusión fue propuesto originalmente por Quintanar et al. (Quintanar-Guerrero, Allémann, Doelker, & Fessi, 1998). Entre las ventajas que tiene esta técnica destacan su alto nivel de encapsulamiento de sustancias liofílicas e hidrofílicas y su alta reproducibilidad. Para llevar a cabo esta técnica es necesario contar con una fase orgánica y una fase acuosa. La fase orgánica contiene un solvente orgánico, un polímero y un aceite, tal que los últimos dos componentes sean miscibles en el solvente. Asimismo, otro requisito que debe cumplir el solvente orgánico es que debe ser parcialmente miscible en agua. Por su parte, en la fase acuosa se tiene agua saturada con un agente estabilizador.

Tabla 1. Materiales utilizados para la preparación de nanopartículas por el método de nanoprecipitación

Polímero	Fármaco	Solvente	NS <sup>a</sup>	T <sup>b</sup>	Referencia
PCL	Espirinolactona	Acetona	Agua	Span 20	(Limayem Blouza, Charcosset, Sfar, & Fessi, 2006)
PCL o PLA	Indometacina	Acetona	Agua	Polisorbato 80	(Raffin Pohlmann, Weiss, Mertins, Pesce da Silveira, & Stanisçuaski Guterres, 2002)
MPEG-PCL	---	Acetonitrilo o THF	Agua	---	(Lee, Hwang, Lee, Kim, & Kim, 2009)
PLGA	DOX	Acetona	Agua	---	(T, 2016)
PCL	Diclofenaco	Acetona	Agua	Polisorbato 80	(Schaffazick, Pohlmann, Dalla-Costa, & Guterres, 2003)
PLGA	HCL de procaina	Acetonitrilo	Agua	---	(Govender, 1999)
PHB	Natokinasa	Acetona	Agua	Tween 80	(Deepak, Pandian, Kalishwaralal, & Gurunathan, 2009)
PCL	Tretinoína	Acetona	Agua	Polisorbato 80	(Ourique, Pohlmann, Guterres, & Beck, 2008)
PLGA	Curcumina	Acetona	Agua	PVA	(Yallapu, Gupta, Jaggi, & Chauhan, 2010)

<sup>a</sup>NS=No solvente; <sup>b</sup>T=Tensoactivo

La fase orgánica es emulsificada bajo agitación en la fase acuosa, la subsecuente difusión del solvente orgánico hacia la fase acuosa se lleva a cabo con la adición de

agua, esto causa la separación del polímero y el aceite. Una posterior solidificación del polímero forma una membrana sólida que sirve como cascarón. Cuando se busca encapsular una sustancia activa, ésta se añade a la fase orgánica y en caso de ser necesario se puede añadir también un solvente apropiado. La formación de las nanocápsulas ocurre en la etapa de la difusión cuando el solvente orgánico sale de las gotas de aceite.

El tamaño de las nanocápsulas producidas mediante el método de emulsión-difusión varía entre 100-500 nm y depende, entre otras cosas, de la composición de la fase orgánica (Moinard-Chécot, Chevalier, Briançon, Beney, & Fessi, 2008). Los materiales más comunes para la fase orgánica son acetato de etilo como solvente, PCL como polímero y como núcleo se utiliza triglicérido de ácido caprílico. Para la fase acuosa se utiliza como agente estabilizador PVA.

### *5.1.2.3 Doble emulsión*

El método de doble emulsión es un proceso simple mediante el cual es posible encapsular eficientemente compuestos hidrofílicos. La técnica de doble emulsión implica una separación entre fases, dependiendo del tipo de preparación es posible obtener formulaciones estables de doble emulsión como w/o/w, s/o/w, w/o/o y s/o/o, donde w representa agua, o aceite y s un sólido. Sin embargo, me enfocaré en el método más común de encapsulación para la preparación de partículas, la doble emulsión w/o/w.

La técnica de doble emulsión w/o/w desarrollada por Ogawa et al. (Ogawa, Yamamoto, Okada, Yashiki, & Shimamoto, 1988) es la más popular para

encapsular sustancias activas que se dispersan en agua. En dicha técnica dos fases acuosas están separadas por una capa de aceite. Para preparar las estructuras primero se emulsifica una solución acuosa del agente activo (fase acuosa interna, w) dentro de una solución orgánica que contiene un polímero (fase aceite, o), posteriormente la emulsión primaria resultante es nuevamente emulsificada en una fase acuosa que contiene un estabilizador (fase acuosa externa, w) (Meng, Ma, Qiu, & Su, 2003). Finalmente, cualquier solvente orgánico utilizado en el proceso debe ser removido, de esta manera se obtienen las partículas de doble emulsión w/o/w. El tamaño de estas estructuras varía desde los 200 nm hasta los micrómetros, pues depende de diversos factores como la temperatura, el peso molecular del polímero, entre otros. Estos sistemas de doble emulsión son excelentes candidatos para la liberación de fármacos hidrofílicos.

Mediante esta técnica es posible encapsular distintas sustancias activas como la doxorubicina dentro de PLGA como es reportado por Tewes et al. (Tewes et al., 2007) o insulina en una doble emulsión que contiene solventes parcialmente miscibles en agua (Gallarate, Trotta, Battaglia, & Chirio, 2009). Sin embargo, en ambos casos aún es necesario mejorar la eficiencia de encapsulación, pues el nivel de encapsulación de la doxorubicina es significativamente menor que usando otros métodos como una emulsión simple, mientras que la baja encapsulación de la insulina se debe a que se cuenta con una fase acuosa interna demasiado pequeña.

#### 5.1.2.4 *Capa por capa*

Mediante la técnica de capa por capa creada por Sukhorukov et al. (Sukhorukov et al., 1998) es posible obtener micro o nanopartículas cuyas propiedades físicas pueden ser modificadas a lo largo del proceso de síntesis. Para ensamblar este tipo de partículas se necesita un núcleo o una plantilla sobre el cual se deposita un polímero, este proceso se repite hasta agregar las capas de polímero necesarias para posteriormente remover la plantilla inicial. La gran mayoría de las cápsulas creadas por este método son hechas a partir de polielectrolitos debido a que de esta manera se pueden adsorber polímeros mediante atracción electrostática irreversible, es decir, los polímeros que se depositan sobre la plantilla están cargados y la carga de cada polímero se alterna positiva y negativamente para lograr el ensamble.

Para introducir las sustancias activas es necesario abrir los poros de la capsula creada para permitir el ingreso del fármaco, este mecanismo puede ser activado al modificar las condiciones ambientales como el pH, temperatura o incluso con sal (Johnston, Cortez, Angelatos, & Caruso, 2006). No obstante, se debe considerar que esta variación en las condiciones puede ser inapropiada para algunos polímeros. Otra forma de introducir el fármaco es con una plantilla porosa que permita la infiltración del fármaco previo al proceso de agregar las capas para finalmente remover la plantilla, este proceso no afecta al medicamento encapsulado. En este método se pueden encapsular distintas sustancias como enzimas (Caruso, Trau, Möhwald, & Renneberg, 2000) o insulina (Fan, Wang, Fan, & Ma, 2006) con tamaños promedio de 20  $\mu\text{m}$  y 200 nm respectivamente.

## **5.2 Experimental**

### **5.2.1 Preparación de partículas compuestas**

A continuación, describiré el método a través del cual sintetizamos nanopartículas compuestas que sirven para transportar medicamentos de carácter hidrofóbico, su posterior caracterización y finalmente mostramos el porcentaje de liberación de la sustancia activa contenida ante un estímulo térmico.

Para lograr la encapsulación se utilizó la técnica de nanoprecipitación pues es un método totalmente reproducible y con un alto nivel de encapsulación. En la técnica de nanoprecipitación las variables clave del procedimiento son aquellas asociadas con las condiciones en las que se añade la fase orgánica a la fase acuosa, tales como: la tasa de inyección de la fase orgánica, tasa de agitación de la fase acuosa y la proporción entre la fase acuosa y la fase orgánica. Además, las características de las nanocápsulas están influenciadas por la naturaleza y concentración de sus componentes. Por lo tanto, antes de encapsular un fármaco se realizaron una serie de muestras con distintas variaciones, principalmente en el método de agitación, con el objetivo de encontrar las condiciones adecuadas para obtener una menor distribución de tamaño en las nanocápsulas.

En la Figura 5-3 se muestra una representación esquemática de la ruta seguida para lograr la formación de nanocapsulas mediante la técnica de nanoprecipitación.



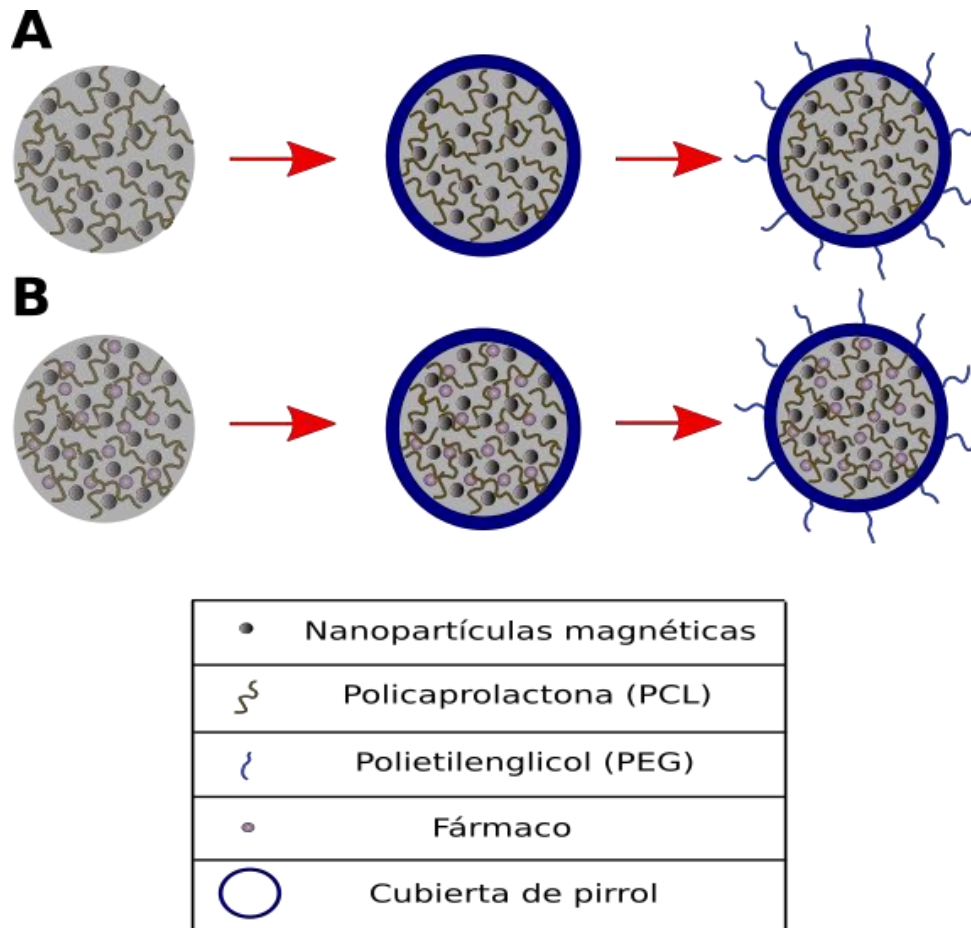


Figura 5-3. Representación de la ruta que seguimos para sintetizar y funcionalizar las nanocápsulas. Primero se muestra el resultado de la nanoprecipitación, después el resultado de la polimerización por plasma de la capa de pirrol y finalmente se añade el PEG. La parte A representa las distintas pruebas sin fármaco, mientras que en la parte B se añadió el fármaco.

Como primer paso se variaron el solvente utilizado y el método de agitación, las proporciones de los materiales utilizados es la siguiente:

- 40 ml de agua desionizada
- 1 gr de PVA (Sigma-Aldrich, Mw 9,000-10,000, 80 % hydrolyzed)
- 10 ml de solvente (Tetrahidrofurano (Sigma Aldrich, 99.9 %) o Acetona)
- 40 mg de PCL
- 100 mg de nanopartículas magnéticas

La fase acuosa consiste de 40 ml de agua desionizada y 1 gr de PVA, para obtener una mezcla uniforme el agua se calentó hasta los 50° C antes de añadir el PVA, mientras se agitaba el agua con un agitador magnético. Por otro, la fase orgánica está constituida por 10 ml de solvente, 0.04 gr de PCL (en el caso de acetona es necesario calentar la solución para que se disuelva el PCL) y 0.1 g de nanopartículas magnéticas.

Para lograr la formación de nanocápsulas se añadió la fase orgánica a la fase acuosa por medio de goteo utilizando una jeringa. Como un primer paso, se mantuvo fijo el solvente utilizado, mientras que se modificaba el método de agitación. En las primeras 2 muestras la agitación se realizó por medio de un agitador magnético en una parrilla a dos potencias distintas, una moderada y otra muy alta: 4 y 12 respectivamente; en las siguientes 2 muestras se utilizó un procesador ultrasónico *Sonics vibra-cell* (Figura 5-4) en el cual se mantuvo fijo el ciclo de trabajo del procesador con 5 s de trabajo por 5 s de descanso (el goteo se realizó durante los segundos de trabajo) y lo que se varió fue la amplitud a 40 % y 60 %. En la última muestra se utilizó un sonicador durante el goteo. Posteriormente bajo las mismas condiciones variamos el solvente. De esta manera se obtienen cinco muestras por solvente, por lo tanto, al final se realizaron un total de diez muestras.



*Figura 5-4. Procesador Ultrasónico Sonics vibra-cell utilizado durante la nanoprecipitación. Es posible ajustar el ciclo de trabajo y la amplitud de la sonicación.*

En una segunda etapa se modificó la amplitud del procesador ultrasónico y la cantidad de nanopartículas utilizadas en el proceso, esto con el objetivo de encontrar las variables adecuadas que permitan obtener nanocápsulas con una menor distribución de tamaños. En esta etapa fueron realizadas un total de nueve muestras. En las primeras 3 se utilizaron 100 mg de partículas magnéticas y 1 g de surfactante, en las siguientes 3 muestras se redujo la concentración de las partículas a 50 mg manteniendo fija la cantidad de surfactante y finalmente en las últimas tres muestras la concentración de partículas magnéticas fue de 50 mg y sin el uso de surfactante. En cada grupo de 3 muestras se varió la amplitud del procesador en 60 %, 80 % y 100 %.

Con base en las pruebas realizadas llegamos a la conclusión que las cantidades a utilizar para preparar las nanocápsulas en el resto del trabajo sean las siguientes:

- 200 ml de agua desionizada
- 50 ml de acetona
- 50 mg de nanopartículas magnéticas
- 20 mg de PCL
- 25 mg de Indometacina ( $\geq 99$  TLC SIGMA)

Es decir, la fase orgánica consiste de 50 ml de acetona, 20 mg de PCL, 25 mg de Indometacina y 50 mg de nanopartículas magnéticas. Nuevamente la fase orgánica se calentó hasta los 50° C y posteriormente se agregó la fase orgánica de forma lenta mediante una jeringa al agua (fase acuosa) mientras se agitaba utilizando el procesador ultrasónico con 100 % de amplitud.

Una vez decididas las cantidades a utilizar en la técnica de nanoprecipitación, nos dispusimos a llevar a cabo la curva de calibración de la Indometacina en el espectro UV-vis tanto en agua como en metanol. Para realizar la curva de calibración en agua se disolvió 1 mg de Indometacina en 100 ml de agua purificada, de tal manera que se preparó una solución estándar de 10  $\mu\text{g/ml}$ . A partir de la solución estándar se tomaron 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 2 ml y se llevó el volumen hasta los 10 ml de agua purificada de tal manera que se hicieron seis soluciones de concentración 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$ .

Por otro lado, para obtener la curva de calibración del medicamento en metanol se tomaron 10 mg de Indometacina y se disolvieron en 100 ml de metanol para formar una solución estándar de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Después, de la solución estándar se tomaron 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 ml y se agregó solvente hasta llegar a 10 ml con el objetivo

de tener 5 concentraciones distintas, a saber, 1, 2, 4, 6 y 8  $\mu\text{g/ml}$ . La medición de la absorbancia de las muestras fue medida en un espectrómetro UV-vis Cary 50 bio.

Calentamos dos muestras de nanocápsulas cargadas con fármaco a baño maría utilizando agua como solvente, una hasta los 37 °C y la otra hasta los 60 °C. Utilizando el espectrómetro anteriormente mencionado medimos la absorbancia de las dos muestras y además de una más que no se calentó (temperatura ambiente).

Por otro lado, para calcular la cantidad total de Indometacina que se encapsula en la partícula tomamos una muestra y la disolvimos en metanol, después medimos su absorbancia en un volumen 5 ml del mismo solvente.

## **5.2.2 Caracterización**

### *5.2.2.1 Espectroscopia UV-Vis*

La espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis) está basada en la medición de la absorción de soluciones, debido a que moléculas distintas absorben radiación a diferente longitud de onda, la espectroscopia de absorción molecular es valiosa para identificar grupos funcionales dentro de una molécula. La absorción de una muestra puede ser determinada a través de la ley de Beer (Skoog et al., 1998). Si la radiación en la que absorbe la molécula se encuentra dentro del rango ultravioleta o visible, es posible identificar los componentes en nuestra muestra utilizando espectroscopia UV-Vis. La espectroscopia de absorción molecular es muy utilizada para la determinación de una gran cantidad de componentes orgánicos e inorgánicos.

En esta técnica un haz ilumina la muestra con una longitud de onda ( $\lambda$ ) que comprende entre 200 y 800 nm para obtener el espectro de absorción de la muestra. La solución a analizar es colocada dentro de una celda de cuarzo y adicionalmente, una celda que contiene únicamente al solvente es iluminada para comparar la potencia del haz transmitido en cada celda y compensar la absorción debida a la celda y/o dispersión del solvente. La muestra que se quiera analizar debe tener una concentración relativamente pequeña ( $<0.01$  M), pues a concentraciones mayores existe una desviación de la relación lineal entre la absorción y concentración. Esta desviación se debe a diversos factores que incluyen interacciones soluto-soluto.

La absorción de radiación UV o visible de un átomo o molécula se debe a la excitación de los electrones en la muestra como resultado del haz incidente. Generalmente, dicha absorción es producto de la excitación de electrones enlazados, por lo que esta técnica permite relacionar las longitudes de onda de las bandas de absorción con las especies bajo estudio.

#### *5.2.2.2 Análisis termogravimétrico*

El análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) es un método térmico que sirve para medir la cantidad de masa perdida como función de la temperatura o del tiempo. Esta técnica es útil cuando se busca determinar la composición de un material o su estabilidad térmica. Los datos obtenidos pueden ser graficados para obtener una curva llamada termograma que muestra la disminución de la masa a una temperatura específica. Los termogramas proveen información acerca de los patrones de descomposición de cada tipo de polímero (Stuart, 2002) debido a esto

es que posible utilizar esta técnica para identificar los componentes de nuestra muestra y estimar el porcentaje en el que se encuentran.

Los instrumentos de TGA constan de una balanza, un horno, un sistema de gas de purga para proveer una atmósfera inerte y una computadora para controlar las condiciones de calentamiento. En esta técnica la muestra es suspendida sobre la balanza y calentada con un horno que puede alcanzar elevadas temperaturas (hasta 1200°C), mientras que la balanza térmica es lo suficientemente sensible para detectar cambios en la masa de hasta 0.1  $\mu g$ .

### *5.2.2.3 Microscopia electrónica de barrido*

La microscopía electrónica de barrido (SEM) utiliza un haz de electrones de alta energía para revelar información acerca de la morfología de la superficie de un material, su cristalinidad y composición química. La técnica de SEM es una técnica no destructiva (a diferencia del TEM) que requiere una preparación mínima de la muestra. Los electrones en el SEM tienen una pequeña profundidad de penetración por lo que comúnmente la técnica de SEM se utiliza casi exclusivamente para obtener imágenes superficiales de distintos materiales como cerámica, polímeros, metales o cristales.

En el SEM los electrones incidentes son disparados mediante emisión térmica o un campo eléctrico alto, estos electrones tienen una gran cantidad de energía cinética la cual es disipada por medio de las interacciones entre la muestra y los electrones. La interacción del haz de electrones con la muestra produce electrones secundarios, retrodispersados y de Auger. Además de rayos X incluso es posible que la

interacción produzca luz (Vernon-Parry, 2000). Todas estas interacciones son recolectadas por varios detectores con el fin de aportar información sobre la muestra.

Los electrones secundarios se producen por electrones incidentes que excitan un electrón de la muestra y que obtienen la suficiente energía para escapar de sus órbitas. Los electrones secundarios pueden mostrar la morfología y topología de la muestra. Por otro lado, los electrones retrodispersados son electrones incidentes altamente energéticos que se acercan al núcleo de los átomos de la muestra y que posteriormente salen dispersados fuera de la muestra. Los electrones retrodispersados son especialmente útiles para mostrar contraste en la composición del material.

#### *5.2.2.4 Calorimetría diferencial de barrido*

Un calorímetro es un dispositivo en el que se mide el cambio de temperatura de una muestra cuando se le suministra una cantidad determinada de calor (Hönhe, Hemminger, & Flamersheim, 2003). Existen muchos tipos de técnicas de calorimetría, pero uno de las más destacadas es la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) que permite determinar cómo cambia con la temperatura la capacidad calorífica de un material. En el DSC se coloca la muestra y un contenedor vacío que se utiliza como referencia, a partir de ahí se mide la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura cercana al cero entre la muestra y una referencia (Schick, 2009).



La información que un DSC nos brinda sirve para conocer el comportamiento amorfo o cristalino de un material, su temperatura de transición vítrea o la temperatura en la cual se derriten los cristales que contiene. Regularmente, los datos de la técnica del DSC se presentan como una curva de flujo de calor en función de la temperatura, en estas curvas se pueden observar picos distintos que representan eventos endotérmicos o exotérmicos, es decir, eventos en los que es necesario aplicar una mayor cantidad de calor o de frío respectivamente a la muestra en relación a la referencia.

El modo de operación más común en un DSC es el modo *Scan*, en el cual la muestra es calentada o enfriada a una tasa constante. Este modo es especialmente útil para calcular el calor de fusión y el porcentaje de cristalización en un polímero semicristalino. Es importante conocer el porcentaje de cristalización de la muestra, pues dicho porcentaje afecta en gran medida las propiedades del material (por ejemplo, su estabilidad o dureza).

### **5.3 Resultados**

En la técnica de nanoprecipitación, existen distintas variables que afectan el tamaño de las nanocápsulas. Como primer paso se varió el solvente y el método de agitación. La afinidad que tiene el solvente por el no-solvente afecta la difusión y, por ende, el tamaño final de las partículas. El parámetro de Flory-Huggins,  $\chi$ , está relacionado con la afinidad del solvente y no solvente y se puede calcular a partir de parámetros de solubilidad (Ecuación (5-1)).

$$\chi = \frac{V_{NS}}{RT} (\delta_S - \delta_{NS})^2 \quad (5-1)$$

Donde  $\delta_S$  y  $\delta_{NS}$  son los parámetros de solubilidad del solvente y del no solvente respectivamente,  $V_{NS}$  es el volumen molar del no solvente,  $T$  la temperatura y  $R$  la constante universal de los gases. Para que exista solubilidad se debe cumplir que  $\chi \leq 0.5$ . El cálculo del parámetro Flory-Huggins se puede realizar de la manera descrita en (Macario, 2008). En este caso recordando que nuestro no solvente es PCL podemos calcular el parámetro asociado a cada solvente. Para ello, se toman los siguientes valores:  $V_{NS} = \frac{PM}{\rho} = 75.87 \frac{\text{cm}^3}{\text{g mol}}$ ,  $\delta_{NS} = 9.39 \left( \frac{\text{cal}}{\text{cm}^3} \right)^{1/2}$ ,  $R = 1.987 \frac{\text{cal}}{\text{g mol K}}$ ,  $\delta_{s(\text{acetona})} = 9.77 \left( \frac{\text{cal}}{\text{cm}^3} \right)^{1/2}$  y  $\delta_{s(\text{THF})} = 9.52 \left( \frac{\text{cal}}{\text{cm}^3} \right)^{1/2}$ . Por su parte, la temperatura en el caso de la acetona fue de 50 °C (325.15 K), mientras que para el caso del THF fue a temperatura ambiente 22° C (295.15 K). El cálculo se muestra en las ecuaciones (5-2) y (5-3).

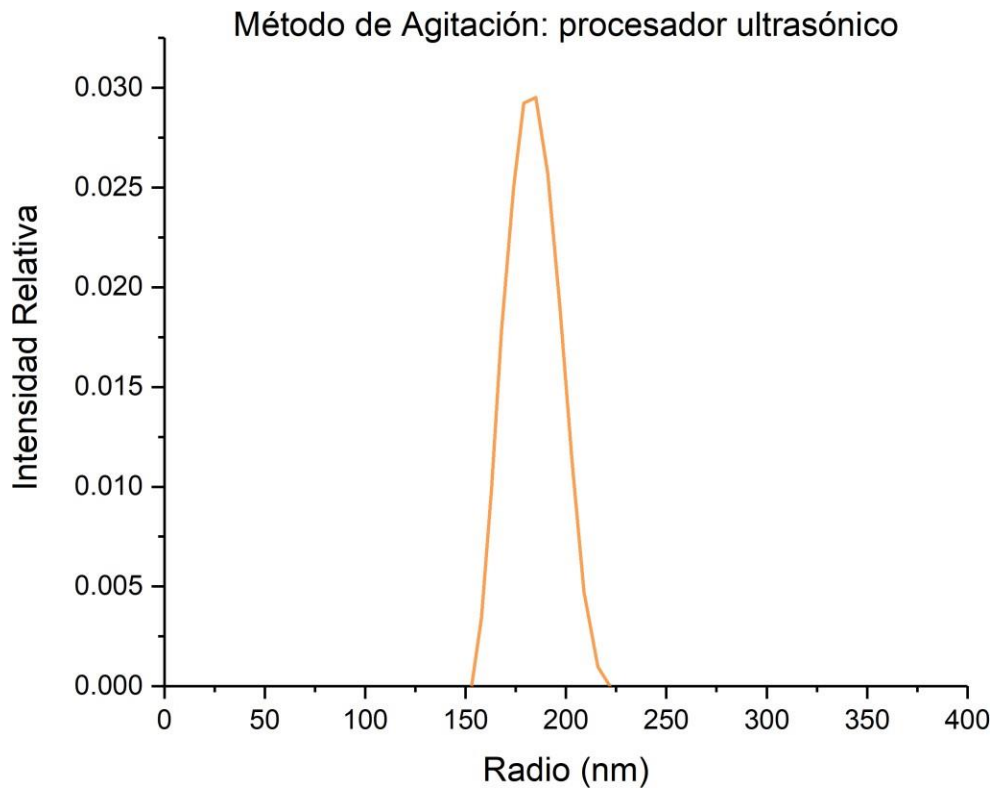
$$\chi_{\text{acet-PCL}} = \frac{75.87 \frac{\text{cm}^3}{\text{g mol}}}{1.987 \frac{\text{cal}}{\text{g mol K}} * 325.15 \text{ K}} \left( (9.77 - 9.39) \left( \frac{\text{cal}}{\text{cm}^3} \right)^{1/2} \right)^2 = 0.017 \quad (5-2)$$

$$\begin{aligned} \chi_{\text{THF-PCL}} &= \frac{75.87 \frac{\text{cm}^3}{\text{g mol}}}{1.987 \frac{\text{cal}}{\text{g mol K}} * 295.15 \text{ K}} \left( (9.52 - 9.39) \left( \frac{\text{cal}}{\text{cm}^3} \right)^{1/2} \right)^2 \\ &= 0.002 \end{aligned} \quad (5-3)$$

Choi et al. (Choi, Kwon, Kim, & Kim, 2002) presentaron un trabajo en el que abordaron el estudio de la relación entre el parámetro de interacción entre el solvente y no solvente con el tamaño de las partículas. En este caso, ya que los parámetros obtenidos son menores a 0.5 ambos solventes son adecuados para obtener partículas de tamaño relativamente pequeño. En la *Tabla 2* muestro los resultados obtenidos en esta primera etapa, para ambos solventes con distintos métodos de agitación.

Tabla 2. Tamaños de las capsulas obtenidos al variar el solvente y método de agitación.

Solvente	Agitador	Agitador	Procesador	Procesador	Sonicador
	Potencia 4	Potencia 12	Amplitud 40%	Amplitud 60%	
THF	520 ± 100 nm	440 ± 100 nm	480 ± 90 nm	460 ± 80 nm	340 ± 70 nm
Acetona	---	400 ± 80 nm	700 ± 500 nm	187 ± 6 nm	340 ± 160 nm



*Figura 5-5. Distribución de tamaños de nanocápsulas hechas por el método de nanoprecipitación con procesador ultrasónico a 60 % de amplitud y utilizando acetona como solvente.*

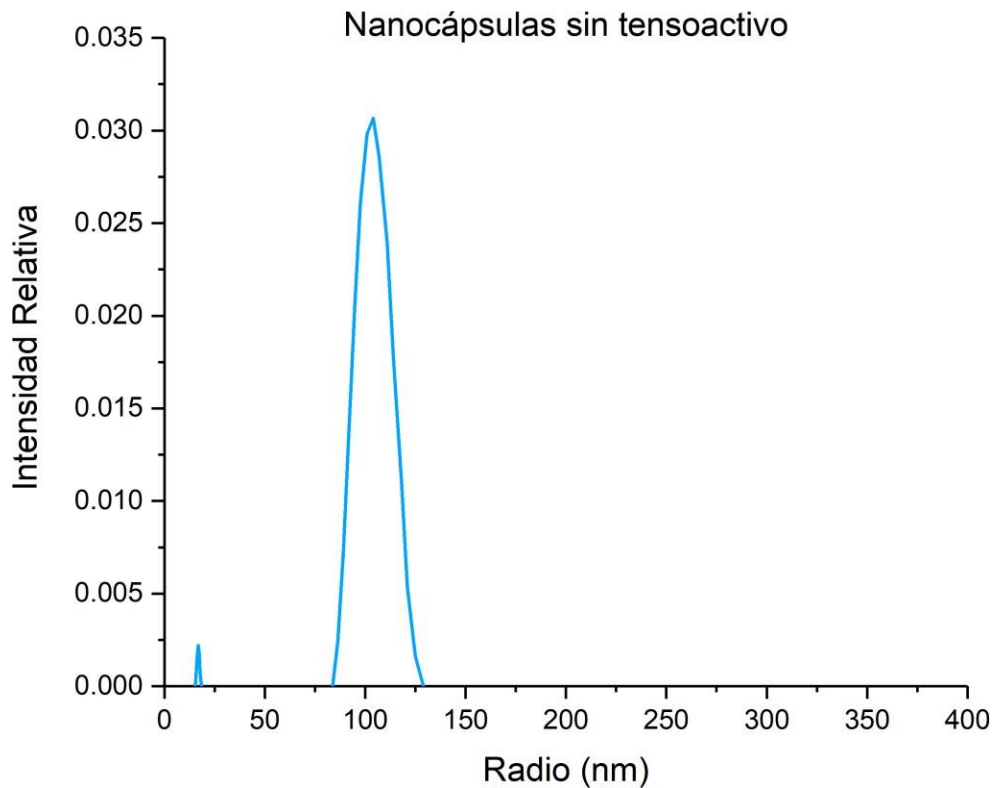
En la *Tabla 2* se observa que el mejor resultado es el del procesador ultrasónico a 60% de amplitud con acetona, cuya gráfica se muestra en la *Figura 5-5*.

A continuación, se tomó la mejor tendencia en la *Tabla 2* correspondiente a acetona en el procesador ultrasónico a 60 % de amplitud y se realizaron 6 pruebas en donde se varió la amplitud a 60 %, 80 % y 100 % y se trató con una nueva variable que es la concentración de las nanopartículas magnéticas a dos valores distintos: 0.1g y 0.05g. Debido a la falta de literatura al respecto de nanocápsulas con nanopartículas magnéticas hechas mediante nanoprecipitación es interesante ver su efecto sobre el tamaño de las

capsulas. Además, en la literatura (Bilati et al., 2005) es conocido que el uso de un tensoactivo no siempre es indispensable para lograr la nanoprecipitación, por lo que en algunas pruebas prescindimos de su uso. A continuación, presento una tabla con los resultados obtenidos

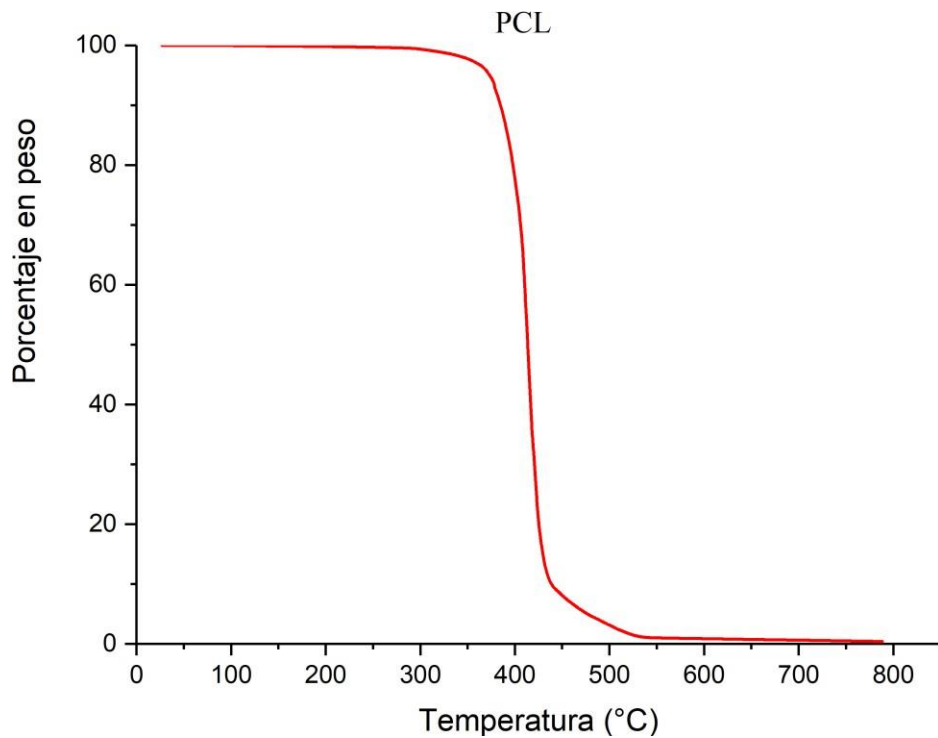
Tabla 3. Distribución de tamaños de nanocápsulas hechas por el método de nanoprecipitación con procesador ultrasónico a 100 % de amplitud utilizando acetona como solvente, con 50 mg de partículas magnéticas y sin tensoactivo.

	<b>Amplitud 60%</b>	<b>Amplitud 80%</b>	<b>Amplitud 100%</b>
100 mg de partículas magnéticas con tensoactivo	180 ± 66 nm	145 ± 18 nm	144 ± 22 nm
50 mg de partículas magnéticas con tensoactivo	162 ± 33 nm	138 ± 38 nm	177 ± 36 nm
50 mg de partículas magnéticas sin tensoactivo	140 ± 220 nm	104 ± 44 nm	100 ± 26 nm



*Figura 5-6. Distribución de tamaños de nanocápsulas hechas por el método de nanoprecipitación con procesador ultrasónico a 100 % de amplitud utilizando acetona como solvente, con 50 mg de partículas magnéticas y sin tensoactivo.*

La falta de tensoactivo también parece generar una disminución de tamaño de las cápsulas. De aquí en adelante las condiciones para preparar las nanocápsulas son las siguientes: procesador ultrasónico a 100 % de amplitud como método de agitación, como solvente usamos acetona, sin tensoactivo y con 50 mg de partículas magnéticas. En la Figura 5-6 se observa el DLS de las muestras bajo estas condiciones.



*Figura 5-7. Se muestra el porcentaje de peso perdido como función de la temperatura para la policaprolactona.*

Después de liofilizar las muestras las llevamos al TGA para poder estimar la proporción de materiales en su composición comparándola con las curvas obtenidas de los materiales por sí solos. En la Figura 5-7 se muestra la curva obtenida mediante análisis termogravimétrico para la policaprolactona. Similarmente, en la Figura 5-8 se muestra la curva para las nanopartículas magnéticas.

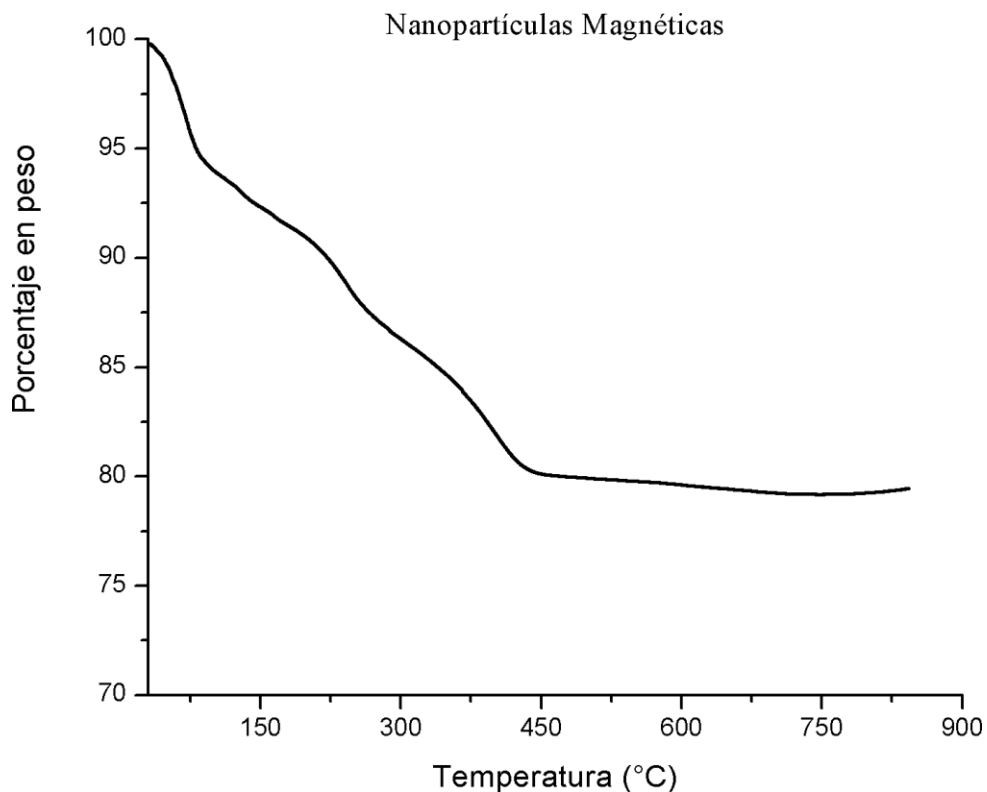


Figura 5-8. Se muestra el porcentaje de peso perdido como función de la temperatura para las nanopartículas magnéticas solas.

Como se puede observar en la figura 5.7 la pérdida de peso del PCL tiene una caída abrupta en el rango de 350 a 450°C, donde el polímero pierde prácticamente todo su peso. Mientras que para el caso de las nanopartículas la Figura 5-8 indica que el peso tiene una caída continua hasta los 430°C aproximadamente, sin embargo, las partículas sólo pierden cerca del 20 % de su peso, esta caída está asociada al recubrimiento de ácido oleico que tienen. Con estas referencias podemos identificar el porcentaje de los componentes de las nanocápsulas, es importante mencionar que antes de realizar el análisis termogravimétrico de las nanocápsulas (Figura 5-9), éstas fueron



liofilizadas por lo que estaban totalmente secas evitando pérdidas de peso relacionadas con el exceso de agua.

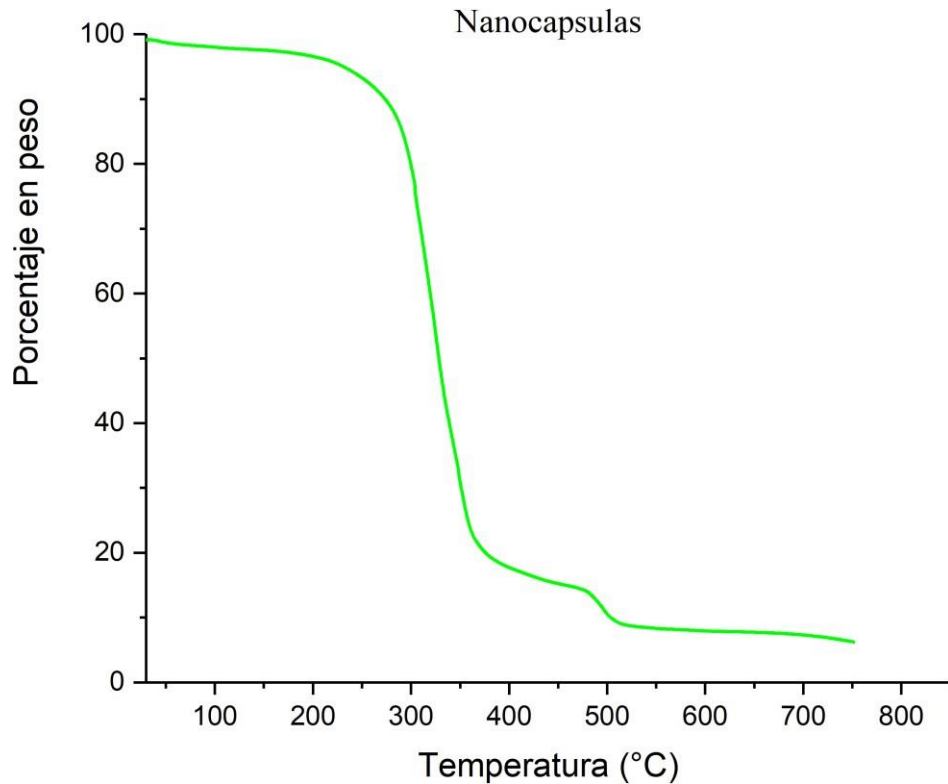


Figura 5-9. Curva de análisis termogravimétrico de nanocápsulas compuestas de PCL y nanopartículas magnéticas. Las nanocápsulas fueron hechas mediante la técnica de nanoprecipitación con el procesador ultrasónico a 80 % de amplitud con 50 mg de partículas magnéticas sin PVA.

Podemos observar en la figura 5.9 que hay una pequeña pérdida de peso antes de los 300°C que pertenece al ácido oleico en las nanopartículas magnéticas, pero a partir de los 300°C se presenta una caída pronunciada como la del PCL, dicha caída corresponde a aproximadamente el 75% del peso de las capsulas. Finalmente, después de los 500°C todo lo que queda son las nanopartículas magnéticas. De esta manera, podemos estimar que cerca del 15% de nuestras nanocápsulas están hechas de nanopartículas magnéticas, 75% de PCL y 10% de ácido oleico.

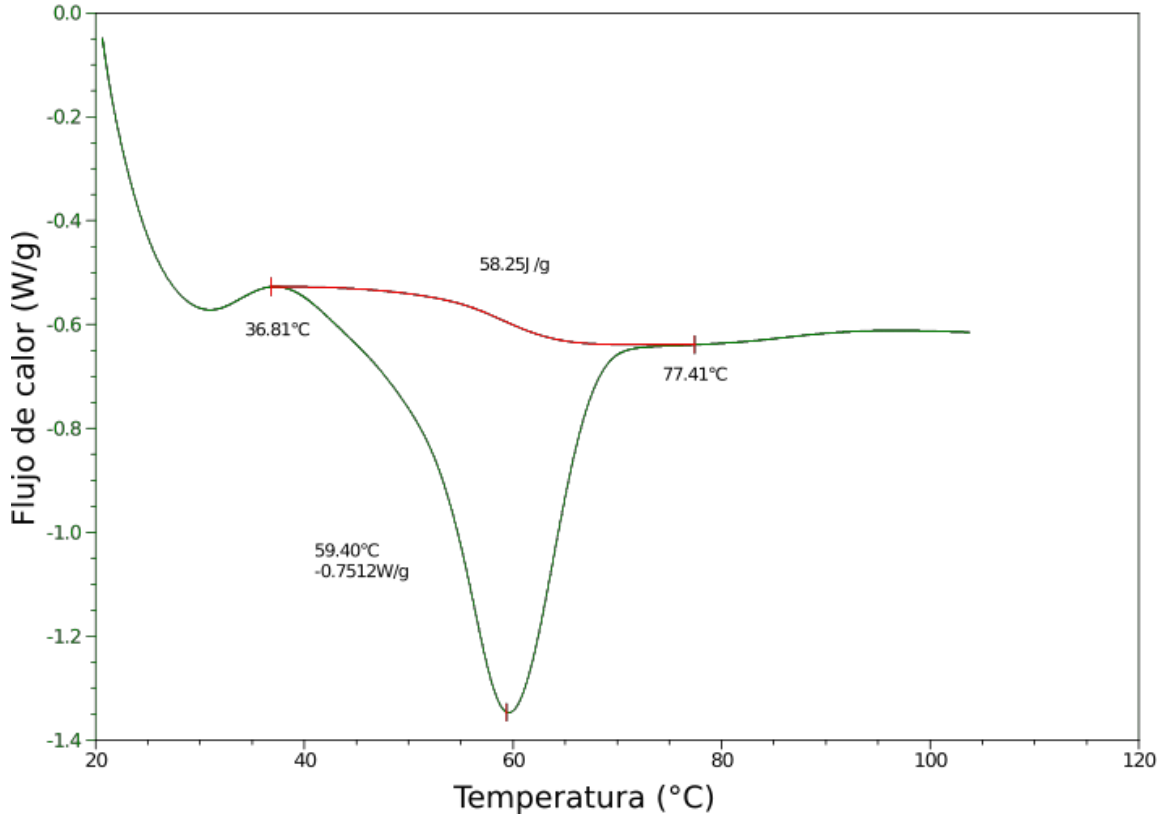


Figura 5-10. Termograma DSC de nacocápsulas compuestas de PCL y nanopartículas magnéticas. El punto de fusión del PCL es de 59.40°C.

Además, las muestras fueron caracterizadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), donde se observa (Figura 5-10) que el punto de fusión del polímero semi-cristalino PCL es de 59.40 °C. Para calcular el porcentaje de cristalización a partir de esta gráfica es necesario integrar el área (J/g) bajo los picos de fusión, regularmente dicha área puede ser obtenida por el propio software del instrumento. El calor de fusión  $\Delta H_m$  es igual a la integración del área del pico de fusión. Si además conocemos el calor de fusión del cristal perfecto del material (100 % cristalinidad)  $\Delta H_m^\circ$  y podemos estimar la fracción en peso del PCL en el material  $W_{PCL}$ , entonces podemos calcular el porcentaje de cristalización  $X_c$  de acuerdo a la ecuación (5-4 (L. Li, 2014)).

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{(W_{PCL})(\Delta H_m^\circ)} * 100 \% \quad (5-4)$$

En nuestro caso  $\Delta H_m = 58.25 \text{ J/g}$ ,  $\Delta H_m^\circ = 136.4 \text{ J/g}$  y  $W_{PCL} = 0.75$  aproximadamente a partir del TGA. El cálculo del porcentaje de cristalinidad se muestra en la ecuación (5-5).

$$X_c = \frac{58.25 \text{ J/g}}{(75)(136.4 \text{ J/g})} * 100 \% = 56.94 \% \quad (5-5)$$

Posteriormente, las muestras fueron polimerizadas con alilamina por plasma durante 20 minutos a una potencia de 5 watts y caracterizadas por TGA. En la Figura 5-11 se muestra una comparación de las curvas de TGA para las nanocápsulas antes y después de polimerizarlas con alilamina donde se observa que ambas curvas son muy similares, lo cual nos da un indicio de que la capa de alilamina es muy delgada pues no se observa una diferencia notoria, aunque la alilamina parece tener un efecto retardante en la degradación del PCL, pues la curva roja tiene una pendiente menos pronunciada entre 300 °C y 380 °C.

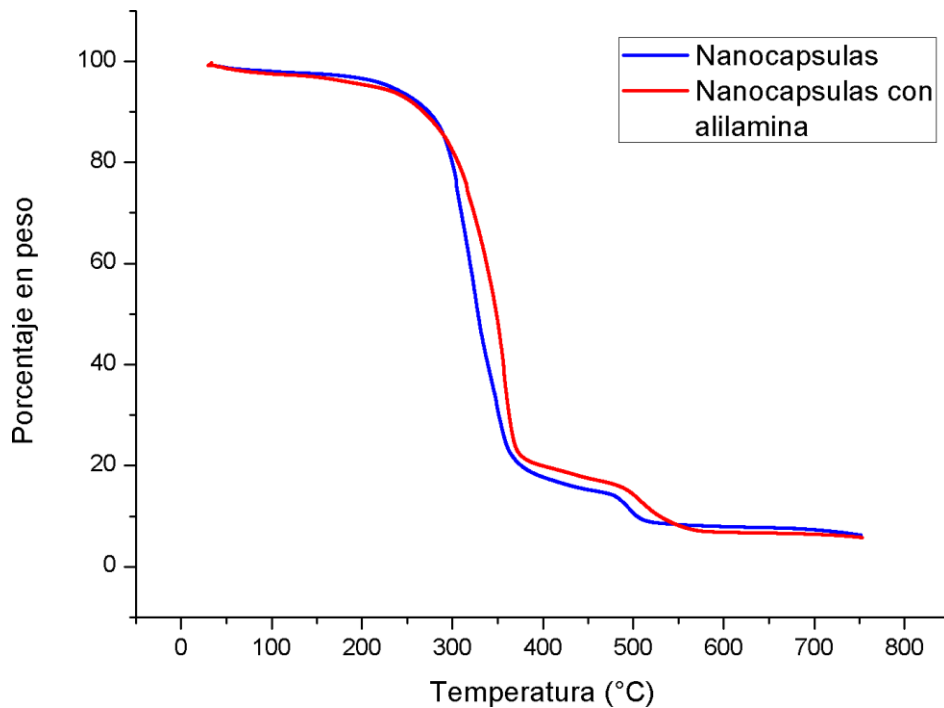


Figura 5-11. Curvas de análisis termogravimétrico para las nanocapsulas de PCL con nanopartículas magnéticas solas (curva azul) y recubiertas con alilamina (curva roja).

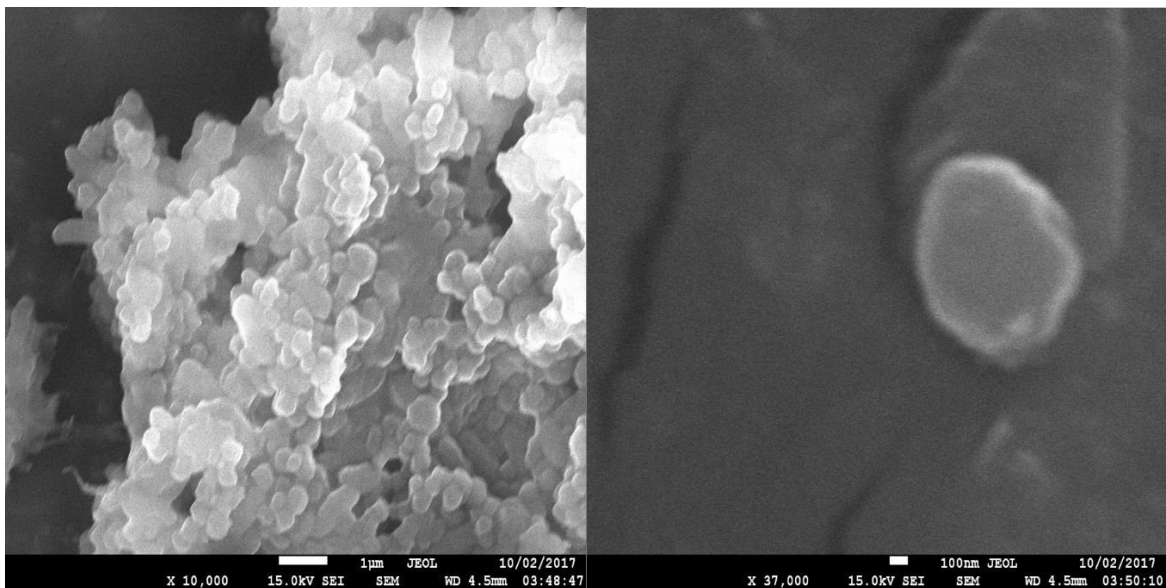
Después las nanocápsulas fueron funcionalizadas con PEG. Este proceso se basa en adherir la cadena de PEG sobre la superficie de la partícula empleando amidas para el enlace.

La funcionalización con PEG brinda a los nanoportadores un incremento en el tiempo de circulación en la sangre. Para acoplar el PEG a las nanocápsulas se utilizó PEG-COOH (PEG carboxilado), para sintetizarlo partimos de un polietilenglicol éter (mPEG) al cual se le aplicó una esterificación con anhídrido succínico. Una vez obtenido el PEG-COOH lo añadimos a las capsulas de PEG, para ello se tomó 1 mg de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodimida (EDC) y 0.6 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) por cada ml de solución del PEG carboxilado en

agua. La reacción se agito durante 24 hrs y finalmente se centrifugo a alta velocidad para precipitar las partículas.

La funcionalización con PEG nos permitió suspender a las partículas en agua y así llevarlas para su posterior caracterización al microscopio electrónico como muestran las figuras a continuación.

La Figura 5-12 muestra imágenes del microscopio electrónico de barrido (SEM) de las nanocápsulas con alilamina. Observamos que las partículas tienen una forma tipo esferas, una superficie suave y presentan una distribución de tamaños de entre 250 y 600 nm de diámetro, distribución que se muestra en el histograma de la Figura 5-13.



*Figura 5-12. Imágenes de SEM de nanopartículas hechas por el método de nanoprecipitación donde se observa la morfología de la muestra.*

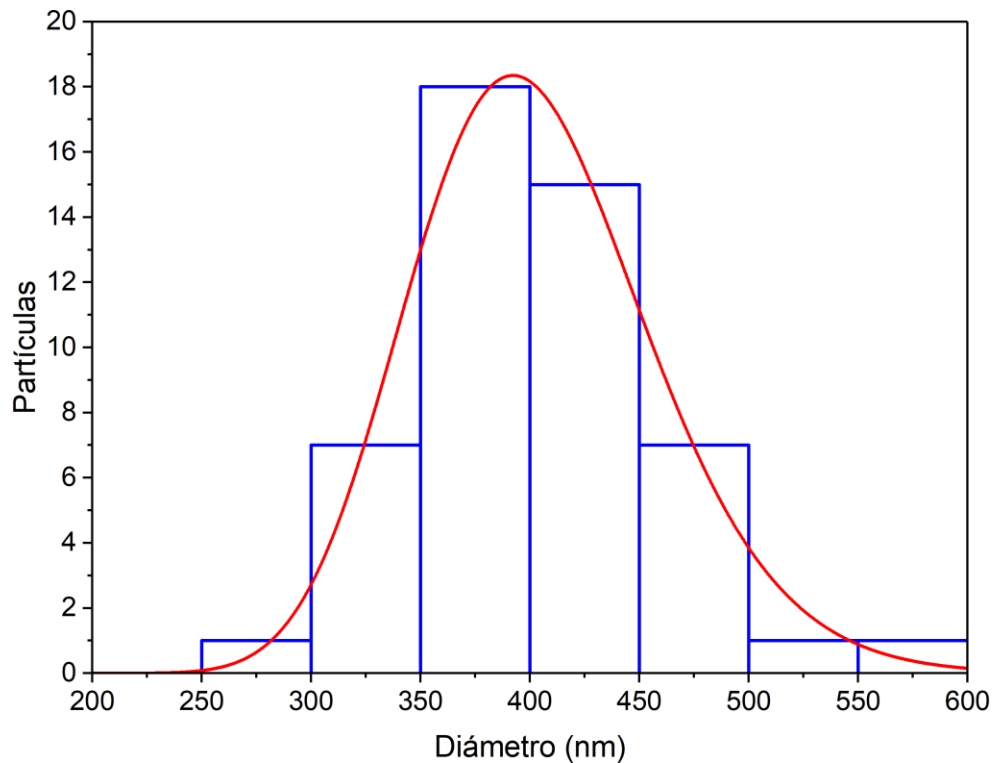


Figura 5-13. Histograma de las nanocápsulas obtenidas a partir de las imágenes por SEM con una curva de distribución ajustada log-normal con un promedio de  $d_0=399$  nm y varianza  $\ln \sigma = 0.14$ .

Una vez caracterizadas las muestras se encapsulo la Indometacina, un medicamento antiinflamatorio, con el objetivo de comprobar que las cápsulas lo pueden liberar a través de un estímulo térmico.

En el proceso de nanoprecipitación se añadió la Indometacina a la fase orgánica, de manera que cuando se vierte la solución orgánica a la solución acuosa, tanto el fármaco como las partículas magnéticas sean atrapadas por el PCL. Para poder estimar la cantidad de fármaco que es encapsulado es necesario caracterizar la muestra por espectroscopia UV-Vis y así observar los picos de absorción de la muestra que corresponden a la Indometacina.

Como primer paso se realizó una curva de calibración para la Indometacina en agua purificada (Figura 5-14).

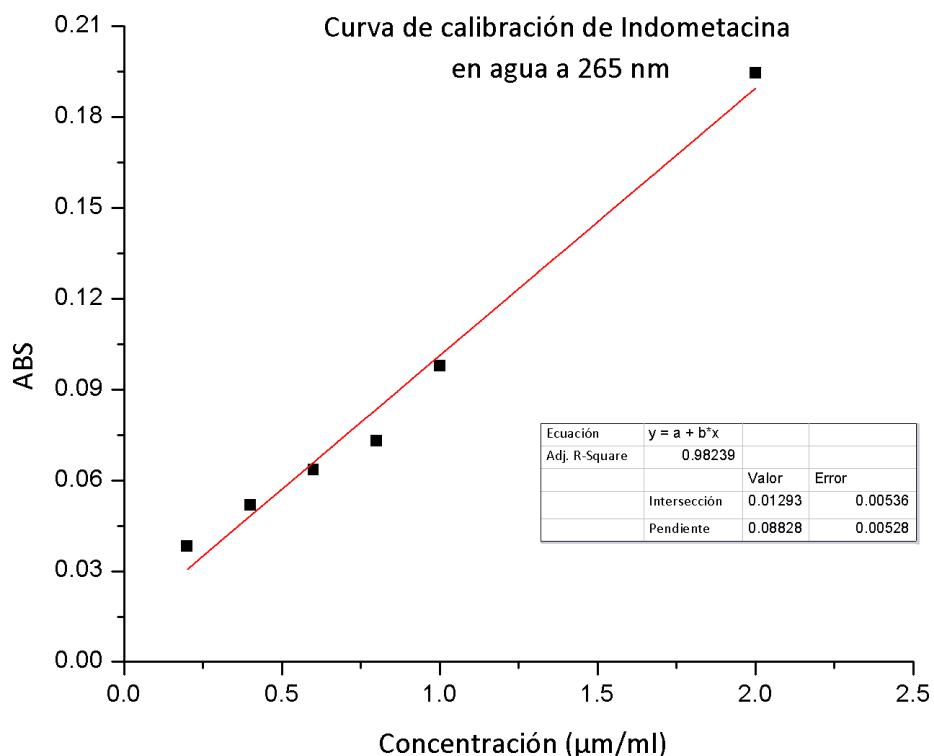


Figura 5-14. Curva de calibración de Indometacina en agua ( $\lambda_{max}$  265 nm).

Nuestro objetivo, una vez obtenida la curva de calibración, es medir la cantidad de Indometacina liberada a tres distintas temperaturas, específicamente a 25 °C, 37 °C y 60 °C. Las temperaturas fueron elegidas para conocer qué tanta Indometacina se libera a temperatura ambiente, a temperatura corporal y finalmente a una temperatura lo suficientemente elevada de tal manera que prácticamente toda la medicina sea liberada. Las absorbancias medidas se muestran en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Absorbancia y cantidad de indometacina liberada a distintas temperaturas.

Temperatura	Absorbancia ( $\lambda = 265 \text{ nm}$ )	Indometacina liberada
25 °C	0.18558	9.8 $\mu\text{g}$
37 °C	0.49018	37.8 $\mu\text{g}$
60 °C	0.62099	55.1 $\mu\text{g}$

Con ayuda de la curva de calibración en agua obtuvimos la cantidad de Indometacina que se liberaba en las muestras. Utilizando la curva de calibración en agua de la Figura 5-14 y tomando en cuenta que los volúmenes de las soluciones fueron 5 ml para la temperatura ambiente y 60°C y de 7 ml para la temperatura de 37°C podemos obtener la cantidad de Indometacina liberada (Tabla 4). La Figura 5-15 muestra el porcentaje de indometacina liberada como función de la temperatura.

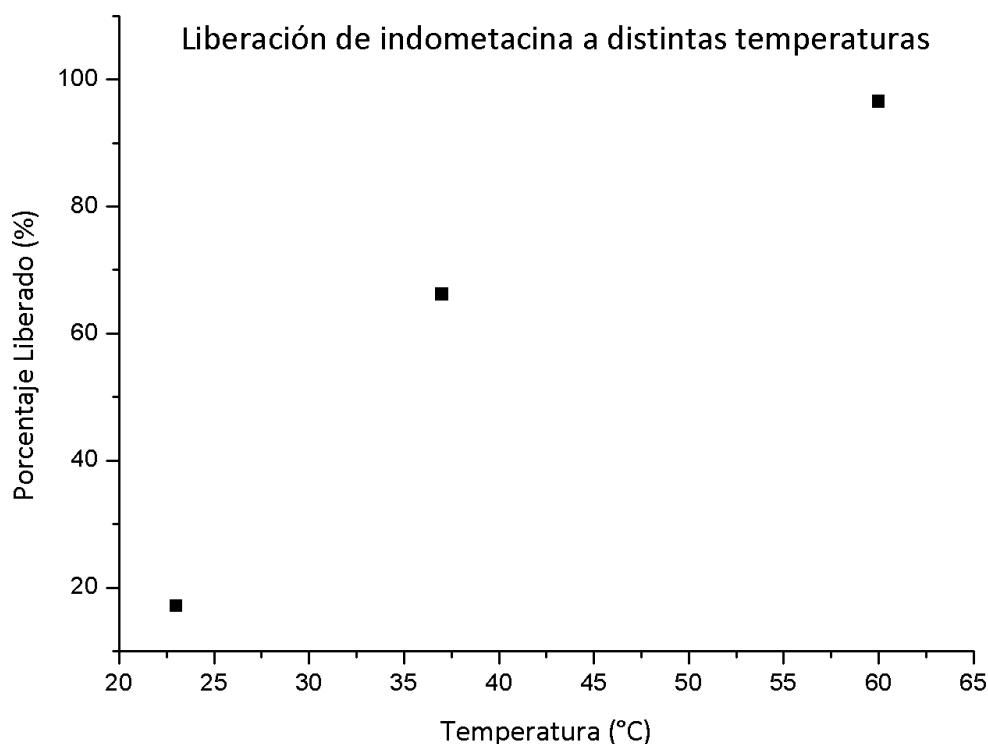


Figura 5-15. Porcentaje de indometacina liberado como función de la temperatura



Como lo mencionamos anteriormente, además de agua también se utilizó metanol para realizar la curva de calibración. La curva resultante se muestra en la Figura 5-16.

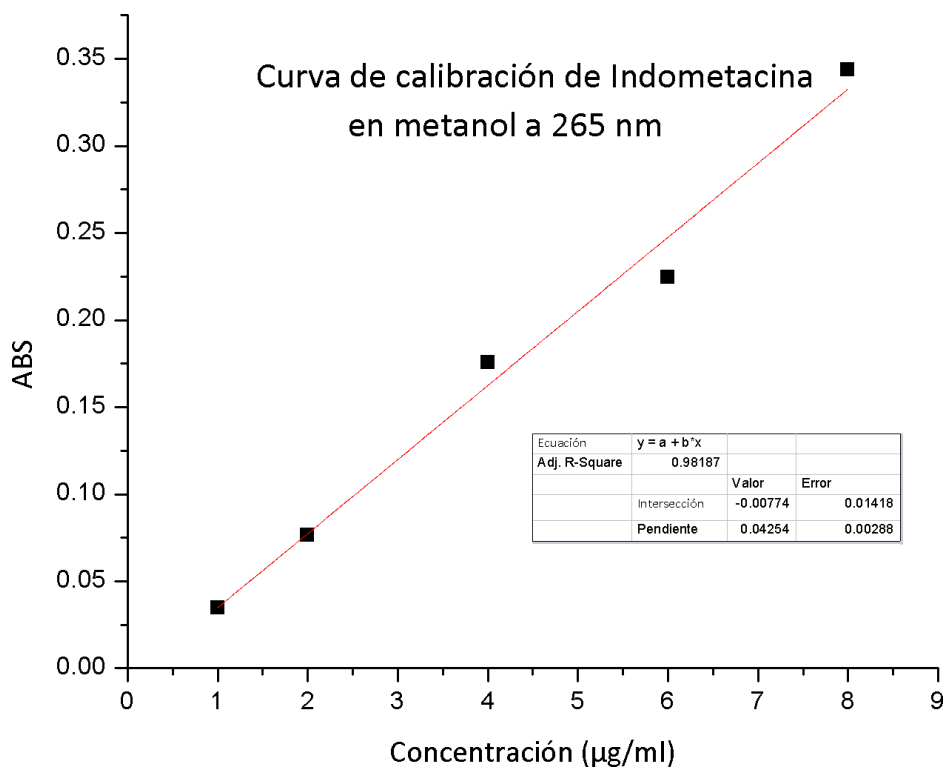


Figura 5-16. Curva de calibración de Indometacina en metanol ( $\lambda_{max}$  265 nm).

Al desintegrar las cápsulas con metanol, el valor de la absorbancia medido fue de 0.478202. Utilizando la curva de calibración de Indometacina en metanol (Figura 5-16.) encontramos que la masa total dentro de la muestra es de 57.1 µg. De esta manera reportamos una capacidad de carga (loading capacity) de las nanocápsulas de aproximadamente 41 µg por cada miligramo de la masa total de la cápsula.

Para concluir, calculamos el porcentaje liberado para cada temperatura, por consiguiente, tomamos los 57.1 µg como el total o el 100% de Indometacina y

encontramos el respectivo porcentaje para cada temperatura utilizando como referencia la Tabla 4.

A partir de la Figura 5-15 podemos observar que a temperatura ambiente ya hay una liberación de Indometacina de aproximadamente 17 % lo cual es un efecto indeseado en cualquier sistema de liberación controlada. En el caso de la temperatura corporal, 37 °C, el porcentaje de liberación es cercano al 66 %. Finalmente aplicando una temperatura de 60 °C se tiene una liberación mayor de 96%, es decir, prácticamente se libera todo el medicamento contenido.

## **5.4 Conclusiones y Perspectivas**

Fuimos capaces de preparar partículas magnéticas que permiten acarrear medicamento. Como primer paso variamos distintos parámetros en el método de nanoprecipitación con el fin de obtener nanocápsulas con la menor distribución de tamaños posible. Las condiciones óptimas según la distribución obtenida por dispersión de luz dinámica son: acetona como solvente, el procesador ultrasónico como método de agitación y sin uso de tensoactivo.

A través del análisis termogravimétrico pudimos estimar la proporción de los componentes en las nanocápsulas, ya que cerca del 15% de nuestras nanocápsulas están hechas de nanopartículas magnéticas, 75 % de PCL y 10 % de ácido oleico. Además, también concluimos que el punto de fusión del PCL es de 59.40 °C y estimamos un porcentaje de cristalización del 56.94 %.

A través del microscopio electrónico de barrido se observa que las nanocápsulas tienen forma tipo esfera y una distribución de tamaños con un promedio de aproximadamente 400 nm. El tamaño de las nanocápsulas sigue estando dentro de los parámetros necesarios para aplicaciones biomédicas.

Después de añadir el fármaco a las nanocápsulas como primer paso demostramos que éstas son capaces de liberar su contenido ante estímulos térmicos. Elegimos tres temperaturas distintas con la intención de medir la cantidad de medicina liberada en cada una de ellas, a saber, a 25 °C, 37 °C y 60 °C. Los resultados son mostrados en la Tabla 4 y como se observa en la Figura 5-15 a altas temperaturas prácticamente se libera todo el medicamento, sin embargo, observamos también un efecto no deseado, pues a temperatura corporal se libera poco más del 60 % del contenido. Por lo tanto, este es un aspecto que mejorar en nuestros nanosistemas.

Para finalizar, encontramos que la capacidad de carga de Indometacina en las nanocápsulas es de 41 µg por cada miligramo de la masa total de la cápsula. En cualquier sistema acarreador de medicamento es importante determinar cuanta medicina puede ser encapsulada en el nanosistema.

## 6 Bibliografía

- Amara, D., Grinblat, J., & Margel, S. (2012). Solventless thermal decomposition of ferrocene as a new approach for one-step synthesis of magnetite nanocubes and nanospheres. *J. Mater. Chem.*, 22(5), 2188-2195. doi:10.1039/c1jm13942h
- Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M. R., & Santamaría, J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2(3), 22-32. doi:10.1016/s1748-0132(07)70084-1
- Barry, J. J. A., Silva, M. M. C. G., Shakesheff, K. M., Howdle, S. M., & Alexander, M. R. (2005). Using Plasma Deposits to Promote Cell Population of the Porous Interior of Three-Dimensional Poly(D,L-Lactic Acid) Tissue-Engineering Scaffolds. *Advanced Functional Materials*, 15(7), 1134-1140. doi:10.1002/adfm.200400562
- Berry, C. C., Wells, S., Charles, S., & Curtis, A. S. G. (2003). Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25), 4551-4557. doi:10.1016/s0142-9612(03)00237-0
- Biederman, H. (1987). Polymer films prepared by plasma polymerization and their potential application. *Vacuum*, 37(3-4), 367-373. doi:10.1016/0042-207x(87)90027-3
- Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(1), 67-75. doi:10.1016/j.ejps.2004.09.011
- Bretagnol, F., Lejeune, M., Papadopoulou-Bouraoui, A., Hasiwa, M., Rauscher, H., Ceccone, G., . . . Rossi, F. (2006). Fouling and non-fouling surfaces produced by plasma polymerization of ethylene oxide monomer. *Acta Biomater*, 2(2), 165-172. doi:10.1016/j.actbio.2005.11.002
- Caruso, F., Trau, D., Möhwald, H., & Renneberg, R. (2000). Enzyme Encapsulation in Layer-by-Layer Engineered Polymer Multilayer Capsules. *Langmuir*, 16(4), 1485-1488. doi:10.1021/la991161n
- Choi, S.-W., Kwon, H.-Y., Kim, W.-S., & Kim, J.-H. (2002). Thermodynamic parameters on poly(d,l-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 201(1-3), 283-289. doi:10.1016/s0927-7757(01)01042-1
- Cole, A. J., David, A. E., Wang, J., Galban, C. J., Hill, H. L., & Yang, V. C. (2011). Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting. *Biomaterials*, 32(8), 2183-2193. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.040

- Cuadros-Moreno, A. C. P., R. San Martín Martínez, E. Yañez Fernández, J. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4).
- Deepak, V., Pandian, S., Kalishwaralal, K., & Gurunathan, S. (2009). Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. *Bioresour Technol*, 100(24), 6644-6646. doi:10.1016/j.biortech.2009.06.057
- Desmet, T., Desmet, T., Morent, R., Morent, R., Geyter, N. D., Geyter, N. D., . . . Dubruel, P. (2009). Nonthermal Plasma Technology as a Versatile Strategy for Polymeric Biomaterials Surface Modification: A Review. 10(9).
- Fan, Y. F., Wang, Y. N., Fan, Y. G., & Ma, J. B. (2006). Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption. *Int J Pharm*, 324(2), 158-167. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.05.062
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1-R4. doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0
- Gallarate, M., Trotta, M., Battaglia, L., & Chirio, D. (2009). Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: preliminary studies on insulin encapsulation. *J Microencapsul*, 26(5), 394-402. doi:10.1080/02652040802390156
- Gonzales-Weimuller, M., Zeisberger, M., & Krishnan, K. M. (2009). Size-dependant heating rates of iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia. *J Magn Magn Mater*, 321(13), 1947-1950. doi:10.1016/j.jmmm.2008.12.017
- Govender, T. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57(2), 171-185. doi:10.1016/s0168-3659(98)00116-3
- Gu, H., Xu, K., Xu, C., & Xu, B. (2006). Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chemical communications (Cambridge, England)*(9), 941-949. doi:10.1039/b514130c
- Hao, R., Xing, R., Xu, Z., Hou, Y., Gao, S., & Sun, S. (2010). Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. *Adv Mater*, 22(25), 2729-2742. doi:10.1002/adma.201000260
- Hönhe, G., Hemminger, W., & Flammersheim, H. (2003). *Differential Scanning Calorimetry*. Springer.
- Johnston, A. P. R., Cortez, C., Angelatos, A. S., & Caruso, F. (2006). Layer-by-layer engineered capsules and their applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(4), 203-209. doi:10.1016/j.cocis.2006.05.001
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Moller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*, 21(9), 1726-1732. doi:10.1021/tx800064j
- Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., & Moller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett*, 188(2), 112-118. doi:10.1016/j.toxlet.2009.03.014
- Kodama, R. H. (1999). Magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 200(1-3), 359-372. doi:10.1016/s0304-8853(99)00347-9

- Kortshagen, U. R., Sankaran, R. M., Pereira, R. N., Girshick, S. L., Wu, J. J., & Aydil, E. S. (2016). Nonthermal Plasma Synthesis of Nanocrystals : Fundamental Principles , Materials , and Applications. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00039
- Krishnan, K. M. (2010). Biomedical nanomagnetism: A spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE Transactions on Magnetics*, 46(7), 2523-2558. doi:10.1109/TMAG.2010.2046907
- Kularatne, B. Y., Lorigan, P., Browne, S., Suvana, S. K., Smith, M. O., & Lawry, J. (2002). Monitoring tumour cells in the peripheral blood of small cell lung cancer patients. *Cytometry*, 50(3), 160-167. doi:10.1002/cyto.10071
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, a., Robic, C., Elst, L. V., & Muller, R. N. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications (vol 108, pg 2064, 2008). *Chemical Reviews*, 108, 2064-2110. doi:Doi 10.1021/Cr900197g
- Lee, J. S., Hwang, S. J., Lee, D. S., Kim, S. C., & Kim, D. J. (2009). Formation of poly(ethylene glycol)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanoparticles via Nanoprecipitation. *Macromolecular Research*, 17(2), 72-78. doi:10.1007/bf03218657
- Levy, L., Sahoo, Y., Kim, K.-S., Bergey, E. J., & Prasad, P. N. (2002). Nanochemistry: Synthesis and Characterization of Multifunctional Nanoclinics for Biological Applications. *Chemistry of Materials*, 14(9), 3715-3721. doi:10.1021/cm0203013
- Li, L. (2014). *Studies on "Perfect" Hyperbranched Chains Free in Solution and Confined in a Cylindrical Pore*: Springer International Publishing.
- Li, Z., Chen, H., Bao, H., & Gao, M. (2004). One-Pot Reaction to Synthesize Water-Soluble Magnetite Nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 16(8), 1391-1393. doi:10.1021/cm035346y
- Li, Z., Sun, Q., & Gao, M. (2004). Preparation of water-soluble magnetite nanocrystals from hydrated ferric salts in 2-pyrrolidone: mechanism leading to Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(1), 123-126. doi:10.1002/anie.200460715
- Limayem Blouza, I., Charcosset, C., Sfar, S., & Fessi, H. (2006). Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, 325(1-2), 124-131. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.06.022
- Lopez, G. P., Ratner, B. D., Tidwell, C. D., Haycox, C. L., Rapoza, R. J., & Horbett, T. A. (1992). Glow discharge plasma deposition of tetraethylene glycol dimethyl ether for fouling-resistant biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*, 26(4), 415-439. doi:10.1002/jbm.820260402
- Lu, A.-H., Salabas, E. L., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 46(8), 1222-1244. doi:10.1002/anie.200602866
- Macario, E. (2008). La teoría de Flory-Huggins en la ingeniería de soluciones y mezclas de polímeros.
- Mahdavi, M., Ahmad, M. B., Haron, M. J., Namvar, F., Nadi, B., Rahman, M. Z., & Amin, J. (2013). Synthesis, surface modification and characterisation of

- biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules*, 18(7), 7533-7548. doi:10.3390/molecules18077533
- Maneeratanasarn, P., Van Khai, T., Kim, S. Y., Choi, B. G., & Shim, K. B. (2013). Synthesis of phase-controlled iron oxide nanoparticles by pulsed laser ablation in different liquid media. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, 210(3), 563-569. doi:10.1002/pssa.201228427
- Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetism*, 17(2), 1247-1248. doi:10.1109/tmag.1981.1061188
- Meng, F. T., Ma, G. H., Qiu, W., & Su, Z. G. (2003). W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of Controlled Release*, 91(3), 407-416. doi:10.1016/s0168-3659(03)00273-6
- Moinard-Chécot, D., Chevalier, Y., Briançon, S., Beney, L., & Fessi, H. (2008). Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science*, 317(2), 458-468. doi:10.1016/j.jcis.2007.09.081
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2), 113-142. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
- Nasongkla, N., Bey, E., Ren, J., Ai, H., Khemtong, C., Guthi, J. S., . . . Gao, J. (2006). Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Lett*, 6(11), 2427-2430. doi:10.1021/nl061412u
- Ogawa, Y., Yamamoto, M., Okada, H., Yashiki, T., & Shimamoto, T. (1988). A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36(3), 1095-1103. doi:10.1248/cpb.36.1095
- Ourique, A. F., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Beck, R. C. (2008). Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int J Pharm*, 352(1-2), 1-4. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.12.035
- Pankhurst, Q. a., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(13), R167-R181. doi:10.1088/0022-3727/36/13/201
- Qiao, R., Yang, C., & Gao, M. (2009). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. *Journal of Materials Chemistry*, 19(35). doi:10.1039/b902394a
- Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm*, 24(12), 1113-1128. doi:10.3109/03639049809108571
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., & Fessi, H. (1998). *Pharmaceutical Research*, 15(7), 1056-1062. doi:10.1023/a:1011934328471
- Raffin Pohlmann, A., Weiss, V., Mertins, O., Pesce da Silveira, N., & Stanisçuaski Guterres, S. (2002). Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: Development, stability evaluation and

- nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(4-5), 305-312. doi:10.1016/S0928-0987(02)00127-6
- Roca, A. G., Morales, M. P., O'Grady, K., & Serna, C. J. (2006). Structural and magnetic properties of uniform magnetite nanoparticles prepared by high temperature decomposition of organic precursors. *Nanotechnology*, 17(11), 2783-2788. doi:10.1088/0957-4484/17/11/010
- Rosensweig, R. E. (1987). Magnetic Fluids. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 19(1), 437-461. doi:10.1146/annurev.fl.19.010187.002253
- Rosensweig, R. E. (2002). Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252(1-3 SPEC. ISS.), 370-374. doi:10.1016/S0304-8853(02)00706-0
- Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., Dalla-Costa, T., & Guterres, S. I. S. (2003). Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56(3), 501-505. doi:10.1016/s0939-6411(03)00139-5
- Schick, C. (2009). Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. *Anal Bioanal Chem*, 395(6), 1589-1611. doi:10.1007/s00216-009-3169-y
- Schladt, T. D., Schneider, K., Schild, H., & Tremel, W. (2011). Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 40(24), 6315-6343. doi:10.1039/c0dt00689k
- Shamay, Y., Paulin, D., Ashkenasy, G., & David, A. (2009). E-selectin binding peptide-polymer-drug conjugates and their selective cytotoxicity against vascular endothelial cells. *Biomaterials*, 30(32), 6460-6468. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.013
- Simovic, S., Losic, D., & Vasilev, K. (2010). Controlled drug release from porous materials by plasma polymer deposition. *Chem Commun (Camb)*, 46(8), 1317-1319. doi:10.1039/b919840g
- Siow, K. S., Britcher, L., Kumar, S., & Griesser, H. J. (2006). Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review. *Plasma Processes and Polymers*, 3(6-7), 392-418. doi:10.1002/ppap.200600021
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (1998). *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(1-2), 1-20. doi:10.1016/S0168-3659(00)00339-4
- Stuart, B. (2002). *Polymer Analysis*: John Wiley & Sons.
- Sukhorukov, G. B., Donath, E., Lichtenfeld, H., Knippel, E., Knippel, M., Budde, A., & Möhwald, H. (1998). Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 137(1-3), 253-266. doi:10.1016/s0927-7757(98)00213-1
- T, J. (2016). The Formation of Doxorubicin Loaded Targeted Nanoparticles using Nanoprecipitation, Double Emulsion and Single Emulsion for Cancer



- Treatment. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 7(3). doi:10.4172/2157-7439.1000379
- Tewes, F., Munnier, E., Antoon, B., Ngaboni Okassa, L., Cohen-Jonathan, S., Marchais, H., . . . Chourpa, I. (2007). Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66(3), 488-492. doi:10.1016/j.ejpb.2007.02.016
- Vernon-Parry, K. D. (2000). Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review*, 13(4), 40-44. doi:10.1016/s0961-1290(00)80006-x
- Voutou, B., Stefanaki, E.-c., & Giannakopoulos, K. (2008). Electron Microscopy : The Basics. *Physics of Advanced Materials Winter School*, 1-11.
- Wang, Z., Liu, Y., & Zeng, X. (2006). One-step synthesis of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles by laser ablation. *Powder Technology*, 161(1), 65-68. doi:10.1016/j.powtec.2005.08.037
- Williams, D. B., & Carter, C. B. (2009). *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science* (Vol. V1-V4).
- Willis, A. L., Turro, N. J., & O'Brien, S. (2005). Spectroscopic Characterization of the Surface of Iron Oxide Nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 17(24), 5970-5975. doi:10.1021/cm051370v
- Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397-415. doi:10.1007/s11671-008-9174-9
- Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., & Kim, W.-S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(2). doi:10.1088/1468-6996/16/2/023501
- Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2010). Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *J Colloid Interface Sci*, 351(1), 19-29. doi:10.1016/j.jcis.2010.05.022
- Yang, P., Zhang, J., & Guo, Y. (2009). Synthesis of intrinsic fluorescent polypyrrole nanoparticles by atmospheric pressure plasma polymerization. *Applied Surface Science*, 255(15), 6924-6929. doi:10.1016/j.apsusc.2009.03.016
- Yoshida, S., Hagiwara, K., Hasebe, T., & Hotta, A. (2013). Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release. *Surface and Coatings Technology*, 233, 99-107. doi:10.1016/j.surfcoat.2013.02.042



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00076

Matrícula: 2152801068

PARTÍCULAS COMPUESTAS PARA  
LIBERACIÓN DE FÁRMACOS  
ACTIVADA MEDIANTE ESTÍMULOS  
TÉRMICOS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 11 del mes de julio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. MAURICIO ORTEGA LOPEZ  
DR. ROBERTO OLAYO VALLES  
DR. PEDRO DIAZ LEYVA



LUIS ENRIQUE GONZALEZ CALDERON  
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (FISICA)

DE: LUIS ENRIQUE GONZALEZ CALDERON

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*aprobar*

REVISO

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. MAURICIO ORTEGA LOPEZ

VOCAL

DR. ROBERTO OLAYO VALLES

SECRETARIO

DR. PEDRO DIAZ LEYVA