



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN QUÍMICA

**Síntesis de Nanopartículas Magnéticas
Multifuncionales y sus aplicaciones en
Biomedicina**

Bqca. Pamela Azcona

BAHÍA BLANCA.....ARGENTINA

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN QUÍMICA

**Síntesis de Nanopartículas Magnéticas
Multifuncionales y sus aplicaciones en
Biomedicina**

Bqca. Pamela Azcona

BAHÍA BLANCA.....ARGENTINA

2019

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto de Química del Sur (INQUISUR) dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur durante el período comprendido entre el 15 de Julio de 2014 y el 1 de Abril de 2019, bajo la dirección de Dra. Verónica Lassalle, Profesora Asociada de la Universidad del Sur e Investigadora Independiente de CONICET.

Pamela Azcona

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo la calificación de(.....)</p>
---	---

A mi mamá, a mis abuelos Coco y Ofelia, a mi hermano Manuel y a Javier, por su invaluable y constante apoyo. Los amo

Agradecimientos

La culminación de esta Tesis Doctoral constituye un gran reto personal y cierra una etapa en mi vida. Es imposible no mirar atrás, hacer recuento y agradecer a todas aquellas personas e instituciones que de forma directa o indirecta han ayudado a que este momento sea posible.

Al soporte económico brindado por CONICET para el desarrollo de la presente Tesis.

A la Universidad Nacional del Sur, donde pude formarme como Bioquímica y en particular al Departamento de Química que me abrió sus puertas para desarrollar mi tarea como docente y para especializarme como Doctora en Química.

A mi directora de Tesis, Dra. Verónica Lassalle, por invitarme a formar parte de, aquel entonces, su pequeño grupo de investigación. Gracias Vero por tu confianza, pero sobre todo gracias por tu paciencia y tú valioso aporte a mi crecimiento profesional.

Al Dr. Roberto Zysler (Centro Atómico Bariloche-Instituto Balseiro) por la realización de la caracterización magnética de las nanopartículas.

Al Dr. Ignacio López Corral (INQUISUR-UNS/CONICET) por la realización y discusión de los estudios teóricos de DFT.

Al Dr. Ariel Zwenger, jefe del servicio de oncología del Hospital Castro Rendón de la provincia de Neuquén, por la donación de las ampollas de Doxorubicina comercial empleadas en este trabajo de Tesis.

Al Dr. Marcos Grünhut (INQUISUR-UNS/CONICET) por su colaboración en el diseño, armado y puesta en funcionamiento del SFC.

Al Lic. Adolfo Giles (iNOVA) por la realización de las medidas de RMI en el equipo clínico.

A la Dra. Ma. Gabriela Montiel Schneider (INQUISUR-UNS/CONICET) por su asesoramiento en la preparación y medición de las muestras para RMI y su ayuda en el análisis de los datos.

A la doctorando Daniela Igartúa y a su directora, la Dra. Ma. Jimena Prieto (UNQ-IMBICE, CONICET), por la realización de los ensayos de biocompatibilidad en el modelo de *zebrafish*, el procesamiento de los datos y su buena predisposición para la discusión de los mismos.

A las Dras. Ma. Julia Martín (INQUISUR-UNS/CONICET) y Claudia Gentili (INBIOSUR- UNS/CONICET) por los ensayos llevados a cabo en la línea celular HCT116 y su invaluable asesoramiento en el análisis de los datos.

A todas las integrantes del grupo de trabajo Nanomateriales Magnéticos. En particular a Nati por tener siempre un oído, por tu disposición a ayudar tanto en lo académico como en lo personal y tus carcajadas contagiosas. Sos una persona increíble, NUNCA lo olvides.

A las Dras. Mariela Agotegaray y Fernanda Horst quienes desde el primer momento fueron testigos de mi trabajo, mis enojos, mis llantos, pero también de mis alegrías y mis logros. Gracias Mari por estos cuatro años compartidos en la oficina, por las charlas, las risas, por apoyarme cada vez que lo necesité, por tus palabras tranquilizadoras, por los sahumeros inspiradores, sos una gran compañera. Gracias Fer, por estar ahí, por acompañarme siempre incluso cuando ni yo misma me soportaba, por los abrazos en los momentos justos, y lo más importante, por tu confianza al concederme el privilegio de acompañar a Milagros en su crecimiento. Te quiero mucho amiga de mi alma.

A la Mg. Elba García, mi compañera de oficina, por todos los momentos y las anécdotas compartidas, te aprecio muchísimo.

A la Dra. Mariana Alvarez, por tener siempre un ratito para escucharme, para una buena charla junto con un rico mate. Por su sonrisa, por estar presente. Marianita, te admiro y respeto muchísimo tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias por contribuir a mi crecimiento en estos años de trabajo.

A mis amigos del trabajo, de la universidad, y de la vida, por estar siempre presentes.

A la gente de docencia que me hizo crecer profesionalmente y en la cual encontré grandes amigos.

A mi mamá, mis abuelos Coco y Ofelia, y mi hermano Manuel, que sin ellos no hubiese podido llegar hasta acá. Por ser mis ejemplos de esfuerzo, de dar lo mejor de mí misma y por estar siempre cerca, a pesar de vernos poco. Los amo.

A la infaltable tía Inés quien supo acompañarme desde el inicio de mis estudios de grado. Por su compañía, su cariño, por sus comidas exquisitas. Gracias por tanto “negrita” y perdón por mis ausencias. Te quiero muchísimo.

Y finalmente, a Javier. Porque sin tu apoyo incondicional, tu inmensa paciencia, tu confianza ciega en mis capacidades, tu ejemplo de perseverancia y esfuerzo, sin dudas hubiese sido muy difícil obtener mi título de grado y completar esta Tesis Doctoral. Gracias amor mío por estar SIEMPRE presente, por darme la mano para no caer, por las risas, por los llantos, por las rosas en la mesa de entrada del Departamento de Química. Por estos 11 años. Te amo.

Resumen

El objetivo de esta Tesis es diseñar sistemas multifuncionales que combinen funciones de diagnóstico y terapia, o teranósticos, a base de nanopartículas magnéticas (NPMs) de óxido de hierro (magnetita/maghemita) para su potencial aplicación en patologías oncológicas.

Para ello se realizó un trabajo experimental que involucró la optimización de las metodologías de síntesis de las NPMs y la posterior incorporación secuencial de los distintos componentes, en conjunto con las caracterizaciones y ensayos tendientes a evaluar su funcionalidad en cada etapa.

En primer término, se estudiaron las vías de síntesis de NPMs de manera de conseguir un control sobre las propiedades fisicoquímicas, y de la estabilidad de NPMs en suspensión acuosa.

Se modificó la superficie de las NPMs con ácido fólico (AF) de manera de proporcionar a las NPMs selectividad para acumularse en células tumorales debido a que el receptor de folatos se encuentra sobreexpresado en células de varios tipos de cáncer.

En una etapa posterior, se cargaron las NPMs modificadas con AF con fármacos oncológicos para impartir la función terapéutica. La Doxorubicina (Doxo) es uno de los agentes quimioterapéuticos más efectivos usados en el tratamiento de varios tipos de cáncer. A pesar de su gran uso, varios efectos secundarios se encuentran asociados a la distribución sistémica de este fármaco una vez administrado. Estos efectos secundarios están relacionados con la necesidad de administrar dosis elevadas del fármaco debido a la escasa selectividad y eficacia asociada con su distribución no específica en el cuerpo.

Las siguientes instancias del desarrollo de este trabajo de tesis se dedicaron a evaluar las potencialidades de los agentes teranósticos para: (i) direccionamiento mediado por un campo magnético; (ii) actuar como medio de contraste en diagnóstico por imagen mediante resonancia magnética (RMI), (iii) ejercer su acción terapéutica.

En el *Capítulo I* se introducen los conceptos básicos sobre nanotecnología, nanociencia y nanomateriales. Se describen en mayor detalle las razones por las cuales se seleccionaron las NPMs para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Dentro del conjunto de NPMs se puntualiza en las de óxido de hierro, en particular, magnetita (MAG, Fe_3O_4). Los métodos de síntesis de este óxido de hierro son

brevemente reseñados, profundizando en la técnica de co-precipitación. Además se describen las diferentes estrategias de estabilización y funcionalización del núcleo magnético.

Se resumen las aplicaciones de las NPMs en biomedicina. En este sentido, se describen las ventajas de las mismas como herramientas de diagnóstico, al actuar como agentes de contraste en RMI. También se muestran las formas de vectorización de fármacos mediante el empleo de NPMs y se enuncian las habilidades de las nanoformulaciones descriptas para actuar como agentes teranósticos.

Finalmente se enumeran el objetivo general y los objetivos específicos, así como la hipótesis planteada en esta tesis.

En el *Capítulo II* se describen los reactivos empleados y las técnicas de caracterización aplicadas a las diferentes nanoformulaciones junto con el tratamiento necesario de las muestras en cada caso.

El *Capítulo III* se dedicó al estudio de las metodologías de síntesis, estabilización y control de la estabilidad de las NPMs de MAG. Se describen los resultados obtenidos al emplear dos métodos de síntesis: co-precipitación y su variante reducción-precipitación, con el fin de seleccionar una metodología adecuada para la obtención de NPMs de MAG en función de las aplicaciones propuestas. En base a los resultados, se seleccionó la técnica de co-precipitación como la más adecuada, y se incluyó un estudio exhaustivo de las variables experimentales asociadas a dicha técnica con el propósito de conseguir un control de las propiedades fisicoquímicas. Este análisis involucró el estudio de los mecanismos que conducen a la formación de las NPMs de MAG así como una completa caracterización y los ensayos necesarios para evaluar la estabilidad, en términos de la evolución del diámetro hidrodinámico (DH) en función del tiempo de almacenamiento en suspensión acuosa. En el *Anexo I* se informan los resultados que complementan a este capítulo.

En el *Capítulo IV* se estudió la incorporación de un ligando selectivo, la vitamina B₉ ó AF, a la superficie de MAG, previamente funcionalizada con 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS). Para ello se evaluaron dos metodologías: la adsorción simple del AF y el anclaje covalente mediado por carbodiimida. Se combinaron los datos experimentales obtenidos con estudios teóricos. Esto permitió adquirir conocimientos acerca del mecanismo de interacción AF-MAG@APTS y corroborar la disponibilidad del grupo selectivo del AF posterior a su incorporación a la superficie de MAG@APTS. En una segunda instancia, se estudió la estabilidad de las nanoformulaciones obtenidas de

acuerdo a dos criterios: (i) evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento en dispersión acuosa y (ii) estudio de la capacidad de retención del AF incorporado. Finalmente, se incluye un estudio tendiente a predecir el comportamiento de las nanoformulaciones en un medio que simula el plasma sanguíneo en términos de osmolaridad, pH y contenido de proteína.

En el Capítulo V se presentan y discuten los ensayos realizados para proveer a las nanoformulaciones de la acción terapéutica necesaria para constituir un agente teranóstico. La carga de la droga se realizó mediante adsorción superficial, explorando la influencia de diferentes parámetros asociados a dicho procedimiento. Se evaluó la liberación de Doxo *in vitro* mediante la implementación de una metodología que intenta simular la ruta que debería atravesar la nanoformulación una vez inyectada, vía intravenosa, en el torrente sanguíneo hasta su acumulación en el tumor.

En el Capítulo VI se investigó la habilidad de las NPMs, presentadas en los Capítulos IV y V, para ser guiadas magnéticamente al exponerlas a un campo magnético externo mediante ensayos *in vitro*. Se propuso el empleo de un sistema de flujo continuo acoplado a un espectrofotómetro Uv-Visible, con el objetivo de monitorear la disminución del contenido de NPMs de la dispersión estudiada como consecuencia de la retención de las mismas por acción de un imán de NdFeB colocado en el sitio blanco. En este capítulo, se analizó además, la capacidad de las nanoformulaciones como agentes de contraste. Se determinó la eficiencia de contraste de cada formulación, comparando los valores obtenidos con los correspondientes a agentes de contrastes comerciales.

En el Capítulo VII se incluyen ensayos *in vitro*, empleando una línea celular de cáncer colorrectal (CCR), con el fin de evaluar la capacidad del nanoteranóstico preparado de inhibir el crecimiento celular, a través de la internalización y la posterior liberación de droga en forma intracelular. En este mismo capítulo, se presentan, como complemento, los resultados correspondientes al estudio de la biocompatibilidad de las mismas nanoformulaciones utilizando un modelo animal de *zebrafish*. En el Anexo II se informan los resultados que complementan a este capítulo.

Finalmente, en el Capítulo VIII, se puntualizan las conclusiones generales abordadas a partir de los resultados obtenidos y analizados en cada uno de los capítulos. Se definen además, los lineamientos de la proyección de futuros trabajos.

Abstract

The aim of this thesis is to design multifunctional nanosystems combining the diagnostic and therapy or theranostics, based on magnetic nanoparticles (MNPs) of iron oxide (magnetite/maghemite) for their potential application in the treatment of oncological pathologies.

To this end, an experimental work involving the optimization of MNPs synthetic procedures followed by a sequential incorporation of different components was performed.

The synthesis of MNPs was carefully studied in order to achieve a control on their physicochemical properties and stability in aqueous suspension.

The folate receptor is overexpressed in several types of tumor cells. Therefore, MNPs surface was modified with folic acid (FA) to provide them selectivity and affinity towards tumor cells.

At a later stage, MNPs modified with FA were loaded with an oncological drug aiming to impart them therapeutic function. Doxorubicin (Doxo) is one of the most effective and used chemotherapeutic agents for the treatment of many types of cancer. In spite of this, several side effects are associated with the systemic distribution of this drug once administrated. These unwanted effects are related to large drug dosage, poor selectivity and low efficiency associated to the non specific distribution of drugs in the body.

The following instances comprising this work were devoted to evaluate the capabilities of the theranostic agents concerning: (i) *in vitro* magnetic targeting, (ii) diagnostic as contrast agent for imaging magnetic resonance (MRI); (iii) therapeutic functions.

In *Chapter I*, the fundamental concepts regarding the nanotechnology, nanoscience and nanomaterials are introduced. The abilities of MNPs to these kinds of applications are emphasized, justifying their selection for the development of this thesis.

Magnetite (MAG, Fe₃O₄) was employed to formulate the MNPs. The methods of synthesis are briefly reviewed, highlighting the co-precipitation technique. Besides, different stabilization and functionalization strategies of the magnetic core are described.

The applications of MNPs in biomedicine are summarized. Their capabilities as contrast agents in RMI, and target drug delivery are presented, as well as their potential as theranostic agents.

Finally, the hypothesis followed by the general and specific objectives is defined.

Chapter II describes all reagents and solvents employed in this work. Besides, the techniques used for the nanoparticles characterizations are described together with preparative treatment of the samples for each one.

In *Chapter III*, the study of the synthesis methodologies, and stabilization of MAG are presented. Two methods of obtention are described; co-precipitation and its reduction-precipitation, both were evaluated in order to select a suitable methodology for achieving MAG. The co-precipitation technique was chosen based on the reached results. An exhaustive study of the experimental conditions associated to this methodology was included. This analysis involved the study of MAG formation mechanisms as well as a complete structural and surface characterization. The necessary tests to evaluate the stability, in terms of the evolution of the hydrodynamic diameter (HD) as a function of the storage time in aqueous suspension were performed. Complementary results are reported in *Annex I*.

In *Chapter IV* the incorporation of FA to MAG surface, previously modified with APTS, was studied aiming to provide selectivity towards folate receptors. To do this, two methodologies were evaluated: simple adsorption and covalent linkage. The obtained experimental data were combined with theoretical studies to gain knowledge about the possible mechanisms to FA-MAG@APTS linkage. These data also provided evidence regarding the availability of the selective FA group after its incorporation into the MAG@APTS surface. The stability of the obtained nanoformulations was studied based on two criteria: (i) the evolution of the HD as a function of the storage time in aqueous dispersion and (ii) the study of the FA retention. Finally, a study tending to predict the behavior of nanoformulations in a medium simulating blood plasma in terms of osmolarity, pH and albumin content was developed. In this sense, the aggregation trend and the nanosystems stability were the analyzed parameters.

In *Chapter V*, the assays devoted to provide the nanoformulations with therapeutic action are presented and discussed. The loading of the drug (Doxo) was carried out by simple adsorption. The influence of different parameters associated with the reaction was explored. The release of Doxo was analyzed by implementing an

original procedure to simulate the pathways followed by MNPs once intravenously administered.

In Chapter VI, the magnetic target ability of MNPs presented in Chapters IV and V, was *in vitro* investigated. To achieve this, a novel continuous flow system was fabricated to quantify the amount of MNPs retained in the magnet site in an environment mimicking the bloodstream. On the other hand, the efficiency of the nanosystems as selective contrast agents in MRI was analyzed using a clinical equipment.

Chapter VII includes *in vitro* tests, using a human colorectal cancer cell line (CCR). The evaluated parameters were the MNPs internalization, cellular viability and the therapeutic action of the MNPs loaded Doxo. On the other hand, the results corresponding to biocompatibility studies of the same nanoformulations *in vivo* are presented. To this end an animal model, zebrafish (*Danio rerio*), was implemented. Complementary results are reported in Annex II.

Finally, Chapter VIII lists the overall conclusions of this investigation work and establishes the guidelines for the future works.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Lista de abreviaturas

NPMs	Nanopartículas magnéticas
H	Campo magnético
Mg	Magnetización
Ms	Magnetización de saturación
Hc	Coercitividad
Mr	Magnetización remanente
χ_{ini}	Susceptibilidad magnética inicial
Tb	Temperatura de bloqueo
MAG	Magnetita
MAGH	Maghemita
SRE	Sistema reticuloendotelial
RMI	Resonancia magnética por imágenes
AC	Agente de contraste
T ₁	Tiempo de relajación longitudinal
T ₂	Tiempo de relajación transversal
AC T ₁	AC que disminuye el tiempo de relajación longitudinal
AC T ₂	AC que disminuye el tiempo de relajación transversal
DH	Diámetro hidrodinámico
EPR	Efecto de permeabilidad y retención aumentada
Nd	Neodimio
SDS	Dodecilsulfato de sodio
AF	Ácido fólico
Doxo	Doxorubicina
AA	Ácido acético
APTS	3-aminopropiltriétoxilano
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ASB	Abúmina sérica bovina
XRD	Difracción de rayos x
FTIR	Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier
DLS	Dispersión de luz dinámica

IPD	Índice de polidispersión
ζ pot	Potencial zeta
PI	Punto isoeléctrico
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UV-Vis	Espectroscopía molecular Ultravioleta-Visible
EAA	Espectroscopía de Absorción atómica de llama
TGA	Análisis termogravimétrico
VSM	Magnetómetro de muestra vibrante
IP	Intraperitoneal
CMC	Concentración micelar crítica
AB	Agua bidestilada
DE	Desviación estandar
RF	Receptor de folato
α RF	Isoforma α del receptor de folato
Anillo PT	Anillo pteridínico
DCU	Diciclohexilurea
PBS	Buffer fosfato salino
MAG@APTS	Magnetita modificada con 3-aminopropiltriétoxissilano
"E"	Muestra obtenida por anclaje covalente de AF a la superficie de MAG@APTS
FFS	Fluido fisiológico simulado
SR	Solución Ringer lactato
IV	Intravenosa
ACMF	Campo magnético de corriente alterna
HFMF	Campo magnético de alta frecuencia
SEMF	Campo magnético externo estático
%EC	Porcentaje de eficiencia de carga
%CC	Porcentaje de capacidad de carga
SFC	Sistema de flujo continuo
PFM	Punto de focalización magnética
r_2	Relaxividad o capacidad de relajación de un AC
d _{pf}	Días posteriores a la fecundación
h _{pf}	Horas posteriores a la fecundación

hpi	Horas posteriores a la incubación
Medio DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco, comúnmente empleado para cultivo celular
SFB	Suero fetal bovino
Medio E3	Medio de cultivo de larvas de <i>zebrafish</i> compuesto por NaCl 5.0mmol.L ⁻¹ , KCl 0.17 mmol.L ⁻¹ , CaCl ₂ 0.33 mmol.L ⁻¹ y MgSO ₄ 0.33 mmol.L ⁻¹ en agua desionizada y 50.0 ppb de azul de metileno como fungicida.

Lista de figuras

Figura 1.1 La nanoescala y los diferentes tipos de nanoestructuras.

Figura 1.2 Curva de magnetización de un sólido ferromagnético (línea completa) y de un sólido superparamagnético (línea de puntos).

Figura 1.3. Estructura cristalina tipo espinela de la magnetita y de la maghemita.

Figura 1.4 Diagrama de LaMer donde se observa la evolución de la concentración de especies precursoras durante las etapas de nucleación y crecimiento.

Figura 1.5 Mecanismos probables de crecimiento de núcleos de MAG.

Figura 1.6 Mecanismo de la formación de partículas uniformes en una solución. **Curva (A)**: nucleación y crecimiento uniforme por difusión (modelo clásico de LaMer y Dinegar). **Curva (B)**: nucleación, crecimiento y agregación de subunidades más pequeñas. **Curva (C)**: nucleación múltiple y crecimiento de maduración de Ostwald.

Figura 1.7 Tipos de estabilización coloidal.

Figura 1.8 Diferentes compuestos empleados como agentes de recubrimiento para NPMs.

Figura 1.9 Esquema representativo de una nanopartícula multifuncionalizada con diversas moléculas biológicas con potencial para ser empleada como teranóstico.

Figura 1.10 Representación esquemática de los caminos seguidos en nanomedicina personalizada

Figura 1.11 Resonador de uso clínico e imágenes de ensayos fantomas usando NPMs como AC para T_1 y T_2 .

Figura 1.12 Representación esquemática de diferentes estrategias de vectorización. (i) La vectorización pasiva basada en el fenómeno EPR. (ii) La vectorización activa. (iii) La vectorización mediada por estímulos magnéticos.

Figura 2.1 Distintos modos de vibración de una molécula triatómica.

Figura 2.2 Esquema de la secuencia de pasos durante todo el trabajo experimental para obtener el espectro FTIR de una muestra.

Figura 2.3 Representación del comportamiento de la luz al interactuar con partículas pequeñas o grandes en suspensión.

Figura 2.4 Representación de la diferencia entre el DH y el tamaño del núcleo de la partícula medido por microscopia.

Figura 2.5 Distribuciones de DH de una misma muestra expresadas en número, volumen o intensidad.

Figura 2.6 Celda de poliestireno utilizada para la medición de diámetro hidrodinámico de dispersiones en medio acuoso.

Figura 2.7 Evolución del DH en función de la concentración de la dispersión.

Figura 2.8 Fotografía del instrumento Malvern Zetasizer utilizado durante el desarrollo del trabajo experimental.

Figura 2.9 Representación de la doble capa eléctrica alrededor de una partícula cargada negativamente.

Figura 2.10 Imagen del instrumento junto con la celda para la medida de ζ pot.

Figura 2.11 Representación de un microscopio electrónico de transmisión

Figura 2.12 Imágenes de (a) rejilla sobre la cual se colocan las muestras y (b) microscopio TEM JEOL 100 CX II.

Figura 2.13 Imágenes de (a) celda de cuarzo utilizada para la realización de las medidas y (b) Instrumento Agilent Technologies 8453A.

Figura 2.14 Imagen del equipo GBC Avanta 932, utilizado durante el desarrollo del trabajo de tesis.

Figura 2.15 Imagen (a) Equipo Rigaku DTA-TAS 1000 y (b) pequeña cápsula de platino (portamuestra).

Figura 3.1 Estructura química del SDS.

Figura 3.2 Posibles mecanismos de estabilización en medio acuoso ejercidos por el SDS sobre (a) NPMs de naturaleza hidrofílica (Adaptado de [44]).(b) NPMs hidrofóbicas (Adaptado de [40]).

Figura 3.3 Difractogramas de MAG-7 y MAG-2.

Figura 3.4 Difractogramas de Maghemita en fase cúbica (JCPDS 39-1346) y Magnetita (JCPDS 19-629) utilizando radiación $\text{Cu}(K\alpha = 1,5406 \text{ \AA})$.

Figura 3.5 Perfil de potencial zeta vs pH correspondientes a MAG-7

Figura 3.6 Micrografías TEM de MAG-2 y MAG-7 (270000x)

Figura 3.7 Difractogramas de (a) MAG-7 y MAG-1, y (b) MAG-8.

Figura 3.8 (a) Espectro FTIR de SDS puro. (b) Espectros FTIR de MAG-7, MAG-1 y MAG-8.

Figura 3.9 Micrografías TEM y curvas de distribución de tamaños por DLS correspondientes a (a) MAG-7, (b) MAG-1 y (c) MAG-8. Escala = 20 nm. (270000x)

Figura 3.10 (a) FTIR de MAG-1 y MAG-1.1. (b) Micrografías TEM (270000x) y curvas de distribución de tamaños por DLS correspondientes a MAG-1.1

Figura 3.11 Influencia de la concentración nominal de SDS empleada durante la reacción en el (a) DH e (b) IPD de las nanopartículas de MAG.

Figura. 3.12 Curva de magnetización vs campo aplicado (a) MAG-7. (b) MAG-8

Figura 3.13 Micrografía TEM de MAG-1 y MAG-6 (270000x)

Figura 3.14 (a) Comparación de DH de MAG-1 y MAG-6.(Inserto en el gráfico se muestran los valores de IPD) (b) Comparación de ζ pot de MAG-1 y MAG-6.

Figura 3.15 Difractogramas correspondientes a muestras obtenidas por co-precipitación directa. MAG-7 (NaOH 5mol.L⁻¹), MAG-4 (NH₄OH 5mol.L⁻¹, 1.38x10⁻³ moles de SDS) y MAG-1 (NaOH 5mol.L⁻¹, 1.38x10⁻³ moles de SDS).

Figura 3.16 Micrografías TEM de MAG-1 y MAG-4 (270000x)

Figura 3.17 Curvas de magnetización vs campo aplicado (a) MAG-7 (b) MAG-4

Figura 3.18 Micrografías TEM de MAG-4 y MAG-9 (270000x).

Figura 3.19 Comparación de DH de MAG-4 y MAG-9 (Inserto en el gráfico se muestran los valores de IPD).

Figura 3.20 Espectro FTIR de MAG-5

Figura 3.21 Gráfico comparativo de la composición, en términos del contenido de Fe, de todas las muestras obtenidas por co-precipitación directa y la muestra obtenida por co-precipitación inversa.

Figura 3.22 XRD de MAG-1 y de MAG-5

Figura 3.23 Curva de ζ pot vs pH obtenida para MAG-7 y MAG-5.

Figura 3.24 Micrografía TEM de MAG-5. (270000x)

Figura 3.25 Curva de magnetización vs campo aplicado de (a) MAG-7 y (b) MAG-5

Figura 3.26 Evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento.

Figura 4.1 Esquema de captación celular de AF mediada por receptor.

Figura 4.2 Molécula de AF

Figura 4.3 Secuencia de lavados para eliminar el compuesto DCU, generado como subproducto en la reacción de acoplamiento covalente.

Figura 4.4 Estructura química de la molécula de APTS

Figura 4.5 Silanización de la superficie de MAG con APTS

Figura 4.6 Espectro FTIR de ácido fólico. Inserto en el gráfico se muestra la estructura química del AF.

Figura 4.7 Espectros FTIR de MAG y MAG@APTS

Figura 4.8 (a) Espectros FTIR de las muestras obtenidas por adsorción simple de AF a MAG. (b) Espectros FTIR de muestras obtenidas por adsorción simple de AF a MAG@APTS

Figura 4.9 Estructura química de la molécula de AF. Entre paréntesis se señalan los pKa de cada grupo funcional a temperatura ambiente.

Figura 4.10 Espectros FTIR de (a) AF, (b) MAG@APTS y (c) muestras obtenidas por acoplamiento covalente del AF a MAG@APTS (E1, E2 y E3)

Figura 4.11 (a) Espectro UV-Vis de una solución de AF. (b) Espectros UV-Vis de dispersiones de MAG@APTS, E1, E2 y E3

Figura 4.12 Medidas de (a) DH medio y (b) ζ pot de MAG, MAG@APTS, E1, E2 y E3.

Figura 4.13 Micrografías de MAG, MAG@APTS y E2 (Magnificación:270000x)

Figura 4.14 Termogramas de MAG, MAG@APTS, E1, E2 y E3.

Figura 4.15 Micrografías TEM de MAG-4 y MAG-5 (270000x)

Figura 4.16 Espectro FTIR de MAG@APTS-AF2 antes y después del ensayo de estabilidad.

Figura 4.17 Comparación de los espectros FTIR antes y después de la incubación en PBS, pH7.4 (a) E1, (b) E2 y (c)E3.

Figura 4.18 Evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento en dispersión acuosa (en viales cerrados, a temperatura ambiente y al resguardo de la luz).

Figura 4.19 Comparación de los espectros FTIR antes y después de la pérdida de estabilidad, determinada en AB (a) E1, (b) E2 y (c) E3.

Figura 4.20 Esquema de interacciones (a) MAG@APTS con FFS. (b) E2 con FFS

Figura 4.21 Espectros FTIR de (a) MAG@APTS y MAG@APTS-FFS (b) E2 y E2-FFS

Figura 4.22 Termogramas de (a) MAG@APTS y MAG@APTS-FFS (b) E2 y E2-FFS.

Figura 4.23 Micrografía TEM de E2 luego de 4hs de incubación en FFS (50000x)

Figura 4.24 Valores de ζ pot de MAG@APTS y E2 antes y después del tratamiento con FFS.

Figura 4.25 DH medio de MAG@APTS, MAG@APTS-FFS, E2 y E2-FFS medidos en SR a 37°C.

Figura 4.26 Evolución del DH medio en función del tiempo, medidos en SR a 37°C.

Figura 5.1 (a) Estructura química de Doxorubicina. (b) Fotografía de Doxorubicina empleada en quimioterapia y utilizada en las experiencias detalladas en este capítulo.

Figura 5.2 Esquema de síntesis de nanoformulaciones magnéticas.

Figura 5.3 Metodología empleada para la adsorción de Doxo a la superficie de E. (SN:sobrenadante)

Figura 5.4 (a) Espectro de absorbancia de una solución de Doxo en AB. (b) Curva de calibrado de Doxo en AB

Figura 5.5 Fotografías de los recipientes una vez finalizada la liberación (a) sin imán (b) con imán

Figura 5.6 Espectros FTIR de (a) Doxo pura, (b) E y E-Doxo1, (c) E-Doxo0.5 y E-Doxo2 (d) E-Doxo6.

Figura 5.7 Espectros FTIR de MAG@APTS y MAG@APTS-Doxo

Figura 5.8 (a) Espectros Uv-Vis de soluciones de AF y Doxo (b) Espectros UV-Vis de E, E-Doxo1 y E-Doxo6. (c) magnificación de (b) en la región entre 300 y 700nm.

Figura 5.9 Dispersiones de MAG@APTS, E y E-Doxo1. Comparativamente se muestra una solución de Doxo pura.

Figura 5.10 Composición de las NPMs, en términos del contenido de Fe.

Figura 5.11 Cantidad de Doxo (μ g) adsorbida sobre la superficie de E en función del

tiempo de reacción en hs.

Figura 5.12 (a) Eficiencia de carga y (b) capacidad de carga en función de la cantidad inicial de droga puesta en contacto con E.

Figura 5.13 (a) Eficiencia de carga y (b) capacidad de carga en función de del pH del medio de reacción.

Figura 5.14 Estructura química predominante de Doxorubicina a pH=6. Entre paréntesis se señalan los valores de pKa de cada grupo funcional a temperatura ambiente y pH=6.

Figura 5.15 (a) Esquema ilustrativo de las NPMs en el torrente una vez inyectadas en el modelo animal y el perfil de liberación de Doxo a partir de E-Doxo a pH 7,4.

Figura 5.15 (b) Esquema de ingreso de E-Doxo a las células tumorales y el perfil de liberación de Doxo a pH 4.9.

Figura 5.16 Perfil de liberación de Doxo a partir de E-Doxo.

Figura 6.1 Sistema de flujo continuo. Las fotos muestran los sistemas de calentamiento y agitación (a la izquierda) y el punto de focalización magnética (a la derecha). Las flechas indican la dirección del flujo ($0.30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). El (*) señala que estos dispositivos son de fabricación propia en el laboratorio.

Figura 6.2 (a) Espectro UV-Vis de una muestra de E2. (b) Gráfico de absorbancia a 440nm vs dispersiones de E2.

Figura 6.3 Imagen de resonador magnético de uso clínico empleado para las mediciones (izquierda). Soporte donde se colocan los viales con las dispersiones a medir (derecha)

Figura 6.4 Descenso de la señal turbidimétrica (%) en función del tiempo (s)

Figura 6.5 Imágenes ponderadas en T_2 (a) E2 y (b) E4 ($TE = 270 \text{ ms}$; $TR = 2000\text{ms}$). En blanco se señalan las concentraciones, expresadas en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, de las dispersiones analizadas.

Figura 6.6 Curvas de decaimiento obtenidas para las diferentes concentraciones de (a) E2 y (b) E4.

Figura 6.7 Inverso de T_2 vs concentración de Fe de las suspensiones de nanopartículas de (a) E2 y (b) E4.

Figura 6.8 Dependencia lineal de la velocidad de relajación ($1/T_2$) con la concentración de Fe. Determinación del valor de relaxividad (r_2) (a) E2 y (b) E4.

Figura 6.9 Propiedades fisicoquímicas de (a) MAG-4 y (b) MAG-5

Figura 6.10 Representación del tiempo de relajación transversal (T_2) de E2 obtenida con y sin Doxo para una dispersión de concentración 0.2 mmol.L^{-1} de Fe.

Figura 7.1 Esquema de síntesis de nanoformulaciones magnéticas.

Figura 7.2 Línea celular derivada de CCR humano empleada como modelo experimental *in vitro*.

Figura 7.3 Esquema de desarrollo del *zebrafish* y ensayos de biocompatibilidad.

Figura 7.4 Efecto de MAG, E, E-Doxo y Doxo libre sobre la viabilidad de las células HCT 116.

Figura 7.5 Células HCT116 incubadas con E-Doxo (concentración de Doxo final liberada= $1 \mu\text{mol. L}^{-1}$) a distintos tiempos de incubación, y teñidas con azul de Prusia. (Magnificación 400x)

Figura 7.6 Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células HCT 116 incubadas con Doxo libre ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) o E-Doxo ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ = concentración final de Doxo liberada). De (a) a (d) se observan las imágenes adquiridas a diferentes tiempos de exposición. Las células indicadas por flechas con cromatina fragmentada, condensada y teñida intensamente son típicas de apoptosis. (Magnificación 400x)

Figura 7.7 Viabilidad de larvas de *zebrafish* expuestas a Doxo, E-Doxo o E.

Figura 7.8 Neurotoxicidad de Doxo, E-Doxo y E estudiados como cambios en el movimiento espontáneo en larvas de *zebrafish*.

Figura 7.9 Evaluación de los efectos de Doxo, E-Doxo y E sobre la frecuencia cardíaca de larvas de *zebrafish*.

Figura 7.10 Anomalías morfológicas evidenciadas en larvas de *zebrafish* expuestas a Doxo, E-Doxo, ó E.

Figura 7.11 Evaluación de la captación *in vivo*, estudiada mediante microscopía óptica en larvas de *zebrafish*. ***Barras de escala:*** 500 μm .

Figura 7.12 Evaluación de la captación *in vivo* estudiada mediante microscopía de fluorescencia en larvas de *zebrafish*. ***Barras de escala:*** 1000 μm

Figura (a) Comparación de los difractogramas de MAG-1 y MAG-6.

Figura (b) Espectros FTIR de MAG-1 y MAG-6

Figura (c) Composición de las muestras MAG-1 y MAG-6 en términos del contenido de Fe.

Figura (d) Espectros FTIR de MAG-1 y MAG-4

Figura (e) Comparación de DH de MAG-1 y MAG-4. (Inserto en el gráfico se muestran los valores de IPD)

Figura (f) Comparación de ζ pot de MAG-1 y MAG-4.

Figura (g) Composición de las muestras MAG-1 y MAG-4 en términos del contenido de Fe.

Figura (h) Imágenes correspondientes a los sólidos MAG-4 y MAG-9.

Figura (i) Respuesta a la influencia de un campo magnético externo de ambas muestras.

Figura (j) Espectros FTIR de MAG-4 y MAG-9

Figura (k) Evaluación de cambios en la morfología, estudiada mediante microscopía óptica en larvas de *zebrafish*.

Figura (l) Evaluación de cambios en la morfología, estudiada mediante microscopía óptica en larvas de *zebrafish*.

Figura (m) Evaluación de cambios en la morfología, estudiada mediante microscopía óptica en larvas de *zebrafish*.

Lista de esquemas

Esquema 1.1 Química de la superficie de MAG en agua.

Esquema 3.1 Síntesis de NPMs empleando la técnica de Reducción-precipitación.

Esquema 3.2 Síntesis de NPMs por co-precipitación (1) Directa, (2) Inversa.

Esquema 4.1 Incorporación del AF a la superficie de los NPMs mediante el protocolo de adsorción simple e imágenes del proceso

Esquema 4.2 Imágenes y esquema de la incorporación de AF a la superficie de MAG@APTS por el método de anclaje covalente.

Esquema 4.3 Mecanismo propuesto para las interacciones entre AF y la superficie de MAG@APTS

Esquema 5.1 Etapas involucradas en el estudio de influencia del pH en la liberación de Doxorubicina a distintos pH.

Esquema 5.2 Estudio de influencia de un SEMF en la liberación de Doxorubicina.

Esquema 5.3 Mecanismos propuestos para las posibles vías de incorporación del fármaco a las distintas nanoformulaciones exploradas.

Esquema 6.1 Esquema representativo de E-Doxo como una nanopartícula magnética multifuncional y sus posibles aplicaciones en biomedicina como teranóstico.

Lista de tablas

Tabla 1.1 Breve descripción de los métodos más comunes empleados en la síntesis de MAG.

Tabla 1.2 Agentes de contraste comerciales basados en NPMs.

Tabla 2.1 Técnicas de caracterización

Tabla 3.1 Resumen de condiciones experimentales evaluadas y nomenclatura utilizada para cada una de las muestras obtenidas por co-precipitación.

Tabla 3.2 Tamaños de NPMs estimados a partir de microscopía TEM y ecuación de Scherrer (XRD). DH medio (registrado en el modo número) e IPD determinados por DLS. Potencial zeta (ζ pot) determinado por Microelectroforesis Laser Doppler.

Tabla 3.3 Tamaños de NPMs estimados a partir de microscopía TEM y ecuación de Scherrer (XRD). DH medio (registrado en el modo número) e IPD determinados por DLS.

Tabla 3.4 Valores de ζ pot (mV) y composición, en términos del contenido de Fe determinado por EAA, de las NPMs obtenidas con distintas concentraciones de SDS

Tabla 4.1 Variaciones incluidas en el protocolo de adsorción simple de AF a NPMs.

Tabla 4.2 Variaciones incluidas en el protocolo de anclaje covalente de AF a MAG@APTS.

Tabla 4.3 Medidas de DH medio (registrado en el modo número) e IPD determinados por DLS y ζ pot de las muestras antes y después de la adsorción de AF, en presencia y ausencia de AA. Rendimiento, expresado en %, de cada una de las reacciones de adsorción

Tabla 5.1 Condiciones exploradas para la adsorción simple de Doxo a los distintos nanotransportadores.

Tabla 5.2 Datos DH medio (nm) y ζ pot (mV) de las diferentes nanoformulaciones en medio acuoso. %EC y %CC

Tabla 6.1 Comparación de datos relacionados con los resultados informados por K. Lee y col. y los resultados *in vitro* obtenidos en este trabajo utilizando SFC.

Tabla 6.2 Comparación entre los valores de r_2 de AC comerciales y los obtenidos a partir de este trabajo.

Tabla 7.1 Masas de NPMs o Doxo libre empleada en los ensayos *in vitro*.

Índice

<u>Capítulo I- Introducción y objetivos</u>	1
1.1 La nanotecnología	2
1.2 Nanopartículas magnéticas	4
1.2.1 Propiedades magnéticas de NPMs	5
1.3 Nanopartículas de óxidos de hierro	8
1.3.1 Métodos de síntesis de MAG	10
1.3.1.1 Co-precipitación	12
1.4 Mecanismos de estabilización	15
1.4.1 Tipos de recubrimientos de las NPMs	17
1.5 Aplicaciones biomédicas de NPMs.	19
1.5.1 NPMs para diagnóstico por imágenes mediante RMI	23
1.5.2 NPMs como transportadores de fármacos.	25
1.5.3 Empleo de NPMs como nanoteranósticos.	29
1.6 Hipótesis y Objetivos.	30
1.6.1 Hipótesis	30
1.6.2 Objetivo general	30
1.6.3 Objetivos específicos	31
1.7 Referencias del capítulo.	32
<u>Capítulo II- Materiales y técnicas de caracterización</u>	41
2.1 Materiales	43
2.2 Técnicas instrumentales de caracterización.	43
2.2.1 Difracción de Rayos X	44
2.2.1.1 Fundamento físico de XRD	45
2.2.1.2 Preparación de la muestra e instrumentación empleada.	45
2.2.2- Espectroscopía infrarroja de transmisión con Transformada de Fourier	47
2.2.2.1 Fundamento físico de la espectroscopía IR	47
2.2.2.2 Preparación de la muestra e instrumentación empleada	48
2.2.3 Dispersión de luz dinámica	49

2.2.3.1 Fundamento de la técnica de DLS.	49
2.2.3.2 Preparación de la muestra e instrumentación empleada	52
2.2.4 Microelectroforesis Laser Doppler.	54
2.2.4.1 Fundamento de la técnica de Potencial zeta.	54
2.2.4.2 Preparación de las muestras.	55
2.2.5 Microscopía electrónica de transmisión	57
2.2.5.1 Fundamento básico del microscopio.	57
2.2.5.2 Preparación de la muestra e instrumentación empleada.	58
2.2.6 Espectroscopía de absorción molecular Ultravioleta-Visible	59
2.2.6.1 Fundamento físico de la espectroscopía UV-Vis.	59
2.2.6.2 Preparación de la muestra e instrumentación empleada.	60
2.2.7 Espectroscopía de absorción atómica de llama	60
2.2.7.1 Fundamento físico de la EAA.	61
2.2.7.2 Preparación de la muestra e instrumentación empleada.	61
2.2.8 Análisis termogravimétrico	62
2.2.8.1 Fundamento físico del TGA.	62
2.2.8.2 Preparación de la muestra e instrumentación empleada.	62
2.2.9 Magnetómetro de muestra vibrante	63
2.2.9.1 Fundamento físico del VSM.	63
2.2.9.2 Preparación de la muestra e instrumentación empleada.	65
2.3 Referencias del capítulo	65
<i><u>Capítulo III- Síntesis de nanopartículas magnéticas</u></i>	67
3.1 Introducción.	70
3.2 Experimental.	74
3.2.1. Método de reducción-precipitación.	74
3.2.2.Técnica de co-precipitación	75
3.2.2.1. Con dodecilsulfato de sodio como estabilizante e hidróxido de sodio como agente precipitante	75
3.2.2.2. Con SDS e hidróxido de amonio como agente precipitante.	76
3.2.2.3.Co-precipitación inversa empleando SDS como estabilizante e NaOH como base	76
3.2.2.4 Co-precipitación tradicional en ausencia de luz visible directa.	77

3.2.2.5. Co-precipitación tradicional sin aditivos, empleando NaOH como agente precipitante.	77
3.2.3 Estudio de la estabilidad de los nanosistemas en medio acuoso.	78
3.3. Resultados y discusión.	78
3.3.1. Análisis comparativo de NPMs obtenidas a partir de los dos métodos de síntesis. Elección de una técnica de síntesis apropiada.	80
3.3.2 Influencia de las distintas variables experimentales sobre las propiedades fisicoquímicas de las NPMs empleando la técnica de co-precipitación	86
3.3.2.1 Efecto de la presencia y concentración de SDS.	86
3.3.2.2 Efecto de la luz visible.	97
3.3.2.3 Efecto del tipo de base utilizada y el volumen final de reacción.	100
3.3.2.4 Efecto del orden de adición de reactivos: Co-precipitación inversa.	105
3.3.3 Estabilidad de las formulaciones de MAG.	110
3.4-Conclusiones	111
3.5-Agradecimientos	113
3.6-Referencias del capítulo	113
<i><u>Capítulo IV- Funcionalización de nanopartículas magnéticas con ácido fólico.</u></i>	119
4.1 Introducción	122
4.2 Experimental	126
4.2.1 Síntesis del núcleo magnético, MAG	126
4.2.2 Modificación de la superficie de MAG con APTS.	126
4.2.3 Incorporación de AF a la superficie de las nanopartículas.	126
4.2.3.1 Adsorción simple	126
4.2.3.2 Acoplamiento covalente.	127
4.2.4 Ensayos de estabilidad.	129
4.2.4.1 Evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento en AB.	129
4.2.4.2. Evaluación de capacidad de retención del AF.	130
4.2.5. Análisis del comportamiento de las NPMs en un medio fisiológico	

simulado	130
4.3 Resultados y Discusión	130
4.3.1 Caracterización fisicoquímica de las NPMs modificadas con AF.	132
4.3.1.1 Análisis de las muestras obtenidas por adsorción simple.	132
4.3.1.2 Análisis de las muestras obtenidas por anclaje covalente.	138
4.3.2 Interacciones MAG@APTS con AF	145
4.3.3 Estabilidad de las diferentes formulaciones.	146
4.3.3.1. Estudio de la retención de AF sobre la superficie de MAG@APTS.	146
4.3.3.2 Evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento.	149
4.3.4 Análisis del comportamiento de MAG@APTS y E2 en un medio de plasma simulado.	150
4.4 Conclusiones	156
4.5 Agradecimientos	157
4.6 Referencias del capítulo.	157
<i><u>Capítulo V- Incorporación del fármaco a NPMs funcionalizadas con ácido fólico</u></i>	<i>161</i>
5.1 Introducción.	164
5.2 Experimental	168
5.2.1 Síntesis del nanotransportador magnético E	168
5.2.1.1 Síntesis del núcleo magnético: MAG	168
5.2.1.2 Modificación de la superficie de MAG con APTS y funcionalización con AF.	168
5.2.2 Incorporación de Doxo a la superficie de E.	168
5.2.2.1 Cinética de adsorción de Doxorubicina	170
5.2.2.2 Determinación del contenido de Doxo incorporado a los nanosistemas	171
5.2.3 Estudios <i>in vitro</i> de liberación de la droga	171
5.2.3.1 Efecto del pH	171
5.2.3.2 Efecto de la presencia de un campo magnético externo estático (SEMF).	172
5.3 Resultados y Discusión.	174

5.3.1 Caracterización fisicoquímica de las nanoformulaciones magnéticas cargadas con Doxo.	174
5.3.2 Efecto de las condiciones experimentales sobre la eficiencia y capacidad de carga de Doxorubicina	181
5.3.2.1 Cinética de adsorción de Doxorubicina. Determinación del tiempo óptimo de reacción	181
5.3.2.2 Influencia de la concentración inicial de Doxo sobre el %EC y %CC.	182
5.3.2.3 Influencia del pH del medio sobre el %EC y %CC.	183
5.3.3 Mecanismo propuesto para la adsorción Doxo sobre E	184
5.3.4 Estudio de liberación de Doxorubicina cargada en E-Doxo	187
5.3.4.1 Efecto del pH	187
5.3.4.2 Efecto de la presencia de un campo magnético externo.	190
5.4 Conclusiones.	195
5.5 Agradecimientos.	196
5.6 Referencias del capítulo.	196
<u>Capítulo VI- Evaluación in vitro del potencial de las NPMs como nanoteranósticos</u>	201
6.1 Introducción	204
6.2 Experimental	206
6.2.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de las NPMs para el direccionamiento mediado por un estímulo magnético.	206
<i>a- Diseño de sistema en flujo</i>	206
<i>b- Ensayo de direccionamiento magnético in vitro.</i>	208
6.2.2 Resonancia Magnética por Imágenes	209
6.3. Resultados y discusión	211
6.3.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de los nanosistemas para el direccionamiento mediado por un estímulo magnético.	211
6.3.2 Evaluación de E2, E4 y E-Doxo como agentes de contraste para el diagnóstico mediante RMI.	215
6.4 Conclusiones.	224
6.5 Agradecimientos.	225

6.6 Referencias del capítulo.	225
<u>Capítulo VII- Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para evaluar el comportamiento de las NPMs.</u>	229
7.1 Introducción.	232
7.2 Experimental.	234
7.2.1 Estudios <i>in vitro</i> de citotoxicidad e internalización.	234
7.2.1.1 Líneas celulares intestinales HCT116	234
7.2.1.2 Ensayos de viabilidad celular.	235
7.2.1.3 Estudios de internalización de las nanoformulaciones.	235
<i>a-Ensayos cualitativos de internalización mediante la técnica de azul de Prusia.</i>	236
<i>b-Microscopía de fluorescencia</i>	236
7.2.1.4 Análisis estadístico de los datos.	237
7.2.2 Estudios de biocompatibilidad en larvas de <i>zebrafish</i> .	239
7.2.2.1 Mantenimiento de los animales.	239
7.2.2.2 Cumplimiento de las normas éticas.	239
7.2.2.3 Tratamiento.	239
7.2.2.4 Viabilidad.	239
7.2.2.5 Neurotoxicidad.	239
7.2.2.6 Cardiotoxicidad.	240
7.2.2.7 Cambios morfológicos.	240
7.2.2.8 Evaluación <i>in vivo</i> de la eficiencia del ingreso del fármaco.	240
7.2.2.9 Análisis estadístico de los estudios <i>in vivo</i> .	241
7.3 Resultados y discusión.	241
7.3.1 Efecto de MAG, E, E-Doxo y Doxo libre sobre la viabilidad celular de las células HCT116.	241
7.3.2 Evaluación <i>in vivo</i> de la biocompatibilidad de Doxo, E y E-Doxo: Análisis de viabilidad, actividad locomotora, ritmo cardíaco, y cambios morfológicos de las larvas de <i>zebrafish</i> .	250
7.3.3 Estudio comparativo del ingreso del fármaco <i>in vivo</i>	255
7.4 Conclusiones	258

7.5 Agradecimientos.	259
7.6 Referencias del capítulo.	259
<i><u>Capítulo VIII- Conclusiones generales y trabajo a futuro</u></i>	263
<i><u>Anexo I: Resultados complementarios al Capítulo III</u></i>	271
-Efecto de la luz visible	273
-Efecto del tipo de base utilizada	274
-Efecto del volumen final de reacción	276
<i><u>Anexo II: Resultados complementarios al Capítulo VII</u></i>	279
-Análisis de cambios morfológicos	281
<i><u>Producción Científica</u></i>	285

-

Capítulo I

Introducción y objetivos

Introducción y objetivos

1.1- La nanotecnología.

La **nanotecnología** es un área interdisciplinar entre la biología, la química, la física, la ciencia de los materiales, la bioquímica y las ingenierías[1]. Si bien el concepto de nanotecnología surge alrededor de 1960 con la emblemática conferencia de Richard Feynman, en la cual planteó la posibilidad de manipular la materia a escala atómica y molecular[2]; el término fue popularizado en el área científica por el profesor Norio Taniguchi, de la Universidad de Ciencias de Tokio, quien lo definió como: “el tratamiento, la separación, consolidación y deformación de los materiales en átomos o moléculas”[3]. La idea básica de esta definición se extendió y se exploró con mayor profundidad a lo largo de la década del 80, impulsada por el desarrollo de técnicas experimentales que permitieron analizar estructuras a escala nanométrica; puntualmente desde el surgimiento de la microscopía de fuerza atómica (AFM) y de efecto túnel (STM). Fue así como, a partir del descubrimiento de los quatum dots en 1981, seguido por el hallazgo de los fulerenos en 1985 y la publicación en 1986 del libro de K. Eric Drexler: *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*, se dio inicio a una intensa investigación basada en la nanotecnología, que ha dado lugar a grandes avances y a nuevos paradigmas.

Mientras que la nanociencia se refiere específicamente al estudio de los objetos de tamaños comprendidos en el rango de los nanómetros, la nanotecnología es un término más amplio que involucra no sólo el estudio sino también el diseño, síntesis, manipulación y aplicación de materiales comprendidos dentro de dicha escala de tamaños[4].

El creciente interés por el estudio de los nanomateriales radica en el hecho de que estos, en todas sus variantes (clusters, nanopartículas, nanovarillas, nanocables, nanotubos, películas delgadas, etc.), presentan propiedades físicas y químicas muy distintas respecto del material de tamaño macroscópico[5]. Una gran parte de estas nuevas propiedades se pueden atribuir al aumento de la relación superficie/volumen

respecto del material macroscópico. Esto conduce a una mayor proporción de átomos superficiales que pueden “reconocer” mejor la presencia de otros átomos externos, incrementando considerablemente la reactividad del material.

Es por lo enunciado que la investigación y desarrollo en nanotecnología se orienta básicamente a la comprensión y creación de materiales inteligentes, dispositivos y sistemas capaces de explotar las propiedades derivadas de la nanoescala. Innovar y desarrollar nuevas herramientas tendientes a resolver problemáticas y mejorar el desempeño de diversos procedimientos y productos en áreas como energía, electrónica, medicina, cuidado del medio ambiente, indumentaria, etc. son los objetivos principales que impulsan el avance de esta disciplina científica.

Al referirse a nanotecnología y nanomateriales es necesario establecer una definición de la nanoescala. Aunque hasta el momento no existe un rango de tamaños único, la nanotecnología y la nanociencia reconocen al átomo (con un tamaño del orden de 1 \AA , es decir, $0,1 \text{ nm}$) como la entidad más pequeña, por lo que este valor sería el límite inferior natural de la nanoescala. El límite superior se ha fijado más arbitrariamente, y es versátil. Por analogía con la microtecnología, ahora un campo bien consolidado que trata con dispositivos de hasta 100 micras de tamaño, se podría fijar el límite superior de la nanotecnología en 100 nm [6]. En términos generales, se denomina nanomateriales a aquellos que presentan al menos una de sus tres dimensiones entre 1 y 100 nm [7,8]. Sin embargo, es bastante flexible y fuertemente dependiente del nanomaterial, dado que se reportan distintos tipos de sistemas que exceden los 100 nm y de todas formas exhiben propiedades típicas de la nanoescala[9].

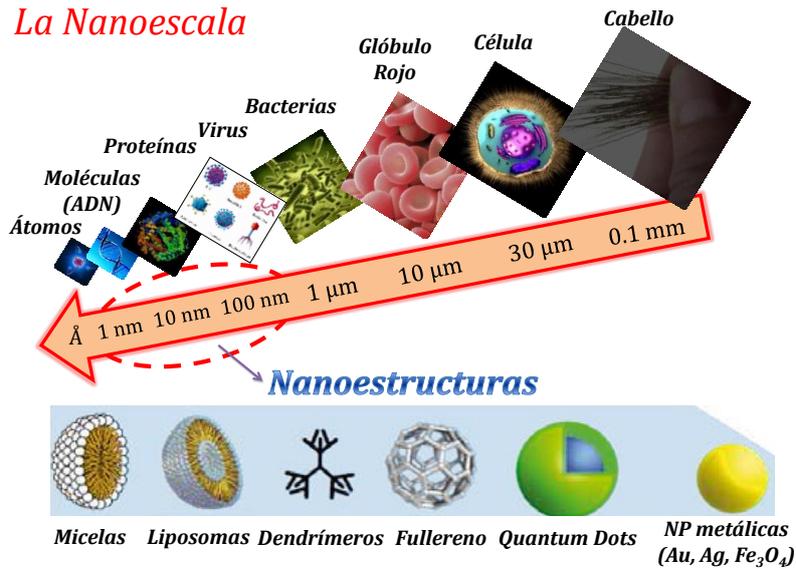


Figura 1.1 La nanoescala y los diferentes tipos de nanoestructuras.

1.2- Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) se han estudiado y utilizado desde hace varias décadas en diversos campos, por lo que existe un volumen sumamente amplio de información al respecto en la literatura abierta[10-12]. La característica distintiva de estas nanopartículas se asocia con su respuesta a la acción de un campo magnético externo. En este sentido, existe una gran variedad de materiales a partir de los cuales se pueden obtener[13,14].

- ❖ Metales de transición puros: Fe, Co, Ni.
- ❖ Metales y compuestos de tierras raras: sulfuro y óxido de europio (EuS, EuO), Gd (gadolinio), Dy (disprobio), Tb (terbio).
- ❖ Óxidos metálicos: hematita (α -Fe₂O₃), maghemita (γ -Fe₂O₃), magnetita (Fe₃O₄), wustita (FeO), ferritas de diversos metales (BaFe₂O₄, MgFe₂O₄, CoFe₂O₄)
- ❖ Aleaciones: Fe-Co, Fe-Ni, Fe-Pt, Co-Pt.

Entre las áreas de mayor incidencia de las NPMs, se reconocen medicina[15-18], remediación ambiental[19-22] y biotecnología[23,24].

En el marco de esta Tesis se centrará la atención en las aplicaciones biomédicas, que se describirán con mayor nivel de detalle en secciones siguientes.

El gran interés y la amplitud en cuánto a los campos de aplicación de NPMs se relacionan, entre otras características, con sus propiedades magnéticas y la reactividad superficial que poseen como consecuencia de la reducción en su tamaño.

1.2.1 Propiedades magnéticas de NPMs

Dependiendo de la respuesta frente a la aplicación de un campo magnético externo, los materiales magnéticos pueden clasificarse en diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos, ferrimagnéticos, ó superparamagnéticos[9].

Si el sólido posee átomos con todos los electrones apareados se define como diamagnético. En este caso, al aplicar un campo magnético se fuerza a la generación de dipolos magnéticos dando lugar a una corriente inducida que tiende a oponerse a ese campo magnético (El material presentan una respuesta muy débil de repulsión al campo magnético aplicado)[25]. Como ejemplos de materiales diamagnéticos se pueden indicar: Ag, Au y la mayoría de los elementos conocidos. Por otro lado, si el sólido posee átomos con electrones desapareados y las interacciones entre éstos son débiles el sólido se define como paramagnético y al aplicar un campo magnético externo aparecen dipolos que se alinean en la dirección y sentido del campo. Sin embargo, al eliminar el campo magnético, las fluctuaciones térmicas hacen que los momentos magnéticos se muevan al azar obteniéndose como resultante un momento magnético nulo[26]. Para este tipo de sólidos, el momento magnético es proporcional al campo aplicado. Dentro de este grupo podemos incluir a materiales constituidos por Ga, Mg, Li, Ta ó Cu. Cuando las interacciones existentes entre los electrones desapareados de los átomos vecinos son más fuertes, el sólido posee un comportamiento ferromagnético. Los materiales compuestos por Fe, Ni ó Co pertenecen a esta categoría. En este caso, una vez retirado el campo magnético los efectos no desaparecen por completo, quedando un magnetismo remanente, que es la causa de la existencia de los imanes permanentes. Por último, en el caso de que todos los momentos magnéticos estén orientados en la misma dirección, los electrones pueden alinearse antiparalelamente (misma dirección, pero sentido contrario). Como consecuencia de ello, si el momento magnético se acaba anulando el sólido se considera antiferromagnético. Sin embargo, si el momento magnético resultante no se anula el sólido es ferrimagnético[27]. En ambos casos, luego de

retirar el campo magnético aplicado, los efectos de este no desaparecen por completo, quedando un magnetismo remanente. Dentro del grupo de materiales antiferromagnéticos se incluyen MnO, CoO, NiO, CuCl₂; mientras que la magnetita (MAG, Fe₃O₄) y la maghemita (MAGH, γ -Fe₂O₃) son ejemplos de materiales ferrimagnéticos.

Los materiales ferri-, ferro y antiferromagnéticos presentan un comportamiento magnético cooperativo, con el fin de disminuir la energía magnetostática, que es la energía potencial producida por el campo magnético externo. Debido a que, si todos los momentos magnéticos se orientan en la misma dirección se genera una gran cantidad de esta energía, el sólido reagrupa a los espines en regiones llamadas dominios magnéticos[28]. Dentro de cada dominio los espines están orientados en la misma dirección, pero distinta a la de los otros dominios magnéticos. Aunque se genere energía en la interfase de unos dominios con otros (paredes de dominio), esta configuración multidominio dentro del sólido es la más favorable desde el punto de vista energético. Los dominios cuentan con un tamaño concreto, conocido tamaño crítico[29]. Si el tamaño de un material ferro o ferrimagnético se reduce hasta alcanzar este tamaño crítico, se estará generando un sistema monodominio. Este cambio es fundamental, ya que aparece un nuevo comportamiento magnético, conocido como superparamagnetismo[9].

En la figura 1.2 se presentan comparativamente las curvas de magnetización de un sólido ferromagnético y un sólido superparamagnético.

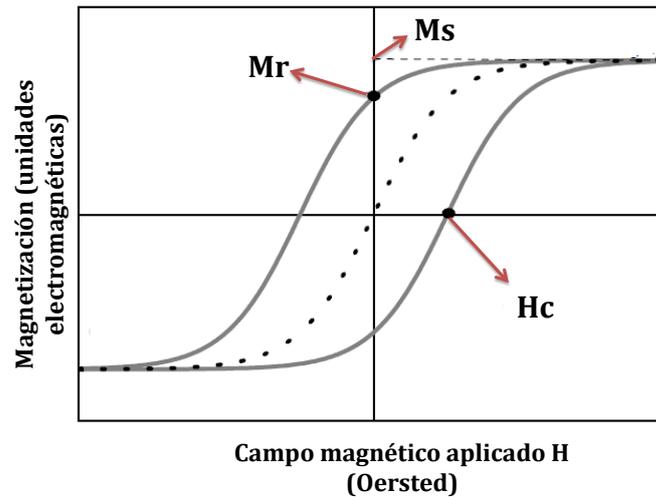


Figura 1.2. Curva de magnetización de un sólido ferromagnético (línea completa) y de un sólido superparamagnético (línea de puntos).

La región del plateau en las curvas es la magnetización a saturación (M_s). Este parámetro constituye una medida de la magnetización (M) por gramo de material y representa el estado en el que todos los dominios están orientados en el mismo sentido. Cuando el campo magnético aplicado disminuye, también lo hace la magnetización del material. Si la curva de desmagnetización, durante la remoción del campo magnético, no sigue la curva de magnetización inicial, se dice que el material manifiesta histéresis, tal como se observa en la figura 1.2. La remanencia (M_r) se define como la magnetización remanente cuando el campo aplicado es cero ($H = 0$). El campo magnético aplicado en la dirección negativa, requerido para retornar la magnetización a cero es la fuerza coercitiva o coercitividad (H_c).

Los materiales superparamagnéticos presentan coercitividad y remanencia prácticamente nulas ($H_c = M_r = 0$). En caso contrario, los spines permanecerían paralelos y su magnetización desaparecería a una intensidad de campo determinada (como es el caso del material ferromagnético). Este hecho resulta fundamental, en términos de la aplicación de NPMs en el área de salud. En particular, asegura que las NPMs presentarán interacciones magnéticas nulas lo que favorece su transporte en el organismo y su eventual respuesta al estímulo de un campo magnético externo, necesario para inducir su acumulación en un sitio específico y/o la liberación de un agente terapéutico, por ejemplo[9],[30].

Entre la extensa variedad de materiales que existen para la preparar NPMs, para este trabajo de tesis se seleccionó la magnetita (MAG) debido a su elevada magnetización de saturación y alta susceptibilidad magnética y, principalmente, por su elevada biocompatibilidad, relativamente baja toxicidad y fácil biodegradación en el organismo una vez administradas. De hecho, es conocido que MAG forma parte del sistema de orientación de ciertas aves migratorias[31]. Normalmente, y dependiendo de su concentración, después que las NPMs de MAG son metabolizadas, los iones de hierro se incorporan a los depósitos del organismo y a determinadas rutas metabólicas[32]. Por otra parte, no son carcinogénicas, son químicamente estables y exhiben una baja sensibilidad a la oxidación respecto de otros materiales magnéticos[13]. Este tipo de partículas presenta una alta relación área/masa (aproximadamente $100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) cuando sus tamaños son nanométricos ($< 50 \text{ nm}$)[33,34] y su superficie se puede funcionalizar con relativa facilidad para incorporar moléculas de interés biológico. Por último, se pueden obtener fácilmente a partir de materias primas de bajo costo y procedimientos moderados amigables con el medio ambiente.

1.3- Nanopartículas de óxidos de hierro.

Este trabajo se centró en el estudio de óxidos de hierro magnéticos, en particular magnetita y maghemita debido a los argumentos puntualizados en la sección anterior. Tanto la MAGH ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) como la MAG (Fe_3O_4) poseen una estructura cristalina cúbica tipo espinela inversa en la cual los aniones O^{2-} se encuentran formando un empaquetamiento cúbico compacto centrado en las caras (fcc). En la figura 1.3, se representa esquemáticamente la disposición de los iones en ambos óxidos.

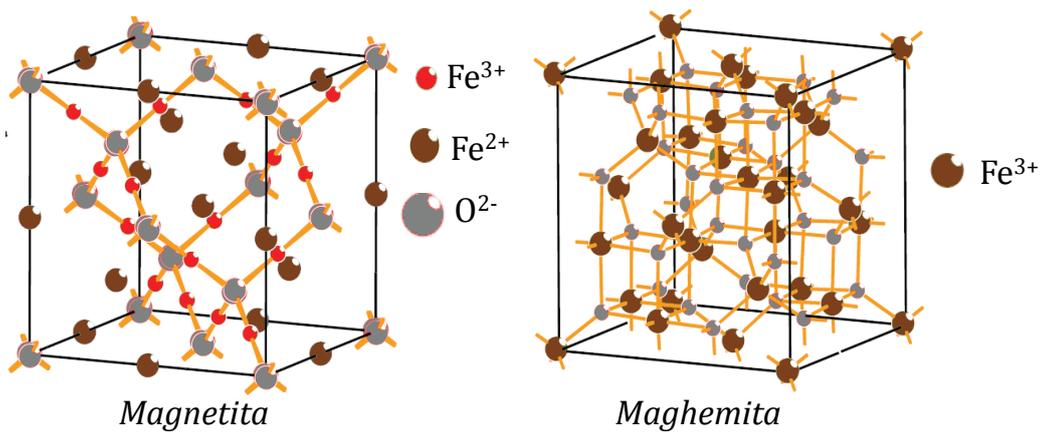


Figura 1.3 Estructura cristalina tipo espinela de la magnetita y de la maghemita

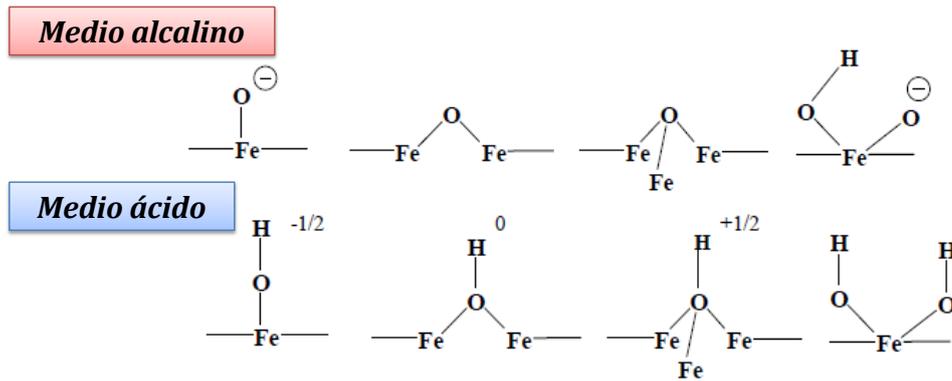
En la estructura cristalina de la MAGH, la mitad de los iones Fe^{3+} se encuentran coordinados octaédricamente y la otra mitad tetraédricamente. En cambio, la MAG contiene cationes en dos estados de oxidación: Fe^{2+} y Fe^{3+} en una relación molar 1:2. En esta estructura cristalina los iones Fe^{2+} y la mitad de los iones Fe^{3+} ocupan los sitios octaédricos mientras que la otra mitad se dispone en los huecos tetraédricos.

El parámetro de celda de la MAGH es ligeramente inferior al de la MAG, 0,8340 nm y 0,8394 nm, respectivamente. Esto se debe a la ausencia de cationes Fe^{2+} que poseen mayor tamaño que los iones Fe^{3+} en la MAGH.

Ambos sólidos son materiales ferrimagnéticos cuando se encuentran en tamaños mayores a los nanométricos, aunque la magnetización a saturación de la MAGH es menor. Sin embargo, presentan un comportamiento superparamagnético, cuando su tamaño es reducido a unos cuantos nanómetros.

A nivel de la superficie, tanto los cationes Fe^{3+} y Fe^{2+} como los átomos de oxígeno (aniones O^{2-}) son los sitios activos de la MAG y su nivel de exposición dependerá de los planos exhibidos preferencialmente por el cristal. Por ejemplo, para los planos (111), frecuentemente muy estables para esta estructura, los cationes Fe^{3+} se comportan como ácidos de Lewis, mientras que los átomos de oxígeno que no están totalmente coordinados actúan como bases de Brönsted[35]. Por tanto, ambos sitios activos (átomos de hierro y de oxígeno) se encuentran en la superficie y sirven de puntos de anclaje para la incorporación de otras especies químicas lo que

aumenta la posibilidad de interacción con los agentes funcionalizantes y ligandos específicos. En el esquema 1.1 se ilustra la química superficial de MAG en suspensión acuosa. Los cationes Fe^{3+} se coordinan con moléculas de H_2O que se disocian fácilmente para dejar la superficie del óxido de hierro funcionalizada con grupos OH. Estos grupos hidroxilo son anfóteros y pueden protonarse o desprotonarse según el pH del medio en que se encuentren[36,37].



Esquema 1.1 Química de la superficie de MAG en agua.

1.3.1- Métodos de síntesis de MAG.

Actualmente se conocen diversos métodos para la obtención de NPMs de MAG, los mismos han sido extensamente revisados[38], y se resumen en la tabla 1.1

Tabla 1.1 Breve descripción de los métodos más comunes empleados en la síntesis de MAG.

Método	Descripción	VARIABLES	Ventajas y desventajas	Ref.
Microemulsión	Dispersión y estabilización con surfactantes de pequeñas gotas de agua de tamaños nanométricos en aceite que actúan como micro reactores donde tienen lugar las reacciones de síntesis de NPMs. El tamaño de las partículas viene controlado por el tamaño de las gotas, que a su vez es definido por la relación agua/surfactante.	-Sales metálicas (tipo y concentración). -Relación agua/surfactante.	<u>Ventajas:</u> -No se forman agregados. <u>Desventajas:</u> -Escasa uniformidad en tamaño y morfología de NPMs -Dificultad de escalado	[39,40]
Descomposición termal	Fe(acac) ₃ (acetilacetonato férrico) es calentado en agua u otro solvente a altas temperaturas por varias horas, a veces en presencia de un compuesto orgánico que actúa como surfactante. Una reducción parcial de Fe ³⁺ provee Fe ²⁺ para formar la MAG	-Disolvente -Precursor metálico -Relación precursores/surfactante	<u>Ventajas:</u> -Alta uniformidad en tamaño y morfología de las NPMs. <u>Desventajas:</u> -Síntesis complicada y lenta. Involucra condiciones extremas	[41]
Síntesis hidrotermal/solvotermal	Descomposición de precursores orgánicos de los metales a elevadas temperaturas que se lleva a cabo en disolventes orgánicos (solvotermal) de alto punto de ebullición o en medio acuoso (hidrotermal) y en presencia de surfactantes.	-Disolvente -Precursor metálico -Relación precursores/surfactante	<u>Ventajas:</u> -Partículas uniformes con tamaños entre 4-30 nm. <u>Desventajas:</u> -Uso de disolventes orgánicos (contaminación). Bajo rendimiento -Reacción lenta (horas o días)	[42-44]
Reacción de sol-gel	Procedimiento de síntesis en húmedo que parte de una dispersión coloidal de los precursores, a partir de reacciones de hidrólisis y condensación se obtiene un gel con alto contenido del solvente que tiene que ser eliminado durante una etapa posterior de secado. El polvo obtenido se somete a tratamientos térmicos para lograr la cristalización.	-Precursores: Metalalcoxidos, sales metálicas. -Concentración de precursores -pH	<u>Ventajas:</u> -Simplicidad <u>Desventajas:</u> -Material amorfo, requiere una etapa adicional de tratamiento a altas temperaturas para permitir la cristalización.	[45]
Síntesis asistida por microondas	Alineación de los dipolos de las moléculas dentro de un campo externo por la excitación debido a la radiación de microondas. La reorientación de las moléculas con el campo eléctrico induce un calentamiento interno intenso. Este hecho reduce el tiempo de procesamiento así como la energía requerida debido a la homogeneidad y selectividad en el calentamiento.	-Radiación de microondas	<u>Ventajas:</u> -control del tamaño y la forma -Temperatura ambiente <u>Desventajas:</u> -Síntesis compleja y lenta	[46,47]

1.3.1.1-Co-precipitación

De interés particular, en el marco de esta tesis, es la técnica de co-precipitación. Esta constituye una de las vías más empleadas debido a su simplicidad, facilidad para ser escalada y bajo costo, su reproducibilidad y las condiciones de reacción que requiere, moderadas y amigables con el medio ambiente[48].

El procedimiento involucra el empleo de soluciones acuosas de sales de hierro en proporción molar 2/1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) y una base (NaOH u otra) como agente precipitante. Comúnmente se lleva a cabo bajo atmósfera inerte y a temperaturas relativamente altas (70–90°C)[49]. Aunque existen reportes respecto de su implementación a temperatura ambiente[50] y en aire[51] que indican la obtención satisfactoria de NPMs de óxido de hierro.

El mecanismo de formación de los cristales de MAG mediante co-precipitación consta de dos etapas: nucleación y crecimiento[52]. Para poder obtener nanopartículas monodispersas estas dos etapas deben estar separadas en el tiempo y, además, la nucleación debe ser instantánea para que los núcleos que son generados al unísono tengan un crecimiento similar[53]. El tamaño final de las NPMs depende fundamentalmente del proceso de nucleación y la distribución, mientras que su forma final está relacionada con la etapa de crecimiento.

En la figura 1.4 se ilustra el fenómeno de cristalización.

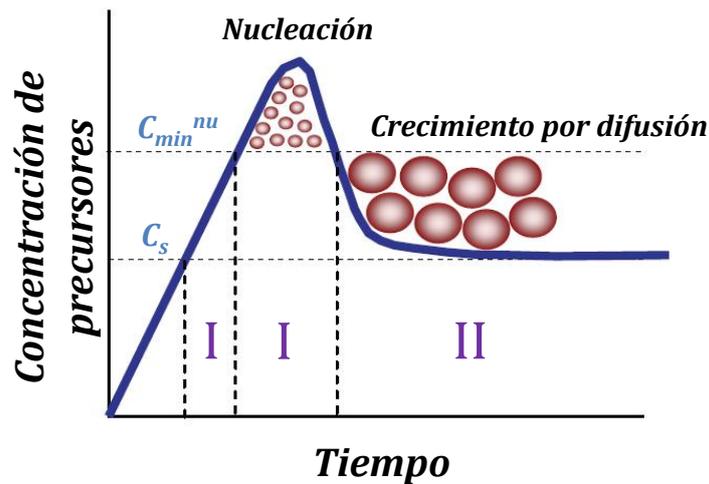


Figura 1.4 Diagrama de LaMer donde se observa la evolución de la concentración de especies precursoras durante las etapas de nucleación y crecimiento

El proceso de nucleación tiene lugar cuando la concentración de especies precursoras de los núcleos supera la concentración de saturación de dichas especies en disolución (C_s) en un fenómeno llamado sobresaturación. Además, ésta concentración debe ser lo suficientemente grande como para que el sistema sobrepase la barrera de energía de formación de los núcleos (C_{\min}^{nu}) (Fase I). Cuando tiene lugar la nucleación, el número de precursores disminuye sustancialmente hasta que se sitúa por debajo de la C_{\min}^{nu} , punto a partir del cual tiene lugar la etapa de crecimiento (Fase II). Para lograr partículas de tamaños nanométricos es necesario aumentar el número de núcleos y reducir el crecimiento de los existentes [54].

En cuanto al crecimiento de los cristales, en la literatura se postulan tres mecanismos probables[55]

- (A) Crecimiento de los núcleos que consumen precursores de la solución.
- (B) Fusión de varias partículas por unión orientada (coalescencia).
- (C) El proceso Ostwald, que tiene lugar cuando partículas grandes crecen a expensas de disolver las más pequeñas.

En la figura 1.5 se esquematizan estos mecanismos.

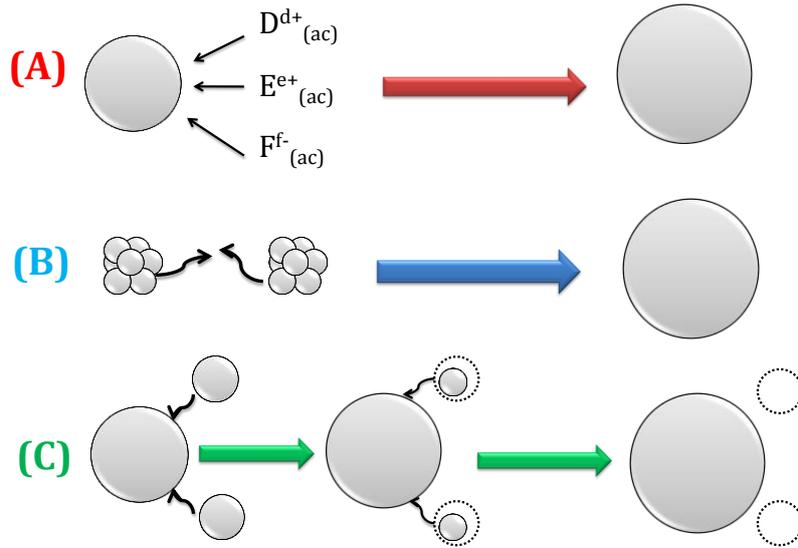


Figura 1.5 Mecanismos probables de crecimiento de núcleos de MAG

A partir de lo expuesto, en la figura 1.6 se presenta un esquema de cristalización que incluye todas las posibles alternativas de crecimiento.

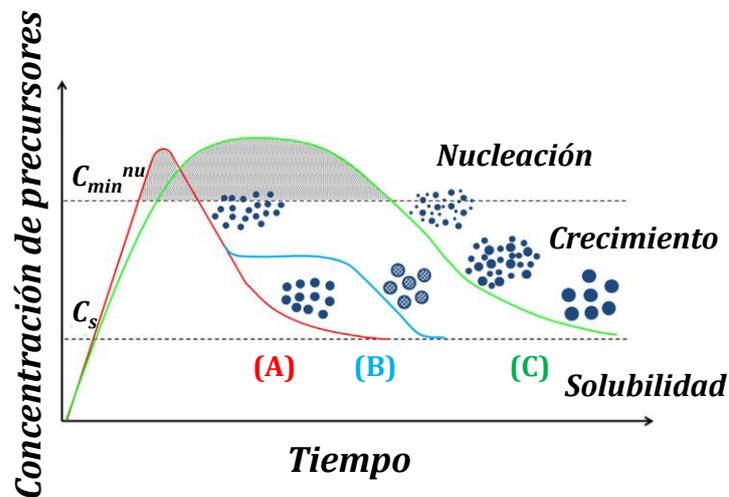
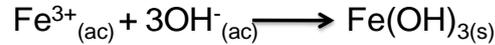


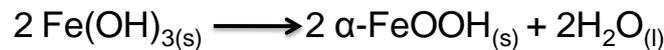
Figura 1.6 Mecanismo de la formación de partículas uniformes en una solución. **Curva (A)**: nucleación y crecimiento uniforme por difusión (modelo clásico de LaMer y Dinegar). **Curva (B)**: nucleación, crecimiento y agregación de subunidades más pequeñas. **Curva (C)**: nucleación múltiple y crecimiento de maduración de Ostwald.

El mecanismo probable de la reacción química de formación de MAG mediante co-precipitación consta de varias etapas[56].

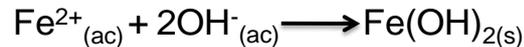
(1) La etapa inicial involucra la precipitación del hidróxido férrico $\text{Fe}(\text{OH})_{3(s)}$. Este es el primer sólido en precipitar, ya que su producto de solubilidad (Kps) es menor que el del hidróxido ferroso. El pH del medio de reacción se mantiene en 1.5 porque la base es consumida inmediatamente a medida que se agrega [48]



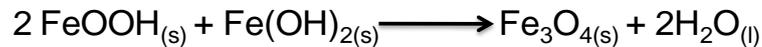
(2) El segundo paso es la reacción de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ para formar goethita (oxihidróxido, $\alpha\text{-FeOOH}$):



(3) Alcanzando un pH de 5, precipita el hidróxido ferroso



(4) Finalmente la goethita y el hidróxido ferroso se combinan para formar magnetita cuando el pH alcanza un valor de 9-10:



Las principales limitaciones del método de co-precipitación son dos: 1) el ineficiente control del tamaño final de las nanopartículas y 2) la tendencia a la agregación de las partículas formando grandes cúmulos debido a la atracción dipolar anisotrópica. Como consecuencia, se pierden las propiedades particulares inherentes a las nanoestructuras magnéticas monodominio[38].

Las estrategias para evitar/minimizar la agregación se relacionan con el agregado de aditivos (surfactantes, estabilizantes), que actúan a través de dos mecanismos principales de estabilización: estérica y electrostática[57]. Cómo se desarrollará más adelante en esta tesis, los aditivos incorporados, en ciertos casos, también pueden actuar favoreciendo el crecimiento de ciertos planos, permitiendo un mayor control de la forma final de las NPMs[58].

1.4- Mecanismos de estabilización.

La estabilidad de una suspensión magnética coloidal resulta del equilibrio entre fuerzas atractivas y repulsivas a las que se ven sometidas las partículas[59].

Las fuerzas más importantes que existen en todo sistema coloidal acuoso son las de van der Waals (de carácter atractivo) y las electrostáticas (de carácter repulsivo). La descripción teórica de estos dos tipos de fuerzas se conoce como la teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)[60,61]. También es posible que se generen fuerzas de repulsión estérica que surgen a partir de la incorporación de modificantes muy voluminosos a la superficie de las nanopartículas, tal y como se esquematiza en la figura 1.7

Al considerar un sistema coloidal formado por partículas magnéticas, existen, además, interacciones de dipolo magnético que poseen carácter atractivo[62].

La estabilización de las NPMs se puede lograr a partir de potenciar las fuerzas de repulsión; y de la misma manera, minimizar o eliminar las de atracción[64].

Para que la estabilización electrostática tenga lugar, es necesario que las partículas desarrollen carga superficial a través de uno o más de los siguientes mecanismos: (i) adsorción preferencial de iones, (ii) disociación de especies cargadas en la superficie, (iii) sustitución isomórfica de iones[57]. La presencia de partículas en un medio que contiene iones o especies cargadas provoca una alteración en la distribución de las mismas en dicho medio ya que en su superficie se desarrolla un exceso de carga que es compensado por la difusión de iones de carga opuesta y de la misma carga desde el medio hasta la proximidad de la superficie de la partícula formando una doble capa eléctrica en torno a la misma[64]. En la figura 1.7 se esquematiza este tipo de estabilización.

La estabilización estérica se logra mediante la adición de moléculas voluminosas (como polímeros u otras macromoléculas) a la solución de sales precursoras o en un tratamiento post síntesis. Al aproximarse dos partículas recubiertas de polímeros adsorbidos, a distancias cortas de una segunda capa de polímero hace que la primera se comprima y no pueda adoptar todas las configuraciones posibles a las que tenía acceso en principio. Esto propicia una disminución del término entrópico lo que hace que no sea energéticamente favorable que dos partículas recubiertas de polímero u otra molécula voluminosa se atraigan. El segundo de ellos es la depleción que consiste en la presencia de macromoléculas libres en el medio que impiden la agregación de las partículas[64]. El efecto estérico

del estabilizante está determinado por la concentración del mismo en el solvente usado como dispersante. En el caso de polímeros hidrófilos que desarrollan carga en agua el tipo de estabilización que ejercen se denomina estabilización electroestérica[65].

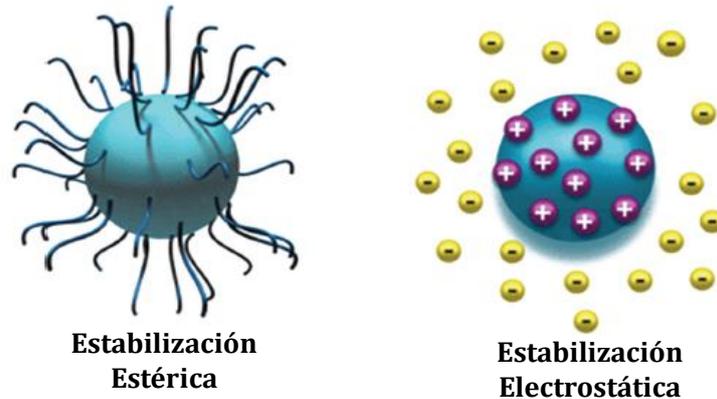


Figura 1.7 Tipos de estabilización coloidal. (Adaptado de [57])

1.4.1 Tipos de recubrimientos de las NPMs.

En la actualidad se conocen una amplia gama de compuestos que pueden emplearse para el recubrimiento de nanopartículas. Se pueden reconocer múltiples funciones asociadas al recubrimiento: (i) estabilización coloidal de la NPMs, (ii) inhibir la corrosión y oxidación del núcleo magnético, (iii) impedir la adsorción de proteínas no específicas del medio biológico, (iv) proporcionar grupos reactivos para introducir fármacos y/o ligandos selectivos a la superficie de las NPMs, (v) evadir la captación por parte del sistema reticuloendotelial (SRE), (vi) aumentar el tiempo de circulación sanguínea, (vii) mejorar la eficiencia de internalización de NPMs, (viii) disminuir la toxicidad de las NPMs[66]. El recubrimiento puede ser incorporado *in situ*, durante el proceso de síntesis o bien en una etapa posterior[67].

Entre las moléculas más comunes utilizadas como estabilizantes se encuentran el ácido oleico[68], la oleilamina[69], el dodecilsulfato de sodio[70], el ácido láurico, los ácidos alcano sulfónicos y los ácidos alcanos fosfónicos[71]. En general, se trata de moléculas de naturaleza anfifílica y desempeñan su función en la interfaz NPMs-solvente. La mayoría de las síntesis en las que se utilizan estos surfactantes tienen lugar en medio orgánico, como hexadecano, tolueno, hexano, etc., ya que, en general, los grupos hidrófobicos (cadena hidrocarbonada) de las moléculas

del tensioactivo quedan expuestas mientras los grupos polares se unen a la superficie de las NPMs[72,73].

Los polímeros constituyen otra gran familia de compuestos empleada para la estabilización, funcionalización y para proporcionar biocompatibilidad a las NPMs[74].

Entre los polímeros que se emplean se encuentran, la gelatina[75], el dextrano[76], el ácido poliláctico[77], el quitosano[78], la polivinilpirrolidona (PVP)[79], el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)[80], y el polivinil alcohol (PVA)[81]. El polietilenglicol (PEG) de elevado peso molecular es uno de los más estudiados[82,83].

La incorporación de las macromoléculas puede implementarse, en general, a partir de distintos procedimientos[84]. Se pueden adsorber físicamente a las superficies de las NPMs mediante interacciones electrostáticas, hidrófobas y puente de hidrógeno. Aquellos que presentan ciertos grupos funcionales en la periferia como, hidroxilo, amina, carboxilo, se adsorben fácilmente a la superficie de las NPMs[85,86].

Otras especies químicas como los aminoácidos[87], el ácido cítrico[88], la manosa[89], y las biomoléculas como las enzimas, los anticuerpos[90] y las proteínas en general[91], resultan de interés como recubrimiento de las NPMs. Estas permiten incorporar grupos adicionales a la superficie como $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$ o $-SH$, cuya función es proporcionar un sitio de anclaje para interacción con biomoléculas o fármacos. En muchos casos este tipo de moléculas se emplean, además, con la intención de que permitan un reconocimiento selectivo de algún componente fisiológico (marcador, célula, etc).

La modificación de NPMs en etapas posteriores a la síntesis, conduce a lo que normalmente se conoce como nanopartículas de estructura *core-shell*. Los compuestos que se utilizan en estos casos pueden coincidir con los materiales descritos anteriormente, y otros de diversa naturaleza como sílica, metales (por ejemplo, oro y cadmio/selenio), moléculas de colorante orgánico, etc[72].

Otros métodos de recubrimiento empleados con menos frecuencia son la polimerización por radicales de transferencia atómica (ATRP del inglés “*Atomic transfer radical polymerisation*”)[92], la emulsión inversa[93], entre otros[94,95].

En la figura 1.8 se representan los compuestos que se usan con mayor frecuencia como recubrimientos de NPMs.

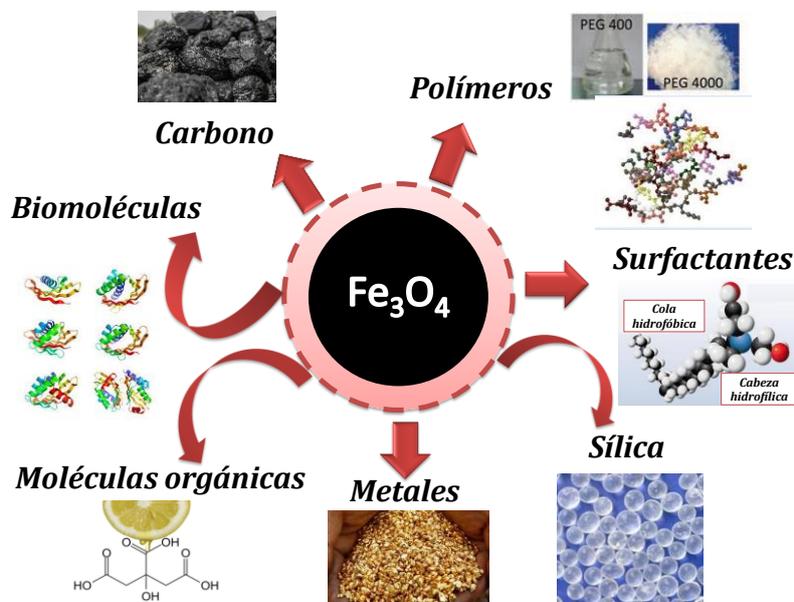


Figura 1.8 Diferentes compuestos empleados como agentes de recubrimiento para NPMs.

1.5- Aplicaciones biomédicas de NPMs.

En las últimas décadas las NPMs han despertado un creciente interés, debido a la gran variedad de aplicaciones que presentan en el ámbito biomédico. Inicialmente se han insertado en el área de la salud a partir de sus propiedades para generar contraste en estudios de diagnóstico por imágenes mediante resonancia magnética (RMI)[96,97]. Posteriormente se investigaron sus habilidades para producir muerte celular mediante el fenómeno de hipertermia que se consigue al someter a las NPMs con propiedades fisicoquímicas adecuadas a la acción de un campo magnético alterno[98].

Otra aplicación biomédica que ha registrado un amplio crecimiento tiene que ver con el transporte de fármacos y su acumulación en un sitio específico. Debido al

núcleo magnético, las NPMs ofrecen la posibilidad de ser guiadas mediante la aplicación de un campo magnético externo[99]. Una vez situadas allí, se puede producir la liberación de fármacos evitando, o al menos disminuyendo, los potenciales efectos secundarios que tienen los mismos sobre el organismo, cuando se administran de forma sistémica.

Para conseguir especificidad en su acción una vez localizadas, es necesario que las NPMs interactúen selectivamente con blancos de interés biológico como células o tejidos del organismo. Para ello, comúnmente se funcionaliza la superficie de las NPMs con distintas biomoléculas, que dependerán del tipo de patología que se pretende enfrentar[100-102].

En estos casos, las especies químicas o ligandos incorporados a la superficie de las NPMs reconocen moléculas de afinidad expresadas o sobreexpresadas exclusivamente en un tipo determinado de células. De esta forma, se puede conseguir que se produzcan interacciones (receptor-ligando o antígeno-anticuerpo, por ejemplo) que sean de utilidad para marcar magnéticamente ciertos tipos de células, como por ejemplo las células tumorales[102,103] y visualizarlas mediante alguna técnica de imagen como por ejemplo RMI. Asimismo, las NPMs pueden transportar fármacos o moléculas capaces de actuar en las células blanco, ejerciendo una acción terapéutica. Este modelo ideal de NPMs mono- o multifuncionalizadas, constituye una estrategia eficaz para poder llegar y actuar en las células deseadas[104].

Las NPMs multifuncionalizadas como las descritas en el párrafo anterior se han propuesto como agentes teranósticos. Este término fue utilizado por primera vez por el presidente y gerente general de *PharmaNetics*, John Funkhouser en el año 2002 haciendo referencia a un sistema con la capacidad de combinar las modalidades de terapia y diagnóstico por imagen en un único dispositivo[105]. Esto se propone por medio del empleo de nanopartículas multifuncionales. En la figura 1.9 se presenta de manera ilustrativa el concepto de NPM multifuncional.

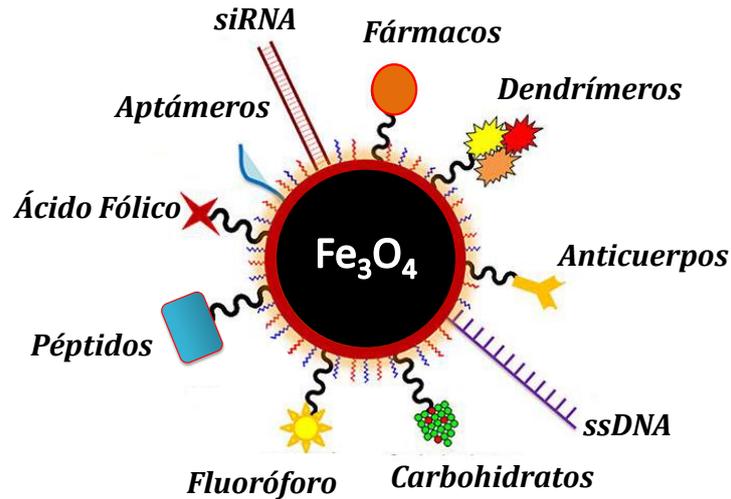


Figura 1.9 Esquema representativo de una nanopartícula multifuncionalizada con diversas moléculas biológicas con potencial para ser empleada como teranóstico.

En una revisión publicada en la revista *Molecular Pharmaceutics*, Lammers y colaboradores, resumen las potenciales aplicaciones de estas nuevas herramientas nanotecnológicas. Se refieren principalmente a las siguientes capacidades: (i) evaluación no invasiva de su biodistribución en tiempo real y de su acumulación en el sitio blanco, (ii) monitoreo de la liberación de fármacos en el sitio blanco, (iii) aumento de la eficacia terapéutica, debido a la focalización de la liberación de un fármaco, (iv) predicción de la respuesta terapéutica de un paciente [106]. Por otro lado, en un artículo más reciente, estos investigadores destacan que la idoneidad del teranóstico para un diagnóstico real es cuestionable [107]. En este sentido, el significado de capacidad diagnóstica no hace referencia a la identificación, localización y/o estadificación de los tumores, sino a la pre-selección de los pacientes, la predicción de posibles respuestas terapéuticas y/o el seguimiento de la eficacia del tratamiento. Este punto crítico ha sido abordado en una interesante revisión elaborada por Rizzo y colaboradores [108].

De este modo los nanoteranósticos se proponen como una herramienta útil para adquirir conocimientos sobre la biodistribución y la acumulación del fármaco en el sitio objetivo, y por lo tanto ayudan a pre-seleccionar a los pacientes y predecir las respuestas a la terapia, permitiendo personalizar los tratamientos, cambiando de

esta manera, el enfoque de “tratamiento de la población” al concepto de “medicina personalizada”[109].

En la figura 1.10 se ilustra el camino que podría tener lugar al emplear nanoteranósticos como herramientas para establecer una terapia personalizada.

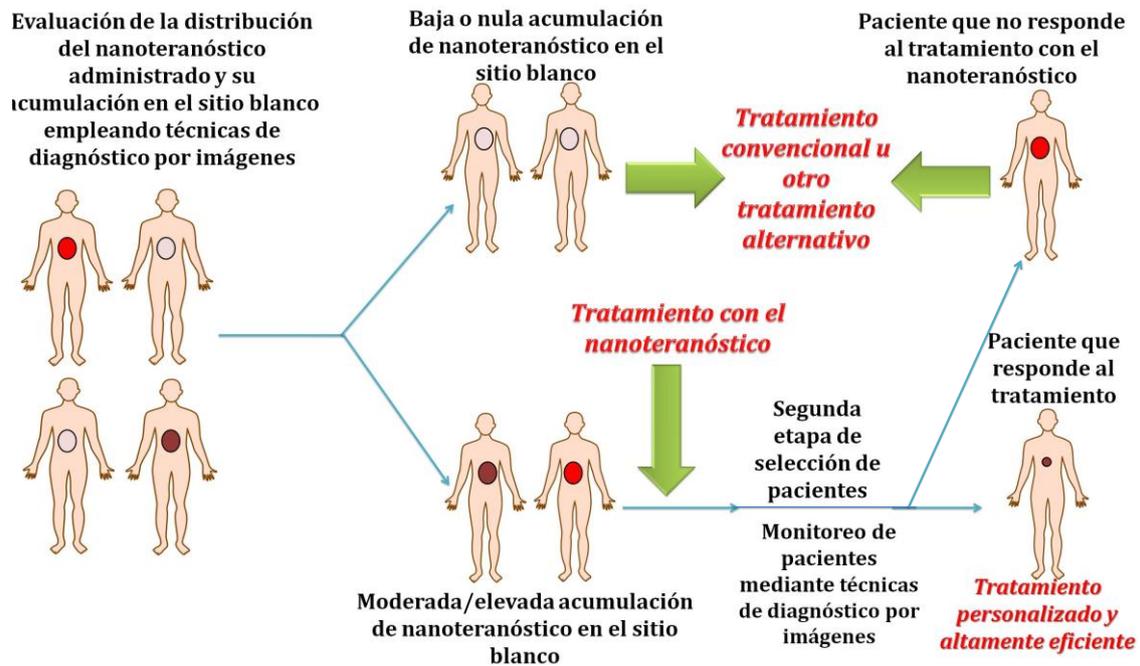


Figura 1.10 Representación esquemática de los caminos seguidos en nanomedicina personalizada (adaptado de [110]).

En la figura 1.10 se muestra que el primer paso hacia el tratamiento personalizado utilizando nanoteranósticos consiste en pre-seleccionar pacientes sobre la base de datos brindados por las técnicas de diagnóstico por imágenes no invasivas que permitan examinar la acumulación del mismo en el sitio blanco (como RMI, PET, fluorescencia, NIFR). Los pacientes que presenten niveles moderados a altos de acumulación en el sitio objetivo, continuarán su tratamiento con el nanoteranóstico (ya sea por hipertemia, terapia fototermal, liberación controlada de fármacos, terapia génica ó combinación de alguna de ellas), mientras que aquellos pacientes que no ofrezcan una respuesta adecuada recibirán tratamiento convencional específico para cáncer u otro tipo de intervención. Posteriormente, en un segundo paso, los pacientes pre-seleccionados y tratados con el nanoteranóstico en cuestión, serán monitoreados de cerca para visualizar mediante técnicas no invasivas de imagen como responden a los primeros 1 a 3 ciclos de tratamiento. Durante este proceso, se podrían adaptar las dosis de fármaco y los regímenes de

dosificación. Además en caso de ser necesario y de acuerdo a la evolución, los pacientes podrían asignarse a otras (nano) intervenciones terapéuticas[110].

1.5.1- NPMs para diagnóstico por imágenes mediante RMI.

En relación al diagnóstico por imagen, la técnica de resonancia magnética es una de las más utilizadas en la actualidad, ya que se trata de una práctica no invasiva[111]. Además, a diferencia de otras técnicas, no utiliza radiación ionizante, sino campos magnéticos para alinear los momentos magnéticos nucleares de los átomos de hidrógeno del agua de los distintos órganos o tejidos del cuerpo[112].

En términos generales, la técnica de RMI se fundamenta en que la aplicación de un campo magnético produce la alineación de los momentos magnéticos de los protones en la dirección de dicho campo generando una magnetización de equilibrio a lo largo del eje longitudinal. Un pulso de radiofrecuencia, a una frecuencia de resonancia capaz de transferir energía a los protones (entre 5–100 MHz), puede hacer que dichos momentos magnéticos se alejen, en fase, del eje longitudinal a un ángulo llamado ángulo de giro. Tras la eliminación de la radiación, los momentos magnéticos de los protones se relajan hasta alinearse con su posición original [113]. El tiempo que tardan los momentos magnéticos en volver a su alineación original con el campo magnético se denomina tiempo de relajación y depende de cada tejido, en función de la distinta proporción de agua. Existen dos mecanismos a través de los cuales se produce la relajación, por un lado el longitudinal, que se asocia al tiempo de relajación T_1 ; y el transversal que se asocia al tiempo de relajación T_2 .

Es importante destacar que incluso cuando la relajación depende del tejido y la técnica de RMI puede permitir la discriminación de un tejido patológico de uno sano, el contraste entre los mismos puede ser insuficiente para el diagnóstico de enfermedades. Para amplificar el contraste, se utilizan agentes de contraste (AC) exógenos, que alteran los tiempos de relajación. Aunque la mayoría de los agentes de contraste pueden afectar tanto T_1 como T_2 , generalmente afectan un tiempo de relajación más que el otro, por lo que pueden clasificarse como AC T_1 o T_2 [114]. En la figura 1.11 se muestra una imagen del resonador de uso clínico junto con las imágenes adquiridas en ensayos fantomas usando dispersiones acuosas de NPMs como AC para T_1 y T_2 .

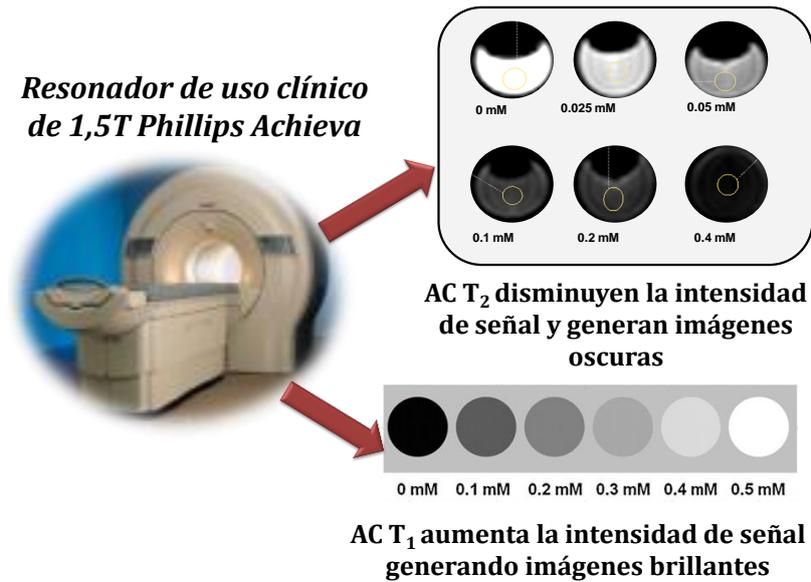


Figura 1.11 Resonador de uso clínico e imágenes de ensayos fantomas usando NPMs como AC para T₁ y T₂

Los AC utilizados para la adquisición de imágenes mediante resonancia magnética, deben reunir ciertas condiciones asociadas con sus propiedades magnéticas y con aspectos de bioseguridad propios de compuestos que van a administrarse en el área de salud.

Dentro de los AC que disminuyen el tiempo de relajación longitudinal T₁ (aumentando la intensidad de señal y generando imágenes brillantes), los más utilizados son los compuestos a base gadolinio (Gd)[115].

Las NPMs se incluyen mayoritariamente en la categoría de los AC para ponderar el T₂ dado que disminuyen la intensidad de señal y generan imágenes oscuras. En el mercado han existido y existen NPMs que se comercializan como AC para la resonancia magnética de distintos órganos[116]. En la tabla 1.2 se presentan algunos de ellos y se indican sus características más importantes.

Tabla 1.2 Agentes de contraste comerciales basados en NPMs.

Nombre comercial	Recubrimiento	DH (nm)	Carga superficial	Tipo de AC	Ref.
Feridex®	Dextrano	150	Neutra	T ₂	[117]
Resovist®	Carboxidextrano	60	Neutra	T ₂	[118]
Sinerem®	Dextrano	30	Neutra	T ₁ y T ₂	[119]
VSOP_C184	Ácido cítrico	7	Negativa	T ₂	[120]

Es importante remarcar que dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las NPMs, como el diámetro hidrodinámico (DH) y la carga superficial, los AC se pueden clasificar en función del órgano, tejido o región que se quiera visualizar y el tiempo de relajación que pueden ponderar (T₁ o T₂ o ambos). Por ejemplo partículas de óxido de hierro recubiertas de dextrano (Feridex®, Guerbet) o carboxidextrano (Resovist®, Schering) con un elevado DH, se han empleado para obtener imágenes de hígado ponderadas en T₂[117-118]. Sin embargo, cuando el DH disminuye, su tiempo de vida media en sangre aumenta y es posible utilizarlos para obtener imágenes del torrente sanguíneo pudiendo visualizar los macrófagos o los nódulos linfáticos (Sinerem®, Guerbet y Supravist®, Schering)[119],[121]. La carga superficial también afecta el tiempo que demora la detección por los macrófagos[122]. Partículas de tamaño pequeño y con elevada carga superficial negativa (VSOP-184) poseen un tiempo de vida medio en sangre de 0,6-1,3 horas[120]. Sin embargo, cuando el recubrimiento es dextrano y poseen una carga neutra (Sinerem®), el tiempo de vida media en sangre aumenta hasta las 45 horas[119].

1.5.2- NPMs como transportadores de fármacos.

Para conseguir una mayor concentración de fármaco en el interior de la célula y, de esta manera mejorar la eficiencia del tratamiento se han propuesto varias estrategias[123], entre las cuales se encuentra el empleo de nanomateriales funcionalizados con ligandos selectivos como un sistema para el transporte y liberación de fármacos[124-127]. La utilización de un núcleo magnético representa un interés adicional dada su capacidad para responder a la acción de un campo magnético externo que induce la acumulación de las NPMs de forma no invasiva aprovechando la propiedad de superparamagnetismo de las mismas[128].

En el marco de esta tesis, en particular, nos enfocaremos en el transporte de fármacos oncológicos.

En el caso de los tumores sólidos, la vectorización pasiva de nanopartículas se basa en el fenómeno de efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR: “*Enhanced Permeability and Retention effect*”), introducido por Matsumura y Maeda en la década del ochenta[129]. Este fenómeno se fundamenta en la angiogénesis acelerada característica de un tumor sólido grande, debido a la necesidad de suplemento continuo de oxígeno y nutrientes por parte de las células tumorales. Estos nuevos vasos sanguíneos, se encuentran formados por células endoteliales que se disponen irregularmente, de modo que los espacios entre ellas son mayores (entre 100 nm y 2 μ m) que los de la vasculatura de los tejidos sanos (entre 2 y 6 nm). Además existe una deficiencia de pericitos y formación de la membrana basal anormal, lo que conduce a una mayor permeabilidad vascular[130] permitiendo el pasaje de nanosistemas con DH de cientos de nanómetros[131]. Por otra parte, el tejido tumoral presenta un drenaje linfático ineficiente y un retorno venoso lento lo que contribuye a alcanzar concentraciones locales de nanotransportadores cargados de fármaco en el sitio del tumor de entre 10 y 50 veces más que en tejido normal dentro de 1-2 días[132].

La efectividad de la vectorización pasiva depende principalmente (i) del grado de vascularización del tumor y la angiogénesis, que a su vez depende del tipo de tumor y del sitio anatómico del mismo, y (ii) de la alta presión del líquido intersticial y el flujo sanguíneo heterogéneo, que limitan la absorción del fármaco y la distribución homogénea en el tumor[129],[133].

Una metodología que se está investigando en los últimos tiempos, consiste en conjugar ligandos específicos a la superficie de los nanosistemas capaces de reconocer receptores moleculares presentes en las células tumorales. De esta manera, se podría llevar a cabo una vectorización activa en forma paralela a la vectorización pasiva[100,101],[134]. En otras palabras, la acumulación selectiva de NPMs en la región tumoral es comparable a la misma conseguida debido al efecto EPR. Sin embargo, una vez en el tejido, las NPMs provistas de ligandos específicos se internalizan de manera más eficiente a través de la endocitosis mediada por receptor.

El empleo de nanosistemas compuestos por un núcleo magnético ha demostrado ser una excelente alternativa para la vectorización de fármacos, sobre todo en aquellos tumores sólidos poco vascularizados donde se ha reportado que el fenómeno de EPR no es eficiente[135].

Las experiencias clínicas de direccionamiento magnético de fármacos han reportado datos alentadores en la década del 90. Lübbe y col. describieron, en 1996, las primeras experiencias empleando un ferrofluido con 4'Epídoxorubicina para el tratamiento oncológico mediante orientación magnética de fármacos. Catorce pacientes con cáncer avanzado, sin respuesta a tratamientos convencionales, se ofrecieron voluntariamente para los ensayos. Siguiendo un protocolo de inoculación endovenosa preestablecido y mediante la colocación de un imán de neodimio (Nd) de dimensiones 8x4x2 cm y 0.5T, observaron una regresión de hasta el 50% del tamaño del tumor como consecuencia de la acumulación de la formulación en el sitio blanco. Sin embargo no registraron una disminución de los efectos hematológicos típicos de la distribución sistémica de fármacos oncológicos[136]. En años más recientes no se han registrado ensayos clínicos al respecto, sólo pre-clínicos en animales de laboratorio[137-139].

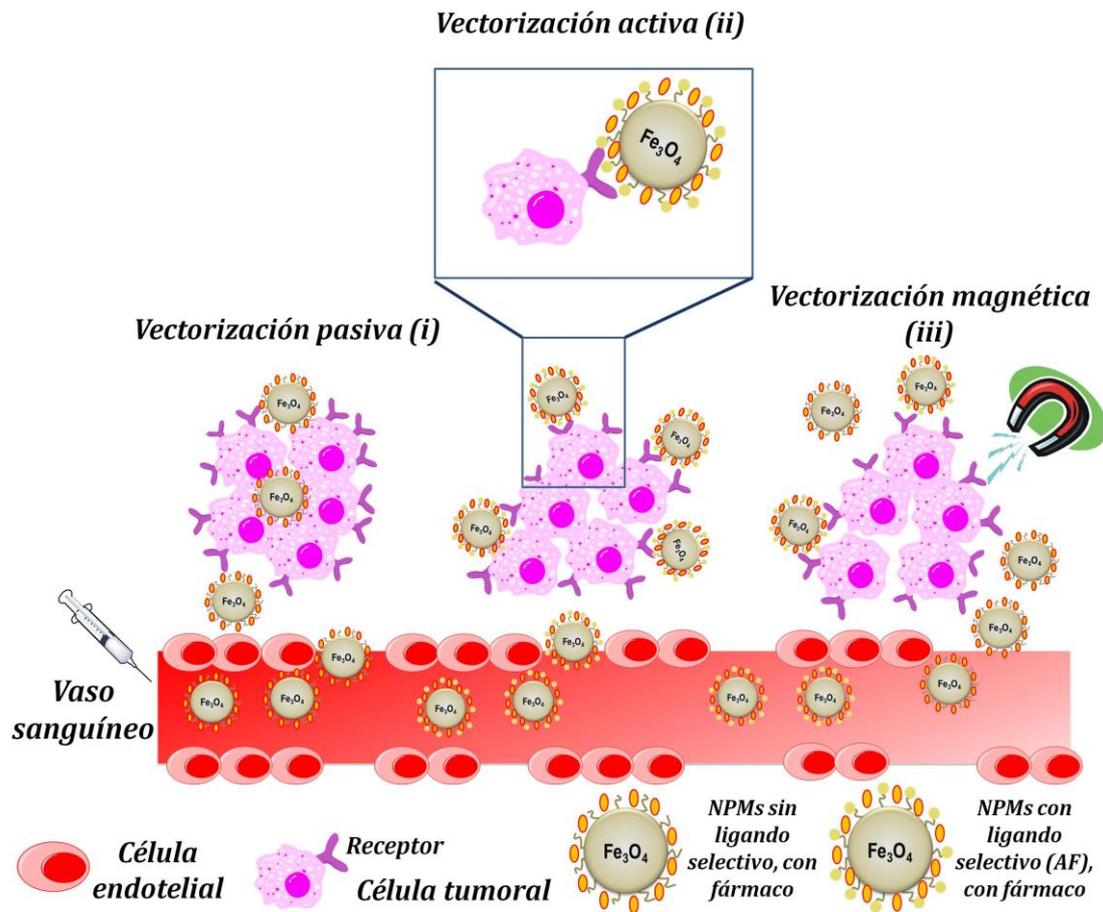


Figura 1.12 Representación esquemática de diferentes estrategias de vectorización. (i) La vectorización pasiva basada en el fenómeno EPR. (ii) La vectorización activa. (iii) La vectorización mediada por estímulos magnéticos.

Todos estos sistemas de direccionamiento, o la combinación de varios de ellos, favorecen la acumulación de las NPMs en el área tumoral. De esta forma, la liberación de los fármacos terapéuticos se produce fundamentalmente en el tumor y se puede reducir, disminuyendo los efectos secundarios no deseados sobre otras células o tejidos sanos[140].

Para inducir a la liberación de los fármacos, se incorporan sensores moleculares a las nanopartículas que son capaces de responder a diferentes estímulos químicos o biológicos como cambios en el pH, cambios en el potencial redox, temperatura, actividad enzimática e incluso a la acción del mismo campo magnético externo[140,141].

En función de lo planteado, para que las NPMs sean consideradas vehículos eficaces para el transporte de fármacos, deben cumplir con ciertos requerimientos como[142]:

- ❖ Capacidad de incorporar el/los fármacos deseados.
- ❖ Estabilidad para mantener el fármaco ligado a su estructura en el medio plasmático, para evitar la distribución sistémica del mismo.
- ❖ Habilidad para acumularse en las células tumorales.
- ❖ Capacidad de liberar el fármaco una vez localizadas en el tumor.
- ❖ Biocompatibilidad y vida útil limitada, para permitir la segura degradación de sus componentes.

1.5.3- Empleo de NPMs como nanoteranósticos.

En la literatura es posible encontrar diversos reportes relacionados al empleo de NPMs como teranósticos y su evaluación en animales de laboratorio.

Yang y col. desarrollaron una plataforma multifuncional a partir del encapsulamiento de NPMs y verde de indocianina, en una matriz de PLGA, cargada con siARN (ARN de silenciamiento). Esta formulación constituyó una herramienta multimodal de diagnóstico por imágenes, a través de NIFR y RMI. A su vez permitió el transporte dirigido de siARN contra la enzima proinflamatoria ciclooxigenasa-2 (COX-2), lo cual produjo una regulación negativa de la misma en macrófagos activados. De esta forma, se propuso una plataforma para el diagnóstico y tratamiento simultáneo de enfermedades inflamatorias[143].

Como ejemplos de teranósticos diseñados para la detección, seguimiento y tratamiento de patologías oncológicas, podemos citar el trabajo de Huang y col., quienes evaluaron el efecto inhibitorio del crecimiento de un tumor mamario en ratones luego de una inyección intravenosa de NPMs (DOX@FA-SPIONs). La acumulación de la nanoformulación en el tumor así como la disminución del tamaño del mismo se monitoreó mediante resonancia magnética por imágenes aprovechando la capacidad de estas formulaciones de actuar como AC de tipo T₂[144].

Por su parte, Thirunavukkarasu y col. desarrollaron nanopartículas magnéticas multifuncionales (NPMs-PEG-Doxo) que resultaron ser eficientes en cuanto al direccionamiento y la capacidad de actuar como AC para ponderar el T₂ *in*

vivo. Además mostraron, mediante la aplicación de un campo magnético alterno externo, la muerte de células de cáncer de colon CT26 por la combinación de hipertermia y quimioterapia localizada (termo-quimioterapia)[145].

Elbially y col. propusieron nanopartículas magnéticas multifuncionales de óxido de hierro, cubiertas de oro (MGNPs) y conjugadas con Doxorubicina (MGNPs-Doxo). Estos investigadores demostraron mediante estudios *in vivo* que las MGNPs-Doxo fueron capaces de (i) administrar selectivamente el fármaco en el sitio del tumor de manera controlada mediante orientación magnética; (ii) inducir terapia fototérmica mediante la producción de calor por absorción de radiación del infrarrojo cercano (NIR) lo cual también facilitó la liberación del fármaco (terapia quimio-fototermal) y (iii) actuar como AC para RMI permitiendo seguir la respuesta al tratamiento[146].

A pesar de la variedad de datos pre-clínicos que han mostrado resultados prometedores, aún no existen nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas, diseñadas y evaluadas como teranósticos, que hayan podido superar las diferentes fases de los estudios de farmacología clínica establecidos por la FDA (del inglés “*Food and Drug Administration*”). No obstante, el interés en la terapia personalizada y el uso de nanoteranósticos se encuentra en continua expansión, y los científicos y la industria de la salud en general están reconociendo que la estratificación del paciente debe integrarse con la investigación en nanomedicina, de modo de maximizar las posibilidades de un resultado exitoso en la terapia[109].

1.6- Hipótesis y Objetivos.

1.6.1 - Hipótesis

Es posible el diseño y la preparación de una formulación a base de nanotecnología magnética como una potencial herramienta de diagnóstico, terapia y seguimiento evolutivo de patologías oncológicas (teranóstico).

1.6.2- Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es generar conocimientos acerca de la obtención de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro con propiedades

fisicoquímicas controladas, dotadas de ligandos específicos para conferirles selectividad y funcionalidad superficial. El fin particular es obtener nanosistemas que combinen múltiples funciones de terapia y diagnóstico por imágenes mediante resonancia magnética.

Este enfoque involucra el estudio exhaustivo de las metodologías de síntesis y modificación de NPMs, los mecanismos asociados a dichos procesos, la caracterización fisicoquímica y el análisis de propiedades de interés, como la estabilidad de las nanopartículas obtenidas en condiciones simulando el entorno fisiológico, en relación a sus potenciales aplicaciones como agentes teranósticos.

1.6.3- Objetivos específicos

Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1) Sintetizar nanopartículas de óxido de hierro (magnetita (Fe_3O_4)-MAG) estabilizadas con dodecilsulfato de sodio (SDS) utilizando el método de coprecipitación y el de reducción-precipitación. Se pretendió estudiar el efecto de la variación de diferentes parámetros de síntesis, principalmente sobre las propiedades de interés de las nanopartículas.

2) Modificar la superficie de las MAG con ácido fólico (AF) con dos propósitos:

i-. Proveer de funcionalidad adecuada para inducir interacciones con otros sustratos como drogas o moléculas específicas.

ii- Conferir selectividad para interactuar con los receptores folato sobrepresados en distintos tipos de células tumorales.

3) Explorar la carga de fármacos antitumorales a las NPMs. Se seleccionó Doxorubicina (Doxo), un anticancerígeno comercial utilizado en el tratamiento de diversos tipos de tumores. Este objetivo involucró el estudio de los parámetros asociados a la adsorción de la droga en la superficie de las NPMs. El fin fue dotar a las NPMs funcionalizadas con AF de concentraciones de droga comparables a las requeridas para su acción terapéutica conservando las propiedades fisicoquímicas adecuadas para su administración intravenosa.

4) Caracterizar las nanopartículas blanco y cargadas con Doxo mediante diferentes técnicas que se describen en detalle en el Capítulo II.

5) Realizar ensayos *in vitro* de liberación del fármaco desde los sistemas diseñados simulando el entorno en contacto con las NPMs una vez que ingresaron al organismo. Este enfoque incluyó evaluar la influencia del pH del medio así como de la presencia de un campo magnético sobre la cinética de liberación.

6) Estudiar *in vitro* el potencial de los nanosistemas para la vectorización magnética a partir del estímulo mediado por un campo magnético externo.

7) Evaluar, *in vitro*, el potencial de las NPMs como agentes de contraste para diagnóstico por imágenes mediante resonancia magnética.

8) Explorar los efectos inhibitorios de las nanoformulaciones. Empleando la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 se estudió cualitativamente la internalización de las NPMs y se analizó el efecto de las mismas sobre la viabilidad celular.

9) Estudiar la biocompatibilidad de las nanoformulaciones sintetizadas mediante ensayos *in vivo* empleando larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*).

1.7- Referencias del capítulo.

- [1] Ramsden J.J., Ramsden J.J., Chapter 17 – Global Nanotechnology, Appl. Nanotechnol. (2018) 245–254.
- [2] Feynman R.P., There's plenty of room at the bottom, in: H.D. Gilbert (Ed.), Miniaturization, Reinhold, New York, 1961, pp. 282–296
- [3] Taniguchi N., On the basic concept of nano-technology, Proc. Intl Conf. Prod. Engng Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering, 1974, pp. 18–23
- [4] Chun YW, Crowder SW, Mehl SC, Wang X, Bae H, Sung H-J. Therapeutic application of nanotechnology in cardiovascular and pulmonary regeneration. Comput Struct Biotechnol J. 7, (2013) 1-7
- [5] Ramsden J.J., Chapter 1-What is Nanotechnology?, Appl. Nanotechnol. (2018) 3–13
- [6] Kargozar S., Mozafari M., Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big, Mater. Today Proc. 5, (2018) 15492–15500.
- [7] Schmid G., Nanoparticles: From Theory to Application, Wiley, 2010
- [8] Auffan M., Rose J., Bottero J. Y., Lowry G. V., Jolivet J. P., et al., Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nat. Nanotechnol., 4, (2009) 634–641
- [9] Agotegaray M., Lassalle Verónica., Silica-coated Magnetic Nanoparticles. An Insight into Targeted Drug Delivery and Toxicology. Springer International Publishing AG, Switzerland, 2017
- [10] Hola K., Markova Z., Zoppellaro G., Tucek J., et al., Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances, Biotechnol. Adv.33, (2015) 1162–1176

- [11] Xu J., Sun J., Wang Y., Sheng J., et al. Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization, *Molecules*. 19, (2014) 11465–11486
- [12] Makarchuk O. V, Dontsova T.A., Astrelin I.M., Magnetic Nanocomposites as Efficient Sorption Materials for Removing Dyes from Aqueous Solutions., *Nanoscale Res. Lett.* 11, (2016) 161
- [13] Karimi Z., Karimi L., Shokrollahi H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 2465–2475
- [14] Gubin S.P., *Magnetic Nanoparticles*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2009
- [15] Yazdani F., Fattahi B., Azizi N. Synthesis of functionalized magnetite nanoparticles to use as liver targeting MRI contrast agent. *J. Magn. Magn.Mater.* 406, (2016) 207–211
- [16] Muñoz de Escalona M., Sáez-Fernández E., Prados J.C., Melguizo C., et al. Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer, *Int. J. Pharm.* 504, (2016) 11–19
- [17] Horst M.F., Coral D.F., Fernández van Raap M.B., Alvarez M., et al. Hybrid nanomaterials based on gum Arabic and magnetite for hyperthermia treatments, *Mater. Sci. Eng. C* 74, (2017) 443–450
- [18] Tietze R., Lyer S., Dürr S., Struffert T., et al. Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles-biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9, (2013) 961–971.
- [19] Mohmood I., Lopes C.B., Lopes I., Tavares D.S., et al. Remediation of mercury contaminated saltwater with functionalized silica coated magnetite nanoparticles, *Sci. Total Environ.* 557, (2016) 712–721
- [20] Verma R., Asthana A., Singh A.K., Prasad S., et al. Novel glycine-functionalized magnetic nanoparticles entrapped calcium alginate beads for effective removal of lead, *Microchem. J.* 130, (2017) 168–178
- [21] Gong Y., Wang L., Liu J., Tang J., et al. Removal of aqueous perfluoro octanoic acid (PFOA) using starch-stabilized magnetite nanoparticles, *Sci. Total Environ.* 562, (2016) 191–200
- [22] Wang P., Wang X., Yu S., Zou Y., et al. Silica coated Fe₃O₄ magnetic nanospheres for high removal of organic pollutants from wastewater, *Chem. Eng. J.* 306, (2016) 280–288
- [23] Mehrasbi M.R., Mohammadi J., Peyda M., Mohammadi M., Covalent immobilization of Candida antarctica lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil, *Renew. Energy*. 101, (2017) 593–602
- [24] Wang J., Jiang L.-H., Zhou Y., Ye B.-C. Enhanced biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Acinetobacter* species strain LMB-5 coated with magnetic nanoparticles, *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 116, (2017) 184–190
- [25] Burano de Ercilla S., Burano García E., Gracia Muñoz C. *Física general*. Madrid Tébar; 2003
- [26] Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D*. 36, (2003) R167–R181.
- [27] Raikher, Y.L., Limiting Viscosity of Ferromagnetic Suspensions in a Strong Magnetic Field., *J Appl Mech Tech Phys.* 15, (1974) 470-475
- [28] Weiss, P., The variation of ferromagnetism with temperature. *Compt. Rend.* 143, (1906) 1136-1139
- [29] Vallet-Regi M., Arcos Navarrete D., *Magnetic Nanoceramics for Biomedical Applications. Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications.*, RSC Nanoscience & Nanotechnology Madrid, (2016) 275-312
- [30] O. Petravic, Superparamagnetic nanoparticle ensembles, *Superlattices Microstruct.* 47, (2010) 569–578.
- [31] Rasilla F. J. D., El sentido magnético y su uso en la orientación de los animales. Aproximación a las ciencias planetarias / coord. por José Ignacio Rubio Muñoz, María Dolores Pereira Gómez, Juan Sesma Plaza, María Angeles Bárcena Pernía, 2004, ISBN 84-7800-582-X, págs. 269-298.
- [32] Weissleder R., Stark D.D., Engelstad B.L., Bacon B.R., et al. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity, *Am J Roentgenol.* 152, (1989) 167-173
- [33] Iconaru S.L., Guégan R., Popa C.L., Motelica-Heino M., Magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles as adsorbents for As and Cu removal, *Appl. Clay Sci.* 134 (2016) 128–135

- [34] Bagbi Y., Sarswat A., Mohan D., Pandey A., et al., Lead (Pb^{2+}) adsorption by monodispersed magnetite nanoparticles: Surface analysis and effects of solution chemistry, *J. Environ. Chem. Eng.* 4 (2016) 4237–4247
- [35] Yang T., Wen X., Cao D., Li Y. et al. Structures and energetics of H_2O adsorption on the Fe_3O_4 (111) surface. *J. Fuel Chem. Technol.* 37, (2009) 506-512
- [36] Lefebure S., Dubois E., Cabuil V., Neveu S., et al. Monodisperse magnetic nanoparticles: Preparation and dispersion in water and oils, *J. Mater. Res.* 13, (1998) 2975-2981
- [37] Tourinho F.A., Campos A.F.C., Aquino R., Lara M.C.F.L., et al., Surface charge density determination in electric double layered magnetic fluids, *Brazilian J. Phys.* 32, (2002) 501–508.
- [38] Lassalle V., Avena M., Ferreira M., A review of the methods of magnetic nanocomposites synthesis and their applications as drug delivery systems and immobilization supports for lipases, *Trends Polym. Sci.* 13, (2009) 37–67
- [39] Li Y., Jiang R., Liu T., Lv H., et al., Single-microemulsion-based solvothermal synthesis of magnetite microflowers, *Ceram. Int.* 40, (2014) 4791–4795
- [40] Yang Q., Lan F., Yi Q., Wu Y., et al., A colloidal assembly approach to synthesize magnetic porous composite nanoclusters for efficient protein adsorption, *Nanoscale.* 7, (2015) 17617–17622.
- [41] Yang G., Zhang B., Wang J., Xie S., et al., Preparation of polylysine-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.* 374, (2015) 205–208.
- [42] Byrappa S., Vicas C.S., Dhanaraj N., Namratha K., et al., Hydrothermal growth of fine magnetite and ferrite crystals, *J. Cryst. Growth.* 452, (2016) 111–116
- [43] Attallah O.A., Girgis E., Abdel-Mottaleb M.M.S.A., Synthesis of non-aggregated nicotinic acid coated magnetite nanorods via hydrothermal technique, *J. Magn. Magn. Mater.* 399 (2016) 58–63
- [44] Wortmann L., Ilyas S., Niznansky D., Valldor M., et al., Bioconjugated Iron Oxide Nanocubes: Synthesis, Functionalization, and Vectorization, *Appl. Mater. Interfaces* 6, (2014) 16631-16642.
- [45] Pandey S., Mishra S., Sol-gel derived organic-inorganic hybrid materials: Synthesis, characterizations and applications. *J Sol-Gel Sci Technol.* 59, (2011) 73-94
- [46] Hu L., Percheron A., Chaumont D., Brachais C. H.. Microwave-assisted one-step hydrothermal synthesis of pure iron oxide nanoparticles: Magnetite, maghemite and hematite, *J Sol-Gel Sci Technol.*, 60, (2011) 198-205
- [47] Jiang F. Y., Wang C. M., Fu Y., Liu, R. C.. Synthesis of iron oxide nanocubes via microwave-assisted solvothermal method, *J Alloy Compd.* 503, (2010) L31-L33
- [48] Ahn T., Kim J.H., Yang H.-M., Lee J.W., et al., Formation Pathways of Magnetite Nanoparticles by Coprecipitation Method, *J. Phys. Chem. C.* 116, (2012) 6069–6076
- [49] Kumar S., Jana A.K., Dhamija I., Singla Y., et al., Preparation, characterization and targeted delivery of serratiopeptidase immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, (2013) 413–426.
- [50] Komarneni S., Hu W., Noh Y. D., Van Orden A., et al., Magnetite syntheses from room temperature to 150 °C with and without microwaves, *Ceram. Int.* 38, (2012) 2563–2568
- [51] Saxena N., Singh M. Efficient synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles under air for biomedical applications. *J. Magn. Magn. Mater.* (2017) 429, 166–176
- [52] Sugimoto T., *Monodispersed particles.* Elsevier: Amsterdam, Holland, 2001.
- [53] Lamer V. K., Dinegar R. H., Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* 72, (1950) 4847-4854
- [54] García Casillas P. E., Rodríguez Gonzalez C. A., y Martínez Pérez C. A. (2012). Infrared Spectroscopy of Functionalized Magnetic Nanoparticles, *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, Prof. Theophanides Theophile (Ed.), ISBN: 978-953-51-0537-4, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-materials-science-engineering-andtechnology/infrared-spectroscopy-of-functionalized-magnetic-nanoparticles>
- [55] Marciello M., Luengo Y., Morales M.P., Chapter 24 Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting.* Elsevier Inc, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-47347-7.00024-0> 667

- [56] Singh H., Bhagwat S., Jouen S., Lefez B., et al., Elucidation of the role of hexamine and other precursors in the formation of magnetite nanorods and their stoichiometry, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, (2010) 3246–3253
- [57] Yu W., Xie H., A review on nanofluids: preparation, stability mechanisms, and applications, *J. Nanomater.* 2012, (2012) 1–17
- [58] Chen Z., Geng Z., Tao T., Wang Z., Shape-controlled synthesis of Fe_3O_4 rhombic dodecahedrons and nanodiscs, *Mater. Lett.* 117, (2014) 10–13
- [59] Meyers D., *Surfaces, interfaces and colloids*. VCH: New York, USA, 1991.
- [60] Derjaguin B.V., Churaev N.V., Muller V.M. *The Derjaguin—Landau—Verwey—Overbeek (DLVO) Theory of Stability of Lyophobic Colloids*. In: *Surface Forces*. Springer, Boston, MA, 1987
- [61] Verwey E. J. W., Overbeek J. T. G., *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1948
- [62] Vincent, B.; Edwards, J.; Emment, S.; Jones, Depletion flocculation in dispersions of sterically stabilised particles (“soft spheres”), *A. Colloids Surf.* 18, (1986) 261-281
- [63] Cornell R. M., Schertmann, U., *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*; VCH Publishers: Weinheim, Germany, 1991
- [64] Van De Ven T. G. M., *Colloidal hydrodynamics*. Academic Press, Inc: New York, USA, 1989
- [65] Kamiya H., Fukuda Y., Suzuki Y., Tsukada M., et al., Effect of polymer dispersant structure on electrosteric interaction and dense alumina suspension behavior, *J Am Ceram Soc.* 82, (1999) 3407–3412
- [66] Tombácz E., Turcu R., Socoliuc V., Vékás L., Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magnetoresponsive nanosystems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, (2015) 442–453
- [67] Laurent S., Saei A.A., Behzadi S., Panahifar A., et al., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges, *Expert Opin. Drug Deliv.* 11, (2014) 1–22
- [68] Angelakeris M., Enhanced biomedical heat-triggered carriers via nanomagnetism tuning in ferrite-based nanoparticles, *J. Magn. Mater.* 381, (2015) 179–187
- [69] Xu Z., Shen C., Hou Y., Gao H., et al., Oleylamine as Both Reducing Agent and Stabilizer in a Facile Synthesis of Magnetite Nanoparticles, *Chem. Mater.* 21, (2009) 1778–1780
- [70] Shariati S., Faraji M., Yamini Y., Rajabi A.A., Fe_3O_4 magnetic nanoparticles modified with sodium dodecyl sulfate for removal of safranin O dye from aqueous solutions, *Desalination* 270 (2011) 160–165
- [71] Sahoo Y., Pizem H., Fried T., Golodnitsky D., et al., Alkyl phosphonate/phosphate coating on magnetite nanoparticles: a comparison with fatty acids, *Langmuir* 17, (2001) 7907–7911
- [72] Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., et al., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, (2011) 24–46
- [73] Klekotka U., Satula D., Spassov S., Kalska-Szostko B. Surfactant dependence on physicochemical properties of magnetite nanoparticles, *Colloids Surf. A* 537 (2018) 452–459
- [74] Muthiah M., Park I-K., Cho C-S., Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting, *Biotechnol. Adv.* 31, (2013) 1224–1236
- [75] Gaihre B., Khil M.S., Lee D.R., Kim H.Y., Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study, *Int. J. Pharm.* 365, (2009) 180–189
- [76] Moore A., Marecos E., Bogdanov A., Weissleder R., Tumoral Distribution of Long-circulating Dextran-coated Iron Oxide Nanoparticles in a Rodent Model. *Radiology*, 214 (2000) 568–574.
- [77] Jacobi C., Friedrich T., Lüdtkke-Buzug K., Synthesis and Characterisation of Superparamagnetic Polylactic acid based Polymers, *Int J Mag Part Imag.* 3, Article ID 1710001, 6 Pag
- [78] Agotegaray M., Palma S., Lassalle V., Novel Chitosan Coated Magnetic Nanocarriers for the Targeted Diclofenac Delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol* 14, (2014) 3343–3347
- [79] Zhang Y., Liu J.-Y., Ma S., Z. Ya-Jing, et al. Synthesis of PVP-coated ultra-small Fe_3O_4 nanoparticles as a MRI contrast agent *J Mater Sci: Mater Med.* 21, (2010) 1205–1210

- [80] Patel D., Moon J. Y., Chang Y., Kim T. J., et al., Poly(D,L-lactide-co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vivo study as MRI contrast agent. *Colloids Surf. A*. 313-314, (2008) 91–94.
- [81] Mahmoudi M., Simchi A., Imani M., Milani A.S., et al. Optimal design and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with polyvinyl alcohol for targeted delivery and imaging, *J. Phys. Chem. B* 112, (2008) 14470–14481
- [82] Savić A.B., Čokeša D., Lazarević S., Jokić B., et al. Tailoring of magnetite powder properties for enhanced phosphate removal: Effect of PEG addition in the synthesis process, *Powder Technol.* 301, (2016) 511–519
- [83] Harraz F.A., Polyethylene glycol-assisted hydrothermal growth of magnetite nanowires: Synthesis and magnetic properties, *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures* 40, (2008) 3131–3136.
- [84] Bautista MC, Bomati-Miguel O, Zhao X, Morales MP, et.al., Comparative study of ferrofluids based on dextran-coated iron oxide and metal nanoparticles for contrast agents in magnetic resonance imaging. *Nanotechnology*. 15, (2004) S154–S159
- [85] Ahmad T, Bae H, Rhee I, Chang Y, et al., Particle size dependence of relaxivity for silica-coated iron oxide nanoparticles. *Curr Appl Phys.* 12, (2012) 969–974.
- [86] Na HB, Song IC, Hyeon T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Adv Mater.* 21 (2009) 2133–2148
- [87] Patel D., Chang Y., Lee G H.. Amino acid functionalized magnetite nanoparticles in saline solution. *Curr. Appl. Phys.* 9, (2009) S32–S34
- [88] Kirillov V. L., Balaev D. A., Semenov S. V., Shaikhutdinov K. A., et al. Size control in the formation of magnetite nanoparticles in the presence of citrate ions. *Mater. Chemical Physics* 145, (2014) 75-81
- [89] Horák D., Babič M., Jendelová P., Herynek V., et al. Mannose-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling, *Bioconjugate Chem.*, 18 (2007) 635–644
- [90] Kandzia J., Anderson M.J.D., Mullerruchholtz W., Antibody-coated magnetic albumin microspheres—preparation conditions and analysis of their efficiency in cell-separation, *Immunobiology* 165, (1983) 289–290
- [91] Okuda M., Eloi J.-C., Jones S. E. W., Sarua A., et al. Fe₃O₄ nanoparticles: Protein-mediated crystalline magnetic superstructures. *Nanotechnology* 23, (2012) 415601-415608
- [92] Wang Y., Teng X.W., Wang J.S., Yang H., Solvent-free atom transfer radical polymerization in the synthesis of Fe₂O₃@polystyrene core-shell nanoparticles, *Nano Letters* 3, (2003) 789–793
- [93] Flesch C., Unterfinger Y., Bourgeat-Lami E., Duguet E., et. al.. Poly(ethylene glycol) Surface Coated Magnetic Particles. *Macromol. Rapid Commun.* 26, (2005) 1494–1498
- [94] Yang F., Hu J., Yang D., Long J., et al. Pilot study of targeting magnetic carbon nanotubes to lymph nodes. *Nanomedicine*, 4, (2009) 317–330.
- [95] Kim D.K., Mikhailova M., Toprak M., Zhang Y., et. al. In-situ gold coating of superparamagnetic nanoparticles by microemulsion method, In *MRS Proceedings*. 704, (2002) 137–142.
- [96] Enochs W. S., Schaffer B., Bhide P. G., Nossiff N., et al., MR Imaging of Slow Axonal Transport in Vivo, *Exp Neurol.* 123, (1993) 235–242.
- [97] Petropoulos, A. E., Schaffer, B. K., Cheney, M. L., Enochs, S., et al., MR Imaging of Neuronal Transport in the Guinea Pig Facial Nerve: Initial Findings. *Acta Oto-Laryngologica*, 115, (1995) 512–516
- [98] Jordan A., Scholz R., Wust P., Fähling H., et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 201, (1999) 413–419.
- [99] Lim B.-K., Tighe E. C., Kong S. D., The Use of Magnetic Targeting for Drug Delivery into Cardiac Myocytes. *J. Magn. Magn. Mater.* (2018). doi:10.1016/j.jmmm.2018.09.118
- [100] Conde J., Dias J.T., Grazu V., Moros M., et al., Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicina, *Front Chem.* 48, (2014) 2-27
- [101] Toporkiewicz M., Meissner J., Matuszewicz L., Czogalla A., et al. Toward a magic or imaginary bullet? Ligands for drug targeting to cancer cells: principles, hopes, and challenges. *Int J Nanomedicine.* 10 (2015) 1399-1414

- [102] Ramzy L., Nasr M., Metwally A. A., Awad, G. A. S. Cancer nanotheranostics: A review of the role of conjugated ligands for overexpressed receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 104, (2017) 273–292
- [103] Mou X, Ali Z, Li S, He N. Applications of Magnetic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery System. *J Nanosci Nanotechnol.* 15, (2015) 54-62
- [104] Shen Z, Wu H, Yang S, Ma X, et al., A novel Trojan-horse targeting strategy to reduce the non-specific uptake of nanocarriers by non-cancerous cells. *Biomaterials* 70 (2015) 1-11.
- [105] Funkhouser J., Reinventing pharma: The theranostic revolution. *Current Drugs Discov.* 2, (2002) 17-19
- [106] Lammers T., Kiessling F., Hennink W.E., Storm G., Nanotheranostics and imageguided drug delivery: current concepts and future directions, *Mol. Pharm.* 7, (2010) 1899–1912
- [107] Lammers T., Rizzo L.Y., Storm G., Kiessling F., Personalized nanomedicine, *Clin. Cancer Res.* 18, (2012) 4889–4894
- [108] Rizzo L.Y., Theek B., Storm G., Kiessling F., et al., Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, (2013) 1159–1166
- [109] Mohammadali D., Roemhild K., Drude N. I., von Stillfried S., et al., Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Adr* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.005>
- [110] Schleich N., Danhier F., Pr at V., Iron oxide-loaded nanotheranostics: Major obstacles to in vivo studies and clinical translation. *J Control Release* 198, (2015) 35–54.
- [111] Zubair Iqbal M., Ma X., Chen T., Zhang L., et al. Silica Coated Super-paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONPs): A New Type Contrast Agent of T1 Magnetic Resonance Imaging (MRI), *J. Mater. Chem. B.* 3, (2015) 5172–5181
- [112] Lee N., Hyeon T., Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents.. *Chem. Soc. Rev.* 41, (2012) 2575–2589
- [113] Stephen Z.R., Kievit F.M., Zhang, M. Magnetic nanoparticles for medical MR imaging. *Mater Today.* 14, (2011) 330–338
- [114] Estelrich J., Sánchez-Martín M.J., Busquets M.A., Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 1727–1741.
- [115] Carrasco Muñoz S., Calles Blanco C., Marcin J., Fernández Álvarez C., et al., Contrastes basados en gadolinio utilizados en resonancia magnética. *Radiolog a* 56, (2014) 21–28.
- [116] Li L., Jiang W., Luo K., Song H., et al., Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI contrast agents for Non-invasive Stem Cell Labeling and Tracking, *Theranostics* 3, (2013) 595-615
- [117] Clément O., Siauve N., Cu nod C. A., Fria G., Liver imaging with ferumoxides (Feridex®): Fundamentals, controversies, and practical aspects. *Top Magn. Reson. Imaging* 9, (1998) 167-182
- [118] Reimer P., Marx C., Rummeny E. J., M ller M., et al., SPIO enhanced 2D-TOF MR angiography of the portal venous system: Results of an intraindividual comparison. *J. Magn. Reson. Imaging.* 7 (1997) 945-949
- [119] McLachlan S. J., Morris M. R., Lucas M. A., Fisco R. A., et al., Phase I clinical evaluation of a new iron oxide MR contrast agent, *JMRI* 4, (1994) 301-307
- [120] Taupitz M., Wagner S., Schnorr J., Kravec I., et al., Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging, *Invest. Radiol.* 39, (2004) 394-405
- [121] Simon G. H., Von Vopelius-Feldt J., Fu Y., Schlegel J., et al. Ultrasmall supraparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging of antigen-induced arthritis: A comparative study between SHU 555 C, ferumoxtran-10, and ferumoxytol. *Invest. Radiol.* 41, (2006) 45-51
- [122] Chouly C., Pouliquen D., Lucet I., Jeune, J. J., et al., Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution, *J. Microencapsul.* 13, (1996) 245-255
- [123] Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Front Pharmacol.* 5, (2014) 159-204
- [124] Cho K., Wang X., Nie S., Chen Z., et al., Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 1310–1316.

- [125] Wong H.L., Bendayan R., Rauth A.M., Xue H.Y., et al., A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, (2006) 1372–1381
- [126] Sahoo S.K., Labhassetwar V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol Pharm.* 2, (2005) 373–83
- [127] Lee E.S., Na K., Bae Y.H. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor, *J. Control Release* 103, (2005) 405–418
- [128] Wang X., Wang L., Tan X., Zhang H., et al., Construction of doxorubicin-loading magnetic nanocarriers for assaying apoptosis of glioblastoma cells, *J. Colloid Interface Sci.* 436, (2014) 267–275
- [129] Maedaa H., Wua J., Sawaa T., Matsumurab Y., et al., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Control. Release* 65, (2000) 271–284
- [130] Stollman T.H., Ruers T.J., Oyen W.J., Boerman O.C., New targeted probes for radioimaging of angiogenesis, *Methods* 48, (2009) 188–192
- [131] Torchilin V.P., Drug targeting, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (Suppl 2) (2000) S81–S91
- [132] Iyer A.K., Khaled G., Fang J., Maeda H., Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting, *Drug Discov. Today* 11, (2006) 812–818
- [133] Danhier F., Feron O., Preat V., To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *J. Control. Release* 148, (2010) 135–146
- [134] Prokop A., Davidson J.M., Nanovehicular intracellular delivery systems, *J. Pharm. Sci.* 97, (2008) 3518–3590
- [135] Park J., Kadasala N. R., Abouelmagd S. A., Castanares M. A., et al., Polymer–iron oxide composite nanoparticles for EPR-independent drug delivery. *Biomaterials*, 101, (2016) 285–295
- [136] Lübbe A. S., Bergemann C., Riess H., Schriever F., et al., Clinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: A Phase I Study with 4'-Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors, *Cancer Res* 56, (1996) 4686-4693
- [137] Jeon H., Kim J., Lee Y. M., Kim J., et al. Poly-paclitaxel/cyclodextrin-SPION nano-assembly for magnetically guided drug delivery system. *J. Control. Release* 231, (2016) 68–76
- [138] Pileri P., Campagnoli S., Grandi A., Parri M., et al., FAT1: a potential target for monoclonal antibody therapy in colon cancer. *Br. J. Cancer.* 115, (2016) 40–51
- [139] Grifantini R., Taranta M., Gherardini L., Naldi I., et al.. Magnetically driven drug delivery systems improving targeted immunotherapy for colon-rectal cancer. *J. Control. Release* 280, (2018) 76–86
- [140] Liu J., Huang Y., Kumar A., Tan A., et al. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnol Adv.* 32, (2014) 693-710
- [141] Menon J.U., Jadeja P., Tambe P., Vu K., et al. Nanomaterials for photo-based diagnostic and therapeutic applications. *Theranostics* 3 (2013) 152-166
- [142] Thakor A.S., Gambhir S.S.. Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin.* 63, (2013) 395-418
- [143] Yang C., Vu-Quang H., Husum D. M. U., Tingskov S. J., et al., Theranostic poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle for magnetic resonance/infrared fluorescence bimodal imaging and efficient siRNA delivery to macrophages and its evaluation in a kidney injury model. *Nanomedicine* 13, (2017) 2451–2462
- [144] Huang Y., Mao K., Zhang B., Zhao Y., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics, *Mater. Sci. Eng. C* 70, (2017) 763–771
- [145] Thirunavukkarasu G. K., Cherukula K., Lee H., Jeong Y. Y., et al., Magnetic field-inducible drug-eluting nanoparticles for image-guided thermo-chemotherapy. *Biomaterials* 180, (2018) 240–252
- [146] Elbially N. S., Fathy M. M., AL-Wafi R., Darwesh R., et al., Multifunctional magnetic-gold nanoparticles for efficient combined targeted drug delivery and interstitial photothermal therapy. *Int. J. Pharm.* 554, (2019) 256-263

Capítulo II

Materiales y técnicas de caracterización

Materiales y técnicas de caracterización

En este capítulo se detallan los reactivos usados en todo el trabajo de tesis. Además, se describen, en términos generales, los principios teóricos en los que se basan cada una de las técnicas de caracterización empleadas y la preparación correspondiente de las muestras.

2.1- Reactivos

El cloruro férrico hexahidratado (99.99%) y el dodecilsulfato de sodio (SDS) (Biopack, Argentina). Sulfato ferroso heptahidratado (99.99%) (Mallinckradt Chemical Works, Estados Unidos). Sulfito de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio y ácido acético (28-29%) (Cicarelli, Argentina). Alcohol absoluto (Quimicor, Argentina), 3-aminopropiltriethoxisilano (APTS) (Avocado Research Chemicals, Reino Unido). N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC) (Fluka, Alemania). Acido fólico (AF) y dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, Alemania). Suero de albúmina bovina (Winer Lab., Argentina) y Solución de Ringer (ROUX-OCEFA S.A, Argentina). Por último, la Doxorubicina comercial fue provista por Laboratorios IMA (Argentina) y donada por el Hospital Provincial de Neuquén (Argentina). Se utilizó agua bidestilada con $5.00\mu\text{S}$ de conductividad.

2.2- Técnicas instrumentales de caracterización.

En la siguiente tabla se resumen las técnicas empleadas para la caracterización de los diferentes materiales obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis, junto con la información de interés brindada por cada una de ellas y el equipamiento utilizado.

Tabla 2.1. Técnicas de caracterización.

Técnica	Características a observar	Equipamiento
<i>Difracción de rayos x</i>	Patrón cristalino y grado de cristalinidad	Philips PW 1710
<i>Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier</i>	Presencia de grupos funcionales asociados a los distintos componentes de las partículas.	Thermo Scientific Nicolet iS50
<i>Dispersión de luz dinámica</i>	Diámetro hidrodinámico–Grado de polidispersión	Malvern Zetasizer
<i>Microelectroforesis Laser Doppler</i>	Potencial zeta	Malvern Zetasizer
<i>Microscopía de transmisión electrónica</i>	Tamaño y morfología de las partículas	JEOL 100 CX II,
<i>Espectroscopía molecular Ultravioleta-Visible</i>	Confirmación de la funcionalización de las partículas. Estimación de la carga de fármaco. Medidas turbidimétricas.	Agilent Technologies 8453A
<i>Espectroscopía de Absorción atómica de llama</i>	Contenido de hierro	GBC Avanta 932
<i>Análisis termogravimétrico</i>	Estimación del contenido de recubrimiento orgánico.	Rigaku DTA-TAS 1000
<i>Magnetómetro de muestra vibrante</i>	Caracterización magnética	Magnetómetro SQUID, modelo PPMS de Quantum Design

A continuación, se especifican los principios teóricos en los que se basan cada una de ellas, detallando el tratamiento o preparación que las muestras requirieron en cada caso.

2.2.1- Difracción de Rayos X

Se utilizó la técnica de difracción de rayos X para realizar la caracterización estructural de las nanopartículas y analizar las fases de óxido de hierro presentes en las muestras. Además de la identificación del material, fue posible conocer el grado

de cristalinidad del mismo dado que los materiales con cristales muy desarrollados generan difractogramas con picos bien definidos mientras que los más amorfos generan desde picos de difracción anchos hasta domos.

2.2.1.1-Fundamento físico de XRD

La difracción de rayos X se produce por la interacción entre un haz que presenta una energía similar a la correspondiente a la distancia interplanar de los átomos “d” (del orden de los rayos X) y los electrones del entorno ordenado de un cristal (ó estructura cristalina).

La técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre el sólido sujeto a estudio. La interacción entre el mismo y los electrones de la materia que atraviesa dan lugar a una dispersión. Al producirse la dispersión tienen lugar interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados. El resultado es la difracción, que da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, por medio de la ley de Bragg[1]

$$n\lambda = 2d_{hkl} \times \text{sen}\theta \quad (1)$$

Donde λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X, θ es el ángulo que forman el haz incidente y los planos cristalinos, n es un número entero y d_{hkl} es la distancia entre planos cristalinos.

Esta ley postula que cuando un haz de rayos X incide sobre la superficie de un cristal formando un ángulo θ una porción del haz es dispersada por la capa de átomos de la superficie mientras que la porción no dispersada del haz penetra en la segunda capa de átomos donde, nuevamente una fracción es dispersada y así sucesivamente con cada capa hasta la profundidad de aproximadamente 1000 nm. El efecto acumulativo de esta dispersión producida por los centros regularmente espaciados del cristal es la difracción del haz.

Luego, si se representa la intensidad de radiación que llega al detector, frente al ángulo θ , aparecerá un pico cuando se cumpla la condición de Bragg. A dicha representación se la denomina diagrama de difracción o *difractograma*.

Cada fase cristalina da lugar, por tanto, a un diagrama de difracción de polvo único [2]. Esta propiedad de los difractogramas se puede aplicar en la identificación de fases por comparación de los picos característicos presentes en un difractograma experimental con listados de picos característicos de fases puras convenientemente clasificados en la base de datos JCPDS (*Joint Committee for Powder Diffraction Sources*) de la ICDD (*International Center for Diffraction Data*).

Un difractómetro de rayos X está compuesto por una fuente de energía que suele ser un ánodo giratorio que produce un haz de rayos X de una determinada longitud de onda, un monocromador que se ocupa de aislar el haz de rayos X deseado, un colimador que se ocupa de alinear el haz de rayos X, un goniómetro giratorio que es donde se encuentra situándola muestra cristalina y que permite posicionar ésta en diferentes ángulos con respecto al haz y un detector que es el encargado de grabar o recoger el patrón de difracción[2]. El equipo es calibrado previamente con un patrón de NaCl cuyos ángulos de difracción son perfectamente conocidos.

A partir de los difractogramas fue posible además, estimar el tamaño promedio del cristal de magnetita. Para ello, se utilizó la ecuación de Scherrer (Ecuación 2)[3].

$$D_{XRD} = \frac{\kappa \lambda}{B_c \cos \theta} \quad (2)$$

Siendo κ una constante que depende de las condiciones experimentales cuyo valor es de 0,89, λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X, que en este caso es la línea CuK α (1,5406 Å). BC es la anchura a media altura del pico con índice de Miller (311) que es el de mayor intensidad [3]; corregida ($B_c = B_{EXPERIMENTAL} - B_{INSTRUMENTAL}$) donde $B_{INSTRUMENTAL}$ es 0,11 en radianes y θ es el ángulo donde tiene lugar la difracción en grados.

2.2.1.2- Preparación de la muestra e instrumentación empleada.

Para realizar la determinación se emplearon unos 50 mg de muestra en polvo que se depositaron sobre un portamuestras de vidrio de forma cuadrada.

Durante este trabajo se utilizó un difractor de polvo de rayos X Philips 1710 que trabaja con ánodo de cobre, radiación CuK α (1,5406 Å) y monocromador curvo de grafito, operado a 45 Kv y 30 mA. Los difactogramas fueron registrados entre 10 y 80° (valores de 2 θ), con pasos de 0,02-0,04 (2 θ) y a una velocidad de 2 s/paso.

2.2.2- Espectroscopía infrarroja de transmisión con Transformada de Fourier

La técnica de espectroscopía infrarroja se empleó para la caracterización del recubrimiento presente en la superficie de las nanopartículas. Se pretendió mediante la implementación de esta técnica identificar los grupos funcionales presentes en la muestra a partir sus vibraciones características en el espectro infrarrojo y con ello inferir acerca de la composición de las nanopartículas magnéticas (NPMs).

2.2.2.1-Fundamento físico de la espectroscopía IR

Un espectro infrarrojo permite identificar los movimientos vibracionales característicos de un enlace dentro de una molécula. Dichos movimientos vibracionales pueden ser de tensión (cambio de la longitud del enlace pero no del ángulo), o de torsión (cambio del ángulo del enlace pero no de la longitud). Para que una vibración sea registrada en el espectro, la molécula debe experimentar un cambio en su momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Si un haz de luz en el rango de la radiación infrarroja incide sobre la molécula, la luz puede ser absorbida cambiando el momento dipolar del enlace, y generando un estado vibracional excitado que podrá ser registrado con el equipo de infrarrojo (IR). La frecuencia a la que aparece cada vibración es inversamente proporcional a la masa reducida de los átomos que lo forman y directamente proporcional a la fortaleza del enlace[4].

Cada grupo atómico o molécula tiene un espectro de absorción característico (huella dactilar) y está compuesto por distintas bandas de absorción, cada una de ellas debidas a un tipo de enlace determinado (caracterizado por la fuerza de enlace y los átomos que lo forman) y a su modo de vibrar[5].

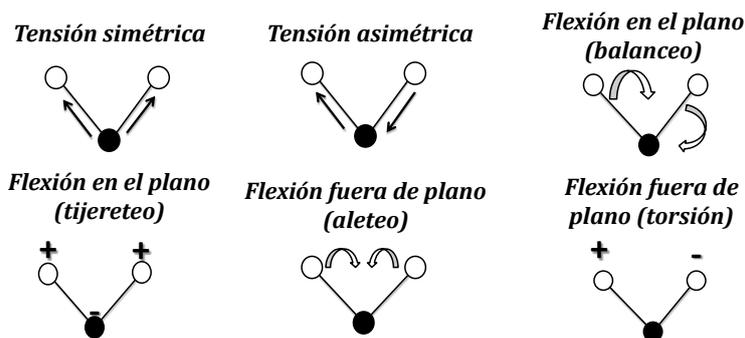


Figura 2.1 Distintos modos de vibración de una molécula triatómica.

2.2.2.2- Preparación de la muestra e instrumentación empleada

La preparación de la muestra involucró la formación de una pastilla, mezclando bromuro de potasio con las NPMs en una proporción aproximada de 2% en peso. La mezcla se compactó con una prensa hidráulica aplicando una presión aproximada de 5000 kg/cm². La mezcla compactada se colocó en la unidad de muestra del espectrómetro FTIR.

Se empleó un espectrofotómetro de transformada de Fourier Thermo Scientific Nicolet iS50 con Esfera de Integración barriendo la región de energías comprendida entre 4000 y 400 cm⁻¹.

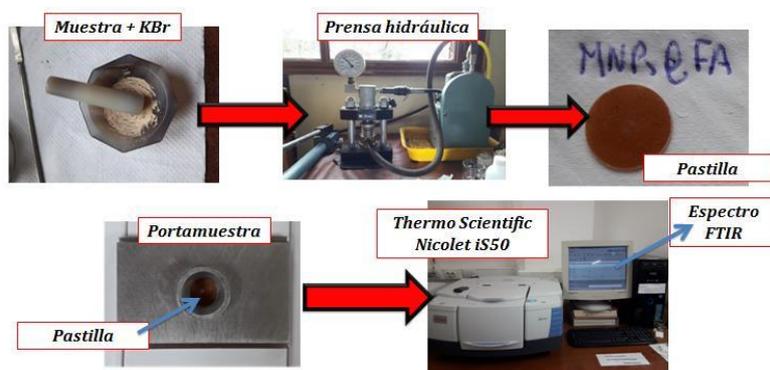


Figura 2.2 Esquema de la secuencia de pasos durante todo el trabajo experimental para obtener el espectro FTIR de una muestra.

El equipo utilizado en este caso para realizar los espectros IR consta de una fuente que es un cilindro de SiC por la que pasa una corriente eléctrica que lo eleva a 1200 °C y desprende radiación infrarroja, una pieza llamada “beamsplitter” que se encarga de desdoblarse el haz IR en 2 partes y enviarla mitad de la radiación a un espejo fijo y la otra mitad a un espejo móvil que pasa a través de la muestra.

Posteriormente los haces vuelven a ser recombinados y la variación en intensidad del haz en función del tiempo da como resultado un interferograma (intensidad en función del tiempo) que es traducido por el interferómetro aplicando la transformada de Fourier dando lugar al espectro (intensidad en función de la frecuencia). Durante el registro del espectro, un haz de láser de He-Ne calibra internamente la frecuencia del aparato [6]

2.2.3- Dispersión de luz dinámica

Esta técnica se empleó para determinar el diámetro hidrodinámico (DH) y el grado de polidispersión de las partículas dispersas en distintos medios.

2.2.3.1-Fundamento de la técnica de dispersión de luz dinámica

El principio que permite emplear DLS para medir diámetro hidrodinámico de partículas se basa en que las partículas pequeñas y las moléculas presentan un movimiento térmico aleatorio constante, llamado movimiento browniano (parametrizado en el coeficiente de difusión traslacional). Es decir, un movimiento al azar que se produce como consecuencia del choque de las partículas con las moléculas del medio que las rodea. Dado que las partículas difunden a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, partículas más pequeñas difunden más rápido que las partículas más grandes.

Al incidir energía de la región del visible sobre las partículas en suspensión dentro de un líquido, éstas dispersan luz en todas las direcciones llegando al detector la radiación dispersada a un ángulo específico. La intensidad de dispersión fluctúa con el tiempo, y esto se detecta utilizando un detector de fotodiodos de avalancha (APD). Un correlador digital compara las fluctuaciones de intensidad a lo largo del tiempo con respecto a la primera señal creando una función de correlación. Si las partículas que se están midiendo poseen tamaño pequeño la función de correlación decaerá a tiempos cortos (evidencia del movimiento rápido de las partículas). En cambio, si las partículas son grandes la función de correlación decaerá a tiempos largos (ver figura 2.3). Finalmente, los datos provenientes de esta curva son transformados en medidas de diámetro hidrodinámico y distribución de tamaños, a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 3)[7].

$$DH = \frac{k_B T}{3\pi \eta D} \quad (3)$$

Donde DH es el diámetro hidrodinámico, k_B constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, η la viscosidad del disolvente y D es el coeficiente de difusión trasnacional.

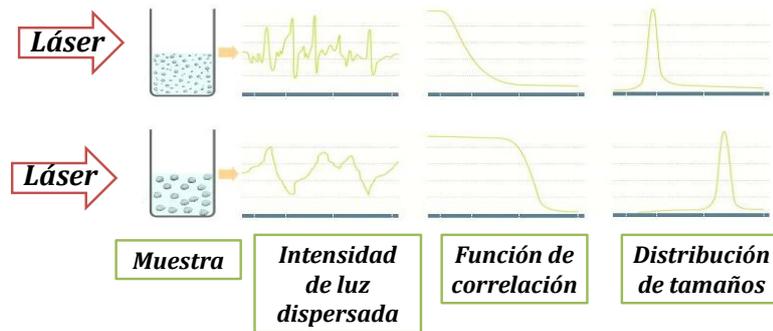


Figura 2.3. Representación del comportamiento de la luz al interactuar con partículas pequeñas o grandes en suspensión. Adaptado [8]

Dado que el coeficiente de difusión traslacional dependerá tanto del “núcleo” de la partícula como de la estructura de la superficie y la presencia de iones en el medio líquido, los tamaños registrados por DLS pueden ser mucho mayores que los observados en microscopía [9], tal como se ilustra en la figura 2.4.

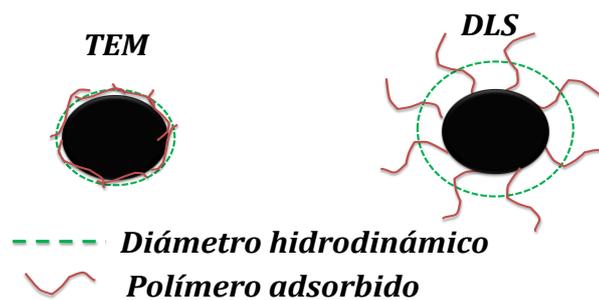


Figura 2.4 Representación de la diferencia entre el DH y el tamaño del núcleo de la partícula medido por microscopía.

La distribución de DH puede ser informada por el software del equipo de tres formas distintas: intensidad de luz dispersada, volumen o número de partículas. Estos mecanismos de ponderación dependen del principio de medición que se utilice.

-Intensidad: Las técnicas de dispersión dinámica de la luz darán una distribución ponderada de la intensidad, donde la contribución de cada partícula en la distribución se relaciona con la intensidad de la luz dispersada por esa partícula. Por ejemplo, usando la aproximación de Rayleigh, la contribución relativa para partículas muy pequeñas será proporcional al tamaño. La aproximación de Rayleigh relaciona la intensidad I de la luz dispersada por una partícula en un haz de luz de longitud de onda λ con la intensidad incidente, I_0 ; cuando el tamaño de la partícula es significativamente menor a λ .

-Número: Una técnica de recuento como el análisis de imágenes dará una distribución ponderada en número en la que cada partícula recibe igual ponderación independientemente de su tamaño. Esto es más útil cuando es importante conocer el número absoluto de partículas-en la detección de partículas extrañas por ejemplo-o donde se requiere alta resolución (partícula por partícula).

-Volumen: Las técnicas de dispersión estática de la luz, tales como la difracción láser, darán una distribución ponderada en volumen. Aquí la contribución de cada partícula en la distribución se relaciona con el volumen de esa partícula (equivalente a masa si la densidad es uniforme). Es decir, la contribución relativa será proporcional al tamaño. Esto es a menudo extremadamente útil desde una perspectiva comercial ya que la distribución representa la composición de la muestra en términos de su volumen / masa y, por tanto, su potencial valor económico [9].

Cuando se comparan los datos del tamaño de partícula para la misma muestra expresado de diferentes formas, los tipos de distribución que se miden e informan pueden producir resultados muy diferentes. Esto se ilustra claramente tomando como referencia una muestra compuesta por igual número de partículas con diámetros de 5 y 100 nm. La distribución ponderada en número es la misma para ambos tipos de partículas. La distribución expresada en términos de intensidad muestra una señal un millón de veces más elevada para las partículas más grandes que 100 nm. La distribución en volumen es intermedia entre los dos, como se observa en la figura 2.5.

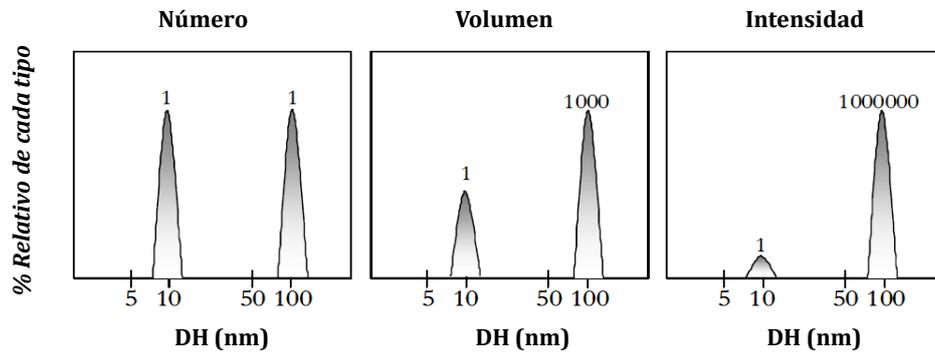


Figura 2.5. Distribuciones de DH de una misma muestra expresadas en número, volumen o intensidad.

2.2.3.2-Preparación de la muestra e instrumentación empleada

Para realizar las medidas de DH, 2 mg de muestra se dispersaron en 10 mL de solvente bajo tratamiento con ultrasonido. 1 mL de la suspensión se colocó en una celda descartable de poliestireno o vidrio de 12 mm de camino óptico.

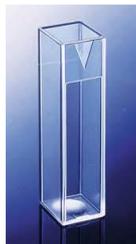


Figura 2.6 Celda de poliestireno utilizada para la medición de diámetro hidrodinámico de dispersiones en medio acuoso (disponible en malvern.com).

El Índice de polidispersión (IPD) es un parámetro que brinda el equipo en simultáneo con la medida de DH. Como su nombre lo indica, proporciona información acerca del grado de polidispersión que presenta la muestra que se analiza. Según bibliografía, valores de $IPD \leq 0.1$ corresponden a nanosistemas altamente monodispersos, mientras que valores entre 0.1-0.5 se obtienen para nanosistemas moderadamente monodisperso. Un $IPD > 0.5$ es indicativo de muestras muy polipersas en el medio estudiado [10,11]. Para el caso de nanoformulaciones que

deseen emplearse con fines biológicos o biomédicos, en general se esperan valores de IPD inferiores a 0.5[12].

Se evaluó, además, la influencia de la concentración de la dispersión en el valor medio de DH determinado por DLS. Para ello se empleó una dispersión madre de concentración $[MAG=3.5 \text{ mg.mL}^{-1}]$ y se prepararon siete dispersiones diluidas de modo de estudiar un rango de concentraciones entre 1.9×10^{-3} y 0.5 mg.mL^{-1} . Los resultados obtenidos surgieron a partir de una serie de entre 12 y 100 medidas. Todas las muestras se analizaron por triplicado bajo las mismas condiciones y las medidas del DH se registraron en el modo número.

El conjunto de datos obtenidos se muestra en la figura 2.7.

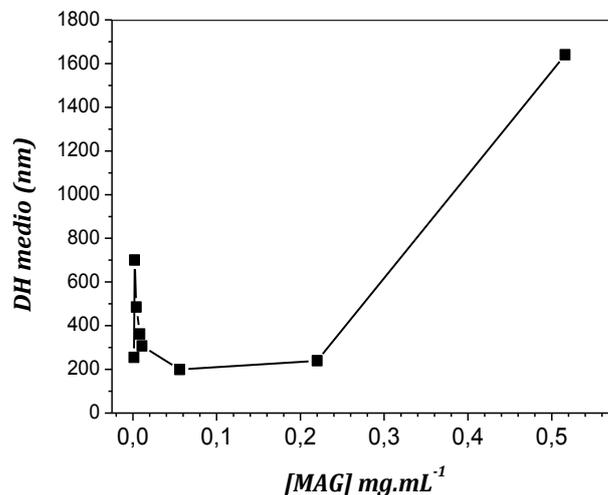


Figura 2.7. Evolución del DH en función de la concentración de la dispersión.

Puede observarse que a concentraciones bajas de MAG, el DH crece conforme aumenta la concentración de la dispersión. Sin embargo, a mayores concentraciones de MAG existe, hasta un cierto punto ($0.22 \text{ mg MAG.mL}^{-1}$), un comportamiento inverso.

Ahmadi y col. establecieron que a medida que se incrementa la concentración de NPMs en la dispersión las fuerzas de atracción aumentan y se forman agregados, lo que lleva a valores elevados de DH[13].

Sin embargo, es preciso considerar que al aumentar la concentración de la dispersión aumenta la viscosidad de la misma, manteniéndose constantes los demás

parámetros, lo que lleva a una disminución del diámetro hidrodinámico, de acuerdo con la ecuación de Stokes-Einstein[13]. Esto es válido para un rango de concentración determinado y específico para cada sistema. Por lo tanto, es importante remarcar la necesidad de realizar una evaluación del valor del DH en función de la concentración cada vez que se obtiene una formulación.

Se utilizó el instrumento Malvern Zetasizer, que se muestra en la figura 2.8, para realizar las mediciones.



Figura 2.8. Fotografía del instrumento Malvern Zetasizer utilizado durante el desarrollo del trabajo experimental (disponible en malvern.com)

El instrumento consta de un láser que suministra un haz de luz que atraviesa la celda que contiene la dispersión de NPMs, un detector que está situado a un ángulo de 90° para recoger la luz dispersada en esa dirección (minimizando así la radiación procedente de contaminantes y los efectos de dispersión múltiple debido a la presencia de muchas partículas), un atenuador que reduce la intensidad de la luz que llega al detector, un correlador que compara la intensidad de la luz dispersada a lo largo del tiempo y un ordenador donde se analizan los datos [7].

2.2.4- Microelectroforesis Láser Doppler

Esta técnica se implementó para conocer la carga superficial de las diferentes nanoformulaciones en términos del ζ pot en función del pH del medio donde se dispersaron. De esta manera se obtuvo información sobre las fuerzas intervinientes en la estabilización de las mismas. La información aportada por esta técnica permitió verificar, en ciertos casos, la composición de las NPMs así como los mecanismos probables de interacción entre los distintos componentes.

2.2.4.1-Fundamento de la técnica de Potencial zeta

El ζ pot, es una medida de la carga eléctrica "efectiva" sobre la superficie de las partículas y permite inferir la estabilidad de carga de las partículas coloidales. Cuando una partícula tiene una carga superficial neta, la carga es "apantallada" por iones de carga opuesta a la superficie de las partículas (contra-iones). Estos iones forman una rígida capa adyacente alrededor de la partícula denominada capa de Stern. Fuera de esta capa fija, existen distintas composiciones de iones de polaridad opuesta, formando un área nebulosa. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de la capa difusa, donde la distribución de iones se determina por un balance de fuerzas electrostáticas y movimiento termal aleatorio. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa son los que juntos constituyen la doble capa[14]. Cerca de la superficie de la partícula, los contra-iones tienen una alta concentración, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones en el seno de la disolución (ver figura 2.9).

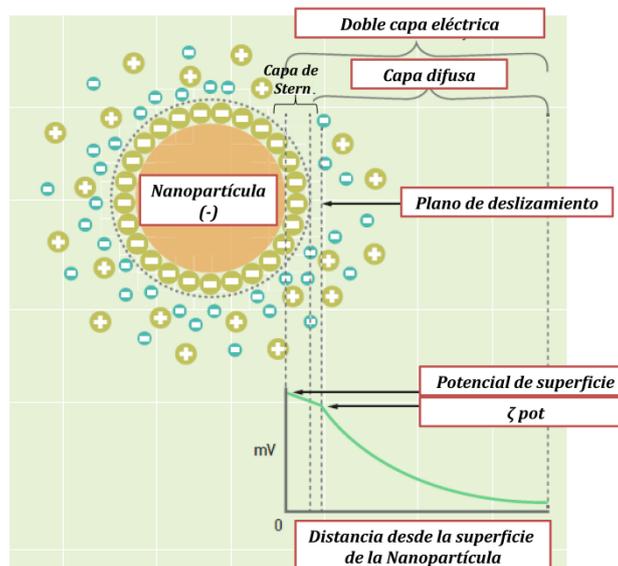


Figura 2.9. Representación de la doble capa eléctrica alrededor de una partícula cargada negativamente (adaptado de [7])

La partícula y su atmósfera cargada producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie de la partícula y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero más allá de la capa difusa. Un punto de particular interés es el valor del potencial en el plano de deslizamiento.

Este potencial es conocido como el potencial zeta, el cual es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse de una forma tan sencilla[15].

La medición de la carga superficial de las partículas se realiza aplicando un campo eléctrico a través de la dispersión. Las partículas migrarán hacia el electrodo de carga opuesta. El cambio de frecuencia o fase de un haz láser incidente, causado por el movimiento de las partículas, se mide como la movilidad electroforética, y ésta es convertida matemáticamente a ζ pot mediante la ecuación de Smoluchowski o Hückel. Éstas son los dos casos límite de la relación entre movilidad electroforética y ζ pot. El primero es aplicable a partículas grandes con bicapas eléctricas delgadas, mientras que el segundo es válido si las partículas son muy pequeñas y por lo tanto su bicapa eléctrica es más gruesa[8,16].

2.2.4.2-Preparación de las muestras.

Para estas mediciones se emplearon las mismas dispersiones acuosas preparadas para medir el DH mediante DLS. La dispersión acuosa se transfirió a la celda para electroforesis (figura 2.10) mediante una jeringa sin aguja o una pipeta tipo Pasteur, evitando el ingreso de burbujas de aire.

El instrumento que se utilizó se incluye en la figura 2.10

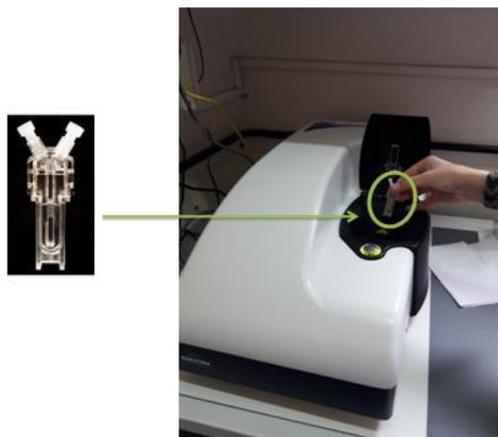


Figura 2.10 Imagen del instrumento junto con la celda para la medida de ζ pot.

Se realizaron dos tipos de mediciones; por un lado, para conocer el ζ pot de una muestra a un pH fijo. Por otra parte, para muestras seleccionadas, se realizó el

análisis de la variación del ζ pot en función de la variación del pH del medio. En este caso, se prepararon dispersiones de 200 mg.L⁻¹ en NaCl 0.01 mol.L⁻¹ como electrolito de soporte y se sometieron a análisis utilizando soluciones de HCl 0.1 mol.L⁻¹ y NaOH 0.1 mol.L⁻¹ para ajustar el pH de las suspensiones. Para evaluar la carga superficial de las nanoformulaciones las mediciones de movilidad electroforética se realizaron en el rango de pH entre 3.5 a 9.0. A partir de este ensayo se determinó el punto isoeléctrico (PI) de cada muestra. Este parámetro se define como el valor pH donde la movilidad electroforética o ζ pot es cero.

2.2.5- Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión permitió la caracterización estructural y morfológica de las muestras mediante la adquisición de imágenes de las nanoformulaciones a partir de dispersiones que posteriormente fueron secadas para su análisis. A partir de estas imágenes se pudo inferir el tamaño del núcleo magnético y visualizar la forma de las nanopartículas.

2.2.5.1- Fundamento básico del microscopio

El microscopio electrónico se compone de un sistema de vacío, una pantalla donde se proyecta una imagen aumentada de la muestra y una cámara fotográfica o pantalla de ordenador que tienen la función de registrar la imagen. Dentro del sistema de vacío se encuentran un cañón que produce un haz de electrones y un sistema de lentes electromagnéticas. El esquema del microscopio electrónico se puede observar en la figura 2.11. Para la obtención de una imagen, el cañón electrónico produce un haz de electrones que es acelerado mediante una diferencia de potencial que puede oscilar entre 80 y 600 KeV dependiendo del modelo. El haz es dirigido y focalizado por las lentes condensadoras hacia la rejilla donde está depositada la muestra. Una vez que interactúan con la muestra unos electrones chocarán y otros la atravesarán formándose así una imagen gracias a las lentes objetivo. Esta posteriormente será aumentada y proyectada por las lentes proyectoras[3].

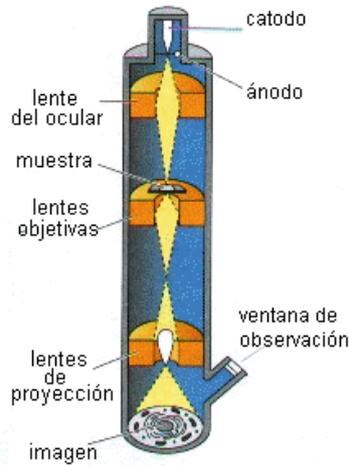


Figura 2.11 Representación de un microscopio electrónico de transmisión. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microscopia/microscopia1.htm>

2.2.5.2- Preparación de la muestra e instrumentación empleada.

Para visualizar las NPMs en el microscopio electrónico de transmisión es necesario preparar una suspensión diluida de éstas. En particular, se emplearon las mismas dispersiones acuosas preparadas para medir el DH mediante DLS. A continuación, se tomaron unas gotas de esta suspensión con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre una rejilla de cobre donde se dejaron evaporar. Una vez que la rejilla se secó se introdujo en el microscopio.

Se empleó un microscopio de la marca JEOL 100 CX II, que opera con una diferencia de potencial de 100 KeV y posee una resolución de 2nm.

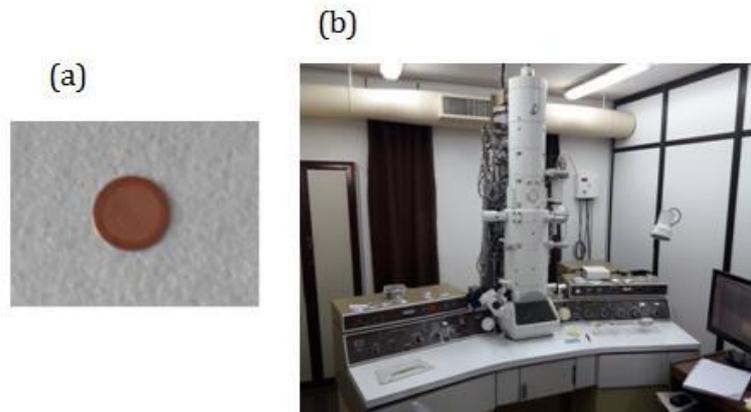


Figura 2.12. Imágenes de (a) rejilla sobre la cual se colocan las muestras y (b) microscopio TEM JEOL 100 CX II

2.2.6- Espectroscopía de absorción molecular Ultravioleta-Visible

Esta técnica fue implementada con tres objetivos principales en el marco de la presente tesis. 1) Confirmar la funcionalización de la superficie de las nanopartículas. 2) Corroborar la carga del fármaco y estimar la capacidad de carga de la nanoformulación. 3) Realizar medidas turbidimétricas en flujo.

2.2.6.1- Fundamento físico de la espectroscopía UV-Vis.

La espectroscopía UV-Vis se basa en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) por una molécula. Dado que existen diferentes tipos de transiciones electrónicas, para cada una de las cuales se requiere distinta cantidad de energía, la longitud de onda (λ) que contenga la energía adecuada va a ser absorbida por la molécula para permitir la transición. Debido a ello, la espectroscopía UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula. Esta técnica permite la realización tanto de análisis cualitativo como cuantitativo de una muestra. La condición fundamental es que la molécula a estudiar presente un grupo cromóforo y que se encuentre disuelta o dispersa en solución.

Debido a que la absorbancia de una muestra se relaciona con la concentración del analito en la misma a través de la Ley de Lambert-Beer (4), es posible realizar el análisis cuantitativo de muestras

$$A = \epsilon \times b \times C \quad (4)$$

Donde A es la absorbancia (no tiene unidades), b es la longitud del camino óptico (ancho de la celda que contiene la disolución del analito) y se expresa en cm, C es la concentración molar de la muestra y ϵ es la absorptividad molar, propiedad característica de cada sustancia correspondiente a la cantidad de radiación que absorbe a una longitud de onda determinada por unidad de concentración, siendo sus unidades $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ [17].

Para poder aplicar la ley de Lambert-Beer es necesario seleccionar previamente una longitud de onda puesto que tanto A como ϵ varían con ella. Para ello se obtiene previamente el espectro de absorción de la sustancia, que consiste en una representación de los valores de absorbancia frente a la longitud de onda

expresada en nanómetros (nm). Del espectro de absorción puede seleccionarse el valor de longitud de onda para el cual la absorbancia es máxima.

Si bien la ley de Lambert-Beer indica que a una representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración le correspondería una línea recta, esto sólo tiene lugar para disoluciones diluidas, por ello, no es conveniente utilizar la expresión matemática directamente, sino construir en cada caso la recta de calibrado que confirme que la ecuación de Lambert-Beer se cumple en el intervalo de concentraciones en el que se trabaja. Esta recta se construye midiendo la absorbancia de una serie de disoluciones de concentración perfectamente conocida[18].

2.2.6.2- Preparación de la muestra e instrumentación empleada.

En general se usaron dispersiones de NPMs que requirieron diferentes tratamientos y blancos de reactivos, por lo que se detallarán oportunamente a lo largo de los próximos capítulos. La celda utilizada fue una de cuarzo de 1 cm de camino óptico y se empleó el espectrofotómetro Agilent Technologies 8453A que se incluye en la figura 2.13 junto con la celda de cuarzo.

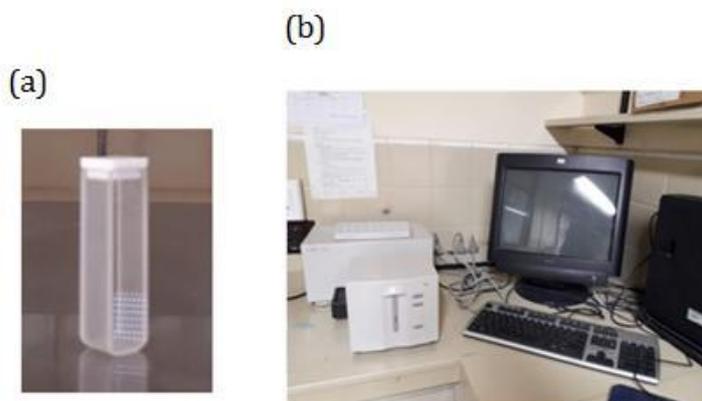


Figura 2.13. Imágenes de (a) celda de cuarzo utilizada para la realización de las medidas y (b) Instrumento Agilent Technologies 8453A

2.2.7- Espectroscopía de absorción atómica de llama

Esta técnica se implementó con el fin de determinar el contenido de Fe en las diferentes muestras, y estimar la composición de las NPMs.

2.2.7.1- Fundamento físico de la EAA

La muestra solución es aspirada a través de un tubo capilar y conducida a un nebulizador donde ésta se desintegra y forma un spray o pequeñas gotas de líquido. Las gotas formadas son conducidas a una llama, donde se produce una serie de eventos que originan la formación de átomos (atomización). Estos átomos absorben cuantitativamente la radiación emitida por la lámpara de cátodo hueco (específica para Fe, en este caso) y la cantidad de radiación absorbida será función de su concentración. Debido a que la cantidad de energía absorbida está relacionada con la cantidad de átomos en la trayectoria de la luz, la concentración de masa de la muestra se puede cuantificar mediante la comparación de la señal con los estándares de calibración de concentraciones conocidas[19]. La señal de la lámpara una vez que pasa por la llama, llega a un monocromador, que tiene como finalidad el discriminar todas las señales que acompañan la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega a un detector o transductor y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura.

2.2.7.2- Preparación de la muestra e instrumentación empleada

Dada la naturaleza inorgánica de las partículas de magnetita y la naturaleza orgánica de los recubrimientos utilizados, se usó ácido clorhídrico para el procedimiento de digestión de las muestras. Una masa conocida -10 a 15 mg- se dispersó en 25,0 mL de HCl al 10% y se colocó en ultrasonido hasta la total desintegración de la misma, de modo que todo el hierro de las nanopartículas pasó a estar como iones libres en la solución para su posterior determinación. Previo a su análisis, la muestra se filtró.

Para la realización de estos análisis se utilizó el equipo GBC Avanta 932



Figura 2.14 Imagen del equipo GBC Avanta 932, utilizado durante el desarrollo del trabajo de tesis.

2.2.8 Análisis termogravimétrico

A través del análisis termogravimétrico se estimó el porcentaje de recubrimiento orgánico presente en las diferentes muestras aportando información acerca de la composición de las NPMs.

2.2.8.1- Fundamento físico del TGA

La técnica de análisis termogravimétrico se basa en la continua medición de la pérdida de masa de una muestra en función de la temperatura y/o del tiempo bajo una atmósfera adecuada que puede ser de aire estático, aire dinámico, O₂, N₂, Ar o H₂[6].

2.2.8.2- Preparación de la muestra e instrumentación empleada.

Para la realización de los análisis termogravimétricos se necesitó una cantidad de muestra en polvo entre 10 y 20 mg.

Los análisis termogravimétricos se llevaron a cabo en un equipo Rigaku DTA-TAS 1000 (ver figura 2.15 (a)). Una pequeña cápsula de platino se utilizó como portamuestra (ver figura 2.15 (b)), mientras que alúmina fue el material de referencia utilizado ya que se caracteriza por no sufrir modificaciones en el rango de

temperaturas seleccionado para el trabajo. El equipo de termogravimetría consta de una balanza analítica muy sensible, para registrar pequeñas variaciones del peso de la muestra, un horno que es el lugar donde se lleva a cabo el calentamiento de la muestra (desde una temperatura ambiente hasta una temperatura final de 500 °C) a una velocidad controlada (10 °C/min). Los análisis fueron realizados en presencia de un flujo de aire. Un microprocesador controla el instrumento en todo momento y permitió adquirir y visualizar los resultados.

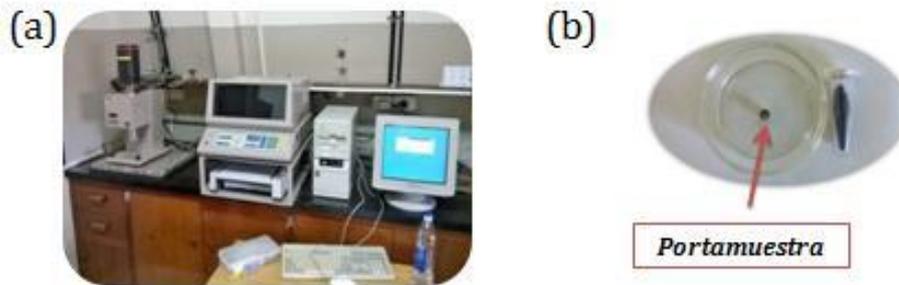


Figura 2.15. Imagen (a) Equipo Rigaku DTA-TAS 1000 y (b) pequeña cápsula de platino (portamuestra)

2.2.9- Magnetómetro de muestra vibrante

Utilizando el magnetómetro se realizó la caracterización magnética de las partículas de magnetita a diferentes temperaturas. Mediante el empleo de esta técnica se puede conocer la respuesta magnética del material (m), su magnetización de saturación (M_s), el valor de su campo coercitivo ó coercitividad (H_c), su susceptibilidad inicial (χ_{ini}), su magnetización remanente (M_r) y su temperatura de bloqueo (T_b) al aplicar un campo magnético (H).

Es importante aclarar que, en el marco de esta tesis sólo se centró el interés en evaluar el comportamiento magnético de las muestras en términos de la existencia de superparamagnetismo y de la magnetización de saturación (M_s), sin avanzar en estudios físicos básicos más profundos del magnetismo. Los parámetros que se evaluaron se relacionan directamente con las aplicaciones biomédicas que se pretenden para las NPMs diseñadas. (RMI, direccionamiento magnético, liberación controlada de fármacos)[20,21].

2.2.9.1- Fundamento físico del VSM

Para obtener la medida del momento magnético de la muestra, ésta se sitúa entre las bobinas de detección, vibrando a una frecuencia y amplitud característica. Al aplicar un campo magnético perpendicular (en el caso del electroimán) o paralelo (para bobina) al movimiento de la muestra se genera un cambio de flujo magnético según rige la ley de Faraday:

$$V_i = N \frac{d\Phi}{dt} \quad (5)$$

Donde V_i es el voltaje inducido, N el número de vueltas que posee la bobina y $d\Phi/dt$ es el cambio de flujo magnético. Este cambio de flujo genera una fuerza electromotriz en las bobinas de detección que es proporcional al momento magnético de la muestra.

La caracterización de las muestras se realizó mediante ciclos de magnetización a diferentes temperaturas. Como características generales en los experimentos, la muestra se encuentra vibrando a una frecuencia de 81 Hz y una amplitud de 0,25 mm. La calibración se lleva a cabo con un patrón de níquel.

Para los ciclos de magnetización se satura la muestra aplicando un campo de 10000 Oe y a continuación se registra el ciclo variando el campo magnético hasta -100000Oe y regresando al punto inicial. La evaluación de la M_s (valor de la magnetización cuando todos los momentos magnéticos están alineados con el campo magnético aplicado) se realiza extrapolando la recta que se obtiene de la magnetización a alto campo magnético con el eje de ordenadas. Mediante este tipo de medidas también se puede obtener la susceptibilidad magnética inicial (χ_{ini}) que representa la respuesta magnética del material al aplicarle un campo magnético pequeño, la magnetización remanente (M_r) que es el valor de la magnetización cuando el campo magnético se hace 0 tras haber saturado la muestra previamente, y la coercitividad o campo coercitivo (H_c) que es el campo magnético en el que el valor de la magnetización se anula.

Un magnetómetro de muestra vibrante consta de un electroimán (para campos menores de 3 T) o una bobina superconductora (para campos magnéticos altos) que se encargan de generar el campo magnético sobre la muestra, dos bobinas de detección (en nuestro caso son dos pares de bobinas) que son las encargadas de

registrar la fuerza electromotriz generada por el movimiento de la muestra, un crióstato (en general con líquido criogénico de N₂ o He líquido) que se ocupa de alcanzar y mantener la temperatura deseada en la medida, un dispositivo de vibración de la muestra para hacerla vibrar a una frecuencia y amplitud deseadas, un amplificador de señal para aumentar la sensibilidad de la medida y por último un ordenador desde el cual se controla el estado del magnetómetro, el tipo de experimento a realizar, las variables de éste y el registro de las distintas medidas llevadas a cabo por el magnetómetro [22,23].

2.2.9.2- Preparación de la muestra e instrumentación empleada.

La caracterización de las medidas magnéticas del polvo se lleva a cabo depositando una pequeña cantidad de la muestra en polvo (entre 5 y 20 mg) en el interior de una cápsula de gelatina como portamuestra. El polvo fue compactado al fondo de la cápsula de gelatina introduciendo una fracción de papel tissue y así dejarlo inmovilizado. Por último, se colocó en una pajita transparente solidaria a la varilla vibrante del magnetómetro.

El modelo de magnetómetro de muestra vibrante utilizado para la caracterización magnética fue el Lake Shore 7500 con un campo magnético aplicado de -1T a +1T.

2.3- Referencias del capítulo.

- [1] Pope C., X-Ray Diffraction and the Bragg Equation, *Journal of Chemical Education* 74 (1997), 129-131.
- [2] Azaroff, L. V., *Elements of X-ray Crystallography*. Mc Graw-Hill: New York, USA, 1968.
- [3] Williams D. B.; Carter C. B., *Transmission Electron Microscopy; a textbook for materials science*. Plenum press: New York, USA, 1996.
- [4] Colthup N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E., *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Academic press: New York, USA 1990.
- [5] Tudja P., Khan M.Z., Mestrovic´ E., Horvat M., and Golja P. Thermal Behaviour of Diclofenac Sodium: Decomposition and Melting Characteristics, *Chem. Pharm. Bull.* 49, (2001) 1245—1250.
- [6] Skoog, D. A.; Leary, J. J., *Principles of Instrumental Analysis*. Mc Graw-Hill: New York, USA, 1992.
- [7] Zetasizer Nano User Manual. Malvern Instruments Ltd.: Worcestershire, United Kingdom, 2007.
- [8] Delgado A. V., González-Caballero F., Hunter R.J., Koopal L.K., et al. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J. Colloid Interface Sci.* 309, (2007) 194–224.
- [9] I. Malvern, A Basic Guide to Particle Characterization. INFORM WHITE PAPER, (2012). [http://golik.co.il/Data/ABasicGuidtoParticleCharacterization\(2\)_1962085150.pdf](http://golik.co.il/Data/ABasicGuidtoParticleCharacterization(2)_1962085150.pdf).
- [10] Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release* 235, (2016) 337–351
- [11] Sreeram K.J., Nidhin M., Indumathy R., Nair B.U., Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates, *Bull. Mater. Sci.* 31, (2008) 93–96.

- [12] Agotegaray M., Palma S., Lassalle V. Novel Chitosan Coated Magnetic Nanocarriers for the Targeted Diclofenac Delivery, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, (2014) 3343–3347.
- [13] Ahmadi R., Madaah Hosseini H. R., Masoudi A., Omid H., et al. Effect of concentration on hydrodynamic size of magnetite-based ferrofluid as a potential MRI contrast agent. *Colloids Surf. A* 424, (2013) 113–117.
- [14] Kirby B., Hasselbrink E. Zeta potential of microfluidic substrates:1. Theory, experimental techniques, and effectson separations. *Electrophoresis* 25, (2004) 187–202.
- [15] Stumm W. *Chemistry of the Solid-Water Interface: Processes at the Mineral-Waterand Particle-Water Interfacein Natural Systems.* John Wiley & Sons, Inc.New York, USA, 1992.
- [16] Hunter R., *Foundations of Colloid Science.* Clared on Press: Orford, United Kingdom, 1987.
- [17] Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante, (n.d.). http://www.ua.es/es/investigacion/sti/servicios/analisis_instrumental/microscopia/tem.html.
- [18] Harris, D. C. *Análisis Químico Cuantitativo.* 3ª ed. Capítulo 18. Ed. Reverté, 2007.
- [19] nanoComposix. Characterization Techniques, (n.d.). <http://nanocomposix.com/pages/characterization-techniques> (accessed November 30, 2016).
- [20] Huang Y., Mao K., Zhang B., Zhao Y. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics. *Mater. Sci. Eng. C* 70, (2017) 763–771.
- [21] Fang K., Song L., Gu Z., Yang F., et al. Magnetic field activated drug release system based on magnetic PLGA microspheres for chemo-thermal therapy. *Colloids Surf. B* 136, (2015) 712–720.
- [22] Cullity B. D., *Introduction to Magnetic Materials.* Addison-Wesley: CA, USA, 1972.
- [23] Foner S., Versatile and sensitive vibrating-sample magnetometer. *Review of Scientific Instruments.* 30, (1959) 548-557.

Capítulo III

Síntesis de nanopartículas magnéticas

Síntesis de nanopartículas magnéticas

RESUMEN

En este capítulo se describe la obtención de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, principalmente magnetita (MAG; Fe_3O_4). Para ello, se evaluaron dos métodos de síntesis: co-precipitación y su variante reducción-precipitación. El objetivo del estudio es conseguir un control de las propiedades fisicoquímicas de interés en vista de las aplicaciones de las NPMs en el área biomédica.

Los resultados de la caracterización de las nanoformulaciones revelaron que la técnica de co-precipitación resulta ser la más adecuada para obtener NPMs con mejores propiedades de acuerdo a los requerimientos en cuanto al futuro empleo de las mismas. En función de ello, se examinaron diversas variables experimentales inherentes al método. Se realizó una caracterización exhaustiva tendiente a conocer la composición, propiedades estructurales y de superficie de las NPMs obtenidas. Se determinaron mecanismos de estabilización impartidos por los estabilizantes y se estudió la estabilidad de las nanopartículas en dispersión acuosa.

A partir de los resultados que se incluyen en este capítulo se seleccionaron las formulaciones más aptas para continuar con el diseño de las NPMs multifuncionales o teranósticos mediante la modificación superficial de las mismas.

3.1- Introducción.

El interés en ampliar los conocimientos relacionados a la síntesis de NPMs, en especial las de magnetita/maghemita, surge a partir de la necesidad de establecer un control minucioso sobre sus propiedades fisicoquímicas. Se encuentra ampliamente reportado que el tamaño, la forma, la tendencia a la agregación y la carga superficial de las NPMs, son determinantes en relación a su desempeño y eficiencia en las áreas de salud[1].

En particular, las propiedades fisicoquímicas de las NPMs gobiernan las posibles interacciones que pueden ocurrir con las células y/o demás componentes del entorno biológico en general. También desempeñan un rol crucial en la biodistribución de las NPMs una vez administradas *in vivo* vía endovenosa[2] ó parenteral[3].

En líneas generales, se ha reportado que NPMs con carga superficial negativa o neutra, registran tiempos de circulación mayores que aquellas cargadas positivamente[4]. El motivo es la importante tendencia de estos últimos a unirse de manera inespecífica a la membrana de las células[5]. Se ha demostrado que como la membrana celular está cargada negativamente, las partículas con carga negativa no la atravesarían fácilmente, de modo que se prolongaría su tiempo de circulación[6,7]. Por otro lado, NPMs neutras resultarían ser las más adecuadas para evadir el sistema retículo endotelial (SRE), debido a una disminución en la opsonización[8]. Además, se ha registrado que la fagocitosis por parte de los macrófagos se volvería más activa al detectar NPMs de elevada carga superficial independientemente de su signo[9]. Por otra parte, la filtración a nivel renal de las NPMs y su posterior excreción, también depende de la carga superficial de las mismas. Las partículas con carga negativa no atravesarían los poros de la membrana capilar glomerular debido a la carga negativa de los mismos, prolongando así su tiempo de circulación[10]. Otros estudios, en tanto, sugieren que cambiando simplemente la carga superficial de la NPMs (de positivo a neutro o ligeramente negativo) el tiempo de circulación de las mismas, una vez administradas, se podría aumentar de un minuto a tres horas[11]. Estudios de biodistribución revelaron que las NPMs con carga negativa tienden a acumularse en el tumor más eficientemente que las de carga positiva[2].

Con respecto al tamaño, se ha determinado de manera general, que el DH de las NPMs no debería ser superior a los 200 nm, en caso contrario estas podrían ser retenidas por los órganos del SRE (hígado y bazo) disminuyendo su tiempo de circulación y la probabilidad de alcanzar el sitio de interés. No obstante, el DH debería ser superior a los 10 nm de modo de evadir la filtración renal[12], por lo que se establece como DH convenientes entre 10 y 150 nm para lograr una distribución óptima *in vivo*[13,14]. Sin embargo, estudios *in vivo* realizados en nuestro grupo de trabajo revelan que nanosistemas entre 200 y 400 nm evidencian un comportamiento satisfactorio en términos de los tiempos de circulación en sangre una vez administrados vía intraperitoneal (IP), en concordancia con resultados de otros autores[3]. Por otra parte, como se comentó en el ***Capítulo I***, la angiogénesis acelerada característica de un tumor sólido, genera una alta densidad vascular con morfología aberrante, fugas vasculares y deterioro de la recuperación linfática que conducen a una mayor permeabilidad y retención de las NPMs. En ese contexto, NPMs de hasta 600 nm podrían acumularse en los tejidos tumorales con mayor facilidad que en los tejidos normales[15].

Con respecto a la forma, se ha estudiado que partículas tipo nanorrodillos ó nanodiscos presentan mayores tiempos de circulación que las NPMs esféricas. Se ha confirmado que, NPMs con forma alargada, son eliminados en menor medida por parte del SRE[16-18], exhibiendo un tiempo de circulación más prolongado respecto de las esféricas[19]. En particular, se han realizado estudios empleando cadenas de óxidos de hierro construidas a partir de 3 a 4 nanoesferas unidas entre sí covalentemente[20-22]. Se demostró que cuando las nanocadenas, específicamente funcionalizadas, dirigidas para identificar ciertos marcadores tumorales y del endotelio vascular eran inyectadas, las mismas podían detectar o arribar a los sitios blanco entre 1 y 3 hs antes, respecto de las esferas de óxido de hierro individuales. Al mismo tiempo, en términos de su capacidad de unión a ligandos en la superficie celular, en una superficie plana los grupos funcionalizantes estarían disponibles en un mayor número en comparación con las partículas esféricas, en las cuales la forma curva limita el número de moléculas disponibles para unirse a los ligandos específicos en la célula[23,24].

Tal como se indicó en el ***Capítulo I***, en el marco de esta tesis se seleccionó la técnica de co-precipitación para la síntesis de MAG. La misma involucra numerosas

variables experimentales que deben ajustarse convenientemente para obtener NPMs con las propiedades de interés que se han detallado en párrafos anteriores. Entre ellas se pueden citar, la relación molar de los iones $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, naturaleza de la base, orden de agregado de reactivos, presencia/ ausencia de atmósfera inerte y presencia, naturaleza y concentración de surfactante utilizado, entre otras [25,26].

Por ejemplo, se ha reportado que la magnetización de las NPMs podría mejorarse modificando la relación $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e incrementando la concentración de las sales precursoras. Por otro lado, se ha verificado que el tamaño de la partícula se ve afectado tanto por la concentración de las sales de hierro como por la relación $\text{OH}^-/(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+})$ [27]. El efecto de la temperatura y la velocidad de adición de la base sobre el tamaño de las partículas obtenidas por co-precipitación, han sido evaluados en diversos trabajos publicados[28]. El tipo de base es otro factor que se ha verificado que influye principalmente, sobre la tendencia a la agregación de las NPMs[29].

Además de la técnica de co-precipitación, se trabajó una variante de la misma: el método de reducción-precipitación. Esta técnica se caracteriza por el empleo de una fuente de iones Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), un agente reductor (NaSO_3) y un agente precipitante (NaOH o NH_4OH). A diferencia de la co-precipitación tradicional, no se utiliza una solución de Fe^{2+} , sino que estos se forman a partir de la reducción parcial de los iones Fe^{3+} por parte del anión SO_3^{2-} . Se ha establecido que para que tenga lugar la obtención de MAG como fase mayoritaria, la relación molar $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{SO}_3^{2-}]$ debe ser de tres y que el agregado de la mezcla de reactivos a la base debe realizarse de manera rápida para evitar la reoxidación de los iones Fe^{2+} a Fe^{3+} , debido a que la reacción tiene lugar en condiciones atmosféricas[30].

La obtención de NPMs de MAG mediante los métodos descritos, comúnmente se lleva a cabo en presencia de aditivos de muy variada naturaleza. Estas sustancias pueden cumplir diferentes roles, como funcionalizar la superficie de las partículas, minimizar la agregación de las mismas en un medio de interés, además de contribuir al control de la forma y tamaño de los cristales[31-33].

El SDS es un surfactante aniónico, constituido por una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica cuya estructura química se representa en la figura 3.1.

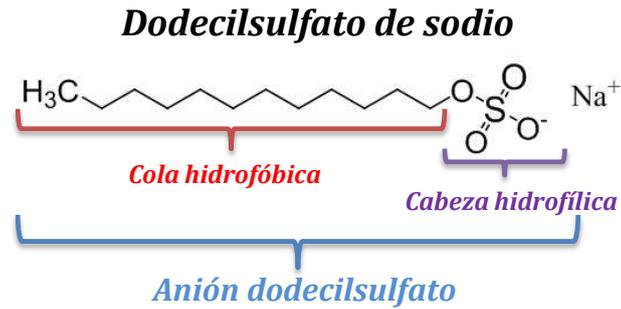


Figura 3.1. Estructura química del SDS

El SDS es un compuesto capaz de estabilizar suspensiones de nanopartículas de diversos materiales como oro, sílice, magnetita u óxido de cobre, entre otros [34-36]. A pesar de que ha sido ampliamente empleado, el mecanismo exacto a través del cual ejerce su acción estabilizante no ha sido aún dilucidado con certeza[37].

Una de las propuestas sugiere que dicho mecanismo es dependiente de la concentración de SDS. Cuando la concentración de surfactante empleada se encuentra por encima de la concentración micelar crítica (CMC), la estabilización en medio acuoso ocurre a través de la formación de una bicapa de tensioactivo sobre las NPMs en la que los grupos alquilo de distintas moléculas de SDS se mantienen unidos mediante enlaces hidrofóbicos. De acuerdo a este modelo, el grupo polar $-\text{OSO}_3^-$ de la segunda capa se orienta hacia el agua mientras que el de la primera interactúa con la superficie de las nanopartículas [38]. Este modelo justifica la estabilización de NPMs con superficies hidrofílicas mediante el mecanismo de repulsiones electrostáticas[39].

Por otro lado, el modelo indica que cuando las NPMs presentan una superficie hidrofóbica, la interacción se produce a través de sus grupos alquílicos, exponiendo las cabezas hidrofílicas en la superficie y permitiendo que las nanopartículas se dispersen en medio acuoso. Según lo reportado por el grupo de Naderi, para que esto ocurra, la concentración de surfactante empleada debe ser inferior a la CMC [40].

El valor de CMC del SDS en agua y a temperatura ambiente es $8.2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ [41]. Sin embargo, se ha reportado un descenso de este valor hasta $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ como consecuencia de la disminución del pH de la solución o la presencia de sales de iones di y trivalentes[42-43].

En la figura 3.2 se ilustran los mecanismos de estabilización propuestos para el SDS en la superficie de las nanopartículas.

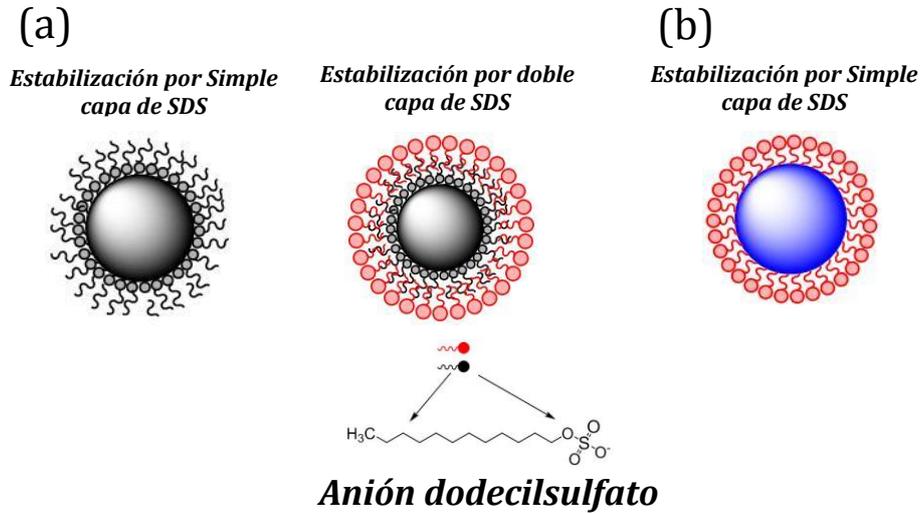


Figura 3.2. Posibles mecanismos de estabilización en medio acuoso ejercidos por el SDS sobre (a) NPMs de naturaleza hidrofílica (Adaptado de [44]).(b) NPMs hidrofóbicas (Adaptado de [40]).

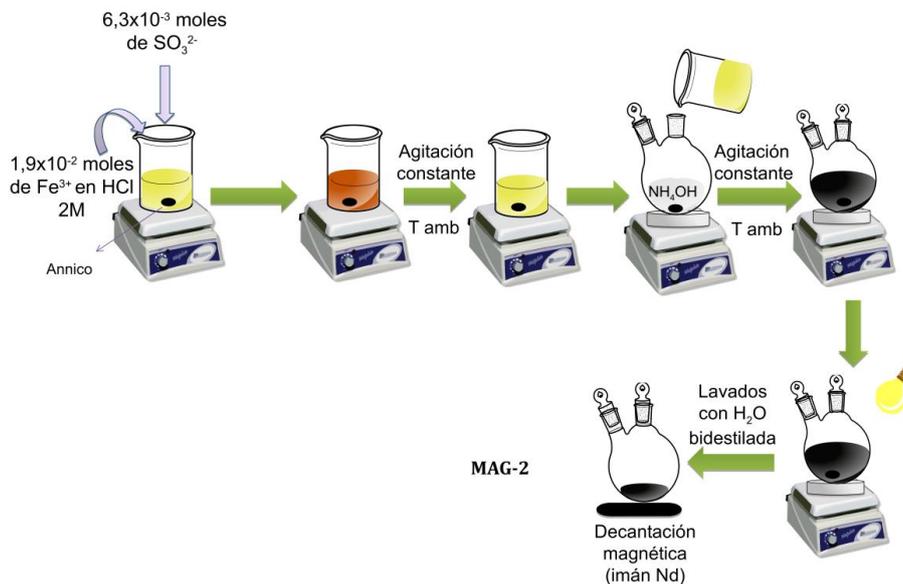
En este capítulo se presentan y discuten los resultados de un trabajo exploratorio tendiente a encontrar una metodología de síntesis adecuada para la obtención de NPMs. Se incluye un estudio exhaustivo de las variables experimentales asociadas a la técnica de co-precipitación a fin de seleccionar el conjunto de las mismas que originen NPMs con propiedades fisicoquímicas controladas y más convenientes en relación a las aplicaciones propuestas. Este análisis involucra el estudio de los mecanismos que conducen a la formación de las NPMs así como una completa caracterización y ensayos para evaluar la estabilidad de las nanoformulaciones.

3.2-Experimental.

3.2.1.- Método de reducción-precipitación.

El método de síntesis que se utilizó fue previamente descrito por ShengchunQu y col. [30] y se representa en el esquema 3.1. Brevemente, se colocaron en un vaso de precipitado 9.4 mL de solución de FeCl_3 en HCl 2 mol.L^{-1} ($1,9 \times 10^{-2}$ moles de Fe^{3+}) y 9.4 mL de agua destilada. Bajo agitación magnética continua se agregaron $6,3 \times 10^{-3}$ moles de SO_3^{2-} . Por otro lado, se colocaron en el

reactor 31.5 mL de NH_4OH concentrado y 31.5 mL de agua bidestilada (AB). La solución de sales se colocó rápidamente en el reactor, bajo agitación constante. Inmediatamente, se observó la formación de un precipitado negro. El reactor que contenía la mezcla se colocó a 10 cm de distancia de una lámpara de luz visible y se continuó agitando durante 30 min más. Finalmente, el precipitado negro se lavó varias veces con AB hasta que la conductividad fue cercana a $5\mu\text{S}$ y pH neutro. Se secó en estufa a 45°C durante 24 hs y se almacenó. La muestra obtenida se denominará **MAG-2**.



Esquema 3.1 Síntesis de NPMs empleando la técnica de Reducción-precipitación.

3.2.2.-Técnica de co-precipitación

3.2.2.1.- Con dodecilsulfato de sodio como estabilizante e hidróxido de sodio como agente precipitante.

Se empleó el método de co-precipitación descrito previamente por Nicolás y col.[31], con algunas modificaciones. Brevemente, se disolvieron 5.401 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.0×10^{-2} moles de Fe^{3+}) y 2.807 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0×10^{-2} moles de Fe^{2+}) en 100mL de AB. 400 mg de SDS ($1,38 \times 10^{-3}$ moles de SDS) se incorporaron a esta solución bajo constante agitación. Se agregó NaOH 5 mol.L^{-1} con velocidad controlada hasta que la dispersión alcanzó valores de pH cercanos a 12

(aproximadamente 37.2 mL). Luego de finalizar el agregado de la base, se colocó el reactor a 10 cm de distancia de una lámpara de luz visible y se continuó agitando durante 30 min. más. Finalmente, se obtuvo un precipitado negro que se decantó con ayuda un imán de NdFeB. Se retiró el sobrenadante y se realizaron lavados con agua destilada hasta conseguir una conductividad cercana a la del agua destilada. El sólido que se obtuvo se almacenó en suspensión. El mismo se denominará **MAG-1**.

Este mismo protocolo se aplicó para obtener **MAG-8**, con la diferencia que en este caso se emplearon 1000 mg de SDS ($3,46 \times 10^{-3}$ moles de SDS).

3.2.2.2.- Con SDS e hidróxido de amonio como agente precipitante.

Se disolvieron 2.0×10^{-2} moles de Fe^{3+} y 1.0×10^{-2} moles de Fe^{2+} en 100mL de agua destilada y se adicionaron $1,38 \times 10^{-3}$ moles de SDS bajo constante agitación. Se agregó una solución de NH_4OH 5 mol.L⁻¹ (100 mL aproximadamente) de modo que el pH de la mezcla aumentó de 1.4 a 11.9. Finalizado el agregado de la base, se colocó el reactor a 10 cm de distancia de una lámpara de luz visible y la agitación continuó durante 30 min más. Se obtuvo un precipitado negro al final de la reacción que se decantó con ayuda un imán de NdFeB. Se retiró el sobrenadante y se lavó varias veces con agua destilada hasta que la conductividad fue cercana a los 5 μS y el pH neutro. El precipitado se secó en estufa a 45°C durante 24 hs y se almacenó. El mismo se denominará **MAG-4**.

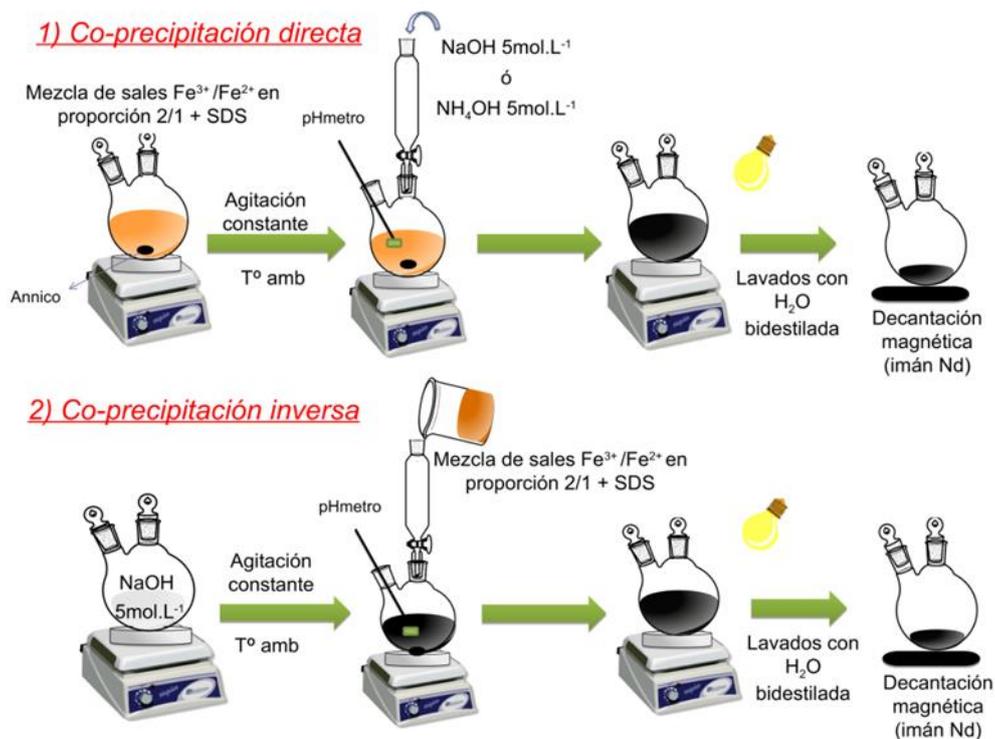
Con el fin de emplear el mismo volumen de base que el utilizado en la obtención de **MAG-1**, y al mismo tiempo analizar el efecto del pH desarrollado durante la reacción, se realizó una reacción empleando 37.2 mL de NH_4OH 5 mol.L⁻¹. En este caso, el pH final fue 10.1. El precipitado obtenido, luego de los lavados correspondientes, se secó en estufa a 45°C durante 24 hs y se almacenó. El mismo se denominará **MAG-9**.

Este protocolo de co-precipitación directa se muestra en el esquema 3.2(1)

3.2.2.3.-Co-precipitación inversa empleando SDS como estabilizante e NaOH como base.

En esta reacción, se emplearon las mismas condiciones que para obtener **MAG-1**, incluyendo las concentraciones de sales de hierro y estabilizante. En este

caso la mezcla de sales de Fe^{3+} , Fe^{2+} y SDS, se agregó a 37.2 mL de la solución de NaOH (5 mol.L^{-1}) a velocidad controlada. El precipitado resultante se denominará de aquí en adelante **MAG-5**. Este protocolo se presenta en el esquema 3.2(2).



Esquema 3.2. Síntesis de NPMs por co-precipitación (1) Directa, (2) Inversa.

3.2.2.4- Co-precipitación tradicional en ausencia de luz visible directa.

Se emplearon las cantidades de sales de hierro, estabilizante y solución de NaOH correspondientes a la síntesis de **MAG-1**. Sin embargo, luego de finalizada la incorporación de la base, la agitación continuó por 30 min más, en ausencia de luz visible directa. Se decantó el sólido negro con ayuda de un imán de NdFeB, retirando el sobrenadante y lavando con agua destilada hasta conductividad cercana a $5 \mu\text{S}$. La muestra se denominará de aquí en adelante **MAG-6**.

3.2.2.5.- Co-precipitación tradicional sin aditivos, empleando NaOH como agente precipitante.

Se disolvieron 2.0×10^{-2} moles de Fe^{3+} y 1.0×10^{-2} moles de Fe^{2+} en 100 mL de AB. Se agregó NaOH 5 mol.L^{-1} con velocidad controlada hasta que la dispersión alcanzó valores cercanos a 12. Posteriormente se colocó el reactor a 10 cm de una lámpara de luz visible y la agitación continuó durante 30 min más. Luego de ese

tiempo se observó un precipitado negro que se decantó con ayuda un imán de NdFeB. Se retiró el sobrenadante y se purificó el sólido con AB hasta alcanzar valores de conductividad cercanos a 5 μS y el pH neutro. Finalmente se secó el precipitado en estufa a 45°C durante 24 hs y se almacenó. El mismo se denominará de aquí en adelante **MAG-7**.

En la tabla 3.1 se resumen las diferentes condiciones exploradas en relación a la síntesis de las NPMs mediante el método de co-precipitación

Tabla 3.1. Resumen de condiciones experimentales evaluadas y nomenclatura utilizada para cada una de las muestras obtenidas por co-precipitación.

Muestra	Relación molar Fe ³⁺ /Fe ²⁺	Moles de SDS utilizados. [SDS] expresada en mol.L ⁻¹	Base empleada [C]: 5mol.L ⁻¹	Orden de agregado de reactivos	Presencia de luz
MAG-1	2/1	1,38x10 ⁻³ [1,00x10 ⁻²]	NaOH	Base a la mezcla de sales de Fe	Si
MAG-4	2/1	1,38x10 ⁻³ [6.90x10 ⁻³]	NH ₄ OH	Base a la mezcla de sales de Fe	Si
MAG-5	2/1	1,38x10 ⁻³ [1,00x10 ⁻²]	NaOH	Mezcla de sales de Fe a la base	Sí
MAG-6	2/1	1,38x10 ⁻³ [1,00x10 ⁻²]	NaOH	Base a la mezcla de sales de Fe	No
MAG-7	2/1	0.0000	NaOH	Base a la mezcla de sales de Fe	Sí
MAG-8	2/1	3,46x10 ⁻³ [2,50x10 ⁻²]	NaOH	Base a la mezcla de sales de Fe	Sí
MAG-9	2/1	1,38x10 ⁻³ [1,00x10 ⁻²]	NH ₄ OH	Base a la mezcla de sales de Fe	Sí

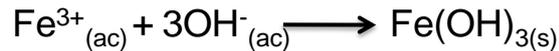
3.2.3 Estudio de la estabilidad de los nanosistemas en medio acuoso.

Se dispersaron entre 0.4 y 1.0 mg de NPMs de MAG en 10 mL de AB. Todas las muestras se sometieron a tratamiento en ultrasonido durante 60 min antes de la medición. Se monitoreó la evolución del DH en función del tiempo durante 3 meses, empleando el instrumento Malvern Zetasizer. El dato informado corresponde a un promedio obtenido a partir de tres réplicas de mediciones.

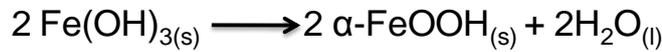
3.3. Resultados y discusión.

El mecanismo general asociado a la síntesis de óxidos de hierro utilizando el método de co-precipitación fue descrito en el Capítulo I, sección 1.3.1.1. En forma resumida se puede representar mediante las siguientes etapas:

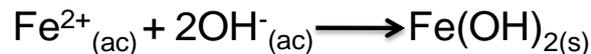
(1) La etapa inicial involucra la precipitación del hidróxido férrico $\text{Fe}(\text{OH})_{3(s)}$ y el pH del medio de reacción se mantiene en 1,5 porque la base es consumida inmediatamente a medida que se agrega



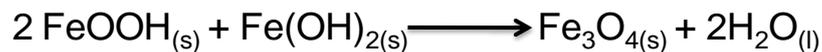
(2) El segundo paso es la reacción de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ para formar goethita (oxihidróxido de hierro, $\alpha\text{-FeOOH}$):



(3) Alcanzando un pH de 5, precipita el hidróxido ferroso



(4) Finalmente la goethita y el hidróxido ferroso se combinan para formar magnetita cuando el pH alcanza un valor de 9-10:



En el caso de la variante reducción-precipitación, como paso previo a la incorporación a la base tiene lugar la reducción de los iones Fe^{3+} a Fe^{2+} por reacción con el SO_3^{2-} [45].

(1) La reducción del ión Fe^{3+} con el ión sulfito, tiene lugar a través de la formación de un complejo de color rojo ó bordó, según la siguiente ecuación:



(2) Este complejo, da lugar a la generación de iones Fe^{2+} , lo que provoca un cambio de la coloración de la solución a amarillo.

Posteriormente, las reacciones que tienen lugar son las enunciadas para la técnica de co-precipitación, a partir de precursores Fe^{2+} y Fe^{3+} .

3.3.1.- Análisis comparativo de NPMs obtenidas a partir de los dos métodos de síntesis. Elección de una técnica de síntesis apropiada.

En la figura 3.3 se muestran comparativamente los difractogramas de dos formulaciones preparadas bajo iguales condiciones experimentales empleando los métodos de co-precipitación y reducción-precipitación para obtener MAG-7 y MAG-2, respectivamente.

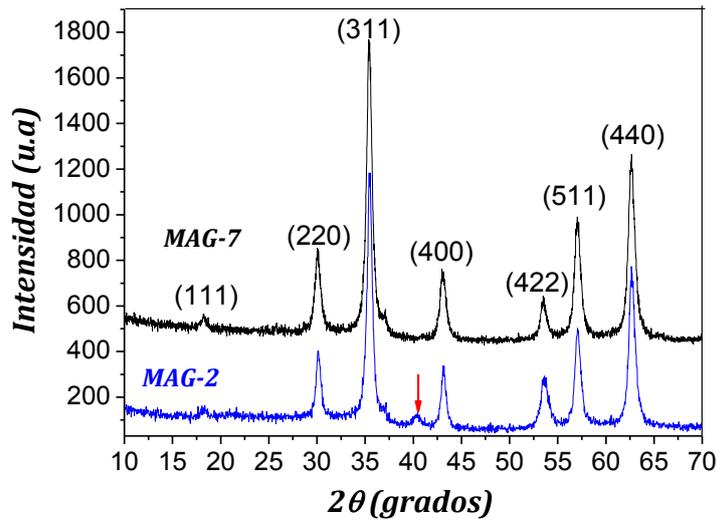


Figura 3.3. Difractogramas de MAG-7 y MAG-2.

Ambos difractogramas muestran picos angostos y definidos, en posiciones que se corresponden con el patrón de difracción de rayos X de magnetita (JCPDS 19-629). Debido a que la amplitud de los picos se relaciona con la cristalinidad de la muestra[46], es posible indicar que se obtuvieron muestras con un buen grado de cristalinidad a partir de la aplicación de los dos métodos de síntesis. La flecha roja en el difractograma correspondiente a MAG-2, indica la presencia de goethita (α -FeOOH (ICDD00-029-0713)) en la muestra, posiblemente como consecuencia de la reoxidación de parte de iones Fe^{2+} a iones Fe^{3+} y la posterior formación de un exceso de α -FeOOH respecto de $\text{Fe}(\text{OH})_2$.

Según lo reportado en bibliografía y tal como se muestra en la figura 3.4, los difractogramas de rayos X obtenidos tanto para MAG (JCPDS 19-629) como para maghemita (MAGH) en fase cúbica (JCPDS 39-1346) son muy similares entre sí. La única diferencia está relacionada con el parámetro de celda, el cual es levemente mayor en el caso de MAG (0,8394 nm) respecto de MAGH (0,8346 nm), debido a que

posee iones Fe^{2+} en su estructura que tienen mayor radio iónico que los iones Fe^{3+} . Este hecho hace que las líneas de la MAGH se encuentren ligeramente desplazadas a mayores ángulos en comparación con las correspondientes al mismo plano de difracción de la MAG. Sin embargo, dado la cercanía en los valores de los parámetros de red de ambos óxidos es difícil diferenciar estas estructuras mediante XRD incluso si ambas fases exhiben buena cristalinidad[47].

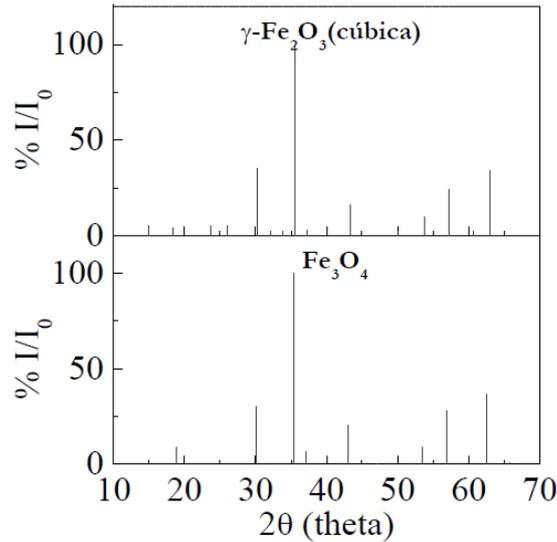
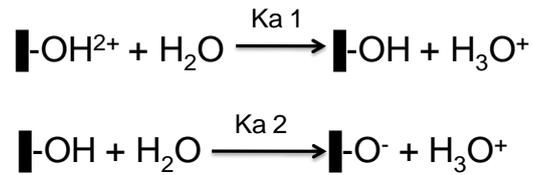


Figura 3.4 Difractogramas de MAGH en fase cúbica (JCPDS 39-1346) y MAG (JCPDS 19-629) utilizando radiación Cu ($K\alpha = 1,5406 \text{ \AA}$).

Kim y colaboradores reportaron la existencia de dos picos adicionales ubicados en 23.77° y 26.10° correspondientes a los planos (210) y (211) respectivamente, en el difractograma de MAGH que podrían utilizarse para distinguir esta fase de la correspondiente a MAG[48]. No obstante, debido a que las intensidades de estos picos son inferiores al 5%, la identificación de los mismos se dificulta en caso de la existencia de un importante ruido de base.

Como herramienta alternativa para distinguir entre los dos óxidos puede utilizarse el perfil de la curva de potencial zeta (ζ_{pot}) en función del pH[49].

El carácter anfótero de la MAG hace que de acuerdo al pH del medio acuoso en que se dispersen, las partículas pueden presentar carga superficial positiva o negativa, de acuerdo a las reacciones[50]:



En este modelo, las partículas actúan como un ácido diprótico, llevando a tres posibles sitios reactivos. A pH muy bajos, la mayoría de los sitios estarán en la forma $\blacksquare\text{-OH}^{2+}$; $\blacksquare\text{-O}^-$ en medio fuertemente básicos, y $\blacksquare\text{-OH}$ (grupos intermediarios anfóteros) cerca del punto isoeléctrico (PI) del óxido, que a 25°C se encuentra entre 6.1-6.9[51].

Pernal y col. observaron que en el caso de muestras constituidas por MAG y MAGH la curva presentaba dos PI con un típico patrón de doble joroba[52]. Esto puede explicarse en términos de la composición de ambos óxidos. En el caso de la MAGH, la concentración de oxígenos es mayor que en la MAG[53]. Dado que los oxígenos en la superficie de la partícula de óxido de hierro se transforman parcialmente en hidroxilos, su carga negativa será mayor y el PI más bajo que el de las partículas menos oxigenadas. Como resultado, el PI más alto, que detectaron a pH 7.2 para SPIONs (siglas del inglés para “nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas”) puros, era derivado de MAG, a diferencia del más bajo, detectado a pH 3.5, que era derivado de MAGH[49].

En la figura 3.5 se muestra la curva de potencial zeta vs pH correspondiente a MAG-7, como representativa de ambas formulaciones. Se observa un único PI, alrededor de 6.5. No se evidencia doble joroba y para el valor de pH de 3.5, el valor de ζ_{pot} que se registra es de 23.4mV.

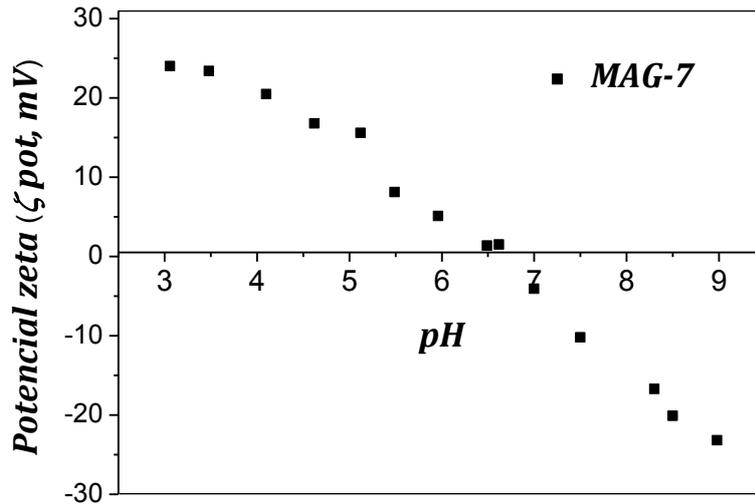


Figura 3.5 Perfil de potencial zeta vs pH correspondientes a MAG-7

Mediante la implementación de estas técnicas y los resultados hallados no es posible descartar la presencia de MAGH en la muestra de MAG-7, sin embargo, se puede inferir que las NPMs se encuentran mayoritariamente constituidas por MAG.

En la figura 3.6 se muestran las imágenes capturadas por TEM de las muestras correspondientes a MAG-2 y MAG-7.

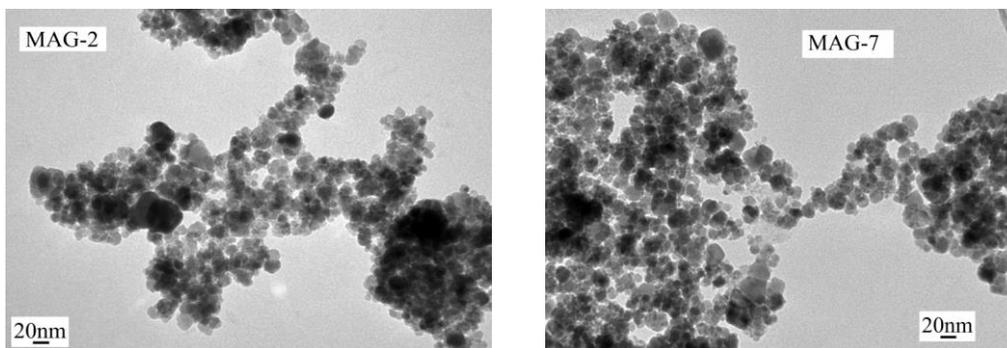


Figura 3.6 Micrografías TEM de MAG-2 y MAG-7 (270000x)

Mediante la técnica de co-precipitación (muestra MAG-7), se obtuvieron principalmente nanoesferas irregulares de aproximadamente 20nm de diámetro. La variante reducción-precipitación (muestra MAG-2), permitió obtener nanoesferas con menor tamaño de núcleo magnético, 15nm aproximadamente.

En la tabla 3.2 se presentan los datos asociados al tamaño estimados a partir de microscopía TEM y a través de la ecuación Scherrer (XRD). Además, se reportan

los valores correspondientes al DH y ζ pot para las diferentes NPMs. Para ambas muestras se empleó AB como solvente para preparar la dispersión y medir ambos parámetros. Sólo en aquella situación en la que la medida no cumplió con el estándar de calidad del equipo, se optó por utilizar un medio de menor polaridad como ETOH:H₂O=50:50.

Tabla 3.2. Tamaños de NPMs estimados a partir de microscopía TEM y ecuación de Scherrer (XRD). DH medio (registrado en el modo número) e IPD determinados por DLS. Potencial zeta (ζ pot) determinado por Microelectroforesis Laser Doppler.

Muestra	Tamaño estimado por TEM (nm)	Tamaño estimado por XRD (nm)	DH medio \pm DE (nm)		IPD medio \pm DE		ζ pot medio \pm DE (mV), en AB, pH=5.8
			H ₂ O	ETOH:H ₂ O 50:50	H ₂ O	ETOH:H ₂ O 50:50	
MAG-2	15.0	11.0	H ₂ O	ETOH:H ₂ O 50:50	H ₂ O	ETOH:H ₂ O 50:50	10.0 \pm 0.7
			*1	1689.7 \pm 32.7	*1	0.207 \pm 0.05	
MAG-7	20.0	14.0	401.0 \pm 5.5		0.264 \pm 0.02		11.8 \pm 0.5

*1La medida no cumplió con el estándar de calidad del equipo.

Es importante destacar que existen diferentes métodos para determinar los tamaños de las NPMs, ya sea en suspensión o una vez que se han secado. El empleo de la microscopía TEM proporciona información acerca del tamaño del carozo magnético y su forma. Del mismo modo, el tamaño del cristalito puede estimarse a partir de los datos brindados por XRD teniendo en cuenta el pico de mayor intensidad, mediante la ecuación de Scherrer, $D_{XRD}=(K\lambda)(B_c \times \cos\theta)^{-1}$, tal como se describió en el *Capítulo II, sección 2.2.1.1*. En ambos casos la determinación se hace con muestra seca, y se refiere al núcleo magnético.

Sin embargo, el dato de tamaño que resulta ser el más interesante en función de las aplicaciones que se proponen para estas NPMs, es el obtenido a partir de las muestras en suspensión. En este sentido, la técnica DLS brinda información más real referida al tamaño que los nanosistemas tendrán en un medio acuoso (como lo es el plasma sanguíneo). A partir de esta información es posible conocer el diámetro tridimensional, la tendencia a agregarse de las NPMs y del tamaño de esos

agregados en el medio analizado. Comparando los valores de DH con los datos de tamaño de partícula estimados mediante microscopía, pueden, en ciertos casos, observarse grandes discrepancias. Esto se debe tal como se expuso, a dos factores principales: i-la agregación de las partículas en las dispersiones y ii-la diferencia en el parámetro medido en cada caso[1].

De acuerdo a los datos presentados en la tabla 3.2, se puede apreciar que la muestra obtenida por co-precipitación (MAG-7) exhibe una buena capacidad de dispersión en agua, indicando que la muestra es hidrofílica. MAG-2 produce dispersiones estables en medio con polaridad inferior. Esto podría estar asociado a la técnica de síntesis empleada.

En todos los casos los valores de índice de polidispersión (IPD) fueron inferiores a 0.5. Como se comentó en el *Capítulo II, sección 2.2.3.2*, para determinaciones realizadas en medios acuosos, IPD inferiores a 0.5, coinciden con dispersiones de NPMs relativamente monodispersas lo cual resulta necesario si las mismas van a emplearse con fines biológicos[54].

Respecto a los valores de ζ_{pot} , no se observan diferencias significativas entre los valores registrados para ambas muestras.

El análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante reducción-precipitación y co-precipitación sugiere que, en condiciones similares en cuanto a tiempos de reacción y tipos de reactivos, la técnica de co-precipitación conduce a nanopartículas con mejores propiedades fisicoquímicas en cuanto al tamaño del núcleo magnético, DH, grado de aglomeración y carga superficial. Esto constituyó el motivo fundamental por el cual se descartó seguir explorando variables experimentales asociadas al método de reducción-precipitación para la preparación de NPMs.

A partir de lo expuesto, se seleccionó la técnica de co-precipitación como la más adecuada para la obtención de NPMs.

Tal como se enfatizó previamente en este capítulo, fue necesario realizar un exhaustivo análisis exploratorio de las variables experimentales asociadas a esta metodología para establecer su influencia en las propiedades de interés de las NPMs.

3.3.2- Influencia de las distintas variables experimentales sobre las propiedades fisicoquímicas de las NPMs empleando la técnica de co-precipitación.

A continuación, se describen y discuten las condiciones exploradas y los resultados alcanzados.

3.3.2.1- Efecto de la presencia y concentración de SDS.

En la figura 3.7 se muestran los difractogramas correspondientes a las muestras obtenidas en presencia de distintas concentraciones de SDS. En la figura 3.7(a) se presentan los correspondientes a MAG-7 (0.00 mol) y MAG-1(1.38x10⁻³ moles). Mientras que en la figura 3.7(b), se presenta el difractograma correspondiente a MAG-8 (3.46 x10⁻³ moles).

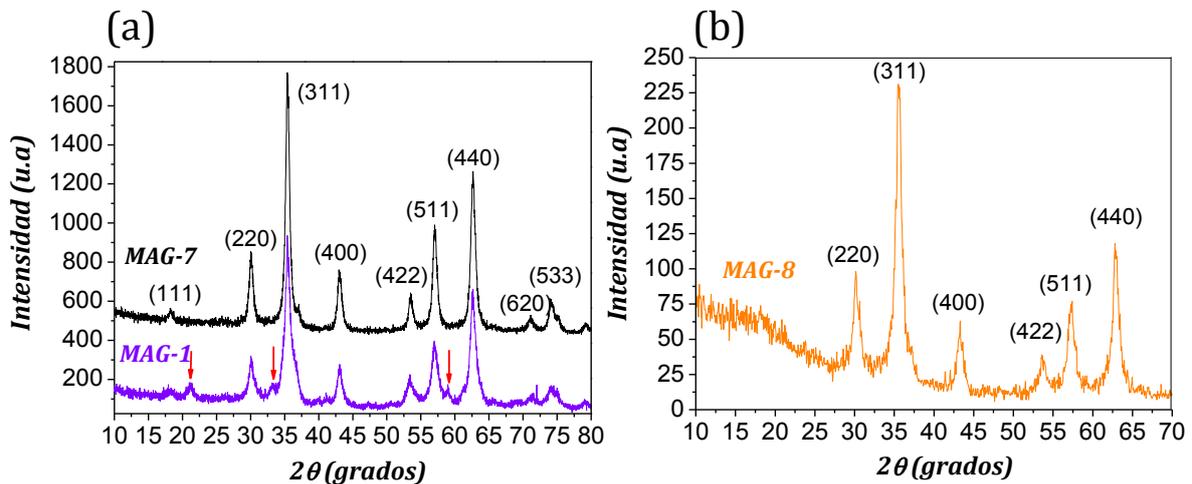


Figura 3.7 Difractogramas de (a) MAG-7 y MAG-1, y (b) MAG-8.

En la figura 3.7 se observa que las muestras obtenidas por co-precipitación directa presentan el patrón cristalino correspondiente a la estructura de espinela inversa asociada a magnetita/maghemita. Al comparar el difractograma de MAG-1 y MAG-8 con el correspondiente a MAG-7, se observa que MAG-1 presenta picos de mayor amplitud y MAG-8 muestra picos de amplitud similar a MAG-1, pero de menor intensidad. En el espectro de MAG-1 se observan 3 señales extras (marcadas con flechas rojas), las cuales podrían asociarse a la presencia del oxihidróxido de hierro, goethita (αFeOOH).

En la figura 3.8(a) se muestra el espectro de FTIR del surfactante puro mientras que en la figura 3.8(b) se comparan los espectros correspondientes a las NPMs con concentraciones crecientes de SDS ($MAG-7 < MAG-1 < MAG-8$).

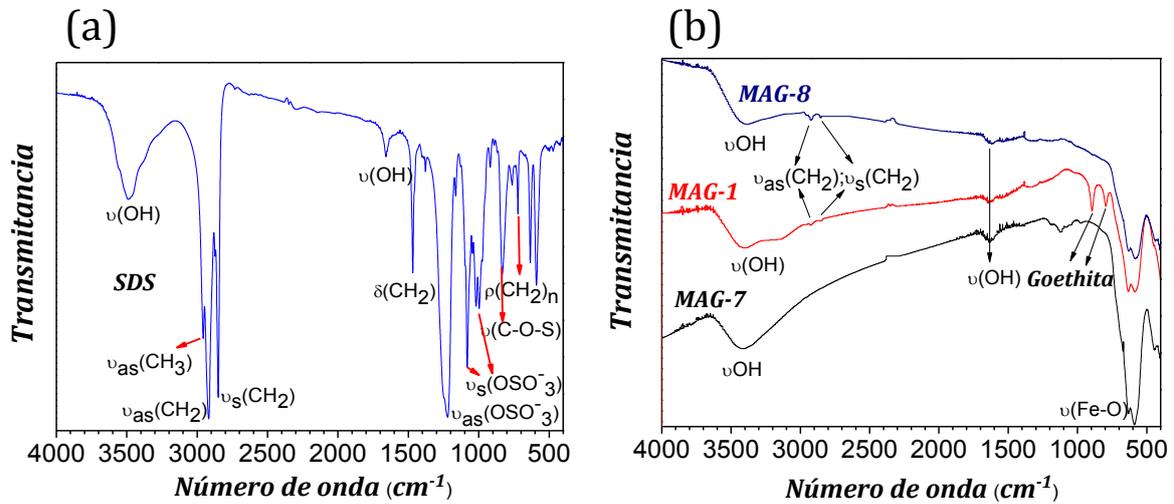


Figura 3.8 (a) Espectro FTIR de SDS puro. (b) Espectros FTIR de MAG-7, MAG-1 y MAG-8.

En la fig 3.8(a), las bandas que se observan entre los 3000 y los 1500 cm^{-1} se asocian a la cola hidrofóbica del SDS, mientras que las bandas correspondiente a la cabeza hidrofílica se encuentran en la región 1250–830 cm^{-1} . Las bandas a 1217 cm^{-1} y 1086 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas del grupo sulfato respectivamente. A 830 cm^{-1} se evidencia una banda que se atribuye la vibración de estiramiento del grupo C-O-S[55]. Por otro lado, se visualiza a 720 cm^{-1} una banda correspondiente a la vibración de balanceo del enlace C-H típica del grupo $(CH_2)_n$ en moléculas donde $n \geq 4$ [56].

El espectro correspondiente a MAG-7 (fig. 3.8(b)), muestra dos bandas a 633 y 587 cm^{-1} , correspondientes a la vibración de tensión del enlace Fe-O. Además, se observan bandas a 3490 y 1660 cm^{-1} aproximadamente que pueden asociarse con el estiramiento del enlace O-H del agua residual adsorbida en la superficie del óxido de hierro[57].

En las muestras correspondientes a MAG-1 y MAG-8 se aprecian bandas alrededor de 2900 cm^{-1} , asociadas a vibraciones de tensión de los enlaces C-H del surfactante (fig. 3.8(b)). Por otro lado, en el espectro de MAG-1, se observan dos bandas a 791 y 894 cm^{-1} características de la vibración de flexión del enlace Fe-O-

OH de α -FeOOH[58]. Esto concuerda con los resultados mostrados en el difractograma de MAG-1.

Propiedades sensibles a la presencia y concentración del surfactante son el tamaño, la carga superficial y la morfología de las NPMs.

En la figura 3.9 se muestran las micrografías TEM de MAG-7, MAG-1 y MAG-8, junto con las curvas de distribución de tamaños obtenidas por DLS.

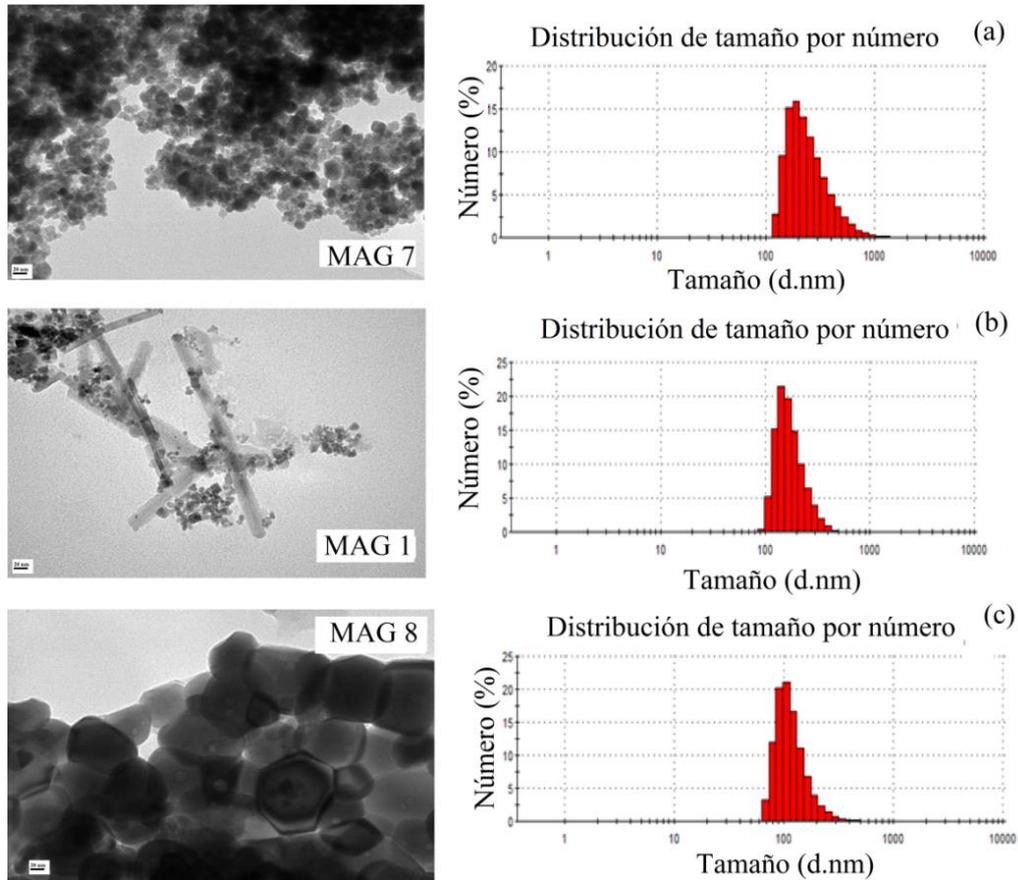


Figura 3.9 Micrografías TEM y curvas de distribución de tamaños por DLS correspondientes a (a) MAG-7, (b) MAG-1 y (c) MAG-8. Escala = 20 nm. (270000x)

Puede establecerse que MAG-7 está formada por nanoesferas irregulares con una importante tendencia a aglomerarse en medio acuoso dando lugar a agregados de 400 nm de DH medio (fig. 3.9(a)). La incorporación de SDS conduce a una reducción de la aglomeración de las NPMs, obteniéndose valores de DH medio cercanos a 249 nm para MAG-1. Sin embargo, la micrografía TEM de esta muestra revela una importante heterogeneidad respecto a la forma de las nanopartículas que la constituyen (fig. 3.9(b)). Pueden detectarse dos formas distintas: lo que por TEM

se perciben como nanoesferas irregulares (que bien podrían ser proyecciones de poliedros en el plano) y nanobastones. Éstos últimos corresponderían, según al estudio de Ahn y col., entre otros reportes, a goethita (α -FeOOH) intermediario en el mecanismo de formación de magnetita por co-precipitación[59]. Este resultado concuerda con los correspondientes a XRD y FTIR de MAG-1.

Mediante la adición de mayor cantidad de SDS (MAG-8) se obtuvieron nanopoliedros de mayor tamaño que los correspondientes a MAG-7, con menor tendencia a la agregación, lo que determinó valores de DH medio cercanos a los 113nm. (Fig. 3.9(c))

Debido a los hallazgos reportados para la muestra de MAG-1 en relación principalmente a la presencia de impurezas de goethita, la síntesis de esta muestra se repitió, bajo las mismas condiciones, nombrando en este caso a la formulación obtenida **MAG-1.1**.

En la figura 3.10(a) se muestran comparativamente los espectros FTIR de MAG-1 y MAG-1.1, mientras que en la figura 3.10(b) se presenta una micrografía TEM de MAG-1.1 junto con la curva de distribución de tamaños correspondiente obtenida por DLS.

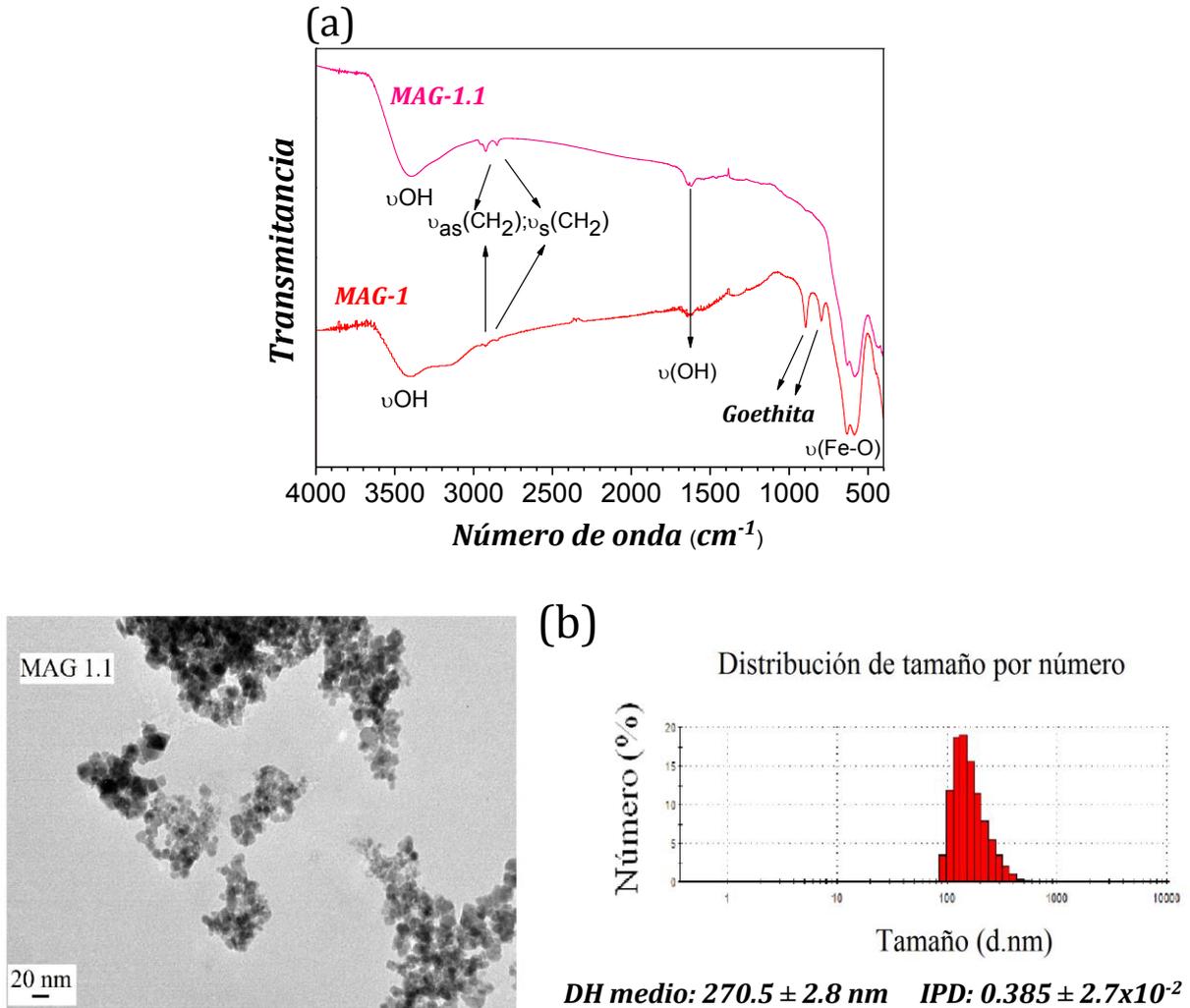


Figura 3.10 (a) FTIR de MAG-1 y MAG-1.1. (b) Micrografías TEM (270000x) y curvas de distribución de tamaños por DLS correspondientes a MAG-1.1

En el espectro de FTIR correspondiente a MAG-1.1 se observa la desaparición de las bandas asociadas a goethita, mientras que en las micrografías TEM, no se observan los nanobastones típicos de la morfología de este óxido. Sólo se aprecia una combinación de nanopoliedros de 20nm de lado y nanoesferas irregulares de 17nm aproximadamente. Esto permite inferir que la formación de goethita durante la primera síntesis estaría principalmente relacionada con un control menos riguroso de los parámetros experimentales asociados a la metodología de síntesis. Esta falencia se revirtió al ganar experiencia en la operación de los equipos y sistemas involucrados en la síntesis de las NPMs por co-precipitación.

En la tabla 3.3 se incluyen los tamaños de las NPMs mediante el empleo de TEM, XRD y DLS.

Tabla 3.3 Tamaños de NPMs estimados a partir de microscopía TEM y ecuación de Scherrer (XRD). DH medio (registrado en el modo número) e IPD determinados por DLS.

Muestra	Tamaño estimado por TEM (nm)	Tamaño estimado por XRD (nm)	DH medio ± DE (nm)	IPD medio ± DE
MAG-7	<u>Nanoesferas</u> de lados irregulares 20.0	14.0	401 ± 5.46	0.264 ± 1.90x10 ⁻²
MAG-1	<u>Nanorrodillos</u> 193.37x14.89 (Goethita) NPMs sin forma definida, con tamaños variables de entre 15 y los 20nm.	8.2	249.9 ± 5.7	0.225 ± 1.0x10 ⁻²
MAG-8	<u>Nanopoliedros</u> 114.01x95.9	7.6 -----	112.6 ± 4.1	0.199 ± 1.20x10 ⁻²

A partir del análisis de los datos incluidos en la tabla, en conjunto con lo observado a partir de las micrografías TEM, puede establecerse que la presencia del SDS sobre la superficie de las NPMs contribuye a una disminución del DH en comparación con la nanoformulación obtenida en ausencia del mismo. Esto se encuentra directamente relacionado con el tipo de estabilización ejercida por el SDS, que se asume que es a través de la formación de una doble capa que induce la repulsión electrostática entre las NMPs, tal como se representa en la figura 3.2, en coincidencia con lo que se reporta en la bibliografía[37],[44]. Esto también se ve reflejado en los valores del IPD. Se observa una disminución a valores por debajo 0.2 en el caso de MAG-8, indicando que las muestras son monodispersas en medio acuoso[60]. Es por esto que se advierte cierta coincidencia entre los tamaños correspondientes a MAG-8 estimados por TEM y los medidos mediante DLS.

En la figura 3.11 se muestran gráficamente ambos resultados.

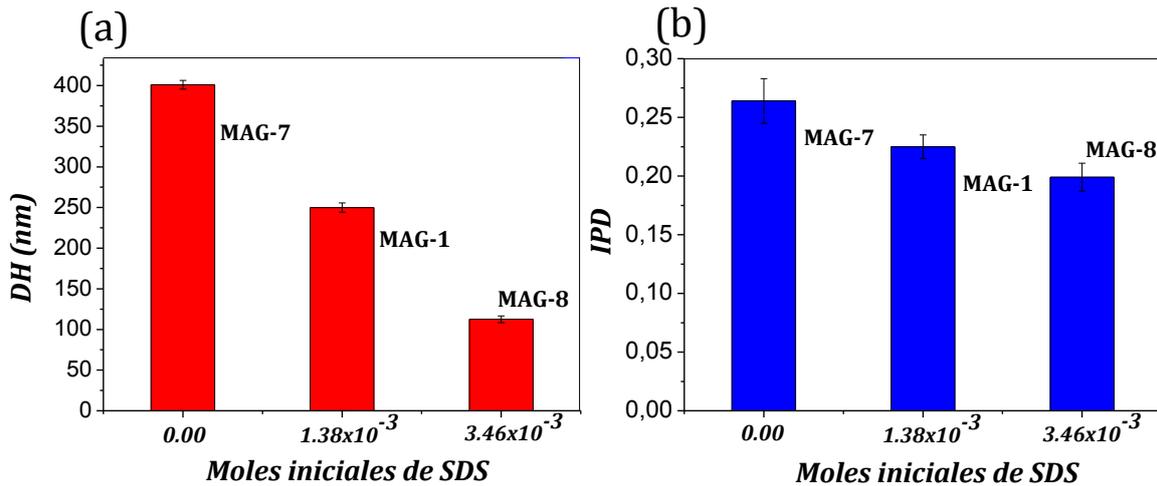


Figura 3.11 Influencia de la concentración nominal de SDS empleada durante la reacción en el (a) DH e (b) IPD de las nanopartículas de MAG.

Por otra parte, en la tabla 3.4 se muestran los valores de ζ_{pot} de las tres nanoformulaciones y la composición de las mismas.

Tabla 3.4 Valores de ζ_{pot} (mV) y composición, en términos del contenido de Fe determinado por EAA, de las NPMs obtenidas con distintas concentraciones de SDS

Muestra	$\zeta_{pot} \pm DE$ (mV) pH: 6.8-7.0	Fe (%) $\pm DE$	% Aditivos
MAG-7	-8.0 \pm 0.5	94.8 \pm 0.6	5.2 \pm 0.02
MAG-1	-30.6 \pm 1.00	65.0 \pm 0.6	35.0 \pm 0.3
MAG-8	-32.1 \pm 1.60	62.0 \pm 0.7	38.0 \pm 0.2

Es bien conocido que, en el caso de nanosistemas estabilizados mediante repulsiones electrostáticas, una mayor magnitud del ζ_{pot} (en valor absoluto) se asocia a una mayor estabilidad de la suspensión, ya que las NPMs tendrán menor tendencia a agregarse debido a las fuerzas de repulsión que provocan las cargas en su superficie[61]. Por el contrario, cuanto más cercano a cero sea el valor del ζ_{pot} las fuerzas electrostáticas de repulsión entre las nanopartículas no serán suficientes para superar las fuerzas de atracción entre las mismas y por lo tanto la estabilidad de la dispersión disminuirá y existirá una mayor tendencia a la agregación, generando nanosistemas con valores de DH mayores[62]. De acuerdo con este criterio, se aprecia que los valores de ζ_{pot} registrados en la tabla 3.4 están en línea con los datos de DH reportados en la tabla 3.3

Las NPMs obtenidas en presencia de SDS, MAG-1 y MAG-8, muestran valores de ζ pot más negativos que la muestra MAG-7 medida en iguales condiciones de pH. Estos resultados son esperables de acuerdo al modelo de doble capa estabilizante ejercido por el SDS sobre NPMs de superficies hidrofílicas. De acuerdo con el mismo, las cabezas hidrofílicas $-\text{OSO}_3^-$ quedarían expuestas en la superficie. El valor de pKa de los sulfatos alquílicos es cercano a -1.95 [63], por lo que se prevé que a pH cercanos a 7, estos grupos se encuentren cargados negativamente. Los datos obtenidos concuerdan con los reportados por Joo-YangPark y col., Liao y col., en relación al comportamiento de nanopartículas estabilizadas con grupos R-OSO_3^- [55],[64] y por Ma y col. respecto a nanopartículas estabilizadas con grupos R-SO_3^- [65]. En este último caso los autores afirman que la incorporación de SDS a la superficie de Fe_3O_4 estabiliza la dispersión a través de un incremento del ζ pot (en valor absoluto), lo que lleva a un aumento de la doble capa eléctrica, y consecuentemente a un incremento en repulsión entre las NPMs.

Los datos presentados en la tabla 3.4 indican que no existen diferencias significativas entre la composición de las NPMs con distintas concentraciones de SDS, lo cual coincide con los datos correspondiente a los ζ pot de ambas formulaciones. Esto puede justificarse a partir de la saturación en cuanto a los sitios reactivos superficiales de MAG disponibles para interactuar con SDS. Al comparar estos datos con el correspondiente a MAG-7 (sin SDS) se pueden asociar las diferencias a la presencia del surfactante interactuando con la superficie de las NPMs.

Las diferencias observadas en la morfología permiten asumir que durante la síntesis, el surfactante se une preferentemente a ciertos planos cristalinos de los núcleos de MAG en formación, favoreciendo el crecimiento de unos y restringiendo el de otros. Esto origina nanopartículas con distintas formas debido a la cristalización orientada[66-68].

En estructuras cristalinas con ordenamientos fcc (siglas en inglés para “cúbico centrado en las caras”), como el de la MAG, la energía superficial de cada plano exhibe el siguiente orden en relación a su magnitud $\gamma\{1\ 1\ 1\} < \gamma\{1\ 0\ 0\} < \gamma\{1\ 1\ 0\}$ [59],[69,70]. Cuando se emplea un agente estabilizante o funcionalizante durante la síntesis, este tiende a adsorberse sobre la cara de mayor energía superficial. Como

consecuencia, la velocidad de crecimiento a lo largo de dicho plano se reduce llevando a la obtención de nanopartículas con diferentes formas.

Zhang y col., estudiaron el crecimiento de cristales de NPMs obtenidos por la técnica de descomposición térmica del $\text{Fe}(\text{acac})_3$, empleando ácido oleico (AO) y oleilamina (OA) como estabilizantes. Sus resultados indicaron que el AO y la OA se adsorben en los planos de elevada energía superficial, reduciéndola, y originando de esa manera que la velocidad de reacción en la dirección de ese plano disminuya. Reportaron que las partículas cúbicas se forman cuando la velocidad de crecimiento en la dirección [111] era mucho mayor que en la dirección [100]. Observaron que esta acción de los estabilizantes tenía lugar cuando las concentraciones de los surfactantes eran suficientemente elevadas[66].

Por su parte, Chen y col. obtuvieron nanopartículas de Fe_3O_4 mediante síntesis hidrotermal empleando hidracina monohidratada. En concordancia con lo informado por Zhang, indicaron que las moléculas de hidracina se adsorbían preferencialmente al plano de mayor energía superficial, reduciendo la velocidad de crecimiento del cristal en la dirección correspondiente a dicho plano. De modo que si el plano [111] era el de mayor energía, las moléculas de hidracina se adsorbían a él reduciendo la velocidad de crecimiento en la dirección [111], conduciendo a la formación de nanodiscos. Por otro lado, si el plano de mayor energía superficial era el [110], siguiendo el mismo comportamiento, conseguían la formación de poliedros de 12 caras. Por último, observaron que cuando el crecimiento se daba a lo largo del plano [110] se obtenían cristales con formas de nanorodillos[71].

Otros investigadores reportaron que, cuando la velocidad de crecimiento en las diferentes direcciones es la misma (crecimiento isotrópico) se generan nanoesferas perfectas[72].

El análisis de las propiedades magnéticas de las NPMs se llevó a cabo mediante magnetómetro de muestra vibrante (VSM). Los parámetros que se estudiaron se acotaron a aquellos de mayor impacto en relación a las aplicaciones biomédicas (RMI, direccionamiento magnético, liberación controlada de fármacos) de las NPMs diseñadas[73,74]. En particular se centró el interés en el comportamiento superparamagnético y la magnetización de saturación (M_s), sin avanzar en estudios físicos básicos más profundos acerca del magnetismo.

En la figura 3.12(a) se muestran las curvas de magnetización para MAG-7 a diferentes temperaturas incluyendo la ambiente. Los ciclos de histéresis obtenidos muestran valores despreciables de coercitividad y magnetización remanente, lo que coincide con un comportamiento superparamagnético[75]. En particular, en función de las aplicaciones, es importante remarcar que el superparamagnetismo se mantiene a 300K, y a esa temperatura se registra un valor de M_s cercano a 63.0 emu/g. Este descenso respecto del valor de M_s registrado para MAG “*bulk*” (aprox.92emu/g)[76] se puede asociar, en principio, al tamaño nanométrico de la muestra. Es importante destacar que cuando se desciende a tamaños del orden de los nanómetros, los efectos de superficie de un material influyen notablemente en el valor de la M_s . Estos efectos tienen que ver con la presencia de defectos y vacantes en las capas externas de las nanopartículas que ocasionan una falta de simetría y coordinación de los átomos que se encuentran en la superficie[77].

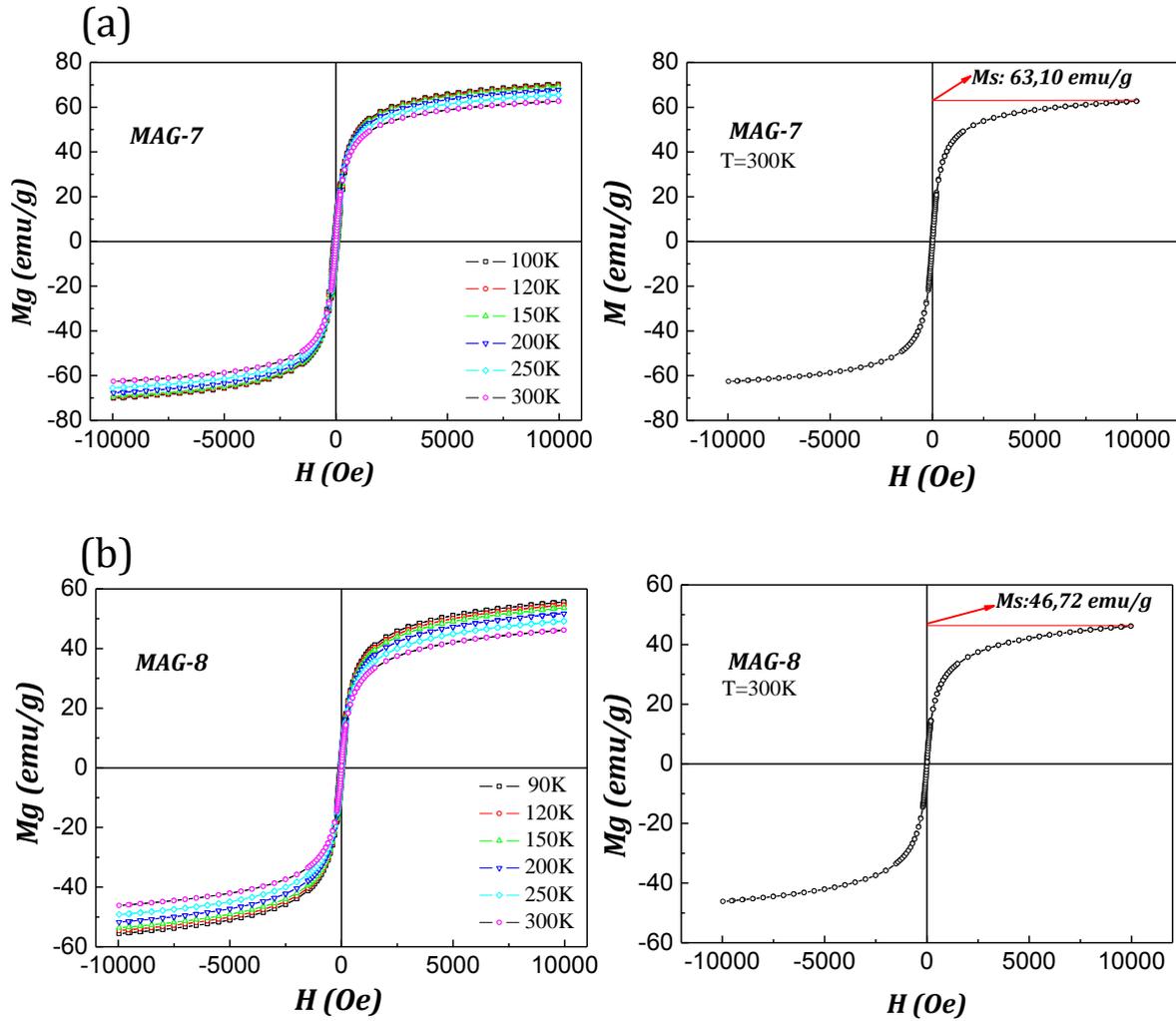


Figura. 3.12. Curva de magnetización vs campo aplicado (a) MAG-7. (b) MAG-8

Al analizar las curvas de magnetización correspondientes a MAG-8 a las diferentes temperaturas estudiadas (fig 3.12 (b)) se aprecia un comportamiento superparamagnético, con un valor de M_s de 46.72 emu/g a 300K. La disminución en el valor de M_s puede atribuirse a la presencia de una capa no magnética constituida por el SDS. Este resultado concuerda con los valores de M_s reportados por otros autores respecto a magnetita estabilizada con SDS [44],[78].

Se han encontrado resultados similares en términos de la magnetización de NPMs cubiertas con distintos sustratos. Por ejemplo, Kanimozhi y col. informaron una disminución del valor de M_s (alrededor de un 60%) como consecuencia de la modificación de la superficie de las nanopartículas con APTS y tetraetilortosilicato (TEOS)[79]. Nicolás y col. obtuvieron NPMs de MAG estabilizadas con ácido oleico (AO). Los estudios de VSM reportados por los autores muestran un comportamiento

superparamagnéticos de todas las formulaciones con una disminución del valor de M_s de MAG/AO respecto de MAG de alrededor del 50% como consecuencia de la incorporación de una capa no magnética de estabilizante[31].

Por otra parte, la anisotropía magneto cristalina de las partículas depende del grado de cristalinidad de las mismas. Una disminución de la cristalinidad de la muestra causará una reducción significativa del momento magnético dentro de las partículas, conduciendo a una disminución en la M_s [80].

Cabe destacar que en la literatura se reporta el empleo de NPMs con valores de M_s comparables e incluso inferiores a 35 emu/g como agentes de contraste en RMI, tanto en estudios realizados *in vitro* como *in vivo*, así como para otras aplicaciones biomédicas[73,74].

A partir de la información colectada de la bibliografía consultada, los valores de M_s obtenidos son aceptables, en vistas de las aplicaciones propuestas para estas nanoformulaciones.

3.3.2.2 Efecto de la luz visible.

De acuerdo con reportes de la literatura la incidencia de luz visible podría influir sobre el mecanismo de formación de NPMs mediante co-precipitación[82]. Se empleó luz visible generada mediante una lámpara de tungsteno y se hizo incidir directamente sobre el reactor durante el proceso de síntesis para evaluar su impacto sobre las propiedades finales de las NPMs. Los resultados de la caracterización de dicha muestra (MAG-1) se comparan con los correspondientes a MAG-6. Cabe recordar que ambas formulaciones fueron preparadas bajo idénticas condiciones, excepto la presencia de luz que estuvo ausente para la síntesis de MAG-6.

Los datos correspondientes a la caracterización a través de espectroscopía FTIR y difracción de rayos X no mostraron diferencias significativas en el patrón cristalino de MAG-6 ni en su grado de cristalinidad en relación a lo hallado para el resto de las formulaciones MAG preparadas bajo efecto de la luz visible.

La composición de las NPMs tampoco se vio influenciada por la incidencia de luz directa durante la síntesis, indicando que sólo se encuentra asociado a la presencia del surfactante. Tanto el difractograma como el espectro FTIR

correspondiente, así como los datos de la composición de MAG-6 expresados como %Fe, están disponibles en el Anexo I de esta tesis (Figuras (a), (b) y (c) respectivamente).

En la figura 3.13 se muestran comparativamente las micrografías TEM de MAG-1 y MAG-6 con el fin de detectar posibles variaciones en la morfología, tamaño y tendencia a la agregación de las NPMs como consecuencia de la incidencia de luz visible directa durante la síntesis. Como ya se analizó, se observan nanoesferas irregulares de 15nm como estructuras predominantes en MAG-1, (sin considerar las estructuras bastón asociadas a goethita) y en la muestra MAG-6 se evidencian nanoesferas irregulares con tamaños cercanos a los 12.5nm. Este último dato coincide con el tamaño de cristalito estimado a partir de la ecuación de Scherrer (10 nm).

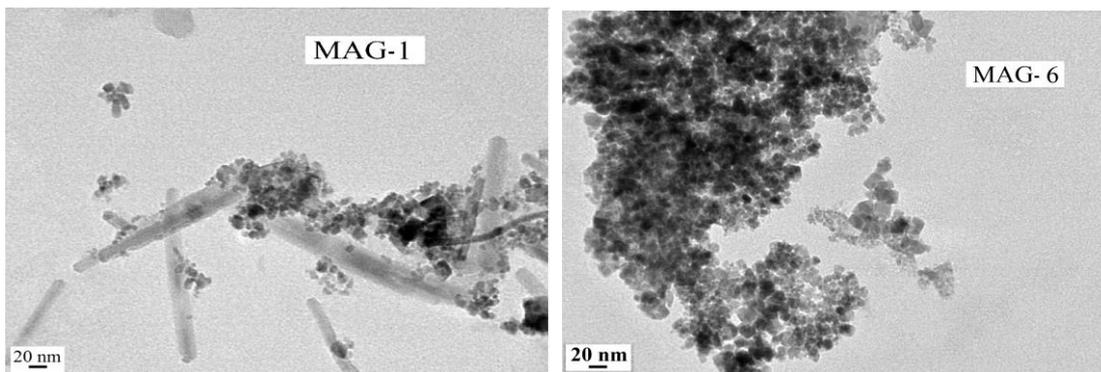


Figura 3.13 Micrografía TEM de MAG-1 y MAG-6 (270000x)

En la figura 3.14(a) y 3.14 (b) se grafican la tendencia que sigue el DH y el ζ pot, respectivamente, para ambas formulaciones.

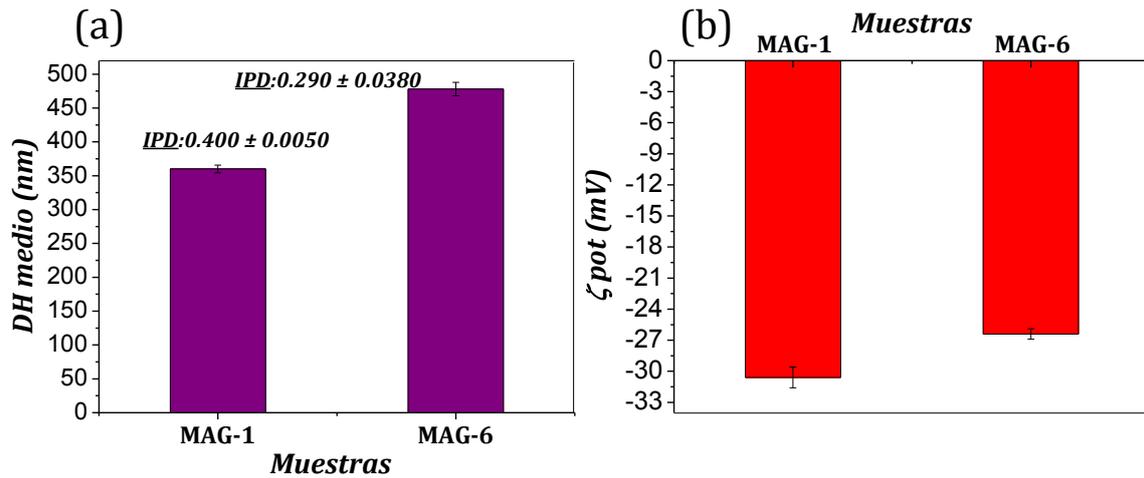


Figura 3.14 (a) Comparación de DH de MAG-1 y MAG-6. (Inserto en el gráfico se muestran los valores de IPD) (b) Comparación de ζ pot de MAG-1 y MAG-6.

Con respecto a la agregación de las NPMs, es posible indicar que aquellas obtenidas en presencia de luz visible directa (MAG-1) tuvieron menor tendencia a formar agregados. Esto se vio reflejado en los datos correspondientes a las medidas de DH registradas por DLS que mostraron un incremento cercano al 40% para MAG-6 respecto del DH obtenido para MAG-1. Como se aclaró previamente, un aumento en el DH de las nanoformulaciones estabilizadas electrostáticamente puede relacionarse con una disminución del valor absoluto de ζ pot, ya que las repulsiones electrostáticas disminuyen y las nanopartículas tienden a formar agregados de mayor tamaño en dispersión acuosa. Esto se ve claramente reflejado en la figura 3.14(b)

La aplicación de luz visible directa no es una variable experimental comúnmente analizada en la síntesis de nanopartículas de óxidos de hierro. Solo se han encontrado algunos pocos artículos haciendo referencia a la influencia de este parámetro y todos ellos muestran los efectos asociados a la influencia, en las propiedades finales de las NPMs, de la incidencia de luz directa desde el comienzo de la síntesis[71],[82].

Sin embargo, poco se ha investigado respecto de la influencia de la luz una vez finalizada el agregado de la base, que es el procedimiento seguido en este caso. Lazhen y col, estudiaron la influencia de la presencia de luz visible directa, sobre las propiedades fisicoquímicas de NPMs obtenidas por la técnica de co-precipitación. Para ello, exploraron la incidencia de la luz visible directa (luego del agregado del

agente precipitante) en función del tiempo de exposición, usando 30 y 60 min. Estos autores registraron, que este parámetro influía en la cristalinidad y el tamaño de las NPMs ya que la presencia de luz favorecería el crecimiento de los núcleos formados[83].

3.3.2.3 Efecto del tipo de base utilizada y el volumen final de reacción.

MAG-4 se obtuvo empleando NH_4OH 5mol.L^{-1} como agente precipitante en lugar de NaOH 5mol.L^{-1} .

El análisis mediante espectroscopía infrarroja no mostró diferencias significativas respecto a las formulaciones descritas anteriormente, en las cuales se empleó NaOH como agente precipitante. En el espectro correspondiente a MAG-4 se detecta la presencia de la típica banda de $\nu(\text{Fe-O})$, así como también las bandas asignadas al surfactante: $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ y $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$. Por otro lado, los valores de ζ_{pot} y DH medido por DLS de las NPMs no se modificaron sustancialmente como consecuencia del cambio de agente precipitante, indicando que ambos parámetros sólo se encuentran afectados por la presencia del surfactante. La composición de la formulación, en términos del contenido de Fe, no evidenció cambios significativos al emplear hidróxido de amonio en lugar de hidróxido de sodio. Tanto el espectro FTIR, así como los datos relativos a la composición de MAG-4, su DH y el valor de ζ_{pot} se han incluido en el *Anexo I* de esta tesis (Figuras (d), (e), (f) y (g) respectivamente).

En la figura 3.15 se muestra el difractograma obtenido para MAG-4, y se compara con los correspondientes a MAG-1 y MAG-7. Se aprecia que MAG-4 presenta un patrón cristalino similar a MAG-7, con señales más agudas e intensas que las registradas para MAG-1.

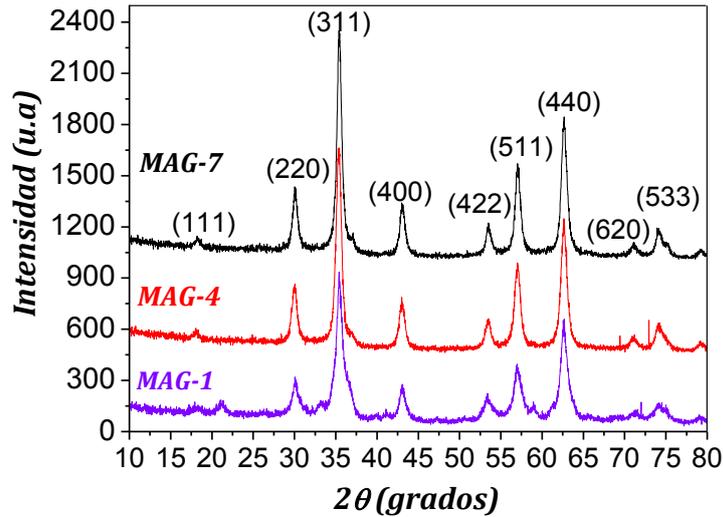


Figura 3.15 Difractogramas correspondientes a muestras obtenidas por co-precipitación directa. MAG-7 ($\text{NaOH } 5 \text{ mol.L}^{-1}$), MAG-4 ($\text{NH}_4\text{OH } 5 \text{ mol.L}^{-1}$, 1.38×10^{-3} moles de SDS) y MAG-1 ($\text{NaOH } 5 \text{ mol.L}^{-1}$, 1.38×10^{-3} moles de SDS).

Pudo establecerse que bajo las condiciones de síntesis de MAG-4, se obtuvo magnetita como fase cristalina predominante. MAG-4 presentó mayor grado de cristalinidad en comparación con MAG-1, por lo que podría indicarse que a partir de la técnica de co-precipitación tradicional en presencia de 1.38×10^{-3} moles de SDS, la modificación del agente precipitante, permite obtener NPMs con mayor grado de cristalinidad.

De acuerdo a la ecuación de Scherrer, utilizando el pico de difracción principal (311), se determinó el tamaño de cristalito correspondiente a MAG-7, MAG-4 y MAG-1 y se observó que mientras MAG-7 y MAG-4 presentaron un tamaño de cristalito similar (11.8 nm para MAG-4 y 14.0 nm para MAG-7), el tamaño de cristalito calculado para MAG-1 fue de 8.2 nm.

En la figura 3.16, se muestran las micrografías de MAG-1 y MAG-4 obtenidas por microscopía TEM

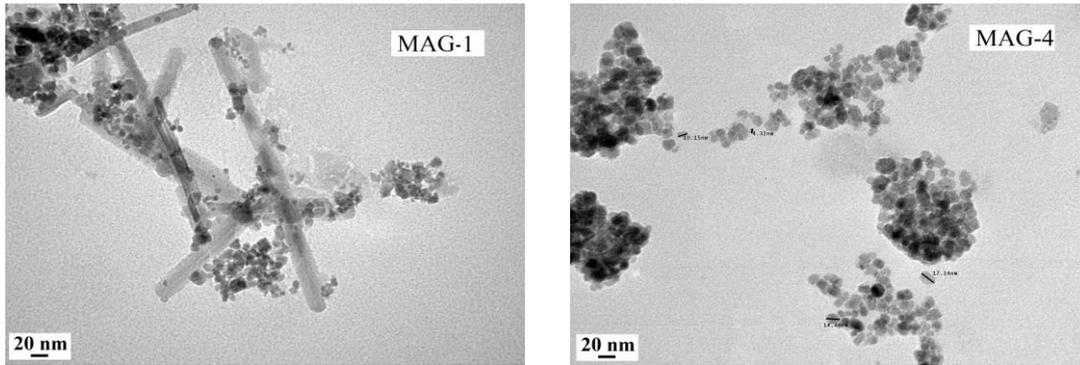


Figura 3.16. Micrografías TEM de MAG-1 y MAG-4 (270000x)

MAG-4 se muestra más homogénea en cuanto a la forma y tamaño de las NPMs, definiendo una morfología formada exclusivamente por nanoesferas de bordes irregulares de tamaños entre 10 y 11.5 nm. En este sentido, Zheng y col. indicaron que el empleo de una base débil como el NH_4OH , en lugar de una base fuerte como el NaOH , proporciona un suministro lento y constante de iones OH^- . Según reportan, la administración paulatina de aniones OH^- podría ser una fuerza impulsora para la formación de las nanoestructuras de Fe_3O_4 uniformes y de elevada cristalinidad. Estos autores informan que cuando emplean NH_4OH , las NPMs exhiben formas esféricas y al reemplazar por NaOH observan formas irregulares (ambos en presencia de PEG como surfactante)[84].

Por otro lado, se evidencia una mayor coincidencia, en el caso de MAG-4, entre los tamaños determinados por TEM y aquellos estimados a partir de la ecuación de Scherrer, respecto de lo que se observa para MAG-1 (presentados en la tabla 3.3). Este hecho se asocia a la cristalinidad de ambas muestras.

Las curvas de histéresis de MAG-4 se muestran comparativamente junto con las de MAG-7 en la figura 3.17.

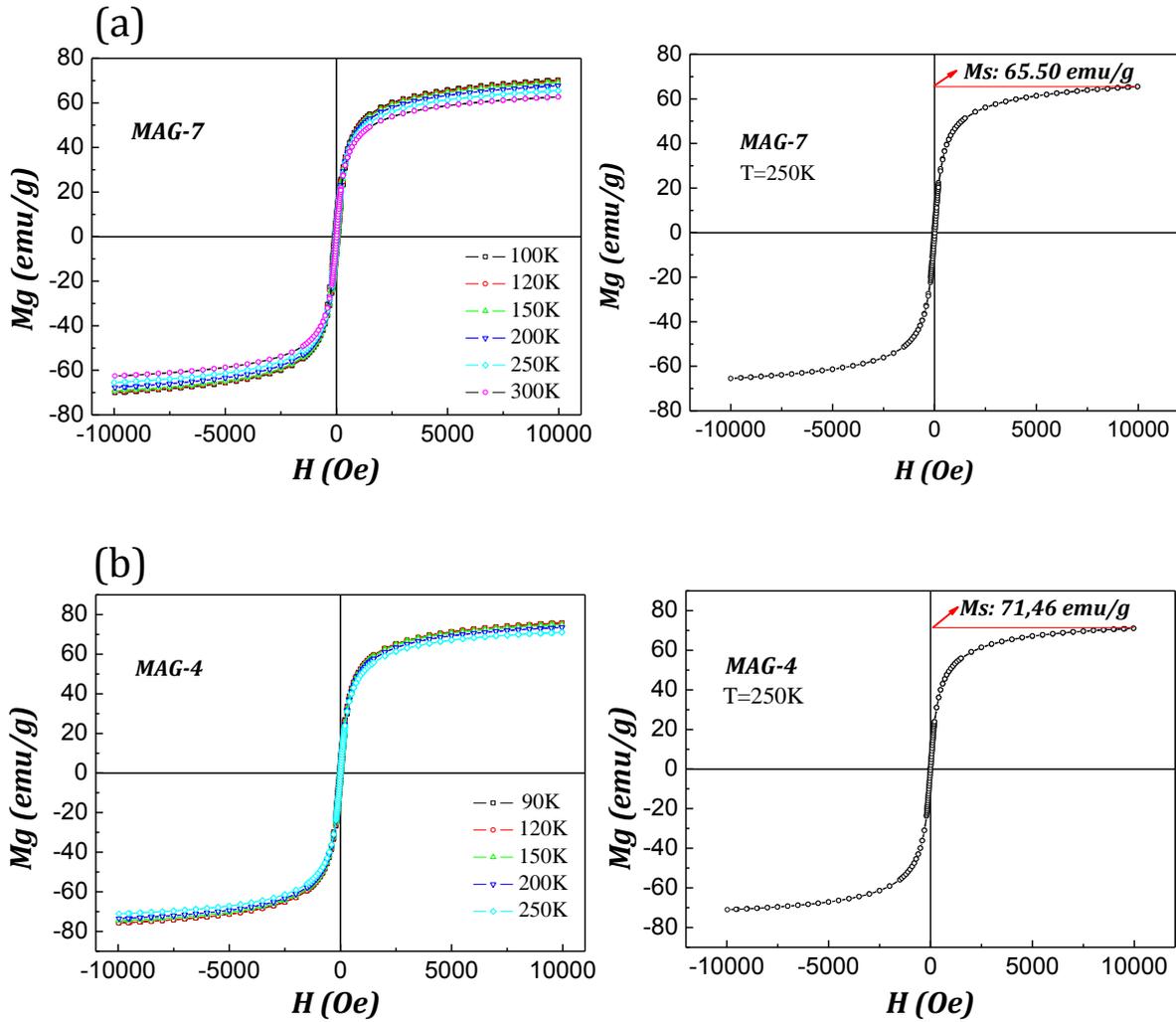


Figura 3.17 Curvas de magnetización vs campo aplicado (a) MAG-7 (b) MAG-4

Se observa que los ciclos registrados son muy similares para ambas formulaciones, con valores de H_c y M_r despreciables indicando un comportamiento superparamagnético en todas las condiciones analizadas, presentando MAG-4 un valor de M_s de 71,46 emu/g a 250 K. La semejanza en las curvas de magnetización-desmagnetización y en los valores de M_s de ambas muestras podría atribuirse, según lo reportado en la literatura, a las similitudes en el grado de cristalinidad y tamaño de cristalito[85,86].

Respecto a la variación del volumen final, se estudió la existencia de diferencias entre las muestras MAG-4 y MAG-9.

Como se indicó en la sección experimental, la muestra MAG-9 se obtuvo al igual que MAG-4 por co-precipitación directa, empleando $1,38 \times 10^{-3}$ moles SDS, pero en un volumen final menor, de 137 mL debido al agregado de 37 mL de la solución

de NH_4OH 5 mol. L^{-1} . En la experiencia en la cual se obtuvo MAG-4, el volumen final fue de 200 mL debido al empleo de 100 mL de NH_4OH 5mol. L^{-1} . Es importante remarcar que al final de la reacción de obtención de MAG-9 el pH fue 10.1 y no 12 como en el caso de MAG-4. En este apartado se examina, por ende, la influencia del volumen final que ocasiona una variación en el pH final de la reacción.

En la figura (h) e (i) del *Anexo I* se presentan las similitudes entre MAG-4 y MAG-9 respecto a la respuesta magnética. El análisis del espectro FTIR de MAG-9 no mostró diferencias significativas respecto de MAG-4. El mismo puede consultarse en la figura (j) del *Anexo I*.

En la figura 3.18 se presentan de las micrografías TEM de MAG-4 y MAG-9, respectivamente mientras que en la figura 3.19, se grafican los valores de DH medio de ambas formulaciones.

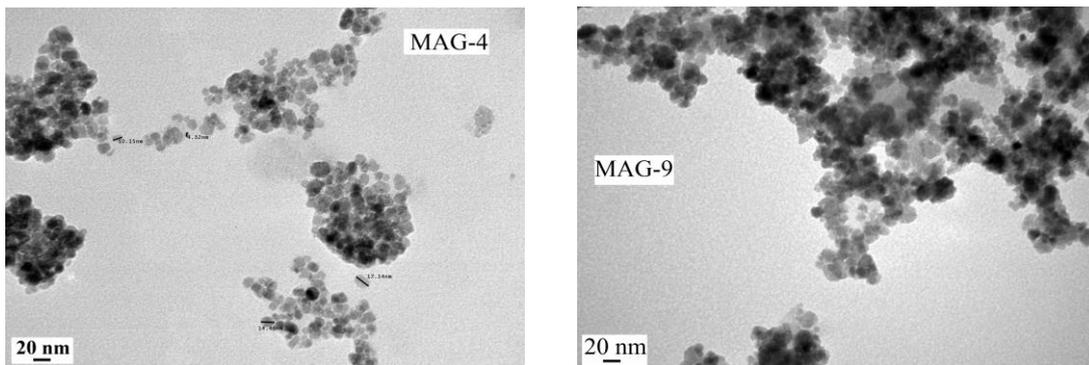


Figura 3.18. Micrografías TEM de MAG-4 y MAG-9 (270000x).

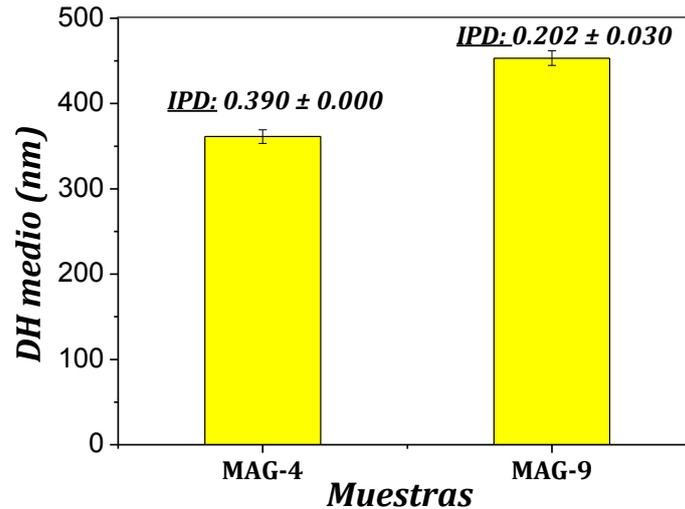


Figura 3.19 Comparación de DH de MAG-4 y MAG-9 (Inserto en el gráfico se muestran los valores de IPD).

Puede indicarse que la diferencia más importante registrada como consecuencia de la variación en el volumen final y el pH final de reacción se relaciona con la tendencia a la agregación de las NPMs. MAG-9 manifiesta una mayor tendencia a agregarse respecto de MAG-4, esto puede verse reflejado en las medidas de DLS, obteniéndose valores de DH medio de 361.3 ± 8.0 nm y 453.2 ± 8.6 nm para MAG-4 y MAG-9, respectivamente. En la micrografía TEM también puede apreciarse cualitativamente esta tendencia.

3.3.2.4 Efecto del orden de adición de reactivos: Co-precipitación inversa.

Se estudió la modificación en el orden de agregado de reactivos durante la co-precipitación. Para ello, la solución acuosa de iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (conteniendo 1.38×10^{-3} moles de SDS) se agregó de a gotas a la solución alcalina (37.5 mL de NaOH 5 mol.L⁻¹) bajo la incidencia de luz directa, a temperatura ambiente y en ausencia de atmósfera inerte, obteniendo la muestra MAG-5.

En la figura 3.20 se muestra la caracterización de MAG-5 mediante FTIR y se puede advertir que no existen diferencias significativas respecto a los espectros de FTIR de las muestras obtenidas por co-precipitación directa bajo las mismas condiciones.

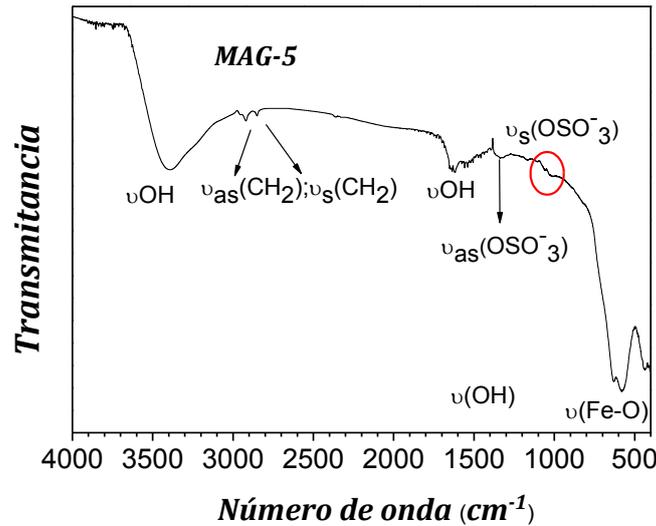


Figura 3.20 Espectro FTIR de MAG-5

Lo mismo pudo observarse en cuanto a la composición de la muestra en términos del contenido de Fe determinado por EAA. Al igual que las muestras anteriores sintetizadas en presencia de la misma cantidad de SDS nominal, el %Fe fue de $60.0 \pm 0.5\%$. Para visualizar esto gráficamente, en la figura 3.21 se muestra comparativamente la composición de todas las muestras obtenidas por co-precipitación directa y la muestra analizada en esta sección (MAG-5). Estas evidencias revelan que existe una concentración máxima de SDS que puede ligarse a la superficie de las NPMs, independientemente de las condiciones de reacción fijadas durante el proceso de co-precipitación, incluyendo entre ellas a la concentración de SDS.

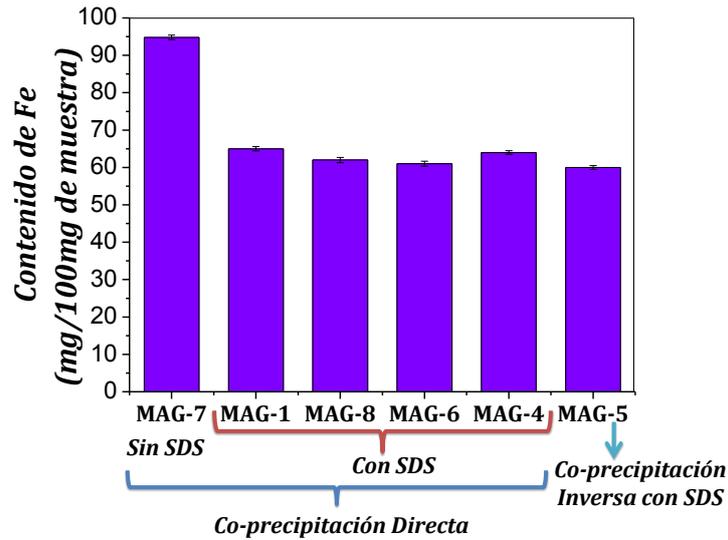


Figura 3.21. Gráfico comparativo de la composición, en términos del contenido de Fe, de todas las muestras obtenidas por co-precipitación directa y la muestra obtenida por co-precipitación inversa.

En términos de su estructura cristalina, y de acuerdo a lo que se puede observar en la figura 3.22, MAG-5 registra el patrón cristalino de espinela inversa correspondiente a magnetita/maghemita. Sin embargo, se observan picos más anchos y de menor intensidad en comparación con el difractograma correspondiente a MAG-1. Las señales asociadas a los planos (111), (422) y (620) son levemente detectadas lo que sugiere una muestra muy poco cristalina.

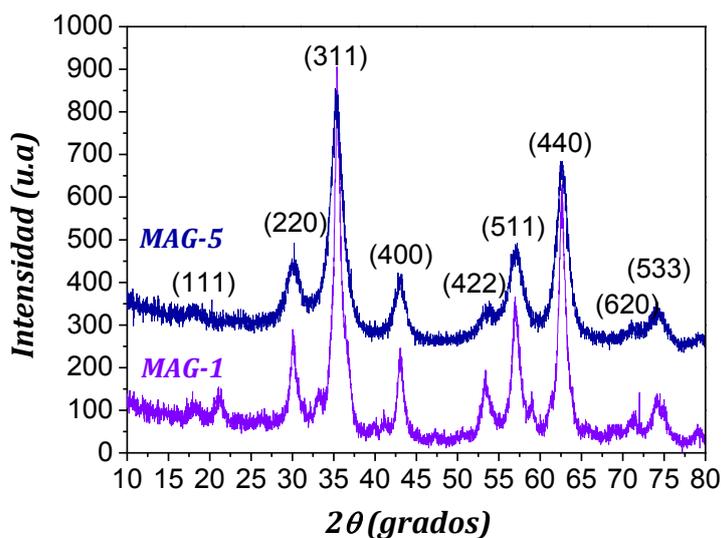


Figura 3.22 XRD de MAG-1 y de MAG-5

Debido a este resultado, y según lo descrito en la **sección 3.3.1**, en relación al análisis del perfil de ζ_{pot} como una herramienta sencilla extra para evaluar la composición de la muestra, se procedió a realizar un estudio de ζ_{pot} en función del pH. La curva resultante se muestra en la figura 3.23 y revela un perfil característico de MAG. Por otro lado, en la figura también se muestra la curva de ζ_{pot} vs pH de MAG-7. Puede observarse que el valor del PI de MAG-5 se encuentra desplazado respecto del valor observado para MAG-7. Esto podría asociarse a la presencia de surfactante en la superficie de las NPMs. Como se enfatizó previamente, los iones sulfato alquílicos presentes en el medio interaccionarían con la superficie de las NPMs dejando expuestas sus colas alquílicas las cuales interactuarían con otras colas alquílicas adyacentes, de modo que las cabezas hidrofílicas $-\text{OSO}_3^-$ quedarían expuestas. El valor de pKa asociado al SDS es -1.95, por lo que este corrimiento del PI nos indicaría la adsorción de SDS. Estos datos se encuentran en concordancia con resultados encontrados por otros autores[55],[64]. Es importante destacar que este corrimiento del PI se espera, en igual o menor medida, para todas las formulaciones MAG preparadas en presencia de SDS, y no sería inherente a la alteración del orden de agregado de los reactivos.

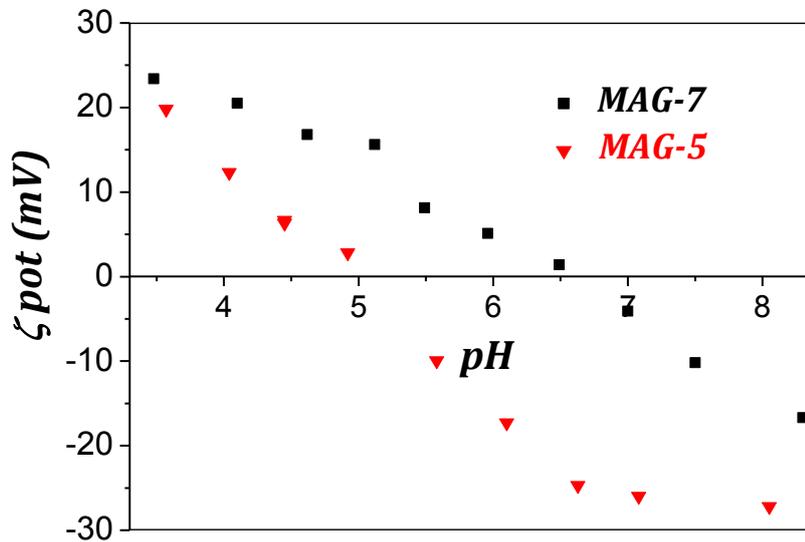


Figura 3.23 Curva de ζ_{pot} vs pH obtenida para MAG-7 y MAG-5.

Liao y colaboradores[64] investigaron el efecto de la presencia de surfactante en el medio de reacción sobre el ζ_{pot} de nanopartículas de TiO_2 . Sus resultados mostraron una disminución del PI de las nanopartículas obtenidas en presencia de SDS respecto de aquellas obtenidas en ausencia del mismo. Estos autores

justificaron los resultados en términos de la incorporación de SDS; indicando que produjo una alteración de la energía superficial de las nanopartículas. Esto derivó en una afinidad y adsorción diferente de protones[87]. Indican además que estas diferencias podrían deberse a los cambios en el área superficial (las partículas son más grandes) y a las habilidades adsorptivas de los iones hidroxilos en la superficie.

La diferencia más destacable que se encontró al implementar la co-precipitación inversa, con respecto a las muestras obtenidas por co-precipitación directa ó tradicional, se relaciona con la morfología de las NPMs. En la figura 3.24, se muestra la micrografía TEM de MAG-5 donde se observan claramente estructuras tipo nanobastones de puntas agudas con dimensiones promedio aproximadas de 35 nm largo x 10 nm de ancho.

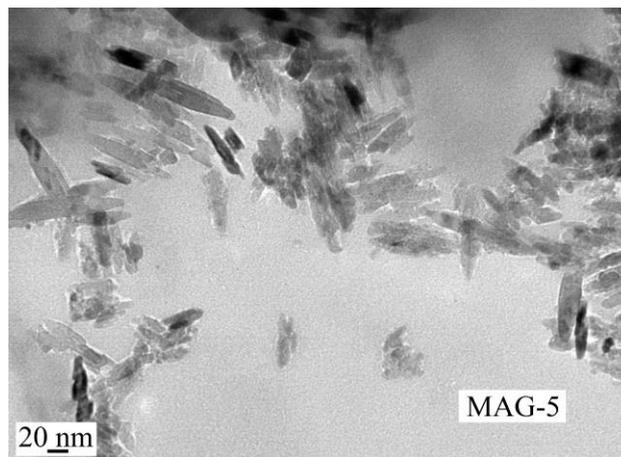


Figura 3.24 Micrografía TEM de MAG-5. (270000x)

Bajo las condiciones en las que se preparó MAG-5, puede inferirse que el incremento en la velocidad con la que tuvo lugar la precipitación (por la adición de la solución $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ conteniendo SDS a la solución de NaOH) ejerció una importante influencia sobre la energía de superficie de cada plano cristalográfico, determinando un crecimiento preferencial a lo largo del plano [110], lo que condujo a la formación de nanobastones[59]. Esto concuerda con los resultados encontrados por otros autores[84].

En la figura 3.25 se muestran comparativamente los ciclos de histéresis obtenidos a diferentes temperaturas y a 300K para MAG-5 y MAG-7.

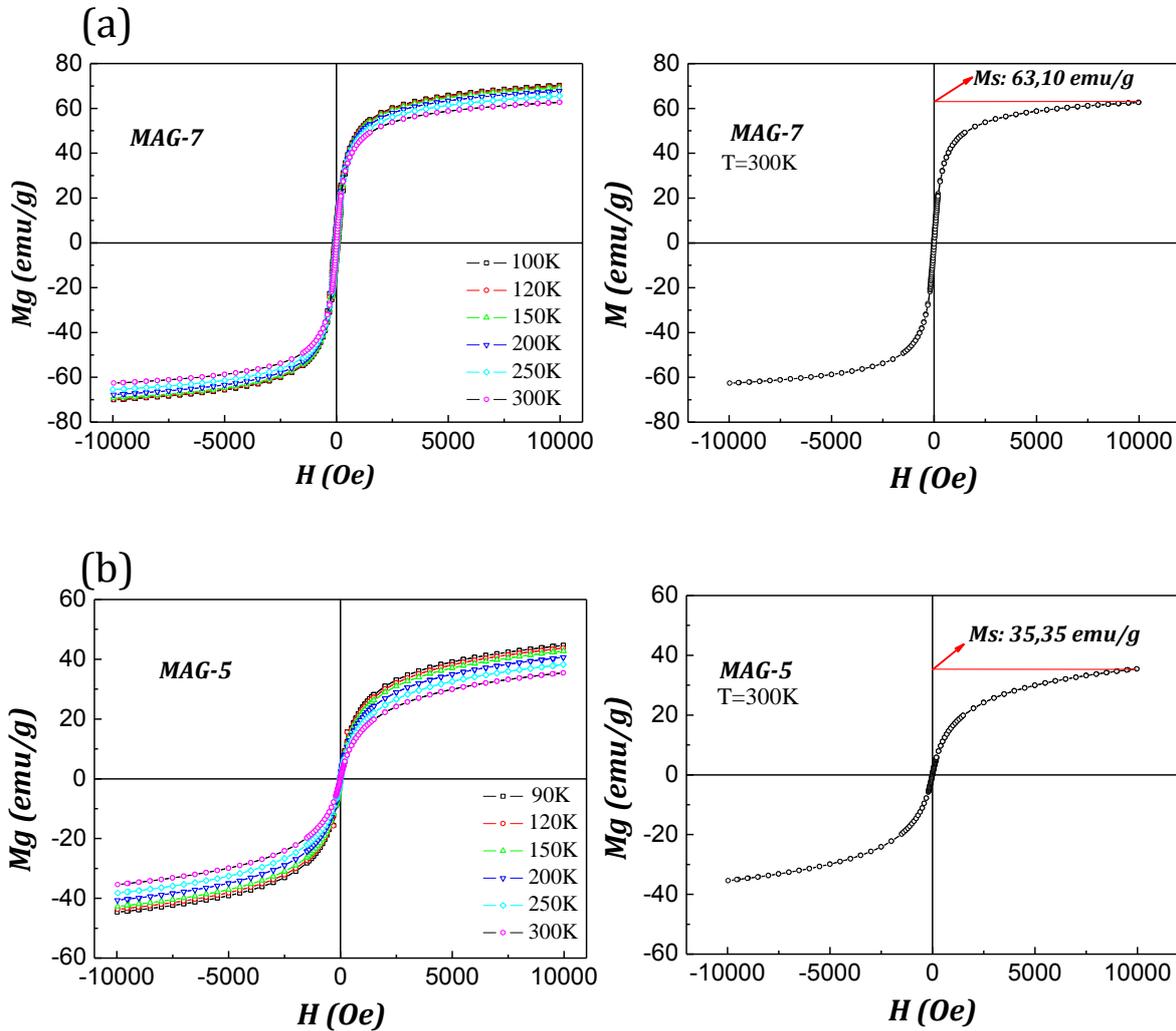


Figura 3.25 Curva de magnetización vs campo aplicado de (a) MAG-7 y (b) MAG-5

Al comparar las curvas de magnetización-desmagnetización de MAG-5 y MAG-7, se observa que MAG-5 resultó superparamagnética, con un valor de Ms un 50% inferior al de MAG-7. Esta disminución podría asociarse principalmente a la baja cristalinidad de MAG-5 reflejada mediante XDR y a la presencia de SDS en la superficie. Sin embargo, según se enfatizó en la sección [3.3.2.1](#), este valor de Ms sería satisfactorio para el empleo de las formulaciones con fines biomédicos.

3.3.3 Estabilidad de las formulaciones de MAG.

La estabilidad de las diferentes formulaciones magnéticas obtenidas por co-precipitación se examinó través de la evolución de sus diámetros hidrodinámicos a lo largo del tiempo.

En la figura 3.26 se incluyen los datos registrados expresados como DH en función del tiempo de almacenamiento (en dispersión acuosa dentro de un vial cerrado y a temperatura ambiente). Es posible inferir que todas las formulaciones obtenidas en presencia de SDS son estables al menos 30 días, dado que su DH no se modifica sustancialmente durante este período de tiempo. Esto significa que el mecanismo de estabilización impartido por el surfactante es eficiente y se prolonga a través del tiempo. Por otra parte, MAG-7 sólo conservó su DH durante 2 días (dato no incluido en la figura. El DH varió de $401.0 \pm 5.5\text{nm}$ a $1781 \pm 212.1\text{nm}$, luego de 72hs), lo que resalta el efecto del SDS. Es importante destacar que la formulación preparada a partir de la mayor concentración nominal de SDS (MAG-8) no solo asegura los DH más bajos sino que además registra variaciones poco significativas a lo largo del tiempo, lo que revela una mayor eficiencia en el mecanismo de estabilización.

Los valores de DH determinados con posterioridad no cumplieron con el estándar de calidad del equipo y por ello no se incluyeron en el gráfico.

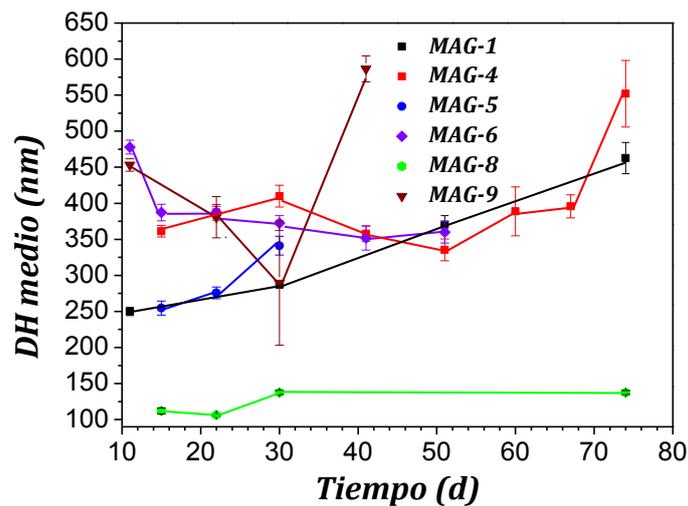


Figura 3.26 Evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento.

3.4-Conclusiones

- Se sintetizaron nanopartículas magnéticas, constituidas fundamentalmente por magnetita, a partir del empleo de la técnica de co-precipitación y su variante reducción precipitación.

- En función de las propiedades fisicoquímicas buscadas de acuerdo a las aplicaciones propuestas en el campo de la biomedicina, se seleccionó la técnica de co-precipitación como la más apropiada para la síntesis de NPMs.

A partir del empleo de la técnica de co-precipitación, se logró demostrar que es posible obtener NPMs con propiedades controladas mediante la modificación apropiada de variables experimentales asociadas a dicha técnica.

En este sentido se estableció que:

- 1) El empleo de un estabilizante, en este caso SDS, constituyó un factor determinante para obtener partículas con propiedades típicas de la nanoescala y no agregados de las mismas.

- 2) Es posible modificar la morfología de las NPMs cambiando la secuencia de agregado de los reactivos así como la concentración inicial de SDS.

- 3) Se detectó que el uso de NH_4OH en lugar de NaOH en la co-precipitación directa o tradicional, conduce a un incremento de la cristalinidad y a un mayor valor de Ms.

- 4) Todas las formulaciones obtenidas exhiben carácter hidrofílico dando lugar a dispersiones acuosas que pueden permanecer estables al menos durante 30 días.

A partir del trabajo exploratorio descrito en este capítulo surgieron dos formulaciones como las más aptas para continuar avanzando en el diseño de las NPMs multifuncionales capaces de actuar como agentes teranósticos:

-Se eligió ***MAG-5*** debido a su morfología particular. Como se comentó en la introducción las NPMs con forma alargada son las de preferencia para internalización celular. Además, su mayor superficie, permitiría consecuentemente una mejor incorporación de agentes funcionalizantes.

-Se seleccionó **MAG-4** como ejemplo de NPMs esféricas, en función de su mayor homogeneidad en cuanto a tamaño y forma, dispersabilidad y estabilidad en el tiempo en un medio acuoso, además de una elevada Ms.

3.5-Agradecimientos

Al Dr. Roberto Zysler (Centro Atómico Bariloche-Instituto Balseiro) por la realización de la caracterización magnética de las nanopartículas presentadas en este capítulo y en el **Capítulo VI**.

3.6-Referencias del capítulo

- [1] Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., et al., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, (2011) 24–46
- [2] He C., Hu Y., Yin L., Tang C., et al., Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31, (2010) 3657–3666
- [3] Agotegaray M., Campelo A., Zysler R., Gumilar F., et. al., Influence of chitosan coating on magnetic nanoparticles in endothelial cells and acute tissue biodistribution. *J Biomater Sci Polym* 27, (2016) 1069–1085
- [4] Papisov M.I., Bogdanov A. Jr, Schaffer B., et al., Colloidal magnetic resonance contrast agents: effect of particle surface on biodistribution. *J. Magn. Magn. Mater.*122, (1993) 383–386
- [5] Chouly C., Pouliquen D., Lucet I., Jeune J. J., et al., Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution, *J. Microencapsulation* 13, (1996) 245-255
- [6] Gbadamosi S.M., Hunter J.K., Moghimi A.C., PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance, *FEBS Lett.* 532, (2002) 338–344
- [7] Yamaoka Y., Kuroda T., Tabata M., Ikada Y., Body distribution of dextran derivatives with electric charges after intravenous administration, *Int. J. Pharm.* 113, (1995) 149–157
- [8] Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B., et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, (2009) 428–437
- [9] Muller R.H., Luck M., et al., *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Rostock, Germany, Plenum, New York, 1996.
- [10] Hall J.E. Guyton and hall textbook of medical physiology. London: Elsevier; 2010
- [11] Ramos M., Castillo C. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas. *Ide@s CONCYTEG*, 6, (2011) 629-646
- [12] Longmire M., Choyke P.L., Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats, *Nanomedicine* 3, (2008) 703–717
- [13] Jain T.K., Reddy M.K., Morales M.A., et al. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol. Pharm.*5, (2008) 316–327
- [14] Mojica Piscioti M.L., Lima E. Jr, Vasquez Mansilla M.M., et al. In vitro and in vivo experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: magnetic targeting. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*102, (2014) 860–868
- [15] Li M., Al-Jamal K. T., Kostarelos K., Reineke J., Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles, *ACS Nano* 4, (2010) 6303–6317
- [16] Champion J.A., Mitragotri S., Role of target geometry in phagocytosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, (2006) 4930–4934

- [17] Arnida M.M., Janát-Amsbury A., Ray C.M., Peterson H., et al., Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77, (2011) 417–442
- [18] Huang X., Li L., Liu T., Hao N., et al., The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo, *ACS Nano* 5, (2011) 5390–5399
- [19] Park J.-H., von Maltzahn G., Zhang L., Schwartz M. P., et al., Magnetic Iron Oxide Nanoworms for Tumor Targeting and Imaging. *Adv. Mater.* 20, (2008) 1630–1635
- [20] Peiris P.M., Bauer L., Toy R., Tran E., et al., Enhanced delivery of chemotherapy to tumors using a multicomponent nanochain with radio-frequency-tunable drug release, *ACS Nano* 6, (2012) 4157–4168
- [21] Peiris P.M., Tam M., Vicente P., Abramowski A., et al., On-command drug release from nanochains inhibits growth of breast tumors, *Pharm. Res.* 31, (2014) 1460–1468
- [22] Peiris P.M., Toy R., Abramowski A., Vicente P., et al., Treatment of cancer micrometastasis using a multicomponent chain-like nanoparticle, *J. Control. Release* 173, (2014) 51–58
- [23] Kolhar P., Anselmo A.C., Gupta V., Pant K., et al., Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, (2013) 10753–10758
- [24] Shuvaev V.V., Ilies M.A., Simone E., Zaitsev S., et al., Endothelial targeting of antibody-decorated polymeric filomicelles, *ACS Nano* 5, (2011) 6991–6999
- [25] Mei F., Valter S., Richard T.O., Lyubov B., et al., Particle size and magnetic properties dependence on growth temperature for rapid mixed co-precipitated magnetite nanoparticles *Nanotechnology* 23 (2012) 145601
- [26] Baumgartner J., Dey A., Bomans P.H.H., Le Coadou C., et al., Nucleation and growth of magnetite from solution, *Nat. Mater.* 12, (2013) 310–314
- [27] Roth H.C., Schwaminger S.P., Schindler M., Wagner F.E., et al., Influencing factors in the co-precipitation process of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a model based study, *J. Magn. Magn. Mater.* 377, (2015) 81–89
- [28] Fang M., Strom V., Olsson R.T., Belovaand L., et al, Particle size and magnetic properties dependence on growth temperature for rapid mixed coprecipitated magnetite nanoparticles, *Nanotechnology* 23, (2012) 145601-145610
- [29] Mascolo M.C., Pei Y., Ring T.A., Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases, *Materials* 6, (2013) 5549–5567
- [30] Qu S., Yang H., Ren D., Kan S., et al., Nanoparticles Prepared by Precipitation from Partially Reduced Ferric Chloride Aqueous Solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 215, (1999) 190–192
- [31] Nicolás P., Saleta M., Troiani H., Zysler R., et al., Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues. *Acta Biomat.* 9, (2013) 4754–4762
- [32] Klekotka U., Satula D., Spassov S., Kalska-Szostko B., Surfactant dependence on physicochemical properties of magnetite nanoparticles, *Colloids Surf. A* 537, (2018) 452–459
- [33] Zhou Z., Zhu X., Wu D., Chen Q., et al., Anisotropic Shaped Iron Oxide Nanostructures: Controlled Synthesis and Proton Relaxation Shortening Effects, *Chem. Mater* 27, (2015), 3505–3515
- [34] Adeli M., Yamini Y., Faraji M. Removal of copper, nickel and zinc by sodium dodecyl sulphate coated magnetite nanoparticles from water and wastewater samples, *Arab. J. Chem* 10, (2017) S514–S521
- [35] Navarro-Badilla A., Hurtado R.B., Cortez-Valadez M, Perez-Rodriguez A., et al., SDS bubbles functionalized with Gold nanoparticles and SERS applications, *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures* 87, (2017) 93–97
- [36] Saien J., Bahrami M., Understanding the effect of different size silica nanoparticles and SDS surfactant mixtures on interfacial tension of n-hexane–water, *J. Mol. Liq.* 224, (2016) 158–164
- [37] López-Miranda A., López-Valdivieso A., Viramontes-Gamboa G., Silver nanoparticles synthesis in aqueous solutions using sulfite as reducing agent and sodium dodecyl sulfate as stabilizer, *J Nanopart Res* 14,(2012) 1101-1112
- [38] Chen Y.H., Yeh C.S., Laser ablation method: use of surfactants to form dispersed Ag nanoparticles, *Colloids Surf A* 197, (2002) 133–139

- [39] Shariati S., Faraji M., Yamini Y., Rajabi A.A., Fe₃O₄ magnetic nanoparticles modified with sodiumdodecyl sulfate for removal of safranin O dye from aqueous solutions, *Desalination* 270, (2011) 160–165
- [40] Naderi O., Sadeghi R., Synthesis and characterization of silver nanoparticles in aqueous solutions of surface active imidazolium-based ionic liquids and traditional surfactants SDS and DTAB. *Molliq* (2018), doi:10.1016/j.molliq.2018.10.046.
- [41] Pavan P. C., Gomes G. de A., Valim J. B., Adsorption of sodium dodecyl sulfate on layered double hydroxides. *Micropor. Mesopor. Mat.* 21, (1998) 659–665
- [42] Rahman A., Brown C. W., Effect of pH on the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate. *J. Appl. Polym. Sci.* 28, (1983) 1331–1334
- [43] Huang J., Shi L., Zeng G., Li H., et al., Removal of Cd(II) by micellar enhanced ultrafiltration: role of SDS behaviors on membrane with low concentration. *J Clean Prod* 209, (2019) 53-61
- [44] Li H., Qin L., Feng Y., Hu L., et al., Preparation and characterization of highly water-soluble magnetic Fe₃O₄ nanoparticles via surface double-layered self-assembly method of sodium alpha-olefin sulfonate. *J. Magn. Magn. Mater* 384, (2015) 213–218
- [45] Carvalho M.D., Henriques F., Ferreira L.P., Godinho M., et al, Iron oxide nanoparticles: the influence of synthesis method and size on composition and magnetic properties, *J. Solid State Chem.* 201, (2013) 144–152
- [46] Komarneni S., Hu W., Noh Y. D., Van Orden A., et al., Magnetite syntheses from room temperature to 150°C with and without microwaves. *Ceram Int.* 38, (2012) 2563–2568
- [47] Ruiz-Baltazar A., Esparza R., Rosas G., Pérez R., Effect of the Surfactant on the Growth and Oxidation of Iron Nanoparticles, *J Nanomater* 2015, (2015) 1–8
- [48] Kim W., Suh C.-Y., Cho S.-W., Roh K.-M., et al., A new method for the identification and quantification of magnetite–maghemite mixture using conventional X-ray diffraction technique, *Talanta* 94, (2012) 348–352
- [49] Pernal S., Wu V. M., Uskoković V., Hydroxyapatite as a Vehicle for the Selective Effect of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles against Human Glioblastoma Cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, (2017) 39283–39302
- [50] Tourinho F.A., Campos A.F.C., Aquino R., Lara M.C.F.L., et al., Surface charge density determination in electric double layered magnetic fluids, *Brazilian J. Phys.* 32, (2002) 501–508
- [51] Prakash S., Das B., Mohanty J., Venugopal R., The recovery of fine iron minerals from quartz and corundum mixtures using selective magnetic coating, *Int. J. Miner. Process.* 57, (1999) 87–103
- [52] Bumb A., Brechbiel M., Choyke P., Fugger L., et al, Synthesis and Characterization of Ultra-Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Thinly Coated with Silica, *Nanotechnology* 19, (2008) 335601
- [53] Wu W., Wu Z., Yu T., Jiang C., et al., Progress on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Surface Functional Strategies and Biomedical Applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16, (2015) 023501
- [54] Agotegaray M., Palma S., Lassalle V., Novel Chitosan Coated Magnetic Nanocarriers for the Targeted Diclofenac Delivery, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, (2014) 3343–3347
- [55] Zeng X., Xu L., Tian J., Yin W., et al., Effect of a CA depressant on flotation separation of celestite from fluorite and calcite using SDS as a collector, *Miner Eng* 111, (2017) 201–208
- [56] González-Martín M.L., Bruque J. M., González-Caballero F., Perea-Carpio R., et al., The mechanism of adsorption of sodium dodecylsulfonate on fluorite and its surface free energy, *Appl Surf Sci.* 103, (1996) 395-102
- [57] Tie S.L., Lin Y.Q., Lee H.C., Bae Y.S., et al., Amino acid-coated nano-sized magnetite particles prepared by two-step transformation, *Colloids Surf. A* 273, (2006) 75–83
- [58] Mohammed R., El-Maghrabi H. H., Younes A. A., Farag A. B., et al., SDS-goethite adsorbent material preparation, structural characterization and the kinetics of the manganese adsorption. *J Mol Liq.* 231, (2017) 499–508
- [59] Ahn T., Kim J.H., Yang H.-M., Lee J.W., et al., Formation Pathways of Magnetite Nanoparticles by Coprecipitation Method, *J. Phys. Chem. C.* 116, (2012) 6069–6076

- [60] Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release* 235, (2016) 337–351
- [61] Bastami T. R., Entezari M. H., High stable suspension of magnetite nanoparticles in ethanol by using sono-synthesized nanomagnetite in polyol medium. *Mater. Res. Bull.* 48, (2013) 3149–3156
- [62] Wang X., Li X., Yang, S., Influence of pH and SDBS on the Stability and Thermal Conductivity of Nanofluids. *Energy & Fuels* 23, (2009) 2684–2689
- [63] www.chemecalize.com.org
- [64] Liao D. L., Wu G. S., Liao B. Q., Zeta potential of shape-controlled TiO₂ nanoparticles with surfactants, *Colloids Surf. A* 348, (2009) 270–275
- [65] Ma C.-M., Li C.-L., Stability of dispersions of iron oxide in mixed solutions of polyvinylpyrrolidone and sodium alkyl sulfate. *Colloids Surf. A* 47, (1990) 117–123
- [66] Zhang L., He R., Gu H.-C., Synthesis and kinetic shape and size evolution of magnetite nanoparticles, *Mater. Res. Bull.* 41 (2006) 260–267
- [67] Cheon J., Kang N.-J., Lee S.-M., Lee J.-H., et al., Shape evolution of single crystalline iron oxide nanocrystals, *J. Am. Chem. Soc.* 126, (2004) 1950–1951
- [68] Kovalenko M.V., Bodnarchuk M.I., Lechner R.T., Fatty acid salts as stabilizers in size and shape-controlled nanocrystal synthesis: the case of inverse spinel iron oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 129, (2007) 6352–6353
- [69] Wang Z.L., *Handbook of Nanophase and Nanostructured Materials*, vol. II: Characterization, First ed., Springer, US, 2002
- [70] Puentes V.F., Zanchet D., Erdonmez C.K., Alivisatos A.P., Synthesis of hcp-Conanodisks, *J. Am. Chem. Soc.* 124, (2002) 12874–12880
- [71] Chen Z., Geng Z., Tao T., Wang Z., Shape-controlled synthesis of Fe₃O₄ rhombic dodecahedrons and nanodisks, *Mater Lett* 117, (2014) 10–13
- [72] Zhou Z., Zhu X., Wu D., Chen Q., et al., Anisotropic Shaped Iron Oxide Nanostructures: Controlled Synthesis and Proton Relaxation Shortening Effects, *Chem. Mater* 27, (2015), 3505–3515
- [73] Huang Y., Mao K., Zhang B., Zhao Y., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics. *Mater. Sci. Eng. C* 70, (2017) 763–771
- [74] Fang K., Song L., Gu Z., Yang F., et al., Magnetic field activated drug release system based on magnetic PLGA microspheres for chemo-thermal therapy, *Colloids Surf., B* 136, (2015) 712–720
- [75] Zhang D.E., Zhang X.J., Ni X.M., Song J.M., et al., Fabrication and characterization of Fe₃O₄ octahedrons via an EDTA-assisted route, *Cryst. Growth Des.* 7, (2007) 2117–2119
- [76] Cornell R. M., Schwertmann U., *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*, 1st ed, VCH: New York, 1996
- [77] Batlle X., Labarta A., Finite-size effects in fine particles: Magnetic and transport properties. *J Phys D Appl Phys* 35, (2002) R15-R42
- [78] Arévalo P., Isasi J., Caballero A. C., Marco J. F., et al., Magnetic and structural studies of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized via coprecipitation and dispersed in different surfactants. *Ceram. Int* 43, (2017) 10333–10340
- [79] Kanimozhi S., Perinbam K., Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and its application in immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* Lp1. *Mater Res Bull.* 48, (2013) 1830–1836
- [80] Patil R. P., Hankare P. P., Garadkar K. M., Sasikala, R., Effect of sintering temperature on structural, magnetic properties of lithium chromium ferrite. *J Alloy Compd* 523, (2012) 66–71
- [81] Jiang Q. L., Zheng S. W., Hong R. Y., Deng S. M., et al., Folic acid-conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hyperthermia and MRI in vitro and in vivo. *Appl Surf Sci.* 307, (2014) 224–233
- [82] Lin Y., Wei Y., Sun Y., Wang J., Synthesis and magnetic characterization of magnetite obtained by monowavelength visible light irradiation, *Mater. Res. Bull.* 47, (2012) 614–618
- [83] Lazhen S., Yongsheng Q., Yong G., Shuangming M., et al., Facile co-precipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles, *Ceram. Int.* 40 (2014) 1519–1524
- [84] Zheng Y. Y., Wang X. B., Shang L., Li C. R., et al., Fabrication of shape controlled Fe₃O₄ nanostructure, *Mater Charact* 61, (2010) 489–492

- [85] Nejati K., Zabihi R., Preparation and magnetic properties of nano size nickel ferrite particles using hydrothermal method, *Chem Cent J.* 6, (2012), <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-23>
- [86] Nawale A.B., Kanhe N.S., Patil K.R., Bhoraskar S.V., et al., Magnetic properties of thermal plasma synthesized nanocrystal line nickel ferrite (NiFe_2O_4). *J Alloys Compd* 509, (2011) 4404-4413
- [87] Mills A., Morris S., Photomineralization of 4-chlorophenol sensitized by titanium dioxide: a study of the initial kinetics of carbon dioxide photogeneration, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 71, (1993) 75–83

Capítulo IV

Funcionalización de nanopartículas magnéticas con ácido fólico

Funcionalización de nanopartículas magnéticas con ácido fólico

RESUMEN

En este capítulo se presentan los estudios experimentales asociados a la incorporación de ácido fólico a la superficie de MAG. Para ello, se estudiaron dos métodos: adsorción simple y acoplamiento covalente. En primera instancia, se trataron las nanopartículas de MAG estabilizadas con SDS, con 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) de manera de incorporar grupos NH_2 a la superficie de las mismas. Todas las formulaciones fueron exhaustivamente caracterizadas, a fin de verificar la presencia de todos los componentes y seleccionar la técnica más apropiada para la funcionalización del núcleo magnético. Se evaluó la estabilidad de los nanosistemas obtenidos de acuerdo a dos criterios: evolución del DH en función del tiempo y estudio de la capacidad de retención del AF incorporado en buffer fosfato, $\text{pH}=7.4$.

Se exponen, además, los resultados asociados al estudio de la interacción de estas nanoformulaciones con un medio fisiológico simulado.

4.1 Introducción

Tal como se indicó en el *Capítulo I, (sección 1.5.2)* en relación a la acumulación de NPMs, la evidencia reciente define al efecto de EPR como un fenómeno muy heterogéneo dado que la vectorización pasiva es altamente dependiente de (i) la vascularización del tumor, la cual a su vez depende del tipo de tumor, (ii) el paciente (inter-variabilidad) y el estadio de la enfermedad; y (iii) el área donde se encuentra el tumor (intra-variabilidad)[1]. Por otra parte, el efecto de EPR es dependiente del tiempo y requiere de un período prolongado de circulación (12 a 24 hs) de las NMPs con una encapsulación estable de un medicamento[2], lo que supone una elevada carga de fármaco para lograr el equilibrio entre la retención y la liberación del mismo[3].

La vectorización activa se ha propuesto como una estrategia superadora al fenómeno de EPR[4]. Para ello es indispensable la incorporación de ligandos específicos a las NPMs. Este proceso, llamado bioconjugación, implica la conjugación química de grupos funcionales de las NPMs con moléculas biológicas. De esta manera el núcleo magnético adquiere una mayor especificidad y permite la acumulación de las NPMs en zonas puntuales del organismo, al ser reconocidas a través de los ligandos biológicos unidos a ellas[5].

Dentro de la variada gama de agentes funcionalizantes que pueden actuar como ligando selectivo, el ácido fólico, también conocido como vitamina B9, resulta muy interesante debido a dos aspectos fundamentales.

Por un lado, es biocompatible, no inmunogénico y estable, por lo que la funcionalización de las NPMs con esta molécula les otorga o incrementa su biocompatibilidad. Además, cuando se lo compara con otros agentes funcionalizantes, es menos costoso y se conjuga más fácilmente[6,7].

Por otro lado, el receptor de folato (RF), más precisamente la isoforma α (α RF), que se caracteriza por presentar una elevada afinidad por el AF ($K_d=10^{-10}$ mol.L⁻¹)[8], se encuentra sobreexpresado en la superficie de diferentes tipos de células tumorales, incluyendo ovario, riñón, útero, colon y pulmón[9]. Esto se debe a que la vitamina es de gran importancia en la reproducción celular, siendo una molécula necesaria para la síntesis de las bases del ADN. Por lo tanto, debido al

comportamiento típico de las células tumorales, necesitan grandes cantidades de folato para la rápida proliferación celular[10]. Además, se encuentra reportado que la densidad de α RF aumenta a medida que el grado de avance del tumor es mayor[11], por lo que, la densidad de α RF en la superficie celular podría considerarse como un parámetro para conocer el grado de malignidad del mismo. Estas observaciones sugieren que el α RF puede ser un objetivo útil para el desarrollo de una terapia selectiva contra ciertas patologías oncológicas.

Es importante aclarar que con excepción de unos pocos tejidos normales (riñón, placenta y plexo coroideo), el α RF está presente sólo en niveles bajos en los epitelios normales. Además, los receptores en estos tejidos, excepto en la placenta, se localizan en la superficie de la membrana apical, es decir, en sentido opuesto a la sangre y, por lo tanto, son inaccesibles para los conjugados de AF administrados por vía intravenosa[12], por lo que estas células estarían protegidas de las terapias dirigidas para α RF.

Aunque aún no se ha definido el mecanismo preciso a través del cual tiene lugar el transporte del AF al interior celular una vez unido al α RF[13], una de las teorías más reportadas involucra la captación celular de AF por una vía endocítica mediada por receptor. De esta manera, los nanosistemas funcionalizados con AF podrían ingresar al interior celular por endocitosis y moverse a través del citoplasma mediante tráfico vesicular liberando el fármaco, por ejemplo, en el interior del citoplasma. Posteriormente, el α RF se reciclaría y podría volver a la superficie de la célula para transportar más nanopartículas funcionalizadas con AF[14]. En la figura 4.1 se esquematiza el mecanismo propuesto.

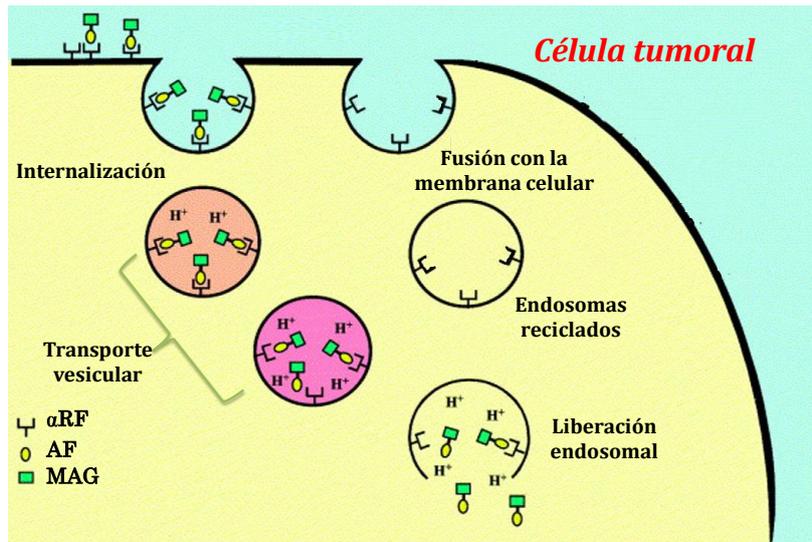


Figura 4.1. Esquema de captación celular de AF mediada por receptor. (Adaptación de [13])

La mayoría de los artículos señalan al anillo Pteridínico (anillo PT) como el grupo responsable de la unión del AF a su receptor[13]. Se ha reportado que la interacción de los grupos α ó γ carboxílicos del AF con otras moléculas no modificaría la retención de la afinidad del α RF por la molécula de AF[15]. En la figura 4.2 se presenta la molécula de AF, en la cual se indican las diferentes partes que la componen.

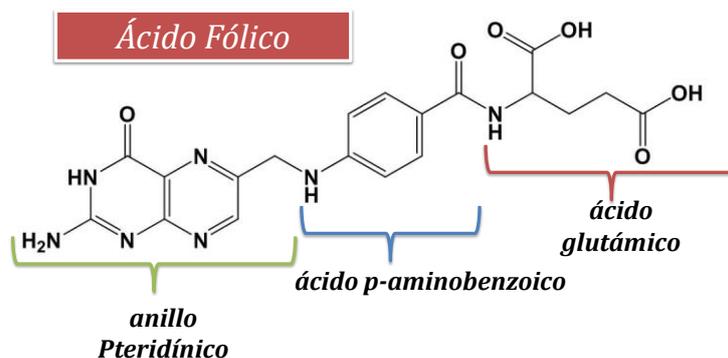


Figura 4.2 Molécula de AF.

En la literatura científica pueden encontrarse diversos reportes relacionados con la incorporación de la vitamina a la superficie de nanopartículas.

Por ejemplo, se ha propuesto el diseño de una plataforma para el transporte de drogas basadas en NPMs cubiertas de polímeros y modificada con AF. En este

caso, polietilenimina (PEI) fue la fuente de grupo amino empleada para conjugar el AF[16]. También se ha reportado la funcionalización de nanopartículas de quitosano con AF con el fin de transportar ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) y determinar su eficacia de focalización y captación en diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal humano (HT29 y Caco -2) por endocitosis mediada por el RF[17]. En otros reportes se ha propuesto la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc cubiertas con trietoxisilano (TEOS) y APTS y conjugadas con AF previo tratamiento con N-Hidroxisuccinimida (NHS)[18].

En este capítulo se pretende modificar las nanopartículas de MAG con AF, con el fin de conferirles selectividad para interactuar con células tumorales que sobreexpresen α RF en su superficie. De este modo la implementación de un transportador magnético que contenga AF asociado a su superficie permitiría no sólo el direccionamiento de estas nanopartículas hacia un sitio específico, mediante el uso de un campo magnético externo, sino también su acumulación preferencial en zonas donde se registre mayor concentración de α RF a través de endocitosis mediada por receptor.

Para ello en primera instancia, se estudian dos protocolos de reacción: adsorción simple y anclaje covalente del AF a la superficie de MAG. El fin es seleccionar aquel método que permita conseguir un adecuado nivel de incorporación del AF a la superficie de las nanopartículas y al mismo tiempo, asegurar una formulación con características fisicoquímicas adecuadas para su empleo en el campo de salud. En una segunda instancia, se evalúa la estabilidad de las nanoformulaciones obtenidas de acuerdo a dos criterios: (i) evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento en dispersión acuosa y (ii) estudio de la capacidad de retención del AF incorporado.

Por otro lado, se combinan datos experimentales con estudios teóricos con el fin de adquirir conocimientos acerca del mecanismo de interacción de la molécula de AF con la superficie de las nanopartículas.

Finalmente, se incluye un estudio tendiente a predecir el comportamiento de las nanoformulaciones en un medio que simula el plasma sanguíneo en términos de osmolaridad, pH y contenido de albúmina.

4.2 Experimental

4.2.1 Síntesis del núcleo magnético, MAG

La síntesis del núcleo magnético se llevó a cabo empleando el protocolo de coprecipitación invertida descrito en la *sección 3.2.2.3 del Capítulo III* que dio lugar a MAG-5 (de acuerdo a la nomenclatura adoptada en dicho capítulo). Esta muestra se nombrará simplemente **MAG** de ahora en adelante.

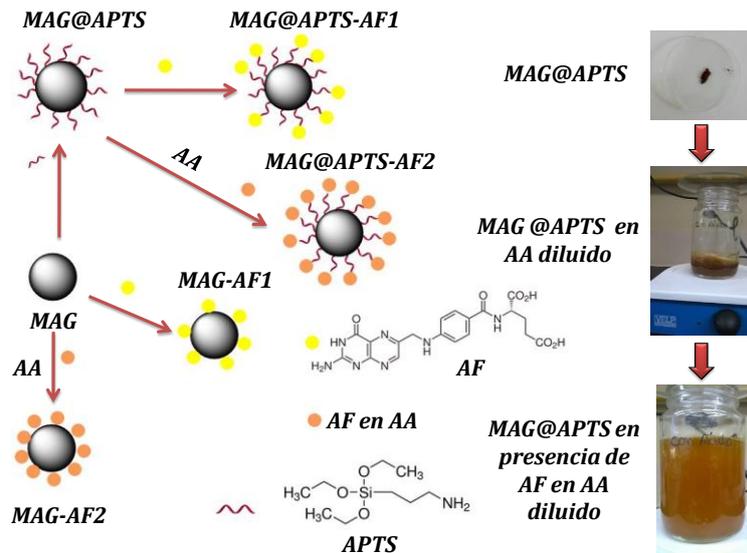
4.2.2 Modificación de la superficie de MAG con APTS.

Se hicieron reaccionar 3.01×10^{-3} moles de APTS con 1.17×10^{-3} moles de MAG en 75 mL de etanol absoluto y se agitaron vigorosamente durante 8 hs a temperatura ambiente. Posteriormente se decantó el sólido presente en la dispersión utilizando un imán NdFeB y se purificó lavando 3 veces con etanol absoluto para eliminar el exceso de APTS. La muestra obtenida se denominará MAG@APTS.

4.2.3 Incorporación de AF a la superficie de las nanopartículas.

4.2.3.1 Adsorción simple

Se incubaron 20 mg de MAG ó MAG@APTS con una solución de ácido acético (AA) durante 30 min a temperatura ambiente y bajo constante agitación magnética. Se agregaron 20 mg de ácido fólico junto con agua bidestilada (AB) para alcanzar un volumen final de 100 mL. La reacción tuvo lugar durante 24 hs bajo constante agitación magnética (ver esquema 4.1).



Esquema 4.1. Incorporación del AF a la superficie de los NPMs mediante el protocolo de adsorción simple e imágenes del proceso.

Las muestras obtenidas se nombraron como MAG-AF 1, MAG-AF 2, MAG@APTS-AF 1 y MAG@APTS-AF 2. El número 1 indica que la síntesis se realizó en ausencia de AA, mientras que el número 2 hace referencia a la síntesis en presencia de este. En la tabla 4.1 se resumen las condiciones analizadas para la obtención de cada muestra.

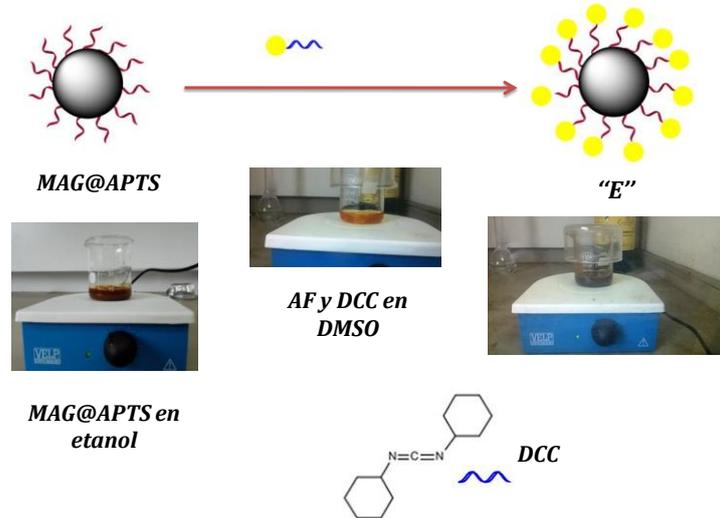
Tabla 4.1 Variaciones incluidas en el protocolo de adsorción simple de AF a NPMs.

Muestra	MAG@APTS (mg)	MAG (mg)	Ácido fólico (mg)	Presencia de Ac. Acético
MAG@APTS-AF1	20.0 mg	-----	20.0 mg	NO
MAG@APTS-AF2	20.0 mg	-----	20.0 mg	SI
MAG-AF1	-----	20.0 mg	20.0 mg	NO
MAG-AF2	-----	20.0 mg	20.0 mg	SI

4.2.3.2 Acoplamiento covalente.

Para lograr la funcionalización de MAG@APTS con AF mediante anclaje covalente se empleó el protocolo de síntesis reportado por Jiang y col.[19] con algunas modificaciones. Para ello, se disolvieron 100 mg de AF y 36 mg de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se agitaron

durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 5 mL de dispersión etanólica conteniendo 100 mg de MAG@APTS y la reacción continuó durante 24 hs más, tal y como se muestra en el esquema 4.2.



Esquema 4.2. Imágenes y esquema de la incorporación de AF a la superficie de MAG@APTS por el método de anclaje covalente.

Al finalizar la reacción, se lavó el sólido resultante para remover el subproducto insoluble generado durante la síntesis, diciclohexilurea (DCU) y los residuos de DMSO. Para ello, la muestra se dispersó en agua y buffer PBS, pH=7.4, se agitó vigorosamente durante 30 min y se decantó utilizando un imán de Nd. Este proceso se repitió hasta que se eliminaron completamente los grumos asociados a los restos de DCU. Los pasos seguidos para el lavado se muestran en la figura 4.3.

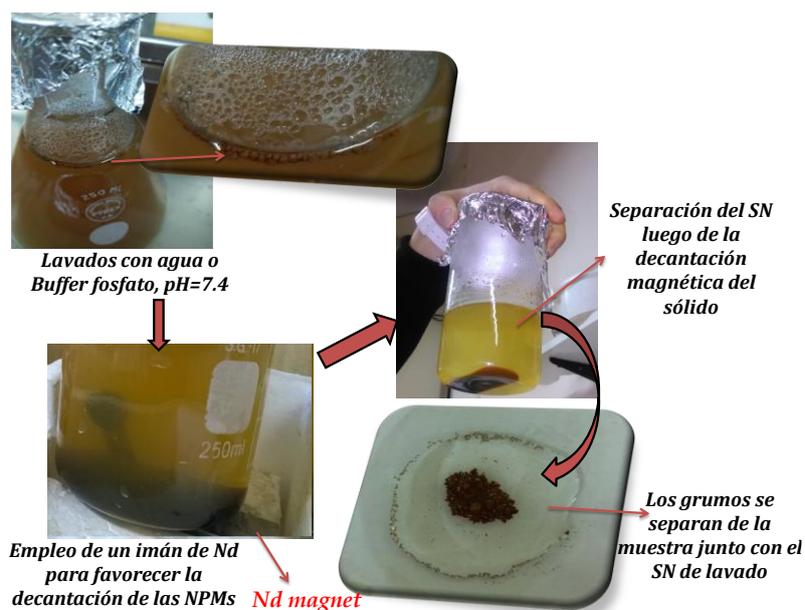


Figura 4.3. Secuencia de lavados para eliminar el compuesto DCU generado como subproducto en la reacción de acoplamiento covalente.

Mediante la aplicación de esta metodología se obtuvieron tres muestras diferentes. En la tabla 4.2 se detallan las condiciones experimentales que dieron lugar a cada una de ellas. Las muestras obtenidas se denominarán de forma general “E”.

Tabla 4.2. Variaciones incluidas en el protocolo de anclaje covalente de AF a MAG@APTS.

Muestra	MAG@APTS (mg)/5mL ETOH	AF (mg)	Relación nominal inicial MAG@APTS/AF	Aditivos
E1	100	50	1/0.5	DCC: 7.2 mg/mL DMSO DMSO: 2.5 mL
E2	100	100	1/1	DCC: 7.2 mg/mL DMSO DMSO: 5 mL
E3	100	200	1/2	DCC: 7.2 mg/mL DMSO DMSO: 10 mL

4.2.4 Ensayos de estabilidad.

4.2.4.1 Evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento en AB.

Se estudió la evolución del DH de las diferentes formulaciones E1, E2 y E3 en función del tiempo de almacenamiento en suspensión acuosa (en un vial cerrado a temperatura ambiente, protegidas de la luz). Se prepararon dispersiones de E1, E2 y E3 en AB y luego de someterlas a ultrasonido durante 60 minutos se midió el DH, utilizando el equipo Malvern Zetasizer, empleando la técnica de DLS. Los resultados obtenidos son el resultado de tres réplicas de cada una de las muestras. Las medidas se repitieron una vez por semana durante un mes empleando siempre la dispersión original. Luego de este período de tiempo, se separó el sólido empleando un imán de NdFeB y se analizó por FTIR para testear la retención de AF en la muestra luego de la pérdida de estabilidad coloidal.

4.2.4.2. Evaluación de capacidad de retención del AF.

Se incubaron 15 mg de muestra en 100 mL de buffer PBS, pH=7.4, durante 4 hs a 37°C y bajo agitación constante. Luego del tiempo estipulado, las suspensiones fueron decantadas magnéticamente y se separaron los sobrenadantes (SN). Se secaron los sólidos en estufa a 37°C y se analizaron por FTIR.

4.2.5. Análisis del comportamiento de las NPMs en un medio fisiológico simulado.

50 mg de E2 se incubaron en 250 mL de un fluido fisiológico simulado (FFS) conteniendo 1.125 gr de albúmina de suero bovino (ASB), durante 4 hs a 37°C y bajo agitación magnética constante. El mismo protocolo fue adoptado para estudiar el comportamiento de MAG@APTS en FFS.

4.3 Resultados y Discusión

Teniendo en cuenta la naturaleza anfótera tanto de la superficie de MAG como de la molécula de AF[20], se realizó la adsorción a diferentes pH, utilizando AA. De esta manera, se intentó favorecer la adsorción a través de diferentes interacciones (electrostáticas ó puentes de hidrógenos) entre la superficie de MAG y el AF.

Por otra parte, reportes científicos indican que la modificación de la superficie de MAG con APTS resulta eficiente para inducir interacciones con grupos carboxilato del AF[21]. Para reforzar y maximizar las posibles interacciones, se

aminó la superficie de MAG usando APTS, cuya estructura química se muestra en la figura 4.4.

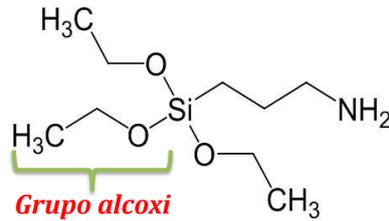


Figura 4.4. Estructura química de la molécula de APTS

Se trata de un aminosilano frecuentemente utilizado en la silanización, proceso que consiste en la cobertura de una superficie con moléculas de alcoxisilano.

La reacción de silanización se produce en dos pasos, que se representan esquemáticamente en la figura 4.5

(1) Hidrólisis del grupo alcoxi del APTS.

Los grupos alcóxido ($-\text{OC}_2\text{H}_5$) son reemplazados por hidroxilo ($-\text{OH}$) para formar grupos silanol reactivos, que se condensan con otros grupos silanol para producir enlaces siloxano ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$). El alcohol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) y el agua se producen como subproductos de esta reacción.

(2) En el segundo paso, los grupos silanol reactivos se asocian con los cristalitas de magnetita a través de un enlace covalente con grupos OH de la superficie. De esta manera se produce deshidratación de la superficie de MAG y adsorción del grupo silano sobre el óxido metálico.

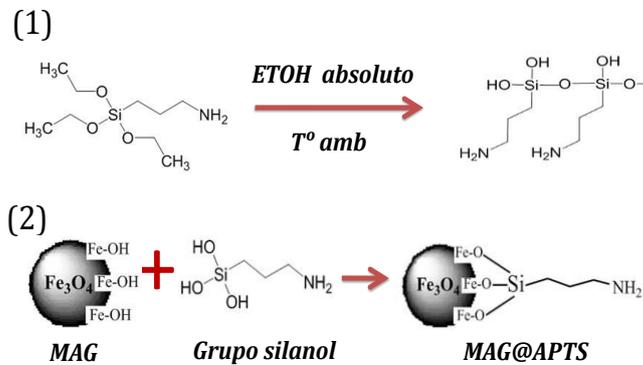


Figura 4.5. Silanización de la superficie de MAG con APTS

Se realizaron cuatro experiencias de adsorción de AF, empleando MAG y MAG@APTS como nanosistemas magnéticos. Los resultados de las cuatro experiencias se compararon a fin de establecer el rol del APTS en la adsorción simple y la influencia del pH en la adsorción de AF a MAG y MAG@APTS.

En una segunda etapa, y con el fin de obtener formulaciones más estables en términos de la retención del AF, y mejores rendimientos de reacción, se implementó el acoplamiento covalente, mediante la aplicación del método de reacción de Steglich o método de la carbodiimida[22]. En este sentido, la presencia de grupos amino resulta fundamental, por lo que la modificación previa de MAG con APTS (ú otra fuente de grupos aminos) es necesaria para que ocurra la posterior funcionalización con AF a través de la formación de un enlace tipo amida[22].

4.3.1 Caracterización fisicoquímica de las NPMs modificadas con AF.

4.3.1.1 Análisis de las muestras obtenidas por adsorción simple.

Los datos obtenidos a partir del análisis mediante espectroscopia FTIR confirmaron la funcionalización de la superficie de las nanopartículas de MAG con APTS y la adsorción del AF.

En la figura 4.6 se muestra el espectro FTIR correspondiente al AF, junto con la estructura química de esta molécula.

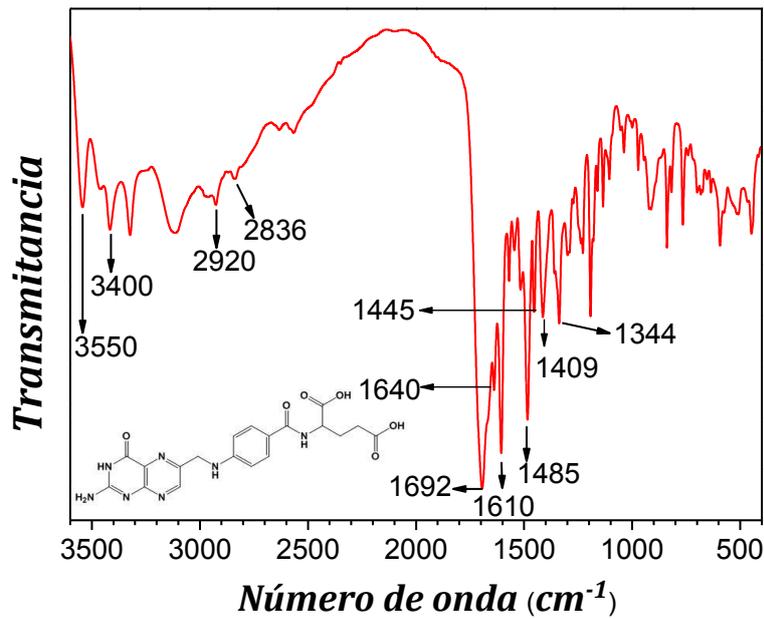


Figura 4.6. Espectro FTIR de ácido fólico. Inserto en el gráfico se muestra la estructura química del AF.

En el espectro pueden observarse las típicas bandas a 3350 y 3400 cm⁻¹ correspondiente a la vibración de tensión de los grupos OH del ácido glutámico y grupos (-NH). El pico asociado a la vibración de tensión del grupo C=O aparece 1692 cm⁻¹, mientras que la bandas presentes a 1640 cm⁻¹ y 1610 cm⁻¹ pueden asociarse a la vibración de tensión C=O del grupo (-CONH) y a la vibración de flexión del grupo (-NH₂), respectivamente. La banda a 1485 cm⁻¹ se atribuye a la absorción del anillo fenilo del grupo Pteridínico[23]. Además, las bandas a 1344 cm⁻¹ y 1445cm⁻¹ pueden asignarse a la vibración de flexión en el plano de los enlaces C-H aromáticos y a la vibraciones de tensión de los grupos C=C del anillos aromático, respectivamente[24].

En la figura 4.7 se muestran los espectros FTIR correspondientes a MAG antes y después de la funcionalización con APTS.

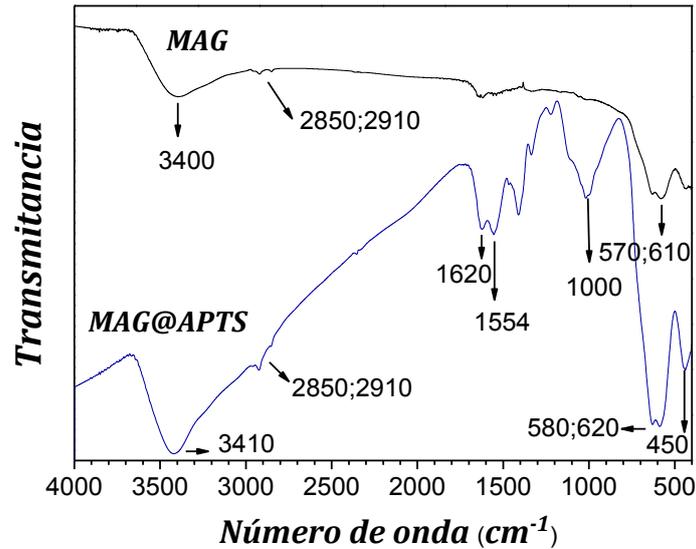


Figura 4.7. Espectros FTIR de MAG y MAG@APTS

Las bandas asociadas a la vibración de tensión del enlace C-H del grupo propil amino del APTS se pueden visualizar claramente a 2910 y 2850 cm^{-1} . La unión entre el modificante y la superficie de la nanopartículas se produce a través del enlace Fe-O-Si, motivo por el cual la vibraciones de tensión de Fe-O de MAG se desplazan de 570 y 610 cm^{-1} a 580 y 620 cm^{-1} en MAG@APTS[25]. Además, la banda que se registra alrededor de los 1000 cm^{-1} se asocia a la presencia de los enlaces Si-O confirmando la funcionalización de la superficie de MAG con APTS. Las dos bandas a 3410 y 1620 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de tensión y flexión de los grupos $-\text{NH}_2$ libres respectivamente. Además la presencia del pico a 1554 cm^{-1} puede asociarse a los modos de deformación de los grupos amino libres[26,27].

En la figura 4.8(a), se muestran comparativamente los espectros correspondientes al núcleo magnético MAG, y a las muestras obtenidas luego de la adsorción, MAG-AF1 (obtenida en ausencia de AA) y MAG-AF2 (obtenida en presencia de AA). Mientras que en la figura 4.8(b) se presentan los espectros FTIR de las muestras obtenidas por adsorción simple de AF a MAG@APTS. MAG@APTS-AF1 (obtenida en ausencia de AA) y MAG@APTS-AF2 (obtenida en presencia de AA)

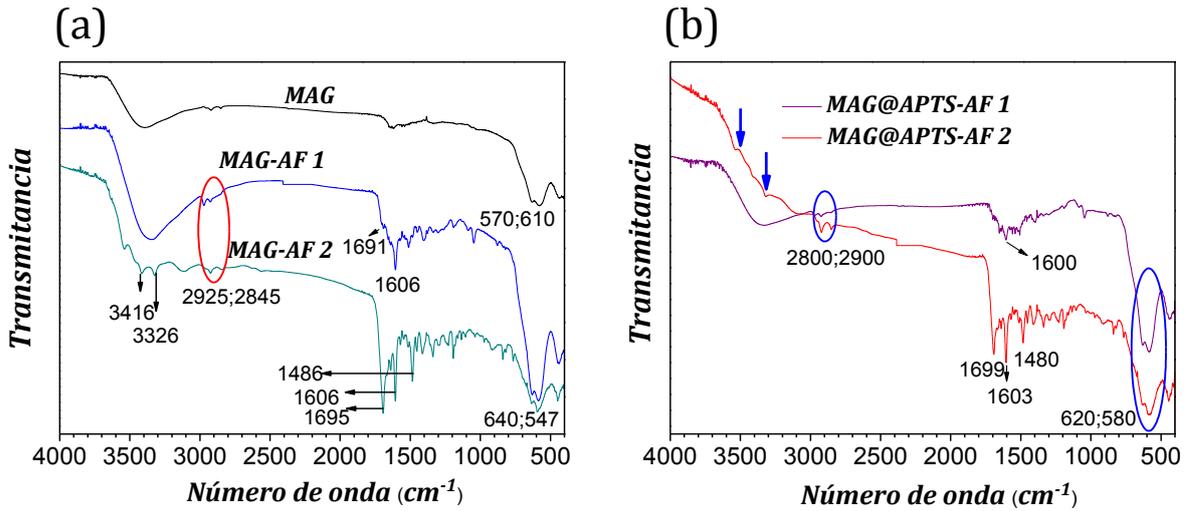


Figura 4.8 (a) Espectros FTIR de las muestras obtenidas por adsorción simple de AF a MAG. (b) Espectros FTIR de muestras obtenidas por adsorción simple de AF a MAG@APTS

A partir del análisis de los espectros se puede indicar que el AF se incorporó a la superficie tanto de MAG como de MAG@APTS mediante adsorción simple. Las bandas típicas asociadas a la vitamina pueden distinguirse claramente en los espectros de MAG@AF2 y MAG@APTS-AF2. El leve desplazamiento de las bandas correspondientes a $\nu(\text{C}=\text{O})$ del grupo carboxilo hacia longitudes de onda mayores y el corrimiento de la banda asociada a la vibración de flexión del grupo ($-\text{NH}_2$), pueden considerarse como indicios de la interacción del AF con la superficie de MAG y MAG@APTS cuando la reacción tiene lugar en medio ácido. Por otro lado, en los espectros correspondientes a MAG-AF1 y MAG@APTS-AF1 sólo se observan las bandas alrededor de 1600 cm^{-1} que pueden asignarse a la vibración de flexión del grupo ($-\text{NH}_2$).

Para las muestras MAG-AF1 y MAG-AF-2, el corrimiento de las bandas asociadas a $\nu(\text{Fe}-\text{O})$ podría deberse a la interacción del AF con los grupo $\text{Fe}-\text{OH}$ de la superficie de MAG.

Por otra parte, en ninguno de los espectros correspondientes a MAG@APTS-AF1 y MAG@APTS-AF2 se distinguen señales asociadas al APTS, debido posiblemente al solapamiento con las correspondientes al AF. Las bandas asociadas al enlace $\text{Fe}-\text{O}-\text{Si}$ pueden distinguirse a 620 y 580 cm^{-1} tanto en MAG@APTS-AF1 como en MAG@APTS-AF 2.

En la tabla 4.3 se muestran los datos correspondientes a las medidas de DH medio y ζ pot de MAG, MAG@APTS, MAG-AF1, MAG-AF2, MAG@APTS-AF1 y MAG@APTS-AF2. Se informan, además los rendimientos correspondientes a cada reacción de adsorción de AF.

Tabla 4.3 Medidas de DH medio (registrado en el modo número) e IPD determinados por DLS y ζ pot de las muestras antes y después de la adsorción de AF, en presencia y ausencia de AA. Rendimiento, expresado en %, de cada una de las reacciones de adsorción

Muestra	AA	DH medio \pm DE (nm), IPD medio \pm DE	ζ medio \pm DE (mV), en agua pH=5.7	Rendimiento de reacción (%)
MAG		254.6 \pm 9.80 IPD: 0.245 \pm 0.030	-25.1 \pm 1.6	
MAG@APTS		357.0 \pm 8.22 IPD: 0.339 \pm 0.025	31.8 \pm 1.4	
MAG-AF1	NO	484.3 \pm 4.10 IPD: 0.247 \pm 0.016	-8.77 \pm 0.12	10
MAG-AF2	SI	490 \pm 18.00 IPD: 0.348 \pm 0.049	-18.5 \pm 1.2	30
MAG@APTS-AF1	NO	451.6 \pm 10.30 IPD: 0.326 \pm 0.048	-10.6 \pm 2.5	30
MAG@APTS-AF2	SI	460 \pm 5.80 IPD: 0.328 \pm 0.032	-20 \pm 3.0	50

Todas las muestras presentaron valores de DH medio inferiores a 500nm. Como se explicó en el *Capítulo I (sección 1.5.2)*, la neo-vasculatura tumoral se caracteriza por presentar anomalías que conducen a una mayor permeabilidad vascular. Según Torchilin y col., se esperaría que NPMs de hasta 1000 nm pudieran atravesar en endotelio vascular y llegar a las células tumorales[28]. No obstante, el grupo de Danhier ha establecido que el tamaño óptimo de las NPMs para aplicarlos con fines de nanoteranósticos oncológicos debe oscilar entre 20 y 600 nm[29].

Las variaciones que se observan en los valores de ζ pot revelan la incorporación secuencial de APTS y AF a la superficie de las NPMs. En el caso de la formulación MAG@APTS, se obtuvieron valores de ζ pot positivos, debido a la exposición de los grupos amino protonados al pH de medición[30]. La adsorción física

de AF sobre las nanopartículas de MAG@APTS provoca un descenso en los valores de este parámetro al mismo pH. Los valores de ζ pot nos darían indicios de los tipos interacciones entre la superficie de MAG ó MAG@APTS y la molécula de AF.

En la figura 4.9 se muestra la molécula de AF con los valores de pKa asociados a cada grupo.

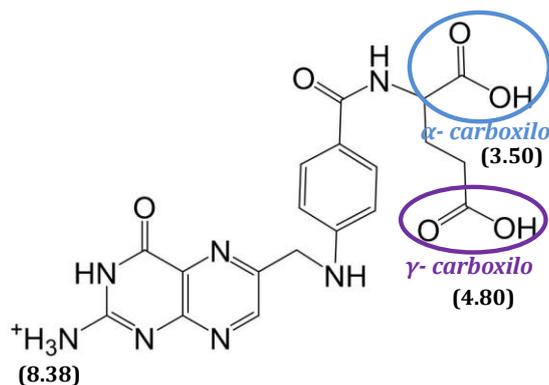


Figura 4.9. Estructura química de la molécula de AF. Entre paréntesis se señalan los pKa de cada grupo funcional a temperatura ambiente[20].

A partir de los valores de pKa, se puede indicar que a ambos pH de estudio (5 y 3.8), el grupo amino del anillo Pteridínico y el grupo γ COOH están protonados, mientras que el grupo α COOH está desprotonado (como α COO $^-$).

Por otra parte, según se reportó en el *Capítulo III (sección 3.3.2.4)*, el PI de MAG se encuentra alrededor de pH=5, por lo que a este pH la superficie de las NPMs se encuentra enriquecida en grupos OH. Por otro lado, los grupos OH $_2^+$ son los predominantes a valores de pH cercanos a 3.8.

Por último, el grupo amino del APTS presenta un valor de pKa cercano a 9[30], lo cual indica que el grupo amino se encuentra como NH $_3^+$ en todas las experiencias realizadas.

Tomando en consideración: (i) lo planteado en relación a la influencia del pH, (ii) los datos obtenidos de la caracterización de todas las formulaciones, y (iii) la escasa información encontrada en la literatura sobre la incorporación de AF a NPMs por adsorción simple; se postulan las vías más probables a través de los cuales podrían darse las interacciones entre la superficie de las NPMs y el AF.

1) Cuando la adsorción de AF sobre MAG tiene lugar en ausencia de AA, las interacciones puente de hidrógeno entre los grupos OH de la superficie de MAG y los grupos carboxilos de AF son responsables de la adsorción de la vitamina a la superficie del óxido. De este modo parte de la superficie de MAG queda cubierta con moléculas de AF que exponen los grupos aminos cargados positivamente. Esto explica el aumento en el valor del ζ pot (aunque sigue siendo negativo) de MAG@FA1, respecto de MAG.

ii) En el caso de las adsorciones en presencia de AA, la superficie de MAG se encuentra cargada positivamente, de modo que la adsorción del AF se encuentra gobernada en este caso por atracciones de tipo electrostáticas entre los grupos OH_2^+ de MAG y los α carboxilatos de AF.

Dado que las interacciones electrostáticas son más fuertes que las atracciones puentes de hidrógeno, se obtuvo un mejor rendimiento de reacción para MAG-AF2 que para MAG-AF1

iii) En el caso de la reacción entre MAG@APTS y AF, cuando la misma tiene lugar en ausencia de AA, las atracciones electrostáticas entre los grupos NH_3^+ de la superficie de MAG@APTS y el grupo α carboxilato de AF son los responsables de la adsorción de AF sobre MAG@APTS. Estas interacciones se ven favorecidas al disminuir el pH, por el agregado de AA. Esto explica la disminución del valor de ζ pot de MAG@APTS-AF1 y más aún de MAG@APTS-AF2, respecto de MAG@APTS, por la neutralización de las cargas.

iv) Por último podríamos indicar que a pH cercanos a 3, la mayor adsorción que se registra para ambas muestras y que se ve reflejada en la mayor intensidad de las señales del FTIR de MAG-AF2 y MAG@APTS-AF2, podría estar gobernada por la escasa solubilidad del AF a pH inferiores a 4[31]. En este sentido, la presencia de un medio ácido mejora las interacciones entre las especies pero además favorece el depósito de AF sobre las nanopartículas de MAG o MAG@APTS.

En vista de los resultados obtenidos de las cuatro muestras, se seleccionó MAG@APTS-AF2 para evaluar su estabilidad en términos de la retención del AF. Esto se discutirá en la sección 4.3.3.1

4.3.1.2 Análisis de las muestras obtenidas por anclaje covalente.

Como se describió en la sección experimental, las muestras obtenidas a partir del anclaje covalente de AF a la superficie de MAG@APTS se denominarán de manera general “E”.

En la figura 4.10(c) se comparan los espectros infrarrojos de E1, E2 y E3; mientras que en las figuras 4.10(a) y 4.10(b) se presentan los espectros de MAG@APTS y de AF descriptos en la sección anterior, como referencia.

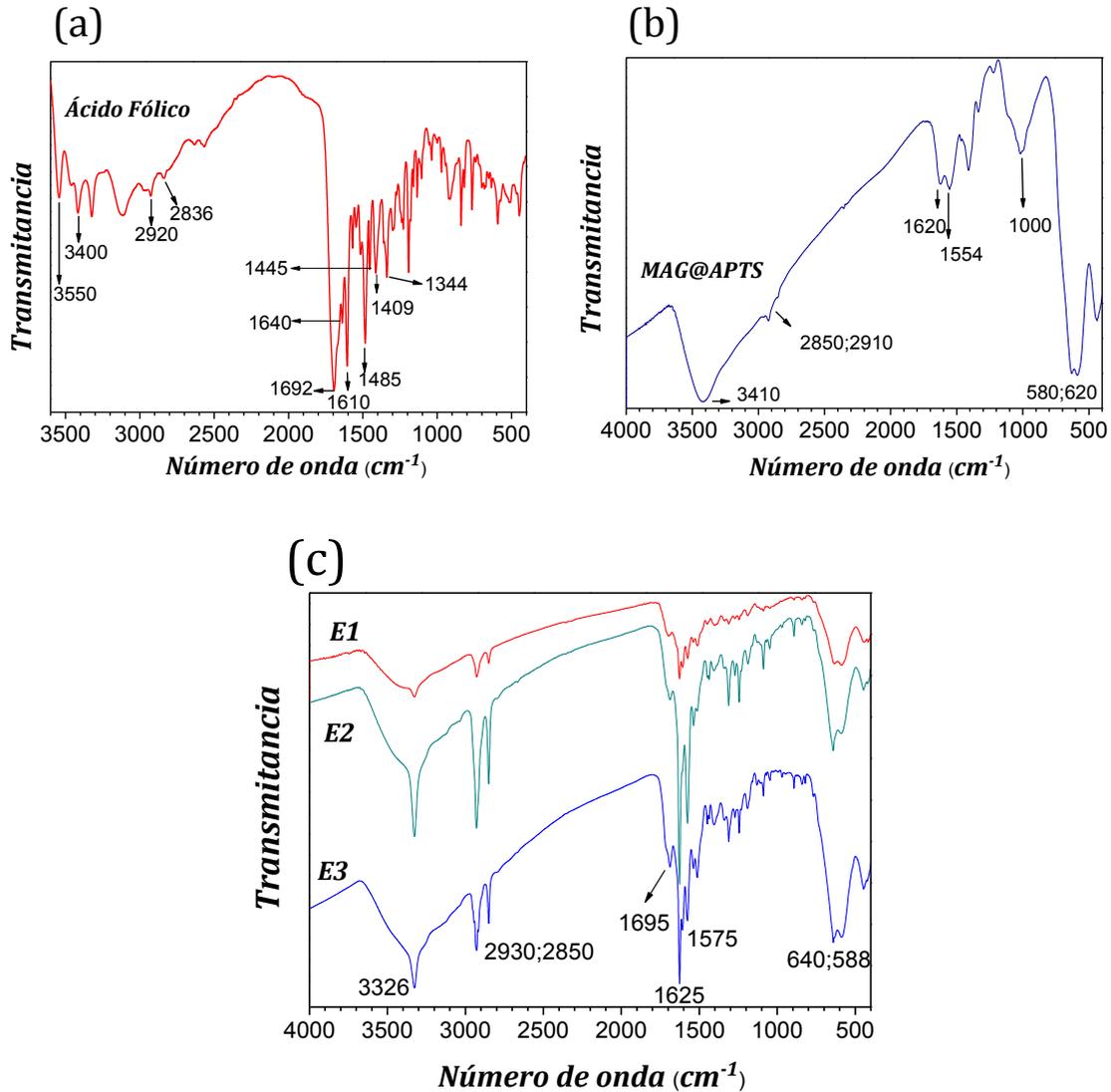


Figura 4.10. Espectros FTIR de (a) AF, (b) MAG@APTS y (c) muestras obtenidas por acoplamiento covalente del AF a MAG@APTS (E1, E2 y E3)

En los tres espectros de la figura 4.10(c) puede observarse una intensa banda a 3326 cm^{-1} asociada a los grupos aminos libres del anillo PT. Se registra la banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace (C=O) de los grupos carboxilos a 1695 cm^{-1} . La intensidad de esta señal es menor que la observada en el espectro de

AF puro o en los espectros de las muestras obtenidas por adsorción simple. Al mismo tiempo, dos nuevas y agudas bandas se observan a 1625 cm^{-1} y 1575 cm^{-1} , respectivamente. Las mismas pueden atribuirse a las vibraciones de tensión de los enlaces C=O y N-H correspondientes al grupo amida, indicando la formación del enlace de tipo peptídico, lo que confirma el acoplamiento covalente del AF a la superficie de MAG@APTS[32]. No se observan las señales relacionadas a la molécula de DCC. Esto es consistente con el mecanismo de acción de la carbodiimida, la cual únicamente se agrega con el fin de aumentar la electrofilicidad de los grupos carboxílicos del AF[33].

La técnica de espectroscopía UV-Vis se utilizó como complemento a la de FTIR para confirmar la unión del AF a la superficie de NPMs. En la figura 4.11(a) se presenta el espectro UV-Vis de una solución de AF puro, donde se observan claramente dos señales de absorción a 280 y 350 nm asociadas a las transiciones $n-\pi^*$ y $\pi-\pi^*$, respectivamente del anillo PT[34,35]. Por otra parte, en la figura 4.11(b) se comparan los espectros UV-vis obtenidos a partir de dispersiones de MAG@APTS, E1, E2 y E3 (1 mg de nanopartículas/25 mL de AB). Puede visualizarse en los espectros correspondientes a los “E”, una intensa señal a 283 nm y también un hombro alrededor 350 nm que no se evidencia en el espectro de MAG@APTS. Mediante este resultado se corrobora la información obtenida a partir del análisis por FTIR.

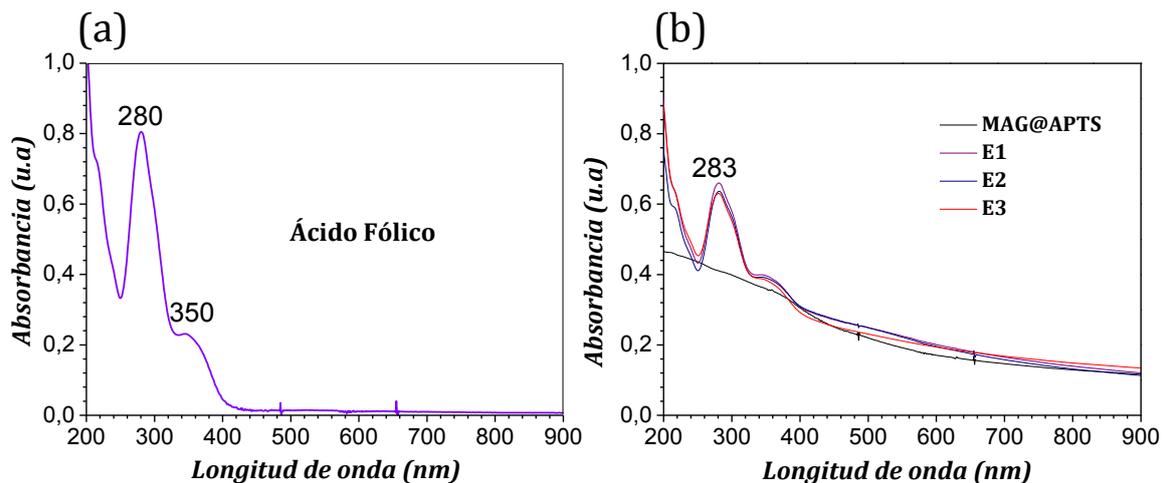


Figura 4.11. (a) Espectro UV-Vis de una solución de AF. (b) Espectros UV-Vis de dispersiones de MAG@APTS, E1, E2 y E3

En la figura 4.12(a) se incluyen los datos obtenidos respecto del DH medio mientras que en la figura 4.12(b) se muestran los datos de ζ pot de las tres formulaciones “E” junto con los correspondientes a MAG y MAG@APTS, como referencia.

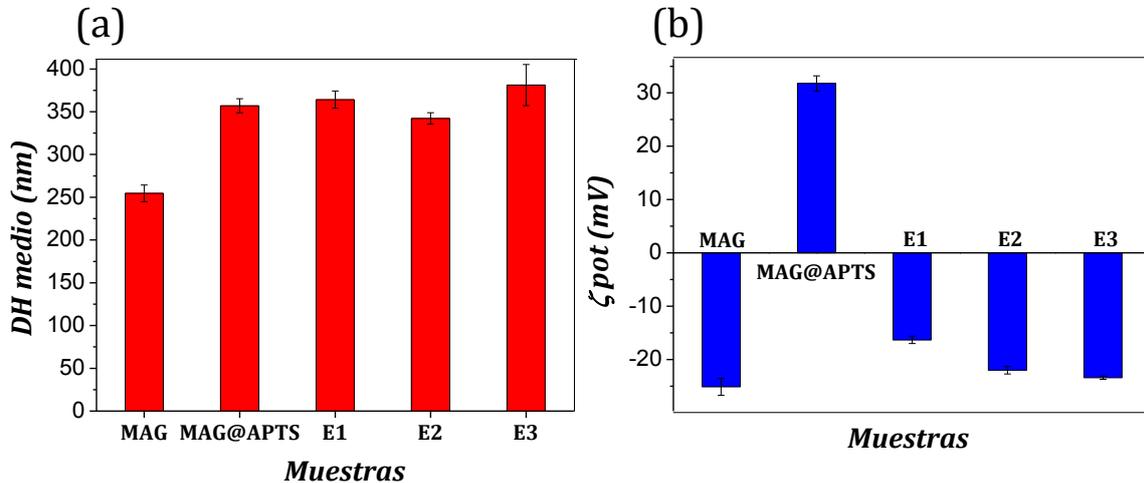


Figura 4.12. Medidas de (a) DH medio y (b) ζ pot de MAG, MAG@APTS, E1, E2 y E3.

Se observa un incremento del DH de MAG luego de su modificación con APTS. Esto puede explicarse en términos de la técnica de incorporación del APTS a la superficie de MAG. Como se comentó previamente se indujo una silanización para obtener MAG@APTS. Esta reacción implica, en primer lugar, una hidrólisis de los grupos alcóxido del APTS, que son reemplazados por grupos hidroxilo de MAG. Sin embargo, también tiene lugar la condensación entre grupos silanol reactivos para formar un oligómero de silano[36]. De esta manera se explica el incremento de casi 100nm en el valor del DH de MAG@APTS respecto de MAG.

Los valores de DH correspondientes a las tres formulaciones “E” son similares al de su precursor, MAG@APTS. Esto podría justificarse en términos del tamaño de la molécula de AF. En este sentido, Yeang y col. obtuvieron resultados similares usando nanopartículas de quitosano-AF. Empleando seis relaciones molares AF/Quitosano diferentes, no encontraron variaciones significativas en los valores de DH[17]. Los autores atribuyeron este resultado al menor tamaño de la vitamina respecto del quitosano. Resultados similares fueron reportados por Viota y col. En este caso, los investigadores emplearon la técnica de DLS con el fin de seguir la evolución del DH de las formulaciones preparadas a medida que tenían lugar las sucesivas modificaciones del núcleo magnético. Los investigadores indicaron

importantes incrementos en el DH asociados a la modificación de MAG con ácido poliacrílico, en primer lugar, y la posterior incorporación de quitosano. Sin embargo, no detectaron incrementos en los valores de DH luego de la incorporación de AF. Justificaron el comportamiento hallado en términos del tamaño molecular en coincidencia con otros autores[37].

Las variaciones que se observan en los valores de ζ pot pueden considerarse indicativas de la incorporación secuencial de APTS y AF.

Como se describió en la sección 4.3.1.1, el cambio de signo del ζ pot de MAG@APTS respecto de MAG se debió a la incorporación de grupos amino como consecuencia de la silanización de MAG. Estos se encuentran protonados cuando la medida se realiza en AB, pH=5.7. Según se observa en figura 4.12(b), el anclaje covalente de AF a la superficie de MAG@APTS, conduce a una disminución de aproximadamente 40 puntos en el valor del ζ pot. Esta diferencia se debe a la reacción entre el grupo carboxilo del AF y los grupos amino del APTS de la superficie de las NPMs. Esto se representa esquemáticamente en la sección 4.3.2 donde se analizan las interacciones entre MAG@APTS y AF. La exposición del grupo negativo del carboxilato que no reacciona es responsable del valor de ζ pot al pH de medida. Otros autores reportaron resultados similares[38].

La morfología y tamaño del núcleo magnético se estimaron mediante microscopía electrónica.

En la figura 4.13 se incluyen las micrografías correspondientes a nanopartículas de MAG, MAG@APTS y E2. Esta última, como ejemplo de las formulaciones obtenidas a partir de acoplamiento covalente de AF a MAG@APTS. Se observa claramente que la forma original de nanobastones con puntas agudas de MAG no se modifica luego de los diferentes tratamientos que tienen lugar para obtener E2. Así mismo, los tamaños de los núcleos magnéticos de las tres muestras se estimaron en 35 nm de largo x 10 nm de ancho, promedio, indicando que los sucesivos tratamientos no ocasionan alteraciones en los mismos.

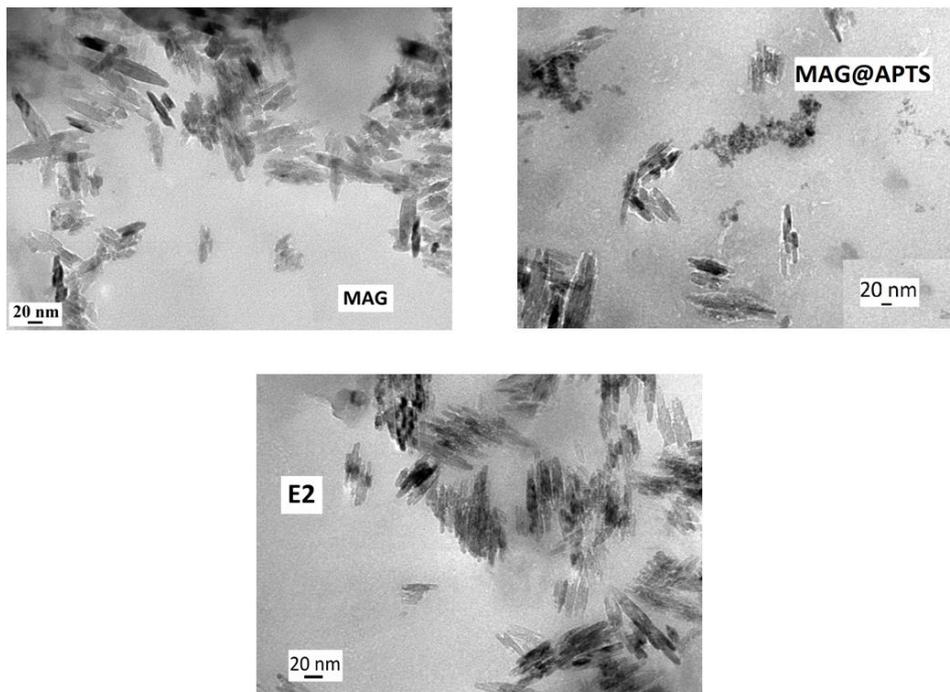


Figura 4.13. Micrografías de MAG, MAG@APTS y E2 (Magnificación:270000x)

En la figura 4.14 se muestran los termogramas correspondientes a MAG, MAG@APTS y a las formulaciones que contienen AF unido covalentemente (E1, E2, E3). Se observa claramente que todas las muestras experimentan una pérdida de masa de alrededor de 5% asociado al agua fisisorbida. Además, en el caso del termograma correspondiente a MAG@APTS se observa una pérdida de masa de 4% entre los 280°C y 320°C, que revela la descomposición térmica de los grupos orgánicos aminopropilos[27]. Los termogramas asociados a E1, E2 y E3 muestran dos pérdidas de masa importantes, entre 230°C y 410°C, que pueden relacionarse con la descomposición de APTS y AF. A partir de estos resultados, puede inferirse que la pérdida de componentes orgánicos en las formulaciones varía entre un 11 y un 41%[39]. Es posible inferir que un incremento nominal de la cantidad de AF, no conduce a una mayor incorporación de esta molécula a la superficie de la nanopartícula.

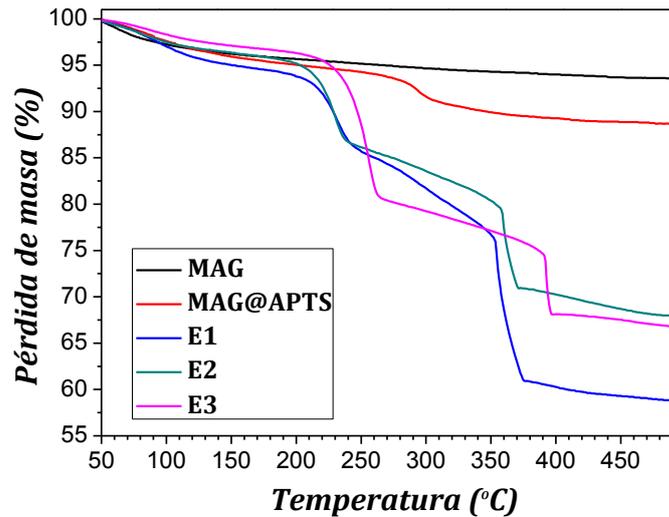


Figura 4.14. Termogramas de MAG, MAG@APTS, E1, E2 y E3

Con fin de evaluar la influencia de la forma, el tamaño, la agregación y la Ms del núcleo magnético en la funcionalización con AF, se llevó a cabo el estudio de anclaje covalente usando como núcleo magnético la muestra MAG-4 obtenida por coprecipitación directa empleando SDS y NH_4OH , según se reportó en el *Capítulo III, sección 3.2.2.2*. En la figura 4.15 se incluyen micrografías TEM de MAG-4 y MAG-5 donde se pueden apreciar las diferencias en la morfología entre ambas muestras.

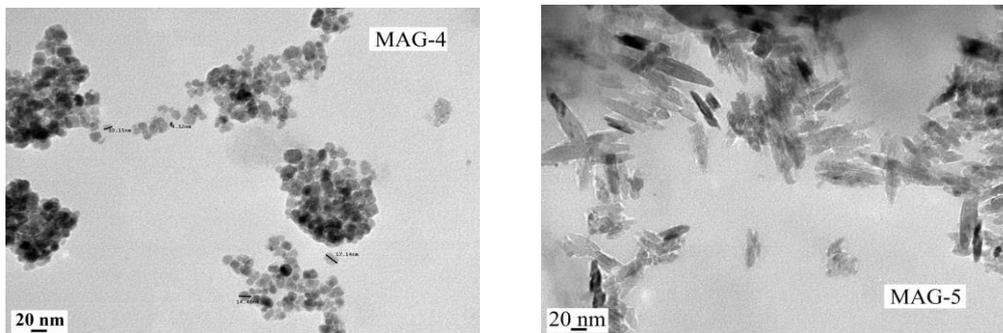
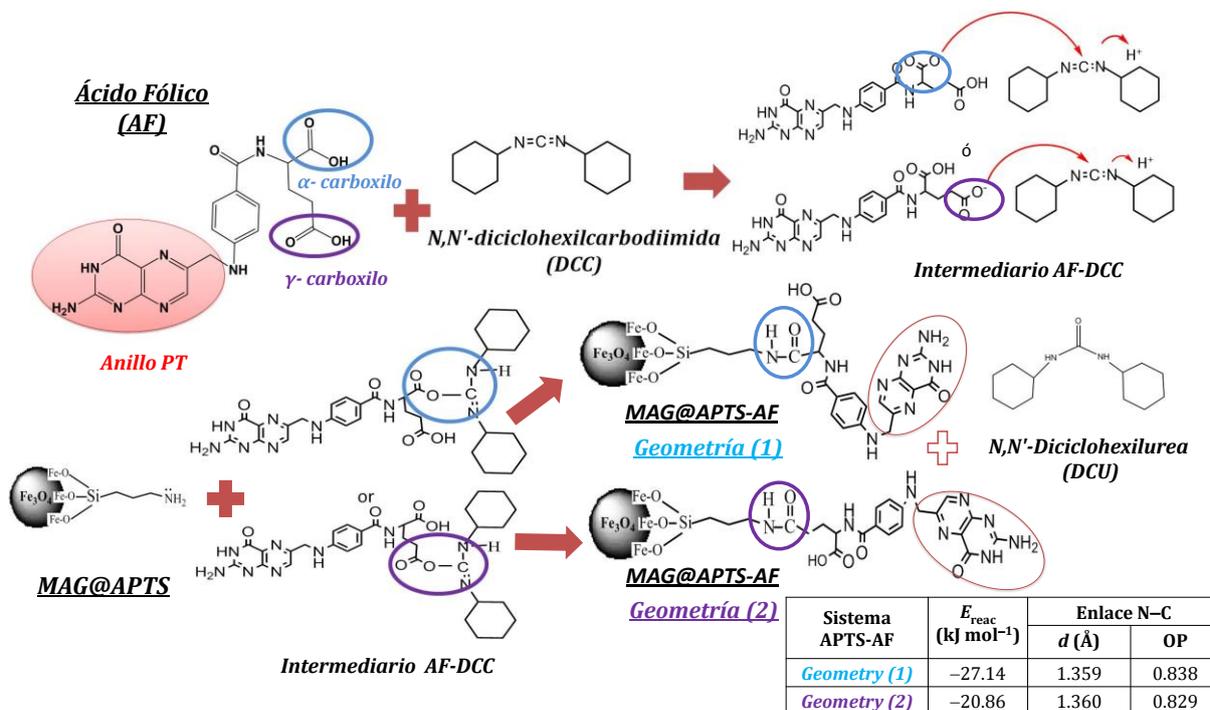


Figura 4.15 Micrografías TEM de MAG-4 y MAG-5 (270000x)

Las condiciones de reacción empleadas con MAG-4 fueron idénticas a las fijadas para obtener E2 a partir de MAG-5, y la muestra final se denominó E4. Los datos de la caracterización no revelaron diferencias significativas. Esto implica que independientemente del núcleo magnético utilizado es posible inducir la unión covalente del AF mediante la metodología propuesta alcanzando resultados comparables.

4.3.2 Interacciones MAG@APTS con AF

De acuerdo con la exhaustiva caracterización incluida en la sección anterior puede inferirse que el grupo PT del AF permanece inalterable luego de la reacción de acoplamiento covalente a la superficie de las NPMs. En función de esto, se propone un mecanismo probable que se ilustra en el Esquema 4.3



Esquema 4.3 Mecanismo propuesto para las interacciones entre AF y la superficie de MAG@APTS.

Con el objetivo de reforzar la hipótesis en cuanto al mecanismo propuesto, se realizaron estudios teóricos que complementaron los resultados experimentales obtenidos. Para ello, empleando la teoría funcional de densidad polarizada por espín (DFT), utilizando el código SIESTA (Iniciativa Española para Simulaciones Electrónicas con miles de átomos) [40,41], se realizaron cálculos teóricos de química cuántica a fin de establecer la estabilidad, en términos energéticos, de los diferentes tipos de enlaces que pueden tener lugar entre el grupo amino de la superficie de MAG@APTS y los grupos carboxilatos del AF.

De acuerdo a los resultados se obtuvieron dos sistemas de nanopartículas funcionalizadas.

Como puede observarse en el esquema 4.3, la denominada Geometría (1) tiene lugar cuando el grupo α carboxilo del AF reacciona con el grupo amino de la molécula de APTS, mientras que la Geometría (2) está determinada por la reacción del APTS con el grupo γ carboxilo del AF. Los valores de energía de reacción (E_{reac}), y longitud de enlace ((d) y OP) pertenecientes a las estructuras totalmente optimizadas se presentan en la tabla inserta en el esquema 4.3. Los resultados muestran que la geometría (1) es ligeramente más estable (alrededor de 6,3 kJ.mol⁻¹) que la geometría (2). De hecho, la E_{reac} calculada para el proceso APTS+AF \rightarrow APTS-AF + H₂O es -27.14 kJ.mol⁻¹ para la geometría (1) y -20.86 kJ.mol⁻¹ para la geometría (2). No se encontraron diferencias significativas en la longitud del enlace N-C para estas dos geometrías. Del mismo modo, los valores obtenidos de OP (“*overlap population*”) sugieren que el enlace N-C perteneciente a la geometría (1) es solo un 1.0 % más fuerte que el correspondiente a la geometría (2). El modelado teórico permitió inferir que las dos geometrías APTS-AF analizadas tienen prácticamente la misma estabilidad. Estos hallazgos refuerzan el mecanismo propuesto que revela que el APTS podría reaccionar con los grupos α o γ carboxilos del AF, preservando el sitio reactivo capaz de unirse a los receptores folato (anillo PT)[41].

4.3.3 Estabilidad de las diferentes formulaciones.

4.3.3.1. Estudio de la retención de AF sobre la superficie de MAG@APTS.

En la **sección 4.3.1** se demostró la incorporación satisfactoria de la molécula de AF a través de todas las rutas estudiadas. Sin embargo, en vista de la implementación de estos nanodispositivos en los sistemas biológicos, es importante evaluar la retención del AF en la estructura de las NPMs, una vez que estas ingresan al torrente sanguíneo y antes de alcanzar el órgano, tejido o célula diana.

En general, pueden encontrarse reportes sobre la selectividad del AF asociado a nano/microdispositivos medidos en diferentes líneas celulares tumorales empleando tiempos de incubación que van desde las 2 hs a 24hs [39],[43]. Por este motivo se seleccionó 4 hs como tiempo de ensayo.

El análisis de la capacidad de retención del AF sólo se evaluó en aquellas muestras cuyas características fisicoquímicas finales cumplieron con los requisitos

para ser empleados en biomedicina. Es decir, se seleccionaron las tres muestras obtenidas por anclaje covalente y MAG@APTS-AF2 para realizar dicho ensayo.

En la figura 4.16 se comparan los espectros de MAG@APTS-AF2 antes y después del ensayo de estabilidad en buffer PBS, pH=7.4.

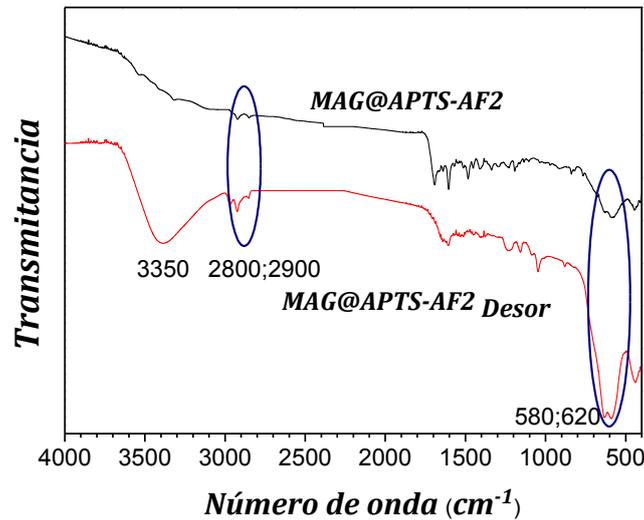


Figura 4.16 Espectro FTIR de MAG@APTS-AF2 antes y después del ensayo de estabilidad.

En el espectro FTIR del sólido luego de ensayo (MAG@APTS-AF2_{Desor}), se aprecia claramente la desaparición de las bandas correspondientes a AF, junto con un aumento de la intensidad de la banda asociada al enlace Fe-O-Si. El resultado nos indica que la vitamina se desorbió casi en su totalidad de la superficie de MAG@APTS bajo las condiciones del ensayo. Esto podría explicarse en términos de la solubilidad del AF. Como se informó anteriormente, la solubilidad del AF en medios acuosos se incrementa a pH entre 6.0 y 9.0. De esta manera, las débiles interacciones establecidas entre AF y MAG@APTS, rápidamente se pierden al colocar MAG@APTS-AF2 en un medio a pH 7.4.

En las figuras 4.17 se muestran los espectros FTIR de los sólidos obtenidos luego de la incubación de E1, E2 y E3 en buffer PBS, pH=7.4.

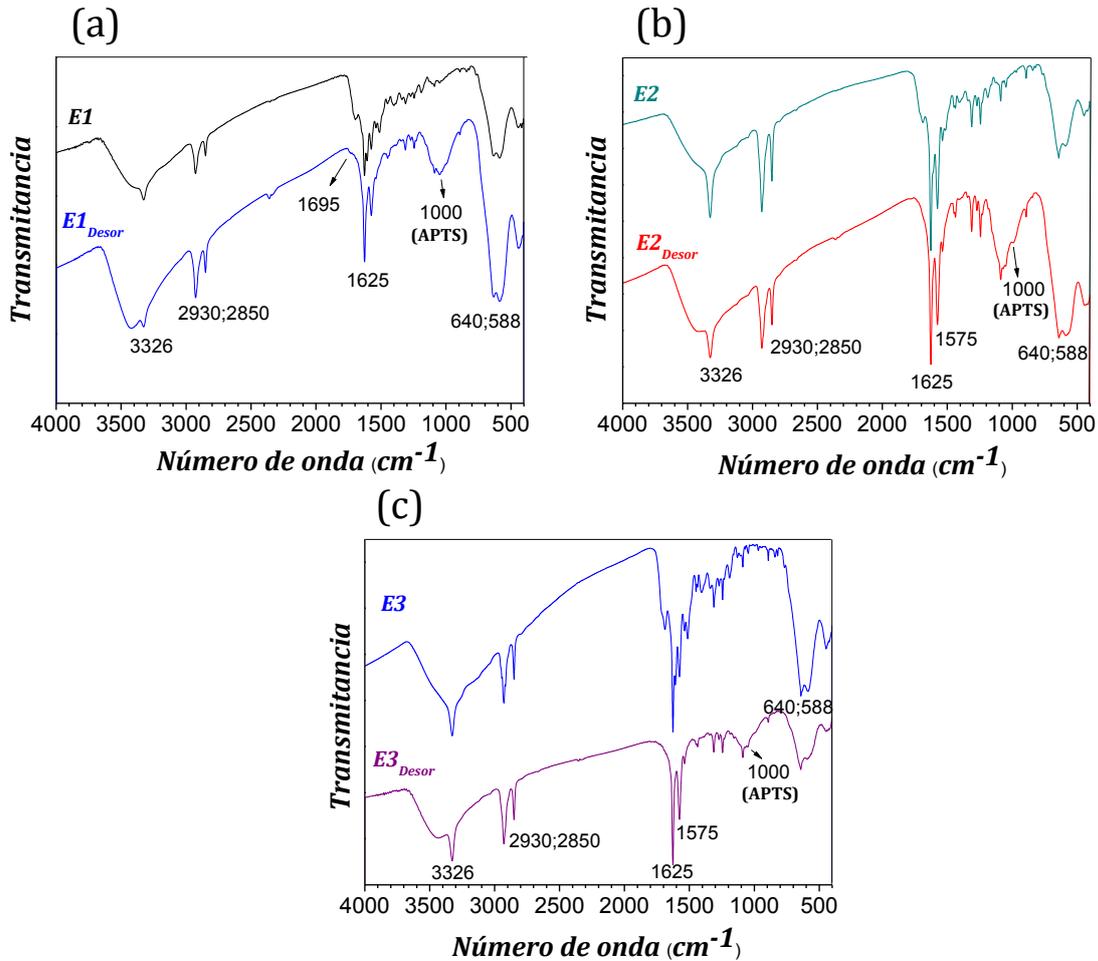


Figura 4.17 Comparación de los espectros FTIR antes y después de la incubación en PBS, pH7.4 (a) E1, (b) E2 y (c)E3.

En todos los espectros “E_{Desor}” (luego del período de incubación) se observan las señales asociadas al AF.

Si comparamos estos espectros con los incluidos en la figura 4.16 se determina que las formulaciones obtenidas por unión covalente del AF son las más aptas para las aplicaciones propuestas en cuanto a su capacidad para retener el ligando selectivo.

Es importante destacar que el único objetivo que se persiguió mediante la implementación de este ensayo, fue evaluar si después de un cierto período de tiempo (fijado en 4 hs según datos de bibliografía) el AF permanece en la superficie de la nanopartícula.

Si bien la presencia de AF es fundamental para proporcionar selectividad a la nanoformulación de MAG, de acuerdo con los datos de la literatura, la cantidad del

mismo no sería determinante para favorecer el ingreso de los nanosistemas a las células que sobreexpresan α RF en su superficie[44,45]. De hecho, se ha reportado que, aun cuando se encuentra una mínima cantidad de AF unido a la superficie del transportador, la elevada afinidad del α RF por este ligando induce a una elevada captación de las NPMs por parte de las células tumorales[46]. Teniendo en cuenta estas evidencias, y la complejidad del sistema multicomponente que se formó, es que no se avanzó en análisis cuantitativos para estimar la cantidad de AF en las NPMs.

4.3.3.2 Evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento.

El estudio de estabilidad de las formulaciones en términos de la evolución del DH, medido en AB, a lo largo del tiempo se realizó empleando las muestras que resultaron más estables a partir de lo detallado en la sección anterior, es decir las obtenidas por anclaje covalente: E1, E2 y E3. Los resultados que se muestran en la figura 4.18, indican que E1 se podría almacenar en dispersión acuosa al menos durante 15 días sin que se registren variaciones significativas en su DH. E2 y E3, registran incrementos notables de su DH a partir de los 7 días de almacenamiento

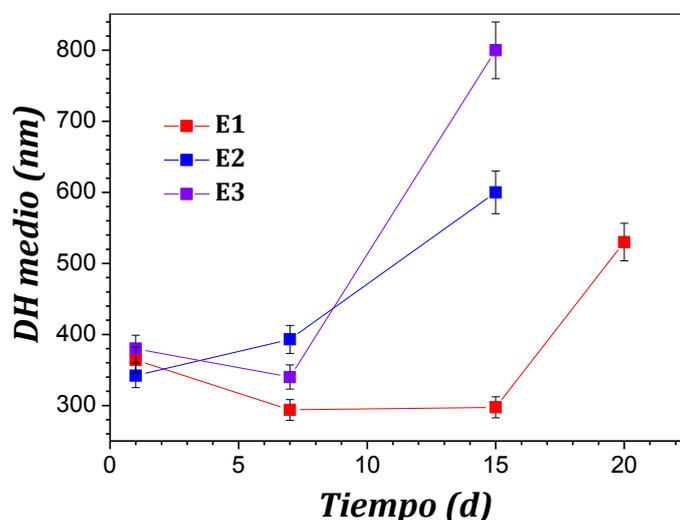


Figura 4.18 Evolución del DH en función del tiempo de almacenamiento en dispersión acuosa (en viales cerrados, a temperatura ambiente y al resguardo de la luz).

En la figura 4.19 se muestran los espectros FTIR de los sólidos decantados luego de su almacenamiento en AB durante 15 días. Se evidencian las bandas típicas del AF, con lo cual podría asegurarse su persistencia en la superficie de las diferentes nanoformulaciones.

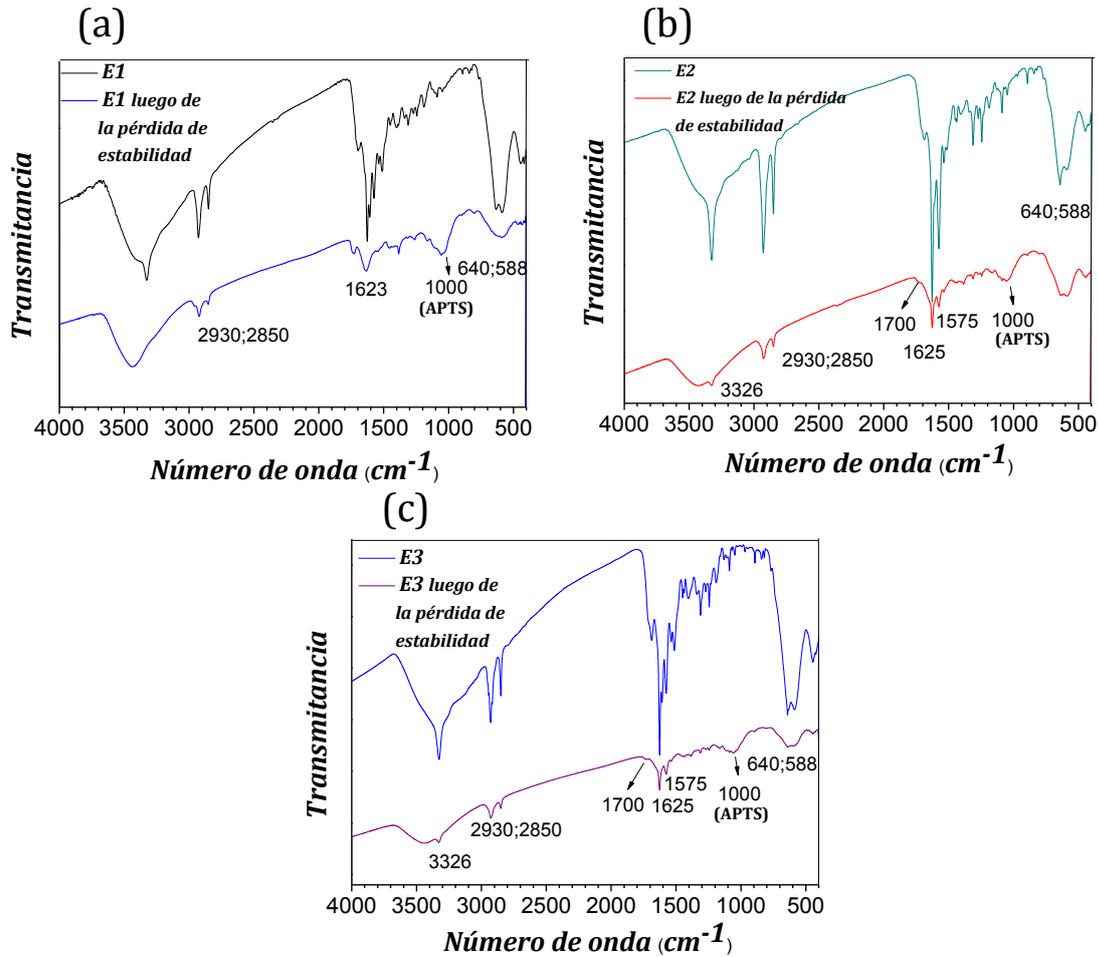


Figura 4.19 Comparación de los espectros FTIR antes y después de la pérdida de estabilidad, determinada en AB (a) E1, (b) E2 y (c) E3.

En vista de los resultados obtenidos, tanto E1 como E2 podría seleccionarse para continuar avanzando en el diseño de un nanoteranóstico. En este caso se decidió optar por E2 para completar el diseño de una partícula multifuncional con potenciales funciones como teranóstico.

4.3.4 Análisis del comportamiento de MAG@APTS y E2 en un medio de plasma simulado.

MAG@APTS y E2 se seleccionaron para ser incubadas en un medio que simula el fluido plasmático, en términos del contenido proteico, pH y la fuerza iónica. El medio empleado para este estudio se obtuvo a partir de ASB y solución Ringer Lactato (SR), ajustando el pH a 7.4. De ahora en más, este medio de SR+ASB se nombrará como fluido fisiológico simulado (FFS).

Se eligió la SR ya que tiene la misma osmolaridad y concentración electrolítica que el plasma sanguíneo, con una composición en mEq/100 mL de 12.9 de Na, 0.4 de K, 0.27 de Ca, 10.9 de Cl y 2.7 de CO_3H (por metabolización del lactato) y es comúnmente empleada para el aporte de electrolitos en diferentes situaciones clínicas (como alternativa a la solución fisiológica).

En la figura 4.20, se muestran esquemáticamente las interacciones NPMs–proteína.

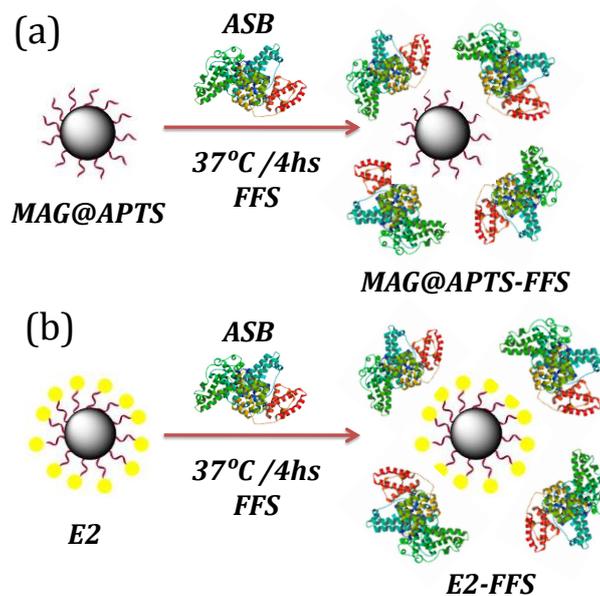


Figura 4.20 Esquema de interacciones (a) MAG@APTS con FFS. (b) E2 con FFS

La modificación en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas en este ambiente podría considerarse como un estudio preliminar del comportamiento que se espera para las mismas una vez administradas *in vivo*.

Es bien conocido que las propiedades fisicoquímicas, como tamaño, forma o carga superficial, de las nanopartículas condicionan los tipos de interacciones que se establecen con los componentes de un fluido biológico como el plasma sanguíneo[47]. Una vez que los nanosistemas son introducidos en un ambiente biológico, estos rápidamente se rodean de proteínas plasmáticas, siendo la albúmina sérica humana (análoga de la ASB), la más abundante. Este proceso dinámico finaliza con la formación de una corona de proteínas alrededor de las nanopartículas[48-50]. El estudio de las propiedades de las NPMs como el tamaño, forma, composición, la

funcionalidad y la carga superficial permiten definir la estructura y composición de la corona de proteínas[48],[51,52].

En la figura 4.21(a) se muestran los espectros FTIR de MAG@APTS antes y después del contacto con FFS (MAG@APTS-FFS), mientras que en la figura 4.21(b) se presentan los correspondientes a E2 antes y después del contacto con FFS (E2-FFS). En la figura, las señales asignadas a MAG@APTS y E2, descritas previamente en las *secciones 4.3.1.1 y 4.3.2.2*, se visualizan claramente. Por otra parte, alrededor de 1650 y 1590 cm^{-1} , aparece una señal intensa en los espectros correspondientes a las muestras tratadas con FFS. Esta podría asociarse a la vibración de tensión de amida-I y amida-II (vibración de flexión del enlace N-H y vibración de tensión del enlace C=N) confirmando la presencia de la estructura de α -hélice de la ASB sobre la superficie de las nanopartículas[53-55]. La ausencia de bandas alrededor de 1000 cm^{-1} correspondiente al grupo Si-O-Si en el espectro de MAG@APTS-FFS podría considerarse como una prueba extra de la interacción MAG@APTS con ASB. Por otra parte, en el espectro de E2-FFS algunas bandas asociadas a E2 se superponen con aquellas correspondientes a los grupos de la albúmina.

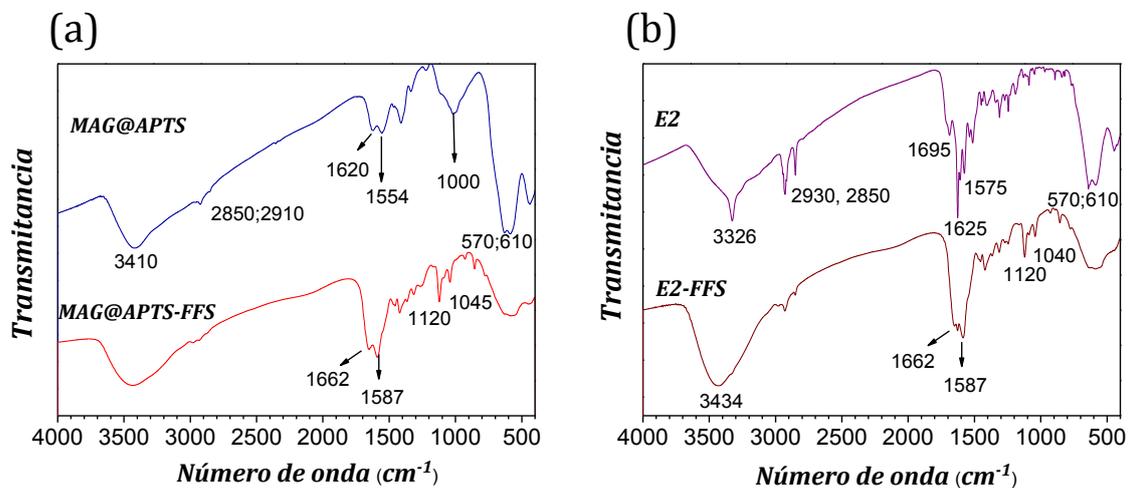


Figura 4.21 Espectros FTIR de (a) MAG@APTS y MAG@APTS-FSS (b) E2 y E2-FSS

Se realizó un análisis termogravimétrico comparativo entre MAG@APTS y MAG@APTS-FFS, y entre E2 y E2-FSS con el fin de demostrar la eficiente incorporación de proteínas en ambas formulaciones. En el caso de MAG@APTS-FFS se registró una pérdida de masa de alrededor del 14% a 350°C, mientras que para

E2-FFS el porcentaje de pérdida de masa fue alrededor del 15% y tuvo lugar a partir de los 425°C. Los termogramas descriptos se incluyen en la figura 4.22. Ambas temperaturas y porcentajes de pérdida de masa, correspondientes a la cubierta de proteína, son similares a los reportados en la literatura científica consultada donde se analizan nanosistemas similares[53],[56].

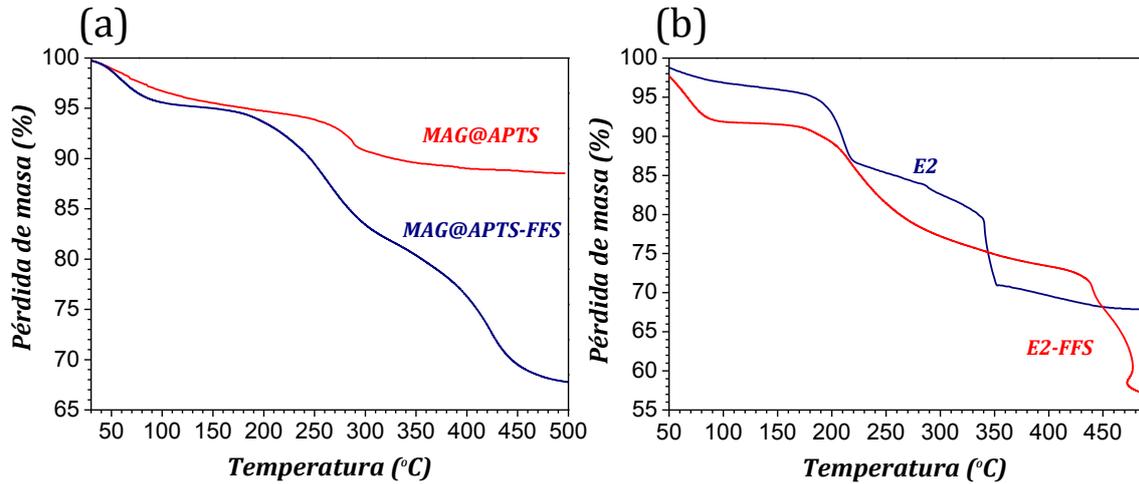


Figura 4.22. Termogramas de (a) MAG@APTS y MAG@APTS-FFS (b) E2 y E2-FFS.

En la figura 4.23 se muestra una micrografía TEM de la muestra E2, a modo de ejemplo, luego de 4 hs de tratamiento con FFS.

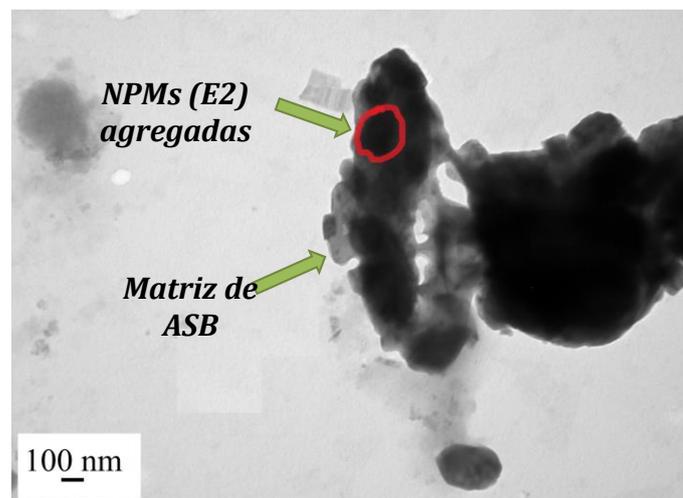


Figura 4.23. Micrografía TEM de E2 luego de 4hs de incubación en FFS (50000x)

La figura sugiere claramente que los nanorrodillos de las partículas magnéticas se encuentran agregados en una matriz de ASB. A partir de la imagen

presentada, no es posible distinguir si la incubación de las NPMs en este medio condujo a la formación de una capa homogénea de proteínas en la superficie de la partícula o eventualmente dio lugar a la formación de agregados de proteína que contienen a las NPMs. Esto es consistente con hallazgos de otros investigadores[56].

En la figura 4.24 se muestran los valores de ζ pot correspondientes a las formulaciones antes y después de la incubación en FFS. La interacción de las moléculas de proteína con la NPMs tiene un gran impacto sobre la carga superficial de estas últimas.

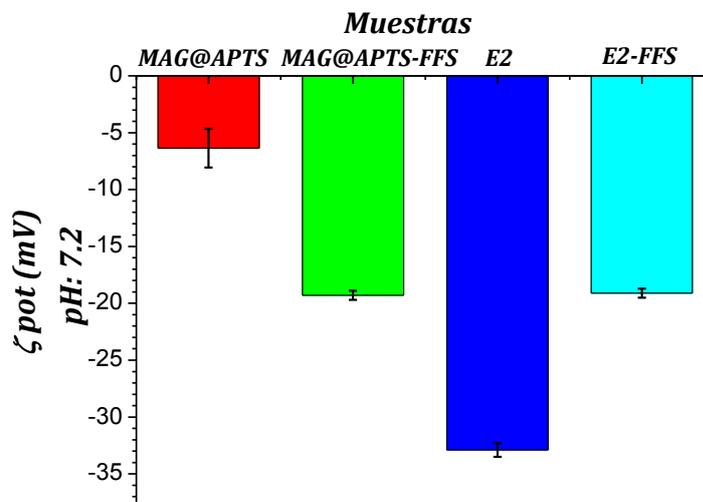


Figura 4.24 Valores de ζ pot de MAG@APTS y E2 antes y después del tratamiento con FFS.

En el caso de MAG@APTS, se observa una importante reducción en el valor del ζ pot, de -8.4 ± 0.7 mV a -19.3 ± 0.4 mV luego de la incubación con FFS. Sin embargo, en el caso de E2, se presenta una tendencia inversa luego del mismo tratamiento. La ASB es una proteína anfótera con PI igual a 4.8. De acuerdo con la información disponible en la literatura, la carga superficial de ASB a pH=7.8 es -18 mV[57,58]. La similitud observada en los valores de ζ pot de ambas formulaciones (MAG@APTS y E2) luego de la incubación con FFS, podría atribuirse al alto número de moléculas de ASB interactuando con la superficie de las NPMs. Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos por FTIR y TEM.

Trabajos realizados por otros investigadores con el fin de estudiar la formación de la corona de proteínas sobre nanosistemas de diferente carga

superficial, demostraron que la incubación con suero provoca cambios significativos en la carga superficial de las nanopartículas, y aseguraron que independientemente del valor inicial de ζ pot de las partículas, luego del tratamiento las mismas muestran carga superficial negativa con valores de ζ pot cercanos a -20 mV[56],[59,60]. La naturaleza de las interacciones NPMs-ASB podría asociarse a los cambios conformacionales que se observan en la estructura de la proteína en función del pH del medio en el cual se encuentra presente. En ese caso, la adsorción de ASB estaría gobernada entonces, por interacciones de tipo electrostáticas e hidrofóbicas[58],[61] junto con una posible alteración conformacional de su estructura en el medio de incubación [62]

En la figura 4.25 se muestran los valores de DH de las NPMs con y sin ASB adsorbida, medidos en SR a 37°C.

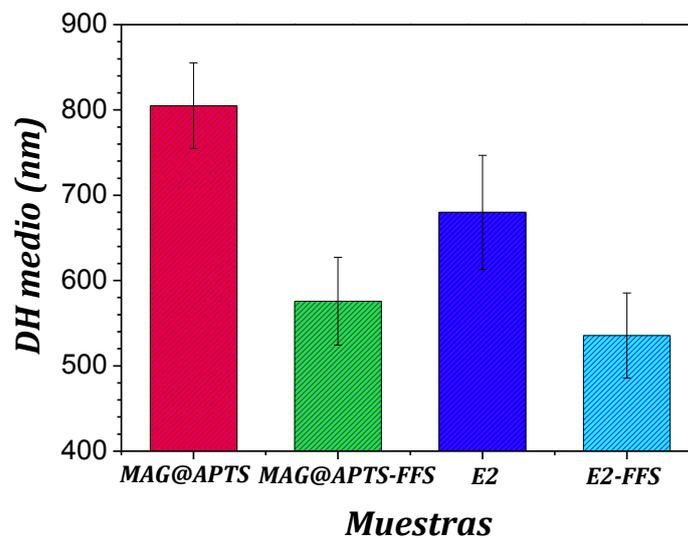


Figura 4.25. DH medio de MAG@APTS, MAG@APTS-FFS, E2 y E2-FSS medidos en SR a 37°C.

A partir de los datos obtenidos es posible inferir que la formación de la corona de ASB juega un papel muy importante evitando la tendencia a la agregación de las nanopartículas, brindándoles estabilidad en medio fisiológico[63]. Similares resultados fueron reportados con anterioridad por otros investigadores[51],[64].

Se ha propuesto que la proteína formaría complejos con iones del suero, protegiendo la superficie de los NPMs impidiendo que estos iones interactúen

directamente con la superficie de las mismas, manteniendo su estabilidad en medios análogos al fisiológico[65].

Para evaluar la estabilidad de las nanoformulaciones en SR, se siguió la evolución del DH en función del tiempo. Los datos colectados utilizando todas las formulaciones se incluyen en la figura 4.26.

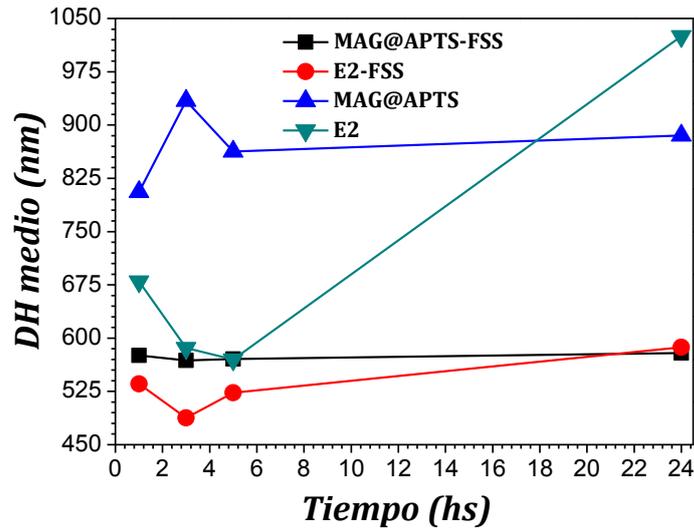


Figura 4.26. Evolución del DH medio en función del tiempo, medidos en SR a 37°C.

Los datos sugieren que las NPMs recubiertas con ASB (MAG@APTS-FSS y E2-FSS) resultaron ser más estables en SR que aquellas que no presentaban la cubierta (al menos durante el período estudiado de 24 hs).

De acuerdo con contribuciones publicadas, la capacidad de las nanopartículas para adsorber ASB representa una perspectiva prometedora en vistas de las futuras aplicaciones *in vivo* que se pretende dar a las mismas. Por ejemplo, Sinnecker y col. reportaron experimentos *in vitro* utilizando células Caco-2 y células epiteliales intestinales, concluyendo que el pre-tratamiento de nanopartículas con ASB permitió reducir la adherencia de las mismas a las células mejorando su estabilidad coloidal [66]. El equipo de Gonzalez Moragas propuso que, las nanopartículas revestidas con ASB exhiben menos interacción con entornos biológicos que sus contrapartes no recubiertas[59].

4.4 Conclusiones

- Se lograron obtener NPMs funcionalizadas con AF mediante el empleo de ambos métodos de síntesis: adsorción simple y anclaje covalente.
- Se estableció el rol de cada uno de los diferentes reactivos utilizados. En el caso del método de adsorción simple, la presencia de AA favoreció la incorporación de AF. En el anclaje covalente, la presencia de grupos amino es necesaria para la incorporación del AF a través de la reacción de la carbodiimida.
- Se halló que el método de anclaje covalente es la vía de incorporación más adecuada para el AF a la superficie de las NPMs debido a la estabilidad de las formulaciones y las propiedades fisicoquímicas de las mismas, incluyendo su estabilidad en el tiempo.
- Los resultados obtenidos a partir de la caracterización de las NPMs, revelaron que el protocolo que involucra la unión covalente utilizando el valor de concentración de AF intermedia resultó ser el más apropiado.
- Mediante el empleo de los datos experimentales que se corroboraron con cálculos teóricos se elucidó el mecanismo de interacción NPMs-AF. A partir de estos datos, se confirmó que el grupo Pteridínico permanece disponible para interactuar selectivamente con los α RF, demostrando el potencial de este teranóstico para detectar, por ejemplo, células tumorales.

4.5 Agradecimientos

Al Dr. Ignacio López Corral (INQUISUR-UNS/CONICET) por la realización y discusión de los estudios teóricos de DFT que soportaron los resultados experimentales presentados en el este capítulo.

4.6 Referencias del capítulo.

- [1] Schleich N., Danhier F., Pr at V., Iron oxide-loaded nanotheranostics: Major obstacles to in vivo studies and clinical translation, *J Control Release* 198, (2015) 35–54
- [2] Maeda H., Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors a well as issues related to its heterogeneity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 91, (2015) 3-6
- [3] Shi C., Guo D., Xiao K., Wang X., et al., A drug-specific nanocarriers design for efficient anticancer therapy, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7449
- [4] Conde J., Dias J.T., Grazu V., Moros M., et al., Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicina, *Front Chem.* 2, (2014) 48. 22 p ag doi:10.3389/fchem.2014.00048
- [5] Ramzy L., Nasr M., Metwally A. A., Awad G. A. S., Cancer nanotheranostics: A review of the role of conjugated ligands for overexpressed receptors, *Eur. J. Pharm. Sci.* 104, (2017) 273–292

- [6] Li P., Wang Y., Zeng F., Chen L., et al., Synthesis and characterization of folate conjugated chitosan and cellular uptake of its nanoparticles in HT-29 cells, *Carbohydr. Res.* 346 (2011) 801–806
- [7] Dhas N.L., Ige P.P., Kudarha R.R., Design, optimization and in-vitro study of folic acid conjugated-chitosan functionalized PLGA nanoparticle for delivery of bicalutamide in prostate cancer, *Powder Technol.* 283, (2015) 234–245
- [8] Low P. S., Henne W. A., Doorneweerd D. D., Discovery and Development of Folic-Acid-Based Receptor Targeting for Imaging and Therapy of Cancer and Inflammatory Diseases, *Acc. Chem. Res.* 41, (2008) 120–129
- [9] Sudimack J., Lee R. J., Targeted drug delivery via the folate receptor, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41, (2000) 147–162
- [10] Cheung A., Bax H. J., Josephs D. H., Ilieva K. M., et al., Targeting folate receptor alpha for cancer treatment, *Oncotarget* 7, (2016) 52553-52574
- [11] Schneider R., Schmitt F., Frochot C., Fort Y., et al., Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.* 13, (2005) 2799–2808
- [12] Wang S., Low P. S., Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells, *J. Controlled Release* 53, (1998) 39-48
- [13] Lu Y., Low P., Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, (2012) 342–352
- [14] Zhang X., Yang X., Ji J., Liu A., et al., Tumor targeting strategies for chitosan-based nanoparticles, *Colloids Surf. B* 148, (2016) 460–473
- [15] Leamon C.P., DePrince R.B., Hendren R.W., Folate-mediated drug delivery: effect of alternative conjugation chemistry, *J. Drug Target.* 7, (1999) 157–169
- [16] Huang Y., Mao K., Zhang B., Zhao Y., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics, *Mater. Sci. Eng. C* 70, (2017) 763–771
- [17] Yang S.-J., Lin F.-H., Tsai K.-C., Wei M.-F., et al., Folic acid-conjugated chitosan nanoparticles enhanced protoporphyrin IX accumulation in colorectal cancer cells, *Bioconjugate Chem.* 21, (2010) 679–689
- [18] Patel K., Raj B.S., Chen Y., Lou X., Novel folic acid conjugated Fe₃O₄-ZnO hybrid nanoparticles for targeted photodynamic therapy, *Colloids Surf. B* 150, (2017) 317–325
- [19] Jiang Q.L., Zheng S.W., Hong R.Y., Deng S.M., et al., Folic acid-conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hyperthermia and MRI in vitro and in vivo, *Appl. Surf. Sci.* 307, (2014) 224–233
- [20] Cardona S., Cabrera C., Study of photodegradation of folic acid encapsulated in microspheres of gum arabic and maltodextrin, *Revista Cubana de Farmacia* 44, (2010) 443-455
- [21] Feng B., Hong R. Y., Wang L. S., Guo L., et al., Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 328, (2008) 52–59
- [22] Llinàs M. C., Sánchez-García D., Silica nanoparticles: preparation and applications in biomedicine, *AFINIDAD LXXI*, 565, Enero - Marzo 2014, 12pp
- [23] Hea Y.Y., Wang X.C., Jin P.K., Zhao B., et al., Complexation of anthracene with folic acid studied by FTIR and UV spectroscopies, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 72, (2009) 876–879
- [24] Santos C., Gomes P., Duarte J. A., Almeida M. M., et al., Development of hydroxyapatite nanoparticles loaded with folic acid to induce osteoblastic differentiation, *Int. J. Pharm.* 516, (2017) 185–195
- [25] Ma M., Zhang Y., Yu W., Shen H.-ying, et al., Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane, *Colloids Surf. A* 212, (2003) 219–226
- [26] Weigel C., Kellner R., FTIR-ATR-spectroscopic investigation of the silanization of germanium surfaces with 3-aminopropyltriethoxysilane, *Z. Anal. Chem.* 335, (1989) 663–668
- [27] Cao H., He J., Deng L., Gao X., Fabrication of cyclodextrin-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄/amino-silane core-shell nanoparticles via layer-by-layer method, *Appl. Surf. Sci.* 255, (2009) 7974–7980
- [28] Torchilin V.P., Drug targeting, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (Suppl 2), (2000) S81–S91

- [29] Schleich N., Sibret P., Danhier P., Ucakar B., et al., Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging, *Int. J. Pharm* 447 (2013) 94–101
- [30] Digigow R. G., Dechézelles J.-F., Dietsch H., Geissbühler I., et al., Preparation and characterization of functional silica hybrid magnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater* 362, (2014)72–79.
- [31] Acevedo-Fani A., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. Photo-protection and controlled release of folic acid using edible alginate/chitosan nanolaminates. *J Food Eng*, 229, (2018) 72–82
- [32] Wang Z., Zhou C., Xia J., Via B., et al., Fabrication and characterization of a triple functionalization of graphene oxide with Fe₃O₄, folic acid and doxorubicin as dual-targeted drug nanocarrier. *Colloids Surf. B* 106, (2013) 60–65
- [33] Zhang J., Rana S., Srivastava R.S., Misra R.D.K., On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated: polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles, *Acta Biomater.* 4, (2008) 40–48
- [34] Bhattacharya D., Behera B., Sahu S. K., Ananthkrishnan R., et al., Design of dual stimuli responsive polymer modified magnetic nanoparticles for targeted anti-cancer drug delivery and enhanced MR imaging, *New J. Chem* 40, (2016), 545–557
- [35] De Moraes Profirio D., Benedito Teixeira Pessine F. Formulation of functionalized PLGA nanoparticles with folic acid-conjugated chitosan for carboplatin encapsulation. (2018), *Eur. Polym. J.* doi:10.1016/j.eurpolymj.2018.09.011
- [36] Sundar S., Mariappan R., Piraman S., Synthesis and characterization of amine modified magnetite nanoparticles as carriers of curcumin-anticancer drug, *Powder Technol.* 266, (2014) 321–328
- [37] Viota J. L., Carazo A., Munoz-Gamez J. A., Rudzka K., et al., Functionalized magnetic nanoparticles as vehicles for the delivery of the antitumor drug gemcitabine to tumor cells. Physicochemical in vitro evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* 33, (2013) 1183–1192
- [38] Sonvico F., Mornet S., Vasseur S., Dubernet C., et al., Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments. *Bioconjug Chem* 16, (2005) 1181–1188.
- [39] Feng X., Zhang S., Wu H., Lou X., A novel folic acid-conjugated TiO₂-SiO₂ photosensitizer for cancer targeting in photodynamic therapy, *Colloids Surf. B* 125, (2015) 197–205
- [40] Ordejón P., Artacho E., Soler J.M., Self-consistent order-N density-functional calculations for very large systems, *Phys. Rev. B* 53, (1996) R10441–4
- [41] Soler J.M., Artacho E., Gale J.D., García A., et al., The SIESTA method for ab initio order-N materials simulation, *J. Phys.: Condes. Matter.* 14, (2002) 2745–2779
- [42] Li Z., Liu S., Wang S., Qiang L., et al., Synthesis of folic acid functionalized redox-responsive magnetic proteinous microcapsules for targeted drug delivery, *J. Colloid Interface Sci.* 450 (2015) 325–331
- [43] Huong L.T.T., Nam N.H., Doan D.H., Nhung H.T.M., et al., Folate attached, curcumin loaded Fe₃O₄ nanoparticles: a novel multifunctional drug delivery system for cancer treatment, *Mater.Chem. Phys.* 172, (2016) 98–104
- [44] E.Allard-Vannier K., Hervé-Aubert K., Kaaki T.t, Blondy A., et al., Folic acid-capped PEGylated magnetic nanoparticles enter cancer cells mostly via clathrin dependent endocytosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 2016 1578–1586
- [45] Nguyen V. D., Min H.-K., Kim C.-S., Han J., Park, et al., Folate Receptor-targeted Liposomal Nanocomplex for Effective Synergistic Photothermal-Chemotherapy of Breast Cancer In Vivo, (2018), *Colloids Surf. B.* doi:10.1016/j.colsurfb.2018.10.013
- [46] Elnakat H., Ratnam M., Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy, *Adv. Drug Del. Rev.* 56, (2004) 1067–1084
- [47] Forest V., Pourchez J., Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: a too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona, *Mater. Sci. Eng. C* 70, (2017) 889–896

- [48] Mortensen N. P., Hurst G. B., Wang W., Foster C. M., et al., Dynamic development of the protein corona on silica nanoparticles: composition and role in toxicity, *Nanoscale* 5,(2013), 6372
- [49] Barbero F., Russo L., Vitali M., Piella J., et al., Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System, *Semin Immunol* 34, (2017) 52–60.
- [50] M. Rahman et al., *Protein-Nanoparticle Interactions*, Springer Series in Biophysics 15, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, doi 10.1007/978-3-642-37555-2_2
- [51] Izak-Nau E., Voetz M., Eiden S., Duschl A., et al., Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation, *Part. Fibre Toxicol.* 10, (2013) 56
- [52] Brun E., Sicard-Roselli C., Could nanoparticle corona characterization help for biological consequence prediction?, *Cancer Nanotechnol.* 5, (2014) 7–20
- [53] Swain S.K., Sarkar D., Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 286, (2013) 99–103
- [54] Bordbar A.K., Rastegari A.A., Amiri R., Ranjakhsh E., et al., Characterization of modified magnetite nanoparticles for albumin immobilization, *Biotechnol. Res. Int.* 2014 (2014) 6, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/705068> Article ID 705068.
- [55] Zhang B., Zhang H., Li X., Lei X., et al., Synthesis of BSA/ Fe₃O₄ magnetic composite microspheres for adsorption of antibiotics, *Mater. Sci. Eng. C* 33, (2013) 4401–4408
- [56] Weidner A., Gräfe C., von der Lühe H., Clement D., et al., Preparation of core-shell hybrid materials by producing a protein corona around magnetic nanoparticles, *Nanoscale Res. Lett.* 10, (2015) 282–293
- [57] Peters T.J., Serum albumin, *Adv. Protein Chem.* 37, (1985) 161–245
- [58] Gonzalez J., Nicolas P., Ferreira M.L., Avena M., et al., Fabrication of ferrogels using different magnetic nanoparticles and their performance on protein adsorption, *Polym. Int.* 63, (2014) 258–265
- [59] Gonzalez-Moragas L., Yu S.-M., Carezza E., Laromaine A., et al., Protective effects of bovine serum albumin on superparamagnetic iron oxide nanoparticles evaluated in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Biomater. Sci. Eng.* 1, (2015) 1129–1138
- [60] Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., et al., Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, (2008) 14265–14270
- [61] Peng Z.G., Hidajat K., Uddin M.S., Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles, *J. Colloid Interface Sci.* 271, (2004) 277–283
- [62] Fair B.D., Jamieson A.M., Studies of protein adsorption on polystyrene latex surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 77, (1980) 525–534
- [63] Eberbeck D., Kettering M., Bergemann C., Zirpel P., et al., Quantification of the aggregation of magnetic nanoparticles with different polymeric coatings in cell culture medium, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 43, (2010) 405002–405011
- [64] Sabuncu A.C., Grubbs J., Qian S., Abdel-Fattah T.M., et al., Probing nanoparticle interactions in cell culture media, *Colloids Surf. B* 95, (2012) 96–102
- [65] Yu S.-M., Gonzalez-Moragas L., Milla M., Kolovou A., et al., Bio-identity and fate of albumin-coated SPIONs evaluated in cells and by the *C. elegans* model, *Acta Biomater.* 43, (2016) 348–357
- [66] Sinnecker H., Ramaker K., Frey A., Coating with luminal gut constituents alters adherence of nanoparticles to intestinal epithelial cells, *Beilstein J. Nanotechnol.* 5, (2014) 2308–2315

Capítulo V

Incorporación del fármaco a NPMs funcionalizadas con ácido fólico

Incorporación del fármaco a NPMs funcionalizadas con ácido fólico

RESUMEN

En este capítulo se presentan y discuten los ensayos realizados tendientes a dotar a las nanoformulaciones de la acción terapéutica necesaria para constituir un agente teranóstico. Para ello se seleccionó Doxo, como el fármaco oncológico a incorporar en las NPMs modificadas con AF (denominadas de manera general “E”). La carga de la droga se realizó mediante adsorción superficial analizando diferentes parámetros asociados a esta metodología. Todas las formulaciones obtenidas se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis, FTIR, EAA, DLS y medidas de ζ pot. Se determinó la eficiencia (%) y la capacidad de carga (mg Doxo/100 mg NPMs). Se evalúa además *in vitro*, la liberación de Doxo mediante la implementación de una técnica que simula las diferentes instancias que debería atravesar la nanoformulación una vez inyectada, vía intravenosa, en el torrente sanguíneo. Se explora, además, la influencia de un campo magnético externo sobre el perfil de liberación de la Doxo en un medio simulando el endosoma de la célula tumoral.

5.1- Introducción.

El fármaco Doxo es uno de los agentes quimioterapéuticos más efectivos entre los empleados en patologías oncológicas de diverso tipo como carcinoma de mama, ovario y pulmón, cáncer de células de transición de la vejiga, neuroblastoma, tumor de Wilms, sarcomas de tejidos blandos, osteosarcoma, leucemia linfocítica-linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin y enfermedad de Hodgkin, entre otras[1,2].

Esta droga, perteneciente a la familia de las antraciclinas, se incluye dentro de los denominados antibióticos antitumorales dado que se fabrican a partir de productos naturales sintetizados por especies de la bacteria *Streptomyces*. A principios de la década de los cincuenta se obtuvo el primer antibiótico de la serie de las antraciclinas con actividad citotóxica, la Daunorubicina, sintetizada por *Streptomyces peucetius*[3]. Su derivado, la Doxorubicina, fue obtenida de una mutante (*var peucetius*) y mostró mayor y más extensa actividad biológica[4].

En la figura 5.1 se muestra la estructura química del fármaco estudiado.

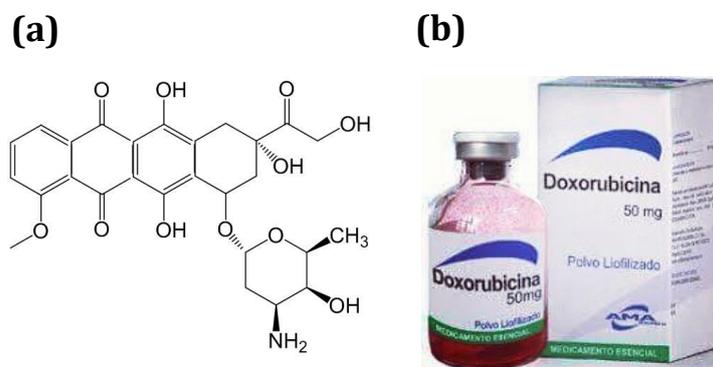


Figura 5.1. (a) Estructura química de Doxorubicina. (b) Fotografía de Doxorubicina empleada en quimioterapia y utilizada en las experiencias detalladas en este capítulo.

La Doxo ejerce su efecto citotóxico a través de diferentes caminos. Esta droga se intercala entre las bases del ADN, formando complejos y generando cambios en la doble hélice que bloquean tanto su réplica como su transcripción. Por otro lado, se ha indicado su acción inhibitoria sobre la enzima topoisomerasa II[2],[5,6], lo cual evita que tenga lugar la relajación del ADN superenrollado bloqueando así su transcripción y replicación, además de inducir rupturas en el mismo, lo que finalmente obliga a las células a entrar en apoptosis (ciclo de muerte celular

programada). Además, la Doxo reacciona con la NADPH citocromo P450 reductasa, en el complejo respiratorio tipo I de la mitocondria, formando radicales intermediarios de semiquinona los cuales se oxidan y generan radicales libres como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo[7]. Estas especies reactivas de oxígeno (ERO) causan la peroxidación de los lípidos de membrana y otros componentes celulares e inhiben la respiración celular, por daño a los componentes de la cadena de fosforilación oxidativa y a la membrana de la mitocondria[7].

En clínica, la Doxo se administra usualmente mediante inyección intravenosa. La dosis inicial recomendada en adultos por cada ciclo es de 60-90 mg/m² de superficie corporal. La dosis inicial total por ciclo, puede ser administrada como dosis única o se puede dividir, para administrarla en 3 días consecutivos o en los días 1 y 8 del ciclo. Si la recuperación de la toxicidad inducida por la Doxo es normal (particularmente la depresión de la médula ósea y la estomatitis), cada ciclo de tratamiento puede repetirse cada 21-28 días[8].

A pesar de ser uno de los agentes quimioterapéuticos más empleados, se le asocian varios efectos secundarios con distintos niveles de severidad. Inicialmente, pueden aparecer náuseas/vómitos, diarrea, signos de irritación local (en el caso de que ocurriese extravasación), estomatitis, y alopecia, entre otros. Durante la segunda semana de tratamiento la mielodepresión alcanza su mayor grado, afectando en mayor proporción a la serie blanca que a la roja o a las plaquetas. Esto último puede causar incluso la aparición de una nueva patología oncológica, la leucemia. Más aún, la administración repetida de estos medicamentos puede generar cardiotoxicidad con un daño cardíaco irreversible, específicamente cuando se alcanzan dosis acumuladas mayores a 550 mg/m²[9-11]. Esto se debe al elevado número de mitocondrias existentes en el citoplasma del cardiomiocito.

Los efectos colaterales detallados en el párrafo anterior están relacionados con la distribución sistémica e inespecífica del fármaco una vez inyectado. Esto genera que tanto células tumorales como tejidos normales se vean afectados en igual medida. Por otro lado, este tipo de distribución, limita la dosis que llega al tumor lo cual hace necesario administrar dosis sucesivas de la droga para alcanzar los niveles adecuados en el sitio blanco, acentuando su toxicidad[12,13].

Es por lo expuesto que desde hace varias décadas muchos investigadores han concentrado sus esfuerzos en la preparación de sistemas portadores de este fármaco que permitan su localización en el sitio específico, disminuyendo así las dosis requeridas y su circulación sistémica como droga libre[1]. A la fecha, solo dos formulaciones han ingresado en ensayos clínicos de fase II y III y han sido aprobados por la FDA para su uso clínico en casos de cáncer de mama con metástasis, la Doxorubicina liposomal (LD) y la Doxorubicina liposomal pegilada (PLD)[14].

La preparación de nanosistemas transportadores de Doxo se ha estudiado extensamente sobre la base de nanopartículas de MAG combinada con recubrimientos o aditivos de diversa naturaleza y origen: biopolímeros[15,16], proteínas[17], compuestos inorgánicos como sílica[18], entre otros. En general, se ha descrito la absorción del fármaco a la NPMs a través de los poros de sílica o del entrecruzamiento polimérico que recubre a núcleo de MAG[19,20], aunque también se encuentran registros de la incorporación a través de enlaces covalentes entre el recubrimiento de MAG y la Doxo[21,22]. Además, como se comentó en el *Capítulo IV*, se ha avanzado en la incorporación de agentes funcionalizantes que actúen como ligandos específicos, capaces de unirse selectivamente a células tumorales, entre ellos el AF[12], que puede tener lugar antes o después de la incorporación de la droga a la formulación magnética[19][23].

Uno de los requisitos indispensables a la hora de obtener nuevos nanotransportadores, es lograr una formulación que tenga la capacidad de encapsular/adsorber grandes cantidades de fármaco. De esta manera, se podría por ejemplo, con la inoculación de pequeñas cantidades de nanoformulación, alcanzar las dosis terapéuticas necesarias[24]. Sin embargo, igualmente importante, es el estudio de la cinética de liberación de la droga en el sitio blanco. En este sentido, la influencia del cambio en el pH del medio, la variación de la temperatura ó la presencia de un campo magnético externo son factores estudiados y reportados en la bibliografía[25-28].

Respecto al efecto del pH en la liberación de Doxo, incluso cuando una amplia gama de información puede encontrarse en la literatura científica, en todos los casos se propone dos procedimientos independientes: uno en condiciones que simulan el pH del torrente sanguíneo (pH=7.4) y otro representando el interior del

lisosoma/endosoma de la célula tumoral (pH alrededor de 5)[29,30]. En algunos casos, incluso, los investigadores incorporan una tercera experiencia que se realiza a valores de pH correspondientes al citoplasma de la célula tumoral (pH alrededor de 6)[31,32].

En particular, en este trabajo de tesis, se presenta un procedimiento que, a diferencia de lo reportado en la literatura, propone la evaluación *in vitro* de la liberación de Doxo a dos pH diferentes en forma secuencial. De esta manera, mediante la implementación de una técnica que simula las diferentes instancias que debería atravesar la nanoformulación una vez inyectada, vía intravenosa (IV), en el torrente sanguíneo, sería posible obtener una mejor aproximación de lo que se espera que ocurra *in vivo*.

En relación al estudio de la influencia de un campo magnético externo, la mayor parte de los reportes encontrados, hacen referencia al efecto causado por la aplicación de un campo magnético de corriente alterna (ACMF del inglés *alternating current magnetic field*). De esta forma, se lograría optimizar los efectos terapéuticos al combinar en un único nanosistema, hipertermia y quimioterapia[33]. También es posible encontrar trabajos en los cuales evalúan la influencia de campos magnéticos de alta frecuencia (HFMF del inglés *high frequency magnetic field*) en la liberación de fármacos[34,35]. No obstante, se registran escasos reportes respecto al empleo de campos magnéticos externos estáticos (SEMF del inglés *static external magnetic field*) y todos han sido publicados en el 2018[36-38]. Es importante destacar que en todos ellos las nanoformulaciones se encuentran formadas por un componente magnético y un componente polimérico y/o proteico.

A pesar de la abundante literatura disponible, no se han encontrado publicaciones donde se estudie la incorporación de Doxo al nanotransportador E por adsorción, en general los investigadores reportan ensayos de encapsulamiento del fármaco. Por otra parte, se detecta limitada información en cuanto a los mecanismos de incorporación de Doxo a sistemas nanoparticulados en general. Finalmente, y en cuanto a la liberación *in vitro*, no se han registrado en la literatura protocolos como los que se han explorado en esta tesis.

El objetivo planteado en este capítulo es completar el diseño de un agente teranóstico a partir de la incorporación del fármaco Doxo al nanotransportador E.

Este análisis incluye una caracterización exhaustiva de las NPMs cargadas con el fármaco de manera de elucidar el conjunto de variables que aseguren la mayor eficiencia de carga con propiedades fisicoquímicas aceptables para su aplicación *in vivo*.

5.2 Experimental

5.2.1- Síntesis del nanotransportador magnético E

5.2.1.1 Síntesis del núcleo magnético: MAG

Se llevó a cabo la síntesis del núcleo magnético siguiendo el protocolo de co-precipitación inversa que se describió en la ***sección 3.2.2.3 del Capítulo III***, y que permitió obtener la formulación MAG-5.

5.2.1.2 Modificación de la superficie de MAG con APTS y funcionalización con AF.

El tratamiento MAG con APTS y la posterior funcionalización con ácido fólico mediante acoplamiento covalente se realizó de acuerdo a lo descrito en las ***secciones 4.2.2 y 4.2.3.2 del Capítulo IV*** que dieron lugar a la formulación E2. La misma se nombrará en este capítulo simplemente “E”.

5.2.2 Incorporación de Doxo a la superficie de E.

Se llevó a cabo la incorporación de Doxo a la superficie de E mediante adsorción simple, tomando como referencia el procedimiento previamente reportado por Huang y col.[31], con algunas modificaciones. Para ello, se mezclaron dispersiones acuosas de E con una solución acuosa de Doxorubicina ([Doxo]= 2 mg.mL⁻¹), preparada por disolución del polvo liofilizado comercial. La reacción tuvo lugar bajo agitación magnética y en total oscuridad. Al finalizar el tiempo de contacto, se decantaron las muestras obtenidas utilizando un imán de Nd y se secaron en estufa a 34°C.

En la figura 5.2 se esquematiza el camino de reacción que permitió obtener el nanotransportador E y la incorporación de Doxo.

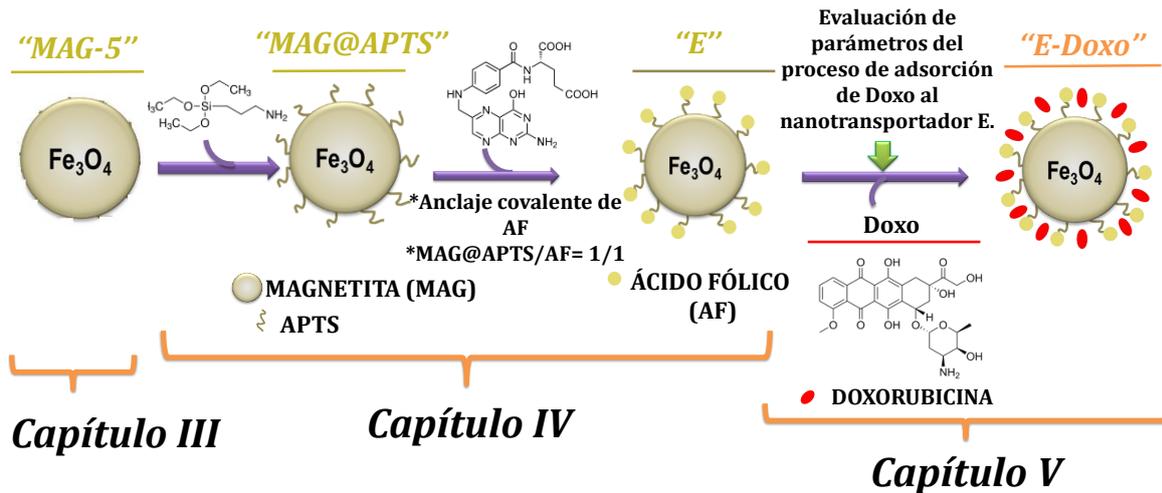


Figura 5.2. Esquema de síntesis de nanoformulaciones magnéticas.

Por otra parte en la figura 5.3 se presenta una secuencia fotográfica de la adsorción del fármaco llevada a cabo en el laboratorio.

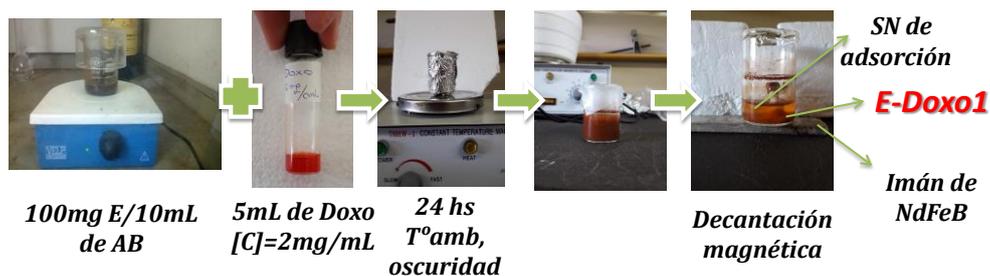


Figura 5.3. Metodología empleada para la adsorción de Doxo a la superficie de E. (SN:sobrenadante)

Se exploraron tres relaciones nominales en masa de Doxo/E: 0.5/10, 1/10, 2/10. Las formulaciones obtenidas de estas experiencias se denominaron E-Doxo0.5, E-Doxo1 y E-Doxo2, respectivamente.

Por otro lado, se obtuvo E-Doxo6 aplicando el mismo protocolo, utilizando la relación nominal de masas Doxo/E de 1/10 y fijando el pH en 6.

Se procedió, además, a evaluar la adsorción de Doxo utilizando MAG@APTS (sin AF) (relación de masa Doxo/MAG@APTS=1/10) y la muestra obtenida se denominó MAG@APTS-Doxo.

En la tabla 5.1 se detallan las condiciones experimentales que dieron lugar a cada una de de las muestras.

Tabla 5.1. Condiciones exploradas para la adsorción simple de Doxo a los distintos nanotransportadores.

Muestra	Masa de E (mg)	Masa de MAG@APTS (mg)	Masa de Doxo (mg)	Relación nominal inicial Doxo/E	Relación nominal inicial Doxo/MAG@APTS	Medio de reacción
<i>E-Doxo0.5</i>	50	-----	2.5	0.5/10	-----	AB
<i>E-Doxo1</i>	50	-----	5.0	1/10	-----	AB
<i>E-Doxo2</i>	50	-----	10.0	2/10	-----	AB
<i>E-Doxo6</i>	50	-----	5.0	1/10	-----	PBS pH=6
<i>MAG@APTS-Doxo</i>	-----	50	5.0	-----	1/10	AB

Para determinar la cantidad de droga incorporada a la superficie de E se empleó la técnica de espectroscopía UV-Visible. Para ello, en primera instancia se preparó una solución de Doxo en agua ($[Doxo]=50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se obtuvo el espectro de absorbancia que se presenta en la figura 5.4 (a). Se seleccionó 480 nm como longitud de máxima absorbancia, y se construyó una curva de calibrado que resultó lineal en el intervalo de concentraciones comprendido entre 20 y 70 $\mu\text{g Doxo}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R^2=0.9999$). La curva de calibrado se muestra en la figura 5.4 (b).

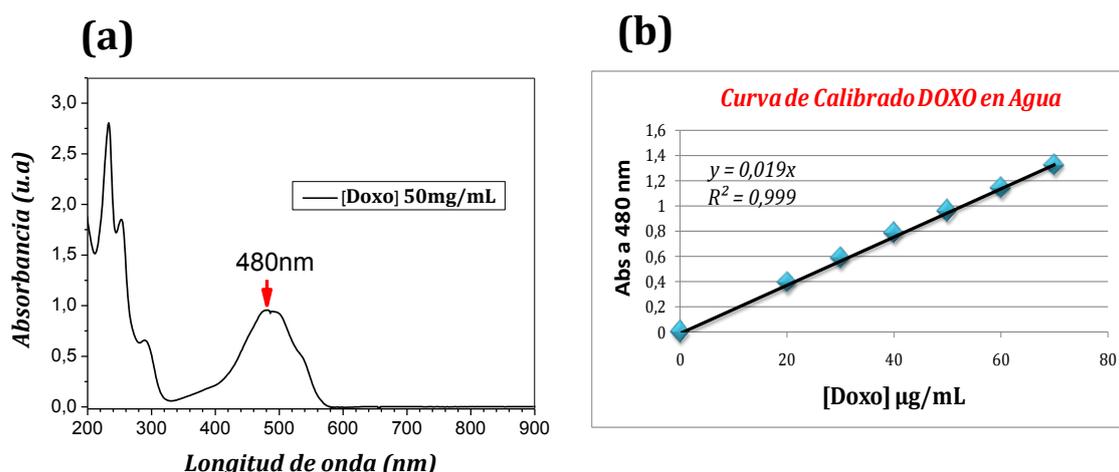


Figura 5.4 (a) Espectro de absorbancia de una solución de Doxo en AB. (b) Curva de calibrado de Doxo en AB

5.2.2.1 Cinética de adsorción de Doxorubicina.

Se mezclaron 50mg de E con 2.5 mL de solución de Doxo ([Doxo]= 2 mg.mL⁻¹). Se tomaron alícuotas de sobrenadante (SN) luego de 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 24 hs de reacción y se determinó el contenido de droga en el mismo por espectroscopía UV-Visible midiendo a 480 nm, empleando la curva de calibrado que se presentó en la figura 5.4 (b). Al finalizar las 24 hs de contacto, se decantó el sólido utilizando un imán de Nd y se secó en estufa a 34°C.

5.2.2.2 Determinación del contenido de Doxo incorporado a los nanosistemas

El contenido de droga incorporado se expresó en términos de la eficiencia de carga (%EC) y la capacidad de carga (%CC). La primera se refiere a la cantidad de Doxo adsorbida en la superficie de E en relación a la cantidad de droga inicial.

$$\%EC = \left(\frac{W3 - W1}{W3} \right) \times 100$$

Donde, W1 es el contenido de droga libre en el sobrenadante, y W3 la cantidad inicial de Doxo que se adicionó al *batch* de adsorción.

Mientras que la capacidad de carga se define como la masa de droga incorporada por unidad de masa de E

$$\%CC = \left(\frac{W3 - W1}{W2} \right) \times 100$$

Donde, W1 es el contenido de droga libre en el sobrenadante y W2 es la masa total de E.

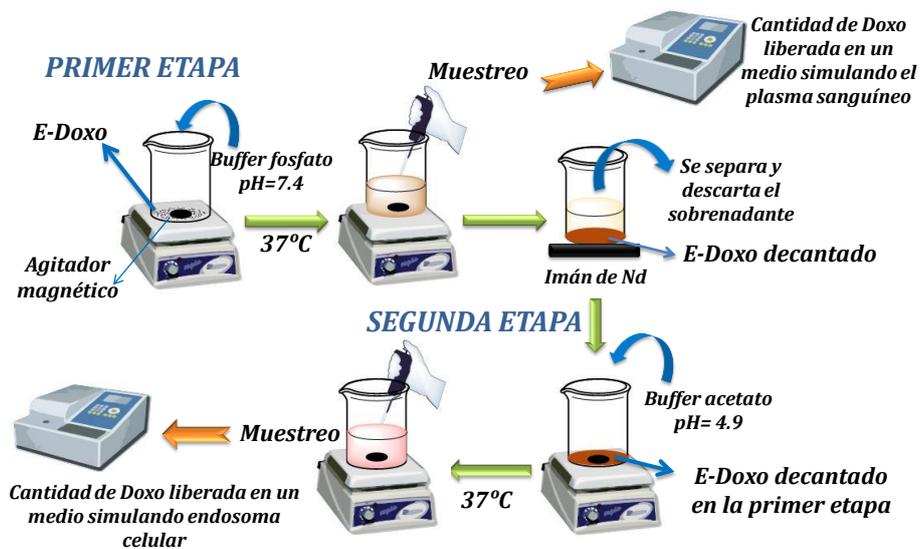
Ambos parámetros se calcularon mediante el método indirecto. Esto es tomando alícuotas de los sobrenadantes de adsorción y cuantificando el contenido de Doxo libre (no adsorbida) por espectroscopía Uv-Visible midiendo a 480 nm.

5.2.3 Estudios *in vitro* de liberación de la droga

5.2.3.1. Efecto del pH

Se dispersaron 12 mg de E-Doxo en 12 mL de PBS pH=7.4, y se incubaron a 37°C bajo agitación magnética constante durante una hora. Este procedimiento se realizó en ausencia de luz, debido a que se ha reportado que Doxo es un fármaco fotosensible[39]. Se tomaron alícuotas del sobrenadante a 15, 30, 45 y 60 min, las

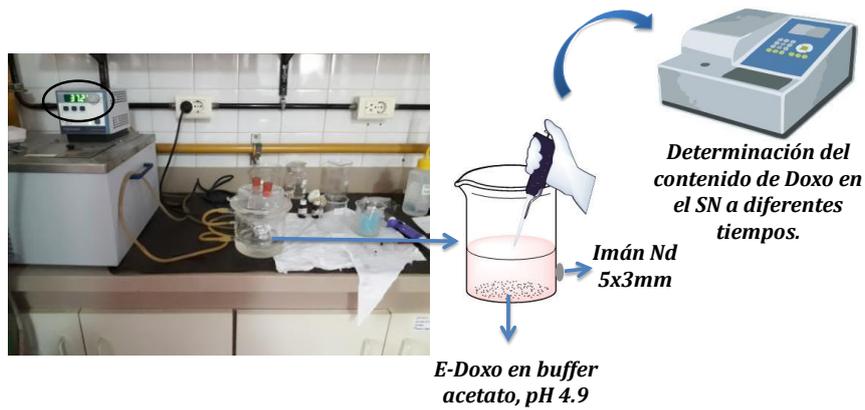
cuales se filtraron utilizando un filtro con tamaño de poro de 0.22 μm con el fin de obtener una solución limpia, apta para analizar el contenido de droga liberada por espectroscopía UV-Visible. Luego de la hora de incubación, se reemplazó el buffer fosfato por 10 mL de buffer acetato, pH=4.9. La nueva suspensión se mantuvo a 37°C bajo agitación magnética durante cuatro horas y en total oscuridad. En esta segunda etapa, las alícuotas se colectaron y filtraron a cada hora y se determinó el contenido de Doxo por espectroscopía UV-Visible. En el esquema 5.1 se ilustran las etapas descriptas.



Esquema 5.1. Etapas involucradas en el estudio de influencia del pH en la liberación de Doxorubicina a distintos pH.

5.2.3.2. Efecto de la presencia de un campo magnético externo estático (SEMF).

En un vaso de precipitado, se colocaron 12 mg de E-Doxo y 12 mL de buffer acetato, pH=4.9. En uno de los lados del recipiente, tal y como se muestra en el esquema 5.2, se colocó un imán de Nd de 5 mm de diámetro y 3 mm de espesor y potencia de 0.3 Tesla (T). La dispersión se incubó a 37°C durante 24 hs en total oscuridad y sin agitación magnética. Se tomaron alícuotas del sobrenadante a los 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 1440 min de incubación, que se filtraron y se determinó el contenido de Doxo por espectroscopía UV-Visible. En el esquema 5.2 se ilustra el procedimiento descrito.



Esquema 5.2 Estudio de influencia de un SEMF en la liberación de Doxorubicina.

Se repitió el mismo protocolo, pero en ausencia del imán de Nd y de agitación magnética, y fue tomado como referencia.

En la figuras 5.5 se muestran los recipientes donde tuvieron lugar las liberaciones, una vez finalizada las experiencias.

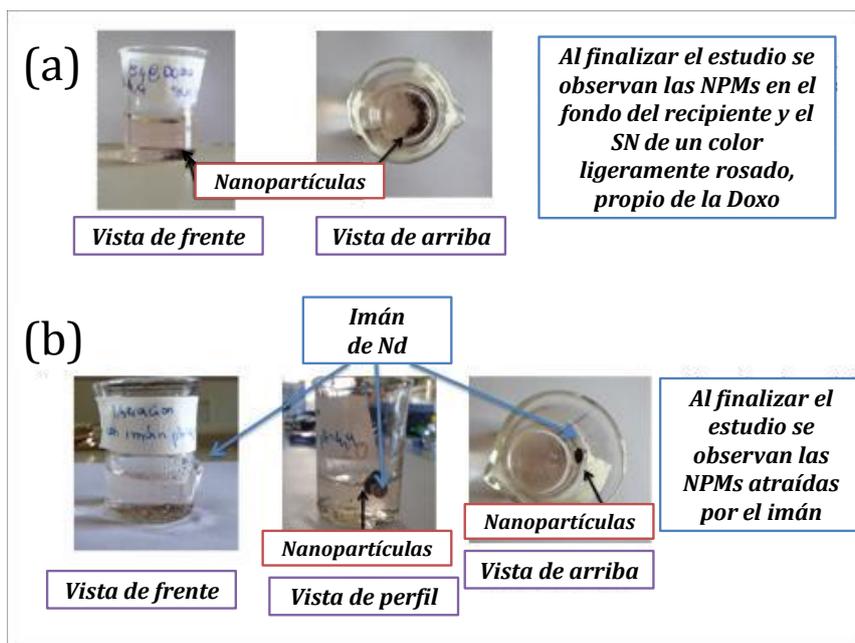


Figura 5.5. Fotografías de los recipientes una vez finalizada la liberación (a) sin imán (b) con imán

Para evaluar el contenido de Doxo en las alícuotas de los sobrenadantes, se construyeron dos curvas de calibrado. Para el caso de las soluciones de Doxo en PBS se tomaron los valores de absorbancia registrados a 480 nm, mientras que para la soluciones de Doxo en buffer acetato, se utilizó la absorbancia registrada a 485 nm.

En el caso de la curva construida a partir de soluciones de Doxo en PBS, la misma resultó lineal para concentraciones entre 0.5 y 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con un R^2 de 0.999. Por otro lado, se emplearon soluciones de Doxo en buffer acetato cuyas concentraciones fueron entre 0.25 y 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La curva obtenida resultó lineal para las concentraciones estudiadas con un R^2 de 0.998.

5.3 Resultados y Discusión.

5.3.1 Caracterización fisicoquímica de las nanoformulaciones magnéticas cargadas con Doxo.

En la figura 5.6(a) se muestra el espectro FTIR de la droga empleada en esta tesis. Es posible distinguir una banda a 3450 cm^{-1} asociada a la vibración de tensión del enlace N-H de la amina primaria y otra a 3330 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del enlace O-H. Además, a 1639 cm^{-1} puede apreciarse una banda relacionada con la vibración de tensión del grupo C=O y los modos de deformación de los grupos aminos libres. Las señales registradas entre los valores de 1144 y 1020 cm^{-1} podrían adjudicarse a las vibraciones de tensión de los enlaces C-O y C-O-C presentes en la estructura de la molécula. Por último puede observarse dos bandas localizadas a 870 y 805 cm^{-1} que se asociarían a $\omega\text{N-H}$ [40].

En la figura 5.6(b) se comparan los espectros FTIR obtenidos para las muestras E y E-Doxo1. En esta figura pueden observarse las bandas asociadas a las vibraciones de flexión del enlace C=O y a la vibración de tensión del enlace N-C=O, a 1694 y 1626 cm^{-1} , respectivamente. Como se describió en la **sección 4.3.1.2 del Capítulo IV**, estas bandas constituyen señales representativas de E asociadas a los enlaces del grupo amida[41]. En el espectro correspondiente a E-Doxo1 se observa una banda ensanchada ubicada a 1607 cm^{-1} que puede atribuirse al solapamiento de las señales propias de la vibración de tensión del enlace C=O de los grupos cetona y quinona de la molécula de Doxo con la banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo N-C=O de E[23]. Asimismo, se observa un pequeño desplazamiento de la señal asignada a la vibración de flexión del enlace C=O de los grupos carboxílicos desde 1694 a 1687 cm^{-1} en el espectro correspondiente a E-Doxo1, con respecto a lo que se aprecia en el espectro de E. Esto último permitiría inferir que la Doxo se liga a la superficie de E a través del AF mediante interacciones de tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas[42]. Las bandas presentes

entre los 900 y los 1300 cm^{-1} en el espectro de E-Doxo, ausentes en el espectro de E, confirman la adsorción de la droga a la superficie de E[18],[40].

Se encontraron espectros similares cuando se analizaron las muestras E-Doxo0.5 y E-Doxo2. Los mismos se incluyen en la figura 5.6(c).

En la figura 5.6(d), se muestra el espectro correspondiente a la muestra E-Doxo6. Se evidencia que las señales asociadas a las vibraciones de tensión de los enlaces C-O y C-O-C de la Doxo son más intensas que las que se detectan en el espectro de E-Doxo1. Este resultado podría asociarse un cambio en el tipo de interacción fármaco nanotransportador que ocurre cuando la reacción tiene lugar a pH 6.

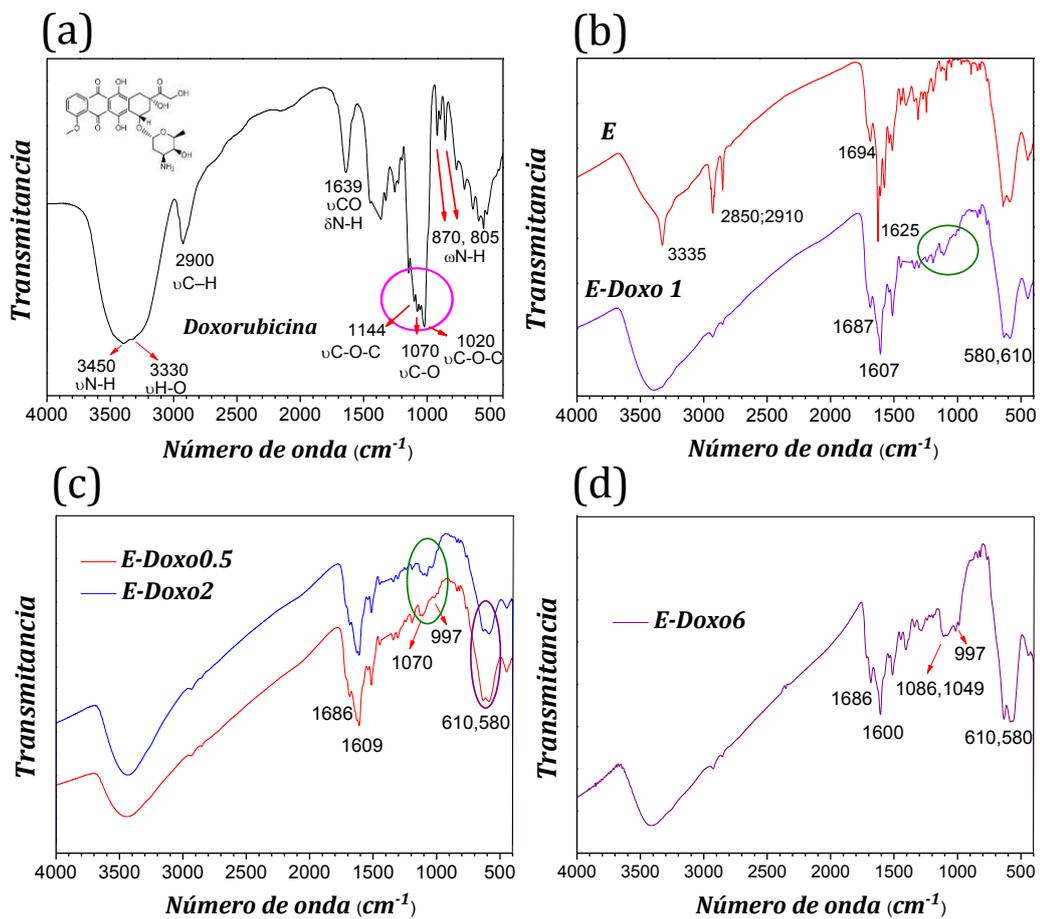


Figura 5.6 Espectros FTIR de (a) Doxo pura, (b) E y E-Doxo1, (c) E-Doxo0.5 y E-Doxo2 (d) E-Doxo6.

Por último, en todos los espectros se observan bandas ubicadas alrededor de 610 y 580 cm^{-1} atribuibles a las vibraciones de tensión del enlace Fe-O así como

también bandas correspondientes a los grupos funcionales propios de la molécula de AF, confirmando la permanencia de todos los componentes en las nanoformulaciones magnéticas finales.

Con el fin de dilucidar el rol del AF en la incorporación de la Doxo a la superficie de E, se analizó la incorporación del fármaco a la superficie de MAG@APTS. Los espectros FTIR obtenidos a partir de las muestras de MAG@APTS y MAG@APTS-Doxo se comparan en la figura 5.7.

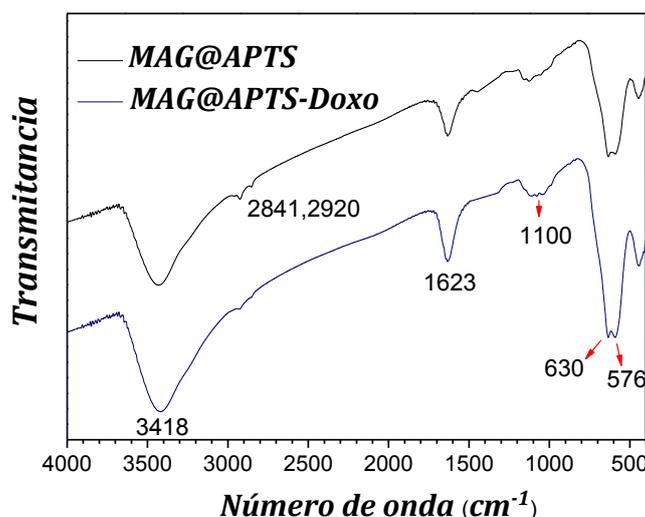


Figura 5.7 Espectros FTIR de MAG@APTS y MAG@APTS-Doxo

No se evidenciaron bandas correspondientes a la droga en el espectro de MAG@APTS-Doxo, por lo que sería factible indicar que las moléculas de AF serían necesarias para la incorporación del fármaco a la superficie de las nanopartículas. Esto se justificará más adelante en la **sección 5.3.3** cuando se evalúe el mecanismo propuesto para la adsorción Doxo sobre E.

En la figura 5.8 se muestran los espectros obtenidos a partir espectroscopía UV-Vis. En la figura 5.8(a) se muestran los correspondientes a las soluciones acuosas de AF y de Doxo respectivamente, con el fin de utilizarlos como referencia a la hora de analizar los espectros de las dispersiones de las muestras.

En el espectro correspondiente a AF se aprecia la banda de absorción a 280 nm típica de este ácido tal como se indicó en la **sección 4.3.1.2 del Capítulo IV**. El espectro de Doxo muestra tres señales estrechas a 230, 253 y 290 nm, mientras que

se observa una banda ancha centrada entre 480 y 490 nm[23]. De todas ellas, se tomó como referencia la señal de 480 nm, asociada a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, y reconocida como la señal característica de esta molécula[18],[23]. Por otra parte, las demás señales se debieron descartar dado que se superponen con la correspondiente al AF.

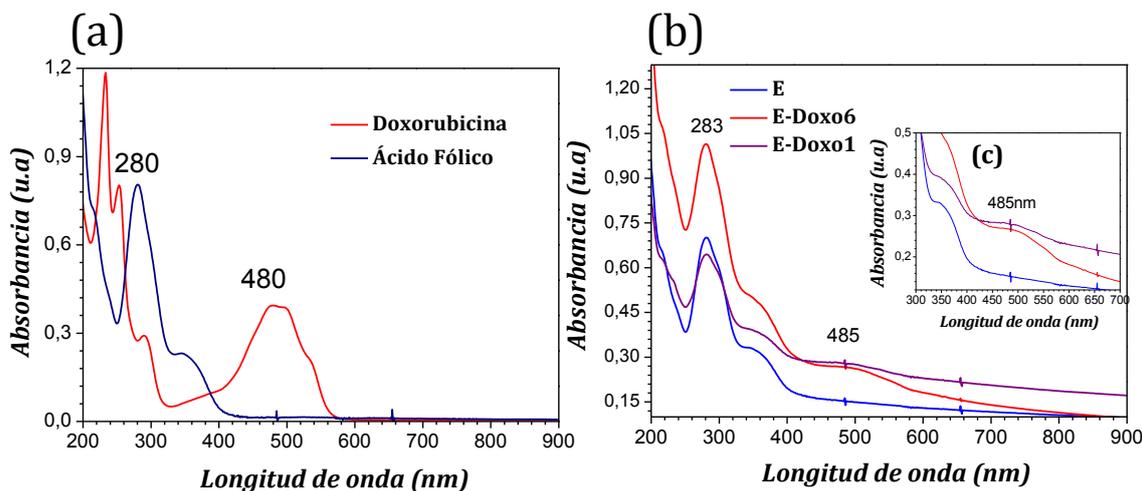


Figura 5.8 (a) Espectros Uv-Vis de soluciones de AF y Doxo (b) Espectros UV-Vis de E, E-Doxo1 y E-Doxo6. (c) magnificación de (b) en la región entre 300 y 700nm.

En la figura 5.8(b) y 5.8(c) se comparan los espectros obtenidos empleando dispersiones acuosas formadas a partir de 1mg de nanopartículas/25 mL de AB. Se observa que los espectros de las tres formulaciones analizadas, E, E-Doxo1 y E-Doxo6 exhiben una señal intensa alrededor de los 283nm, confirmando la presencia de AF en todas ellas. Por otro lado, en los espectros de E-Doxo1 y E-Doxo6 se evidencia además un pequeño hombro alrededor de los 485nm que se podría atribuir a la droga adsorbida[18],[43,44].

Para ambas moléculas, AF y Doxo, se calcularon los coeficientes de extinción (ξ) a partir de las soluciones acuosas, en base a la información brindada en la referencia[45]. Los valores obtenidos fueron $26700 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ para el AF y $10666 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ para Doxo, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura[46]. Por lo tanto, podría indicarse que la elevada proporción de AF y el mayor valor de ξ contribuyen a las diferencias observadas, en términos de la intensidad de la señal a 485nm, cuando se analizan los espectros UV-visible de E-Doxo. Estos resultados han sido reportados previamente por otros investigadores para nanosistemas que contienen en su estructura ambas moléculas[23],[30].

En la figura 5.9 se presentan comparativamente dispersiones de MAG@APTS, E, E-Doxo1 junto con una solución de Doxo pura. La evidente variación del color de las dispersiones que se observa en la imagen permite corroborar la incorporación del fármaco.

MAG@APTS E E-Doxo1 Doxo



Figura 5.9 Dispersiones de MAG@APTS, E y E-Doxo1. Comparativamente se muestra una solución de Doxo pura.

En la figura 5.10 se grafican los datos de contenido de Fe determinado por EAA para MAG, MAG@APTS, E y E-Doxo1, esta última como ejemplo de las formulaciones con el fármaco adsorbido. La disminución del contenido de Fe es una clara señal de la incorporación de Doxo a la superficie de E.

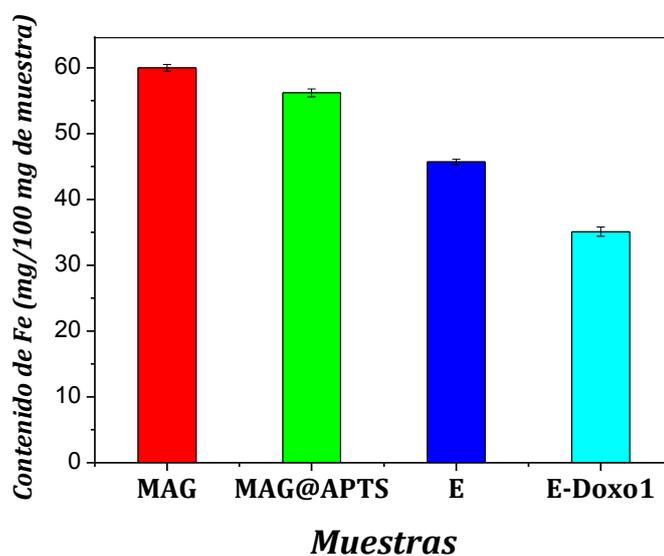


Figura 5.10 Composición de las NPMs, en términos del contenido de Fe.

El DH, determinado por DLS y el valor de ζ pot son dos propiedades sensibles a los cambios que se producen en la superficie de las nanopartículas debido, por ejemplo a la adsorción de una droga (Doxo en este caso).

Se emplearon para realizar las medidas de DLS y ζ pot dispersiones acuosas de nanoformulaciones con valores de pH cercanos al fisiológico (7.4). En la tabla 5.2 se registran los valores obtenidos para estos dos parámetros. Es importante remarcar que todas las muestras mostraron valores de IPD inferiores a 0.5.

Tabla 5.2. Datos DH medio (nm) y ζ pot (mV) de las diferentes nanoformulaciones en medio acuoso. %EC y %CC

Muestra	Relación nominal inicial Doxo/nanopartícula	DH medio (nm)	ζ pot (mV), pH:7.4	%EC	% CC
MAG	-----	254.6 ± 9.8 IPD: 0.245±0.030	-35.5 ± 3.70	-----	-----
MAG@APTS	-----	357.0 ± 8.2 IPD: 0.339 ± 0.025	-6.3 ± 1.70	-----	-----
MAG@APTS-Doxo	1/10	762.2 ± 5.3 IPD: 0.431 ± 0.037	-5.5 ± 0.12	0.0	0.0
E	-----	454.0 ± 12.6 IPD: 0.204 ± 0.090	-37.5 ± 0.20	-----	-----
E-Doxo0.5	0.5/10	890.4 ± 22.3 IPD: 0.139 ± 0.100	-30.1 ± 1.20	76.0 ± 3.8	6.9 ± 0.3
E-Doxo1	1/10	467.2 ± 2.9 IPD: 0.250 ± 0.036	-31.4 ± 0.15	62.4 ± 3.1	4.1 ± 0.2
E-Doxo2	2/10	699.1 ± 21.4 IPD: 0.100 ± 0.034	-31.6 ± 0.40	16.3 ± 0.8	3.0 ± 0.1
E-Doxo6	1/10	573.7 ± 20.2 IPD: 0.392 ± 0.029	-26.5 ± 0.10	95.0 ± 1.9	7.5 ± 0.1

Como se indicó en capítulos anteriores, el DH de las nanopartículas cuyo objetivo final es su aplicación en biomedicina, no debería ser inferior a 10 nm ya que las mismas podrían ser fácilmente removidas del organismo cuando la sangre es filtrada por el riñón. Por otro lado, es esperable que partículas muy grandes sean rápidamente captadas por órganos del sistema retículo endotelial (hígado y bazo) lo cual disminuye su tiempo de circulación en sangre y dificulta su llegada a la zona de interés[47].

En lo que respecta a la carga superficial, todas las nanoformulaciones presentaron valores negativos de ζ pot a pH=7.4. Como se hizo referencia en los

capítulos anteriores, nanopartículas con valores negativos o neutros son las de preferencia en términos de las posibles interacciones que pueden darse en el entorno biológico (células, tejidos, etc.)[48].

En la tabla se observa que las nanoformulaciones obtenidas en AB, registraron pequeños aumentos en el valor de ζ_{pot} como consecuencia de la adsorción del fármaco a la superficie de E. No obstante, los valores de ζ_{pot} permanecieron constantes independientemente de la relación nominal inicial Doxo/E empleada. Por otro lado, al observar el dato de ζ_{pot} correspondiente a E-Doxo6, se aprecia una marcada variación del mismo respecto del valor informado para E.

En cambio, las diferencias son imperceptibles al comparar el ζ_{pot} de MAG@APTS y MAG@APTS-Doxo.

Los datos incluidos en la tabla 5.2, en conjunto con los espectros obtenidos por las técnicas espectroscópicas de FTIR y UV-Visible, indicarían la existencia de distintos tipos de interacciones entre la superficie de E y Doxo; algunas de las cuales se intensificarían con la variación del pH del medio de reacción. Esta discusión se profundizará más adelante en este capítulo cuando se analice el mecanismo de reacción.

5.3.2 Efecto de las condiciones experimentales sobre la eficiencia y capacidad de carga de Doxorubicina

5.3.2.1 Cinética de adsorción de Doxorubicina. Determinación del tiempo óptimo de reacción.

Con el fin de determinar el tiempo de reacción necesario para asegurar la mayor adsorción de Doxo a la superficie del nanotransportador E, se implementó un método indirecto ampliamente reportado en la literatura[22],[35],[49]. En la figura 5.11 se muestra la variación de la cantidad de droga adsorbida en función del tiempo de reacción.

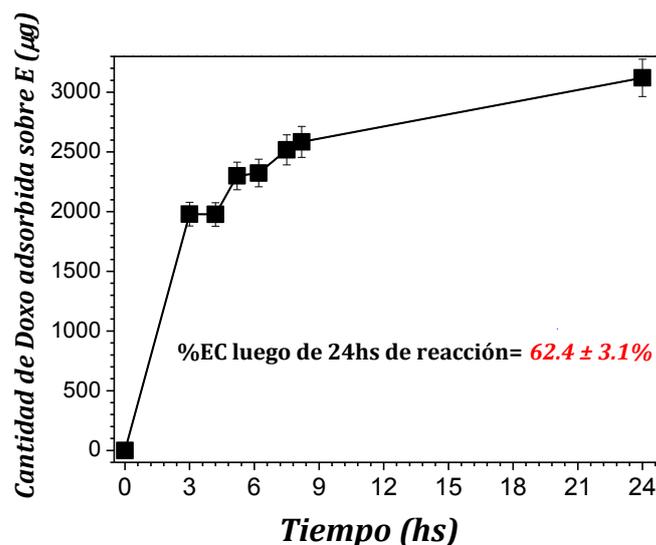


Figura 5.11 Cantidad de Doxo (µg) adsorbida sobre la superficie de E en función del tiempo de reacción en hs.

A partir de lo observado en la figura, puede inferirse que la cantidad de droga incorporada se incrementa a medida aumenta el tiempo de incubación de las NPMs en la solución de la droga, alcanzando un valor de %EC máximo de 62.4% para el caso de la muestra E-Doxo1, cuando el tiempo de reacción es de 24 hs. Por lo tanto, este tiempo se seleccionó como óptimo para la obtención del resto de las formulaciones.

La información encontrada en la literatura científica, es muy variada en relación a la cinética de adsorción de un fármaco a distintas superficies. Se adoptó en este caso 24 hs en concordancia con numerosos trabajos basados en NPMs que se han cargado con diferentes drogas[32],[49,50].

5.3.2.2 Influencia de la concentración inicial de Doxorubicina sobre el %EC y %CC.

Se llevaron a cabo tres experiencias diferentes de adsorción de Doxo sobre E en AB, con el objetivo de analizar la influencia de la cantidad nominal inicial de droga incubada con la eficiencia de carga de la misma por parte de E. Como se describió anteriormente en la sección 5.2.2, variando únicamente las relaciones nominales iniciales, masa de Doxo/masa de E, (05/10, 1/10, 2/10) se obtuvieron 3 formulaciones nombradas E-Doxo0.5, E-Doxo1 y E-Doxo2 respectivamente. En la figura 5.13 se incluyen los datos de %EC y %CC para todas las formulaciones

obtenidas.

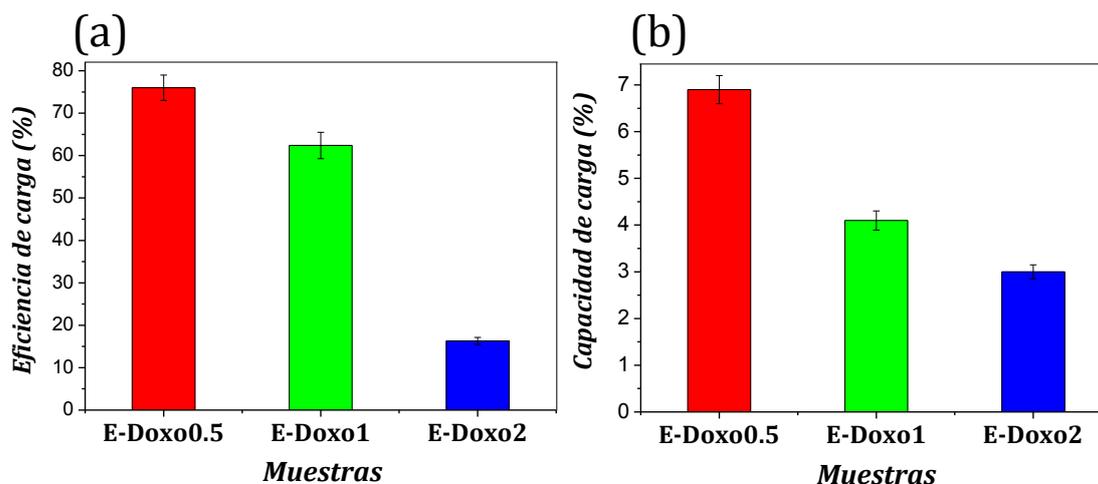


Figura 5.12(a) Eficiencia de carga y (b) capacidad de carga en función de la cantidad inicial de droga puesta en contacto con E.

Los datos de %EC y %CC presentados en el gráfico se encuentran en línea con los reportados en la literatura[22],[35],[51,52]. Estos datos muestran además que la relación Doxo/E=0.5/10, conduce al valor más elevado de %EC cuando la adsorción tiene lugar en AB. Los mismos sugieren, además, que incrementando la cantidad nominal de Doxo, no se obtienen mejoras significativas en los valores de %EC y %CC. En otras palabras, existe una máxima cantidad de Doxo que puede adsorberse a la superficie de E bajo las condiciones de reacción fijadas. Esta tendencia ha sido reportada por otros autores trabajando con sistemas similares[32],[55] y podría atribuirse a la saturación de los sitios reactivos en la superficie de E. Este resultado está en línea con la tendencia que se observa en los valores de DH.

5.3.2.3 Influencia del pH del medio sobre el %EC y %CC.

Con el fin inducir interacciones de tipo electrostáticas, entre la droga y E, se realizó la adsorción a un pH ajustado en 6, y se compararon los resultados con los obtenidos empleado AB pH 3.5, empleando en ambos casos la misma relación de Doxo/E (1/10)[43]. En la figura5.13 se muestran los valores de %EC y %CC correspondientes a E-Doxo1 (obtenida en AB) y E-Doxo6 (obtenida en PBS).

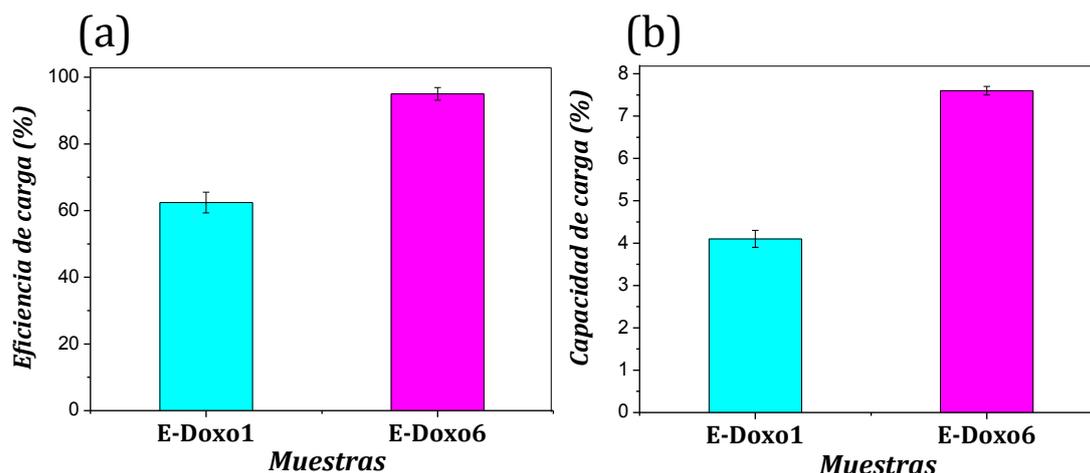
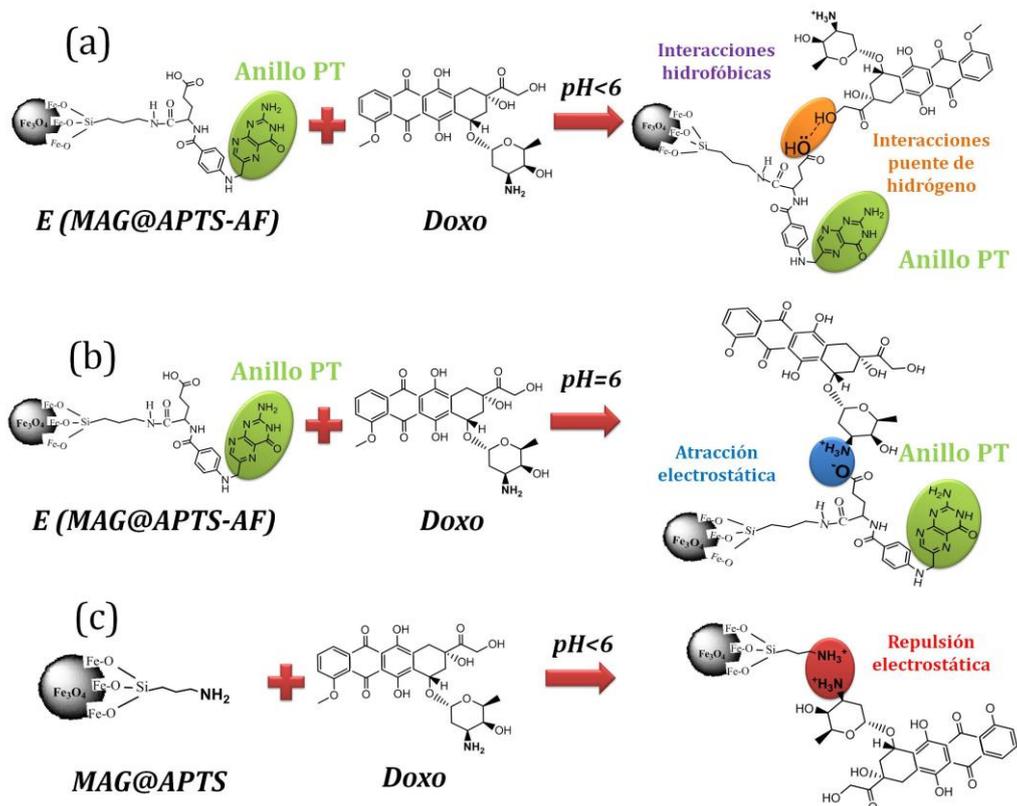


Figura 5.13 (a) Eficiencia de carga y (b) capacidad de carga en función de del pH del medio de reacción.

Los datos indican que la adsorción está fuertemente influenciada por el valor del pH del medio en donde tiene lugar la reacción. En la siguiente sección se propone una justificación para este resultado.

5.3.3 Mecanismo propuesto para la adsorción Doxo sobre E

El conjunto de datos obtenidos a partir de la caracterización completa de las nanoformulaciones E-Doxo y MAG@APTS-Doxo, permitió postular mecanismos probables de interacción entre la superficie del nanotransportador y el fármaco. Estos se ilustran en el esquema 5.3



Esquema 5.3. Mecanismos propuestos para las posibles vías de incorporación del fármaco a las distintas nanoformulaciones exploradas.

Las reacciones de adsorción de Doxo se realizaron en AB y en PBS pH=6. La estructura química predominante del fármaco a pH=6 se presenta en la figura 5.14

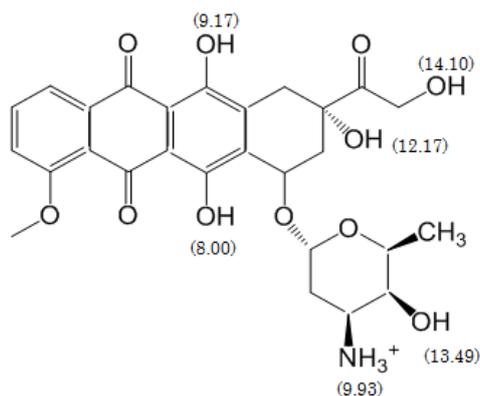


Figura 5.14. Estructura química predominante de Doxorubicina a pH=6. Entre paréntesis se señalan los valores de pKa de cada grupo funcional a temperatura ambiente [54].

En el caso de las experiencias realizadas en agua, el empleo de la droga ácida modificó el pH del AB de 5.5 a 3.5. A este valor de pH el ζ pot de las

nanoformulaciones “E” es 8.8 mV. Por otro lado, a partir de lo mostrado en la figura 5.14, en soluciones con pH inferiores a 7 a temperatura ambiente, el fármaco se encuentra con todos sus grupos protonados. Podría establecerse entonces que bajo estas condiciones de reacción, interacciones tipo puente de hidrógeno entre los grupos OH de la Doxo y los grupos COOH de AF superficial serían los responsables de la incorporación del fármaco, junto con posibles interacciones hidrofóbicas[40]. Esto justificaría, parcialmente, que los valores de ζ_{pot} permanezcan prácticamente invariables ante incrementos de la masa nominal de Doxo inicial. Como se indicó en la **sección 5.3.2.2**, la menor relación de masa Doxo/E (0.5/10), condujo a una mayor eficiencia de adsorción del fármaco en AB. Esto podría asociarse como se comentó anteriormente a la saturación de los sitios reactivos en la superficie de E[32],[53].

El ajuste del pH del medio usando una solución amortiguadora, dio lugar a nanopartículas E con el grupo COO^- (del AF) disponible (ζ_{pot} a pH=6, -29.6 mV). Se podría establecer entonces que interacciones de tipo electrostáticas entre los grupos aminos protonados (NH_3^+) de la molécula de droga y los grupos carboxilatos (COO^-) presentes en la superficie de E serían, en este caso, los principales responsables de la adsorción de la Doxo. Esto explica la marcada disminución del ζ_{pot} de E-Doxo6 respecto de E, asociado a la neutralización parcial de las cargas negativas de la superficie de E por la Doxo catiónica[55].

En el caso de la adsorción de Doxo a MAG@APTS, esta sólo se realizó en AB. El valor de ζ_{pot} registrado para MAG@APTS a pH 3.5 fue de +50 mV, debido a la protonación de los grupos aminos presentes en la superficie de MAG@APTS. Por lo tanto, las importantes fuerzas de repulsión entre la Doxo totalmente protonada y las nanopartículas con carga positiva impidieron la adsorción del fármaco sobre la superficie de MAG@APTS.

Es importante remarcar que en todos los espectros UV-Vis obtenidos a partir de dispersiones de las diferentes E-Doxo sólidas, se observó la presencia de la banda de absorbancia a 283 nm, asociadas al anillo PT de la molécula de AF. Esto permite asumir que el proceso de carga de la droga a la superficie de E no afectaría a los grupos funcionales del AF comprometidos en la función de selectividad del mismo frente a los receptores folato, descrita previamente en la **sección 4.1 del Capítulo IV**.

5.3.4 Estudio de liberación de Doxorubicina cargada en E-Doxo.

Se estudió la liberación *in vitro* de Doxo utilizando la mejor formulación de E-Doxo obtenida a partir de los ensayos previos, esto es, la formulación con mayor contenido de droga y propiedades fisicoquímicas adecuadas, **E-Doxo6**

5.3.4.1 Efecto del pH

Con el objetivo de simular de la manera más fehacientemente posible la ruta que siguen las NPMs de E-Doxo una vez administradas por vía endovenosa, se incubó una única muestra de E-Doxo primero en PBS pH 7.4, y posteriormente en buffer acetato, pH 4.9. De esta forma, en el primer caso se simuló la circulación de las E-Doxo por el torrente sanguíneo, mientras que el medio con pH ácido emuló el acceso de las nanopartículas al endosoma/lisosoma tumoral[56].

En la figura 5.15(a) se muestra el perfil de liberación de Doxo a partir de E-Doxo en un medio de pH 7.4.

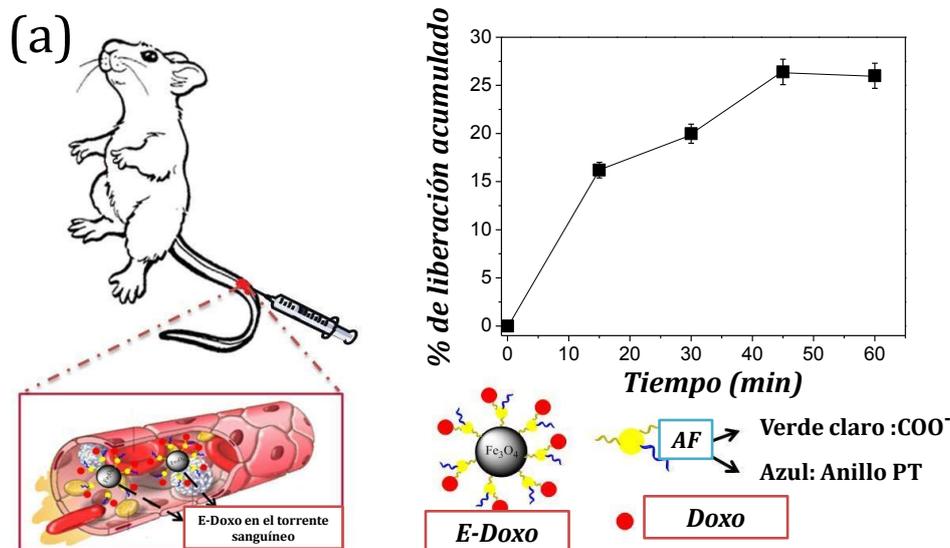


Figura 5.15 (a). Esquema ilustrativo de las NPMs en el torrente una vez inyectadas en el modelo animal y el perfil de liberación de Doxo a partir de E-Doxo a pH 7,4.

Analizando los datos, se observa que durante los primeros 15 min la cantidad de Doxo liberada aumenta rápidamente (efecto “burst” ó de ráfaga). El porcentaje máximo de liberación registrado fue de 26.4±1.3 % y se alcanzó luego de 45 min de ensayo, manteniéndose constante por los siguientes 15 min. La duración de la experiencia se fijó en 60 min teniendo en cuenta los datos reportados en la

literatura. Algunos investigadores han reportado que cuando nanosistemas magnéticos son inyectados en el torrente sanguíneo, se necesitan entre 30 y 60 min para lograr su focalización en el sitio blanco, bajo la influencia de un campo magnético externo. Este tiempo es variable dependiendo del modelo animal empleado y las propiedades fisicoquímicas de las NPMs[24],[57,58].

Como fue descrito en la sección experimental, luego de 1 h de experiencia a pH 7.4 y 37°C, se decantaron las partículas de E-Doxo usando un imán de NdFeB y el medio se reemplazó por buffer acetato, pH 4.9. En la figura 15(b) se muestra el perfil de liberación del fármaco desde E-Doxo a pH 4.9 junto con un esquema que representa el ingreso de las nanopartículas a las células tumorales y la posterior liberación de Doxo.

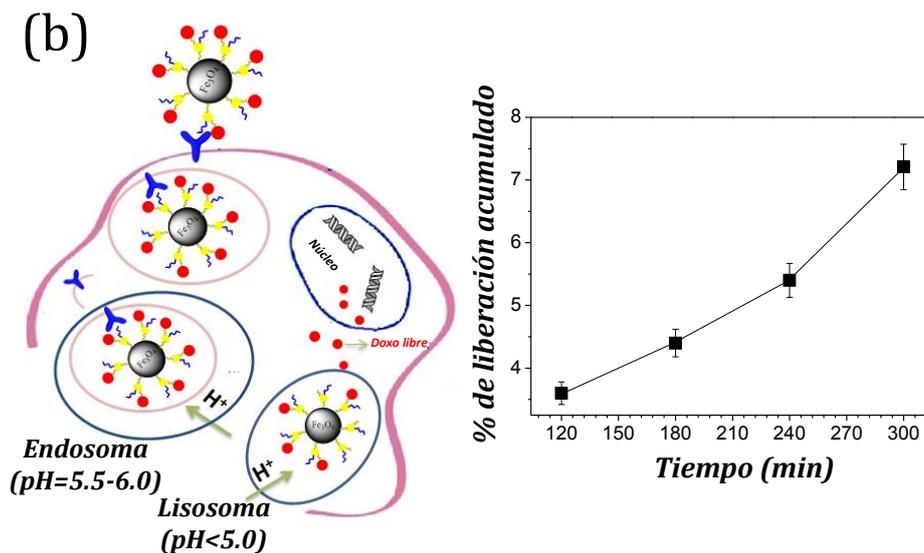


Figura 5.15 (b) Esquema de ingreso de E-Doxo a las células tumorales y el perfil de liberación de Doxo a pH 4.9.

En el gráfico de la figura se observa un incremento de la liberación de Doxo en función del tiempo de ensayo, obteniéndose valores de liberación acumulada de alrededor de $7.2 \pm 0.7\%$ luego de 4 hs de experiencia. El tiempo de duración de esta segunda etapa se fijó en base a los datos informados en la literatura relacionados con los estudios celulares *in vitro* de captación de fármacos.

Agustin y col. investigaron el proceso de captación y muerte celular de células de colon humano HT29 en presencia de conjugados formados por nanopartículas de óxido de hierro y Doxo. En este caso, estimaron que el tiempo de tratamiento óptimo

con la nanoformulación para lograr una penetración satisfactoria del fármaco en las células HT29 fue de alrededor de 2 hs[57].

Por otro lado, Mosafer y col. sintetizaron nanopartículas basadas en ácido polilactico-co-glicólico cargados con óxido de hierro superparamagnético y Doxo, y funcionalizados con el aptámero AS1411. Estos investigadores realizaron experimentos de captura celular del fármaco empleando citometría de flujo y fijando el tiempo de ensayo en 4 hs[59].

Al momento de analizar el perfil de liberación de Doxo a ambos pH es importante tener en cuenta, la presencia del AF en la formulación E-Doxo y la interacción directa AF-Doxo que se describió en la sección anterior. Un factor importante que afecta la cinética de liberación de Doxo relacionado con la presencia de AF, es la solubilidad del mismo en el medio de incubación. Se ha reportado que el AF es soluble en medios acuosos de pH entre 6.0 y 9.8. Sin embargo, su solubilidad decrece cuando el pH es menor o igual a 5.0[60,61].

Acevedo-Fani y col. sintetizaron nanoláminas de alginato/quitosano a las cuales le incorporaron AF, con el fin de obtener una formulación que permitiese mejorar la estabilidad y el rendimiento funcional de esta vitamina en una amplia gama de productos alimenticios. Entre los múltiples ensayos descritos en este trabajo, se encuentra el estudio de la influencia del pH en la liberación AF. Los resultados publicados indican que a pH 3, se liberó el 22% del AF después de 7 hs de ensayo, mientras que se observó una liberación del 100% a pH 7. Estos investigadores justificaron los datos obtenidos en función de la solubilidad del AF. A pH 7 la vitamina se libera de las nanoláminas debido a su alta solubilidad, mientras que a pH 3 la misma permaneció en la estructura independientemente del tiempo de incubación, probablemente formando complejos insolubles dentro de las láminas[62].

Por otro lado, se ha reportado que en condiciones ácidas y a temperatura fisiológica, los grupos aminos de Doxo y los grupos carboxilatos del AF se protonan lo que podría inducir una disociación parcial de las interacciones entre ambas moléculas permitiendo la liberación gradual de Doxo[43].

Con esta información, se pudo inferir que la liberación del fármaco observada a pH=7.4 estaría gobernada en su mayor medida por la pérdida de AF y

consecuentemente de la droga unida a este. Sin embargo, a pH 4.9 la liberación registrada sería consecuencia de la desorción del fármaco en sí mismo y estaría menos influenciada por la liberación del AF.

En base a los estudios *in vivo*, realizados en ratones, descritos en el trabajo de Jaimes-Aguirre y colaboradores[23], es importante remarcar que aunque se pierden pequeñas cantidades de AF a pH 7.4, el remanente que permanece en la superficie de las NPMs sería suficiente para la captación selectiva de las mismas por parte de las células que sobreexpresan receptores de folato en su superficie. La pérdida de AF constituye un factor reportado para nanosistemas de estas características, sin embargo, en función de la información disponible en la literatura, esa pérdida no restringe la propiedad de selectividad hacia los receptores folato[63,64].

Por último, si bien parte del fármaco se libera a pH de 7.4, este es un porcentaje que concuerda con los valores reportados por otros investigadores en la bibliografía[18],[22],[32]. Además, en comparación con la administración de droga libre se estaría disminuyendo, en teoría, un 70% el contenido de fármaco en el plasma sanguíneo, contribuyendo a la disminución de la exposición inespecífica de células normales al fármaco. Respecto al porcentaje de liberación acumulada de Doxo a pH 4.9, se podría indicar que si bien en apariencia es poco significativo, se llegarían a alcanzar los niveles de droga necesarios para inducir muerte celular, de acuerdo con reportes de la literatura que incluyen modelos *in vivo*[24]. Esto se retomará en el ***Capítulo VII*** cuando se analice, *in vitro*, el efecto de la nanoformulación E-Doxo sobre la viabilidad de células de la línea celular HCT 116 (derivadas de cáncer de colon humano).

5.3.4.2 Efecto de la presencia de un campo magnético externo.

Con el fin de simular la presencia de un campo magnético externo como estímulo y herramienta de vectorización activa, se repitieron los ensayos de liberación de la droga a partir de E-Doxo. En este caso se realizaron, en paralelo, dos estudios de liberación en buffer acetato. Uno en ausencia y otro en presencia de un imán de NdFeB de 5 mm de diámetro y 3 mm de espesor y potencia de 0.3 Tesla (T). Se seleccionó para el ensayo el medio de pH 4.9, ya que una vez que las NPMs son inyectadas en el torrente sanguíneo, están sometidas a una mayor exposición al

campo magnético una vez que alcanzan al sitio blanco[24],[65].

En la figura 5.16 se muestran el perfil de liberación en ausencia del campo magnético externo y el obtenido en presencia de este.

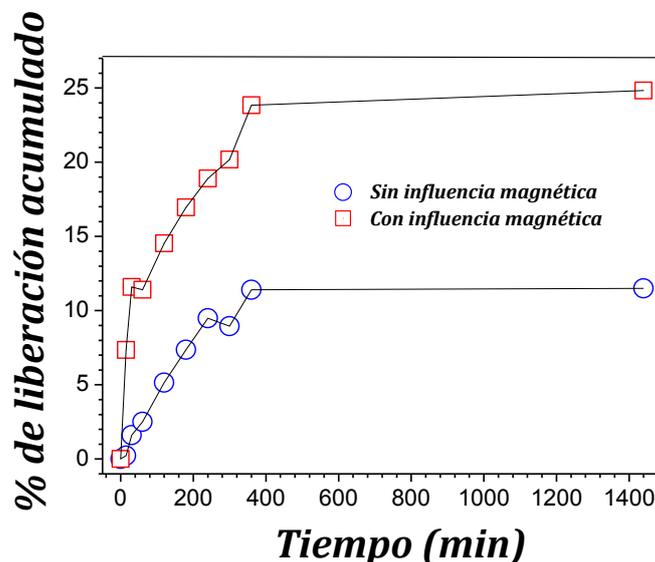


Figura 5.16. Perfil de liberación de Doxo a partir de E-Doxo.

Los perfiles obtenidos muestran que en ambos casos se produjo un aumento gradual del porcentaje de liberación de Doxo con el tiempo hasta la sexta hora de ensayo. Los porcentajes máximos de droga liberada, luego de 24 hs, fueron de $11.50 \pm 0.15\%$ y $25.96 \pm 0.32\%$ para los estudios realizados en ausencia y presencia del campo magnético externo, respectivamente. A diferencia de los datos presentados anteriormente (figura 5.15 (b)), este ensayo se realizó a 24 hs y sin agitación magnética tomando como referencia datos informados en la literatura relacionados con los estudios de liberación de fármacos en presencia de un campo magnético externo estático[37],[49],[66].

Como se comentó en la introducción de este capítulo los primeros estudios respecto a la influencia de la aplicación de campos magnéticos externos se realizaron empleando un campo magnético de corriente alterna (ACMF: *alternating current magnetic field*). Reportes publicados en la literatura científica, señalan un incremento de la liberación del fármaco a partir de una nanoformulación magnética, cuando la misma es sometida al efecto de un ACMF. Por ejemplo, Fang y col. desarrollaron microesferas de PLGA en las que encapsularon Doxo y sobre las cuales adsorbieron electrostáticamente NPMs de maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$). Estos investigadores

reportaron que la liberación del fármaco desde la nanoformulación se incrementó significativamente. Puntalmente encontraron que en ausencia de ACMF se liberaba de forma acumulativa el 2.8% mientras que el porcentaje de liberación acumulativo ascendía a 21.6% mediante la aplicación de un ACMF de 390 kHz durante 30min. Según se informa en este artículo, dos factores podrían estar asociados con este comportamiento: i) La disipación de la energía magnética de las NPMs por la relajación de Néel y Brown que experimentan cuando se encuentran bajo la influencia de ACMF, genera calor en puntos específicos del recubrimiento polimérico (“*hot spots*”) causando la ruptura del PLGA. ii) el aumento de la temperatura por encima de T_g (temperatura de transición vítrea) provoca una transición térmica del polímero del estado vítreo a un estado amorfo. Esto aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas y consecuentemente de las moléculas del fármaco. Además el polímero sería, en este estado, más susceptible a la ruptura de sus cadenas, lo cual causaría un aumento de la hidrólisis del mismo favoreciendo la difusión de la droga fuera de la nanoformulación[33]. Resultados similares ya habían sido reportados en 2002 por Babincová y col. quienes estudiaron la influencia de la aplicación de un ACMF sobre la liberación de Doxo a partir de magnetoliposomas[67] y observaron que el calor liberado como consecuencia de la relajación de Néel experimentada por las NPMs era transferido al lípido circundante, calentándolo por encima de su temperatura de transición (42°C) y promoviendo la rápida liberación de la droga.

Por otro lado, Shang-HsiuHu y colaboradores, evaluaron el efecto de la presencia de un campo magnético de alta frecuencia (HFMF: *high-frequency magnetic field*) sobre la liberación de ibuprofeno (Ibu) a partir de nanoesferas de sílica magnética. Los resultados informados muestran que el HFMF acelera la rotación de las nanopartículas magnéticas depositadas en la matriz de sílice generando calor y modificando la nanoestructura de la matriz. Esto lleva a la formación de canales porosos que permiten que el fármaco se libere con mayor facilidad[34].

Aunque los trabajos reportados en la literatura y descriptos en los párrafos anteriores brindan información valiosa sobre las causas del aumento en la liberación como consecuencia de la presencia de un campo magnético y la posibilidad de combinar terapias de hipertermia y liberación controlada de fármacos, no permitirían justificar el comportamiento observado en este apartado del capítulo. En

un trabajo reciente, XinyuHu y col. estudiaron la influencia de un imán de 0.2 T de potencia en la liberación de Doxo a partir de un hidrogel compuesto por un copolímero de salean- γ -poli(ácido vinilacetico-co-2-hidroxietil acrilato) [poly(VA-co-HEA)] y nanopartículas de Fe_3O_4 @Agarosa. Estos investigadores señalan que bajo la influencia de SEMF la liberación de Doxo aumenta 1.2 veces respecto de la concentración liberada en ausencia de SEMF. Ellos atribuyen este resultado a la alineación de las NPMs con el campo magnético cuando son expuestas al SEMF. El movimiento de agitación producido por las NPMs provocaría un aumento de la relajación de las cadenas poliméricas expandiendo el tamaño de los poros de la red y generando deformaciones en el gel. De este modo, las moléculas de Doxo inmersas podrían difundir con mayor facilidad a través de la matriz del hidrogel[36].

Petri y col. sintetizaron hidrogeles de alginato (Alg) y goma xantana (XG) modificados con NPMs de MAG, para la administración de levodopa. Estos investigadores estudiaron comparativamente la liberación de levodopa a partir de geles de Alg, Alg-XG, Alg/NPMs, y Alg-XG/NPMs. Observaron que en ausencia de un SEMF, no había diferencias significativas entre los perfiles de liberación del fármaco obtenidos a partir de los cuatro films estudiados. Sin embargo, cuando el ensayo de liberación se realizó en presencia de SEMF (0.4 T), encontraron un incremento de 1.26 y 1.42 veces en la liberación de levodopa a partir de Alg/NPMs respecto de Alg y de ALG-XG/NPMs respecto de Alg-Xg, respectivamente. La explicación brindada indica que, como consecuencia de la aplicación de SEMF, la orientación de los dipolos magnéticos genera vibraciones en el interior del gel, provocando compresión y estiramiento local del mismo, estimulando la liberación de la droga[68]. Investigadores del mismo grupo, analizaron el efecto del SEMF en la liberación de amoxicilina a partir de parches basados en goma xantana-NPMs-albúmina, encontrando resultados similares[38].

Por otro lado, Marín y col. obtuvieron films de gelatina y de gelatina/magnetita a los cuales incorporaron el antiinflamatorio acetaminofén (conocido en Argentina como Paracetamol). Evaluaron la influencia de la presencia de un SEMF (constituido por imanes permanentes de NdFeB: neodimio, hierro y boro) y la intensidad de dicho campo en liberación del fármaco a través de experimentos de difusión. Indicaron al comparar la liberación de acetaminofén a partir de los films de gelatina y gelatina/magnetita en ausencia de un SEMF, que la

liberación del fármaco es mayor a partir del film no magnético. No obstante, frente a la aplicación de SEMF la mayor liberación lo observan a partir del film de gelatina/magnetita. Más aún, reportan que cuando se aumenta el campo magnético aplicado (de 0.3 T a 0.5 T), aumenta el porcentaje de fármaco liberado. Justifican estos datos en términos del comportamiento de las nanopartículas magnéticas en el interior del film de gelatina. En ausencia del SEMF las NPMs actúan como una barrera disminuyendo la difusión de la droga a través del film. Por otro lado, cuando se aplica un SEMF el momento magnético de las NPMs se alinea con el campo abriendo los canales de difusión y favoreciendo la liberación del fármaco. Además estos investigadores relacionan el aumento de la liberación con el aumento del SEMF a la magnetización a saturación de dicho film. Para ello, evalúan la curva de magnetización-demagnetización de gelatina/magnetita y encuentran que el valor de M_s lo alcanzan alrededor de 0.38 T. Con este dato concluyen que cuanto mayor es la fuerza del campo aplicado (0.5 T) mayor la cantidad momentos magnéticos de NPMs alineados con el campo. Esto lleva a que menos NPMs se encuentren bloqueando la difusión de la droga y por ende aumente su liberación[37].

En cuanto a la información bibliográfica recolectada respecto al empleo de un campo magnético estático, se puede indicar que además de que todos los estudios son de reciente publicación (año 2018), en todos los casos se indica la liberación de droga encapsulada a partir de una nanoformulación polimérica o de un film. No se han encontrado reportes sobre la influencia de un campo magnético en la liberación de un fármaco adsorbido físicamente a la superficie de NPMs

Es por lo expuesto que, sobre la base de la bibliografía consultada se propone que, en nuestro caso, la presencia del imán de NdFeB durante el ensayo de liberación provocaría un movimiento de las nanopartículas magnéticas favoreciendo la disociación del ácido fólico por un lado y, por ende, promoviendo la desorción de la Doxo. De acuerdo a los datos de la literatura, este movimiento de rotación y alineamiento se intensifica en los primeros minutos de contacto con el imán[34], lo que se traduce en una liberación brusca de la droga (efecto de ráfaga) observado en la primera hora. Además, se ha reportado que la presencia de un campo magnético externo afectaría la disposición de los dipolos del agua, incrementando la hidratación de las especies catiónicas y aniónicas[69]. De esta manera, a pH 4.9 el incremento de la hidratación de la Doxo con el grupo amino protonado y de los carboxilatos que aún

quedan sobre la superficie de E podrían contribuir a una disminución de la intensidad de las fuerzas electrostáticas que operan entre ellos favoreciendo la liberación de la droga.

5.4- Conclusiones

- Los datos obtenidos a partir de la caracterización permiten indicar que todas las condiciones de reacción analizadas aseguraron la adsorción del fármaco a la superficie del nanotransportador E. Sin embargo, se logró obtener la nanoformulación con mayor incorporación de fármaco y con las características fisicoquímicas adecuadas a partir de las siguientes variables: (i) relación nominal Doxo/E=1/10, (ii) pH=6 y (iii) tiempo de reacción 24hs. Por lo tanto, la muestra E-Doxo6 se seleccionó para continuar con los estudios *in vitro* e *in vivo* que se han incluido en el Capítulo VII.

- Se estableció que, a valores bajos de pH y temperatura ambiente, interacciones de tipo puente de hidrogeno entre los grupos carboxilos del AF y los OH de Doxo serían las responsables de la adsorción del fármaco a la superficie de E. Mientras que, cuando la adsorción se realizó en un medio de pH 6, las interacciones electrostáticas gobernarían la adsorción. Por otro lado, bajo las condiciones de reacción analizadas, no se produjo adsorción de Doxo a la superficie de MAG@APTS. Esta información permitió plantear un mecanismo probable de incorporación del fármaco al nanotransportador E.

- La incorporación del fármaco no compromete al anillo PT de la molécula de AF. Esto indicaría, al menos en teoría, que la capacidad del AF para unirse a los receptores folatos sobreexpresados en la superficie de células tumorales no se vería afectada. Es decir, que la selectividad del nanotransportador no se perdería por la adsorción de Doxo.

- De acuerdo a los resultados de la evaluación de la influencia del pH en la liberación, aproximadamente el 7.2±0.7% del total del agente terapéutico administrado se libera una vez alcanzado el sitio blanco. Esta dosis de Doxo sería suficiente para asegurar la muerte de células tumorales.

- El estudio de la liberación en presencia de un SEMF aumentó 2.4 veces el porcentaje acumulativo de fármaco liberado en comparación con la liberación en

ausencia del imán. Se verificó el estímulo del campo magnético no solo para la vectorización sino para inducir la liberación de la droga.

• En conjunto, los resultados presentados en este capítulo permiten poner de manifiesto el potencial de la formulación E-Doxo como agente terapéutico dado que cuenta con capacidades de diagnóstico, transporte y liberación controlada del fármaco terapéutico.

5.5 Agradecimientos.

Al Dr. Ariel Zwenger, jefe del servicio de oncología del Hospital Castro Rendón de la provincia de Neuquén, por la donación de las ampollas de Doxorubicina comercial empleadas en este trabajo de tesis.

5.6 Referencias del capítulo.

- [1] Hortobágyi, G. N. Anthracyclines in the Treatment of Cancer. *Drugs* 54 (1997) (Supplement 4), 1–7)
- [2] Khasraw M., Bell R., Dang C. Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *The Breast* 21, (2012) 142.
- [3] Di Marco A., Cassinelli G., Arcamone F. The discovery of daunorubicin, *Cancer Treat. Rep.* 65, (Suppl. 4) (1981) 3–8.
- [4] Von Hoff D.D., Layard M.W., Basa P., Davis Jr H.L., et al., Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure, *Ann. Intern. Med.* 91, (1979) 710–717.
- [5] Yang, F., Teves S.S., Kemp C.J., Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1845 (2014) 84–89
- [6] Patel, A.G., Kaufmann, S.H.,. How does doxorubicin work? *elifel* (2012) e00387.
- [7] Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L., Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.* 56, (2004) 185–229
- [8] Prospecto del fármaco DICLADOX®. Disponible en www.teva.com.ar/es/argentina/our-products/product-page-template/DICLADOX/
- [9] Shabalala S., Muller C.J.F., Louw J., Johnson R., Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity., *Life Sci.* 180, (2017) 160–170
- [10] Vicente-Hernández B, Sarre-Álvarez D, Rodríguez- Weber FL, Díaz-Greene EJ. Cardiotoxicidad por antracíclicos. *Med Int Méx* 31,(2015) 567-577
- [11] Velásquez C., González M., Berrouet M., Jaramillo N. Cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia desde las bases moleculares hasta la perspectiva clínica..*Rev Colomb Cardiol.* 23, (2016) 104-111
- [12] Cho K., Wang X., Nie S., Chen Z. y Shin Dong M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin Cancer Res.* 14, (2008)1310-1316.
- [13] Xu D., Xu T., Guo X., Liu Q., Liu J., Lv W., Wang J.. Effect of the synthesis method on the performance of Fe₃O₄-inositol hexaphosphate as a drug delivery vehicle for combination therapeutics with doxorubicin. *New J Chem.* 41,(2017), 5305–5312
- [14] Shafei A., El-Bakly W., Sobhy A., Wagdy O.,et al. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 95, (2017) 1209–1218.

- [15] Peng M., Li H., Luo Z., et al. Dextran-coated superparamagnetic nanoparticles as potential cancer drug carriers in vivo *Nanoscale* 7, (2015) 11155-11162.
- [16] Iglesias G.R., Delgado A.V., González-Caballero F., Ramos-Tejada M.M. Simultaneous hyperthermia and doxorubicin delivery from polymer-coated magnetite nanoparticles. *J. Magn. Mater.* 431, (2017) 294-296
- [17] Semkina A., Abakumov M., Grinenko N., Abakumov A. et al. Core-shell-corona doxorubicin-loaded superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for cancer theranostics. *Colloids Surf., B* 136, (2015) 1073-1080.
- [18] Sadighian S, Rostamizadeh K. Doxorubicin-conjugated core-shell magnetite nanoparticles as dual-targeting carriers for anticancer drug delivery. *Colloids Surf., B*. 117, (2014) 406-413
- [19] Banalata S., Sanjana K., Devi P., Dutta S. et al. Biocompatible mesoporous silica-coated superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for targeted drug delivery and MR imaging applications. *J. Colloid Interface Sci.* 431, (2014) 31-41
- [20] Sundaresan V, Menon J., Rahimi M., Nguyen K., et al. Dual-responsive polymer-coated iron oxide nanoparticles for drug delivery and imaging applications *Int. J. Pharm.* 466, (2014) 1-7
- [21] Gautier J., Allard-Vannier E., Munnier E., Soucé M., et al... Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *J. Controlled Release.* 169, (2013) 48-61
- [22] Verma, G., Shetake, N. G., Barick, K. C., Pandey, B. N., et al. Covalent immobilization of doxorubicin in glycine functionalized hydroxyapatite nanoparticles for pH-responsive release. *New J. Chem.* 42, (2018) 6283-6292
- [23] Jaimes-Aguirre L., Morales-Avila E., Ocampo-García B.E, Medina L.A., et al. Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide)/poly(L-γ-glutamic acid) nanoparticles conjugated to folic acid for targeted delivery of doxorubicin, *Mater. Sci. Eng. C*. 76, (2017) 743-751.
- [24] Lee K., David A.E., Zhang J., Shin M.C., et al. Yang, Enhanced accumulation of theranostic nanoparticles in brain tumor by external magnetic field mediated in situ clustering of magnetic nanoparticles, *J. Ind. Eng. Chem.* 54, (2017) 389-397
- [25] Sonker N., Bajpai J., Bajpai A. K. Magnetically responsive release of 5-FU from superparamagnetic egg albumin coated iron oxide core-shell nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol.* 47, (2018) 240-253
- [26]. Farazi R., Vaezi M.R, Molaei M.J., Saeidifar M., et al.. Effect of pH and temperature on doxorubicin hydrochloride release from magnetite/graphene oxide nanocomposites *Mater Today Proc.* 5, (2018) 15726-15732
- [27] Pistone, A., Iannazzo, D., Ansari, S., Milone, C., Salamò, M., Galvagno, S., et al. Tunable doxorubicin release from polymer-gated multiwalled carbon nanotubes. *Int. J. Pharm* 515, (2016) 30-36
- [28] Abasian, P., Radmansouri, M., Habibi, M., Ghasemi, M. V., et al. Incorporation of magnetic NaX zeolite/DOX into the PLA/chitosan nanofibers for sustained release of doxorubicin against carcinoma cells death in vitro. *Int. J. Biol. Macromol.* 121, (2019) 398-406
- [29] Liu Z., Liu J., Wang T., Li Q., et al. Switching off the interactions between graphene oxide and doxorubicin using vitamin C: combining simplicity and efficiency in drug delivery *J. Mater. Chem. B*. 6, (2018) 1251-1259
- [30] Pourjavadi A., Hosseini S.H., Alizadeh M., Bennett C., Magnetic pH-responsive nanocarrier with long spacer length and high colloidal stability for controlled delivery of doxorubicin, *Colloids Surf., B*. 116, (2014) 49-54
- [31] Huang Y., Mao, K. Zhang B., Zhao Y., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics, *Mater. Sci. Eng. C*. 70, (2017) 763-771.
- [32] Soares P.I.P, Sousa A.I., Ferreira I.M.M., Novo C.M.M., et al. Towards the development of multifunctional chitosan-based iron oxide nanoparticles: Optimization and modelling of doxorubicin release, *Carbohydr. Polym.* 153, (2016) 212-221.

- [33] Fang, K., Song, L., Gu, Z., Yang, F., Zhang, Y., & Gu, N. Magnetic field activated drug release system based on magnetic PLGA microspheres for chemo-thermal therapy. *Colloids Surf., B*. 136, (2015) 712–720
- [34] Hu S.-H., Liu T.-Y., Huang H.-Y., Liu D.-M., et al. Magnetic-Sensitive Silica Nanospheres for Controlled Drug Release. *Langmuir* 24, (2008) 239–244
- [35] Oliveira, H., Pérez-Andrés, E., Thevenot, J., Sandre, O., et al. Magnetic field triggered drug release from polymersomes for cancer therapeutics. *J. Controlled Release* 169, (2013) 165–170
- [36] Hu X., Wang Y., Zhang L., Xu M., et al. Magnetic field-driven drug release from modified iron oxide-integrated polysaccharide hydrogel. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, (2018) 558–567
- [37] Marín, T., Montoya, P., Arnache, O., Pinal, R., et al. Development of magnetite nanoparticles/gelatin composite films for triggering drug release by an external magnetic field. *Materials & Design*, 152, (2018) 78–87
- [38] Bueno P. V. A., Hilamatu K. C. P., Carmona-Ribeiro A. M., Petri, D. F. S. Magnetically triggered release of amoxicillin from xanthan/Fe₃O₄/albumin patches. *Int. J. Biol. Macromol.* 115, (2018) 792–800.
- [39] www.serviciofarmaciamanchacentro.es/images/stories/recursos/recursos/docinteres/fotosensibles_julio_2012.pdf
- [40] Kayal S., Ramanujan R. V. Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery, *Mater. Sci. Eng. C*. 30, (2010) 484–490
- [41] Azcona P., López-Corral I., Lassalle V., Fabrication of folic acid magnetic nanotheranostics: An insight on the formation mechanism, physicochemical properties and stability in simulated physiological media, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 537, (2018) 185–196
- [42] Yang S., Lin F., Tsai K., Wei M. et al. Folic Acid-Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.* 21, (2010) 679–689
- [43] Mehrad Fard S., Farhadian N., Rohani Bastami T., Ebrahimi M., et al. Synthesis, characterization and cellular cytotoxicity evaluation of a new magnetic nanoparticle carrier co-functionalized with amine and folic acid. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 38, (2017) 116–124.
- [44] Qin X. C., Guo Z. Y., Liu Z. M., Zhang, W., et al. Folic acid-conjugated graphene oxide for cancer targeted chemo-photothermal therapy. *J. Photochem. Photobiol., B* 120, (2013) 156–162
- [45] [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2248/2_-_Determinaci%C3%B3n_experimental_de_los_coeficientes_de_extinci%C3%B3n_molar_E_y_de_las_secciones_eficaces_de_absorci%C3%B3n_a_UV_de_una_serie_de_vinil_%C3%A9teres_en_distintas_fases.pdf?sequence=5](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2248/2/_Determinaci%C3%B3n_experimental_de_los_coeficientes_de_extinci%C3%B3n_molar_E_y_de_las_secciones_eficaces_de_absorci%C3%B3n_a_UV_de_una_serie_de_vinil_%C3%A9teres_en_distintas_fases.pdf?sequence=5)
- [46] Yabbarov N.G., Posypanova G., Vorontsov E., Popova O.N, et al., Targeted Delivery of Doxorubicin: Drug Delivery System Based on PAMAM Dendrimers., *Biochem. Biokhimiia*. 78, (2013) 884–94
- [47] Marciello M. P. M. M., Luengo Y., Pathology, Elsevier Inc., 2006, pp. 667–694.
- [48] Papisov M.I., Bogdanov A. Jr, Schaffer B., et al., Colloidal magnetic resonance contrast agents: effect of particle surface on biodistribution. *J. Magn. Magn. Mater.* 122, (1993) 383–386
- [49] Agotegaray M.A., Lassalle V.L., Study of the Experimental Conditions and Mechanisms for Diclofenac Loading in Functionalized Magnetic Nanoparticles, *IJCPA* 1, (2014) 154–164
- [50] Agotegaray M., Palma S., Lassalle V., Novel Chitosan Coated Magnetic Nanocarriers for the Targeted Diclofenac Delivery, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, (2014) 3343–3347.
- [51] Bhattacharya D., Behera B., Sahu S. K., et al. Design of dual stimuli responsive polymer modified magnetic nanoparticles for targeted anti-cancer drug delivery and enhanced MR imaging. *New J. Chem.* 40, (2016) 545–557
- [52] Li D., Huang X., Wu Y., Li J., et al. Preparation of pH-responsive mesoporous hydroxyapatite nanoparticles for intracellular controlled release of an anticancer drug. *Biomater. Sci.* 4, (2016) 272–280
- [53] Maltas E., Gubbuk I.H., Yildiz S., Development of doxorubicin loading platform based albumin-sporopollenin as drug carrier. *Biochem. Biophys. Reports.* 7, (2016) 201–205.
- [54] Neacșu A. Physicochemical investigation of the complexation between γ -cyclodextrin and doxorubicin in solution and in solid state. *Thermochimica Acta* 661, (2018) 51–58

- [55] Mallick N., Anwar M., Asfer M., Mehdi S. H., et al. Chondroitin sulfate-capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential carriers of doxorubicin hydrochloride. *Carbohydr. Polym.* 151, (2016) 546–556.
- [56] Wang Z., Zhou C., Xia J., Via B., et al. Fabrication and characterization of a triple functionalization of graphene oxide with Fe_3O_4 , folic acid and doxorubicin as dual-targeted drug nanocarrier, *Colloids Surf., B.* 106, (2013) 60–65
- [57] Augustin E., Czubek B., Nowicka A.M., Kowalczyk A., et al. Improved cytotoxicity and preserved level of cell death induced in colon cancer cells by doxorubicin after its conjugation with iron-oxide magnetic nanoparticles, *Toxicol. Vitr.* 33, (2016) 45–53
- [58] Lim B.-K., Tighe E. C., Kong S. D. The Use of Magnetic Targeting for Drug Delivery into Cardiac Myocytes. *J. Magn. Magn. Mater.* 473, (2019) 21-25.
- [59] Mosafer J., Abnous K., Tafaghodi M., Mokhtarzadeh A., et al. In vitro and in vivo evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 113, (2017) 60–74
- [60] Wu Z., Li X., Hou C., Qian Y., Solubility of Folic Acid in Water at pH Values between 0 and 7 at Temperatures (298 . 15 , 303 . 15 , and 313 . 15) K, *J. Chem. Eng. Data.* 55, (2010) 3958–3961.
- [61] Gazzali A.M., Lobry M., Colombeau L., Acherar S., et al. Stability of folic acid under several parameters. *Eur. J. Pharm. Sci.* 93, (2016) 419-430.
- [62] Acevedo-Fani, A., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. Photo-protection and controlled release of folic acid using edible alginate/chitosan nanolaminates. *J. Food Eng.* 229, (2018) 72–82
- [63] Elnakat H., Ratnam M., Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy, *Adv. Drug Del. Rev.* 56, (2004)1067–1084
- [64] Nguyen V. D., Min H.-K., Kim C.-S., Han J., et al. Folate Receptor-targeted Liposomal Nanocomplex for Effective Synergistic Photothermal-Chemotherapy of Breast Cancer In Vivo. *Colloids Surf., B.* 173, (2019) 539–548
- [65] Chertok B., Moffat B. A., David A. E., Yu F., et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* (2008) 29, 487–496.
- [66] Kondaveeti S., Cornejo D. R., Petri D. F. S. Alginate/magnetite hybrid beads for magnetically stimulated release of dopamine. *Colloids Surf., B.* 138, (2016) 94–101.
- [67] Babincová M., Címanec P., Altanerová V., Altaner C., et al. AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy. *Bioelectrochemistry* 55, (2002) 17– 19
- [68] Kondaveeti S., Semeano A. T. S., Cornejo D. R., Ulrich H., et al. Magnetic hydrogels for levodopa release and cell stimulation triggered by external magnetic field. *Colloids Surf., B* 167, (2018) 415–424
- [69] Silva I. B., Queiroz Neto J. C., Petri D. F. S. The effect of magnetic field on ion hydration and sulfate scale formation *Colloids Surf., A.* 465, (2015) 175–183

Capítulo VI

Evaluación *in vitro* del
potencial de las NPMs
como nanoteranósticos

Evaluación in vitro del potencial de las NPMs como nanoteranósticos

RESUMEN

En este capítulo se presentan los resultados correspondientes a la evaluación, *in vitro*, de la habilidad de las NPMs para ser guiadas magnéticamente al exponerlas a un campo magnético externo, así como de la capacidad de las mismas para actuar como agentes de contraste en el diagnóstico por imágenes mediante Resonancia Magnética.

Para estos estudios se trabajó con NPMs funcionalizadas con ácido fólico, E2 y E4, y la formulación E-Doxo. Para evaluar la capacidad de direccionamiento, se diseñó un sistema de flujo continuo simulando las condiciones fisiológicas a las que estarían sometidos los nanosistemas una vez administrados por la vía intravenosa. Se incluyó un imán y se monitoreó la acumulación de NPMs en función del tiempo de circulación de una dispersión acuosa de las mismas.

En cuanto a la capacidad de las NPMs para actuar como agentes de contraste, en este capítulo se incluyen estudios *in vitro* o ensayos fantomas usando dispersiones acuosas de las distintas formulaciones que se evaluaron en un resonador de uso clínico. Se determinó la eficiencia de las nanopartículas diseñadas para generar contraste, principalmente negativo, comparando los resultados obtenidos con los correspondientes a otros medios de contraste a base de NPMs.

6.1 Introducción

Como ya se ha indicado a lo largo de esta tesis, el empleo de nanopartículas de óxidos de hierro superparamagnéticas como núcleo transportador constituye una herramienta muy interesante a la hora de direccionar fármacos a un sitio específico. De esta manera, una vez inyectadas en el torrente sanguíneo en un punto cercano al sitio donde se desean focalizar, las NPMs pueden ser guiadas por medio de la aplicación de un campo magnético externo, disminuyendo o minimizando de esa manera, los efectos colaterales asociados a la distribución sistémica de drogas[1]

La administración de fármacos magnetoforéticos emplea un gradiente de campo externo para concentrar partículas magnéticamente sensibles en el sitio blanco[2-4]. Se han publicado resultados satisfactorios en cuanto al direccionamiento *in vivo* de NPMs por acción de un campo magnético externo[5,6].

Por ejemplo, Chertok y col. inyectaron por vía endovenosa NPMs comerciales (G100, del laboratorio Chemicell® de Berlín, Alemania) en ratones a los cuales previamente habían inoculado células tumorales de la línea celular 9L de glioma de rata, de modo de generar un modelo de tumor cerebral. Los investigadores demostraron una acumulación de NPMs en el sitio blanco 5 veces mayor en el grupo experimental, respecto del grupo control, poniendo de manifiesto la capacidad de las nanoformulaciones de ser guiadas por la presencia del campo magnético externo de 0.4 T de potencia[7].

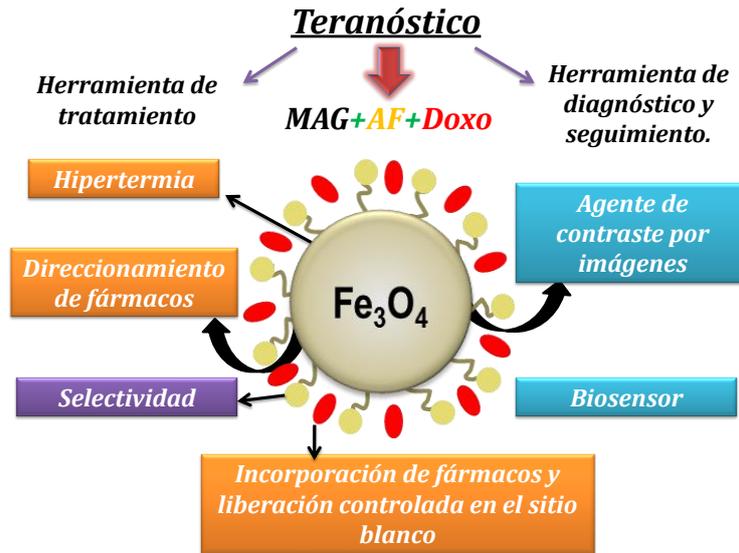
Como se detalló en el ***Capítulo IV***, la incorporación de ligandos selectivos ha demostrado ser un método eficaz para lograr la mayor incorporación de fármacos a las células blanco. De esta forma, las NPMs funcionalizadas podrían alcanzar la zona tumoral al igual que aquellas no funcionalizadas, por efecto EPR y vectorización magnética, y posteriormente ingresar a la célula por la presencia de receptores específicos en la superficie de las mismas, a los que se unen los ligandos[8,9]. Un estudio de Schleich y col. pone de manifiesto las ventajas al combinar diferentes estrategias de vectorización. En particular, estudiaron, *in vivo*, diferentes estrategias en términos de capacidades de vectorización del fármaco PTX encapsulado en una formulación constituida por MAG y los polímeros polientilenglicol (PEG) y ácido poliglicólico (PLGA). El dato más relevante lo hallaron cuando combinaron la vectorización activa y magnética[10].

Otra de las aplicaciones biomédicas de nanopartículas de óxido de hierro en medicina está asociada a la posibilidad de emplearlas como agentes de contraste en RMI.

Las NPMs surgen como alternativa a los medios de contraste tradicionales a base de gadolinio, para contribuir al contraste de la imagen para el reconocimiento de tejidos u órganos patológicos. De acuerdo a lo descrito en la *sección 1.5.1 del Capítulo I*, es posible incluir a las NPMs sintetizadas en el marco de esta tesis dentro de la categoría de agentes de contraste para T₂, debido a que disminuyen la intensidad de señal y generan imágenes oscuras[11].

Por otra parte, pueden ser de gran utilidad para monitorear en tiempo real, por ejemplo, la biodistribución de los nanomateriales una vez inyectados en un organismo y el progreso de algunos tratamientos[12-15]. En este sentido, el grupo del Park y col. estudiaron el efecto de un campo magnético externo como herramienta para favorecer la acumulación de Paclitaxel (PTX) encapsulado en nanocomposites de ácido poliglicólico (PLGA) y MAG (denominados PINC), en un modelo de tumor sólido poco vascularizado constituido por células SKOV3 (línea celular de cáncer de ovario) donde se ha reportado que el fenómeno de EPR no es eficiente[16-18]. Estos investigadores, basándose en las propiedades de sus NPMs de actuar como agentes de contraste, emplearon un equipo de RMI para evaluar diferencias entre los grupos experimental y control. Observaron que en el caso del grupo experimental la intensidad de la señal aumentaba un 20% respecto de la señal basal, mientras que en el grupo control el incremento de la señal fue sólo de un 3%. No obstante, los investigadores hicieron hincapié en que su formulación no fue capaz de distinguir entre células tumorales y células normales; y por lo tanto, sería posible que los PINC extravasados afectasen a ambos tipos celulares presentes en la región del tumor[19].

En el capítulo anterior, se demostró la capacidad de la nanoformulación E de incorporar un fármaco (Doxo), confiriéndole una potencial acción terapéutica. Además, en dicho capítulo se determinó la concentración de droga liberada en las distintas instancias simulando el medio plasmático y tumoral, respectivamente. Tal y como se presenta en el esquema 6.1, esta etapa continua la evaluación de la nanoformulación como agente teranóstico.



Esquema 6.1. Esquema representativo de E-Doxo como una nanopartícula magnética multifuncional y sus posibles aplicaciones en biomedicina como teranóstico.

En particular, este capítulo se dedica a la evaluación concreta de dicho potencial teranóstico a partir de analizar *in vitro*:

- i)-La capacidad de direccionamiento y acumulación mediada por un imán,
- ii)-Eficiencia para generar contraste en RMI

Para el estudio de (i) se diseñó un novedoso y sencillo sistema de flujo continuo (SFC) que simula las características fisiológicas de la vasculatura en la región tumoral, en cuanto a diámetro interno del capilar, velocidad de flujo sanguíneo, pH y osmolaridad del medio de dispersión, así como también la posición del imán.

Para el análisis de (ii) se empleó un resonador de uso clínico realizando ensayos con dispersiones acuosas de las NPMs de distinta concentración.

6.2 Experimental

6.2.1 Evaluación *in vitro* de la capacidad de las NPMs para el direccionamiento mediado por un estímulo magnético.

a- Diseño de sistema en flujo

Se empleó una bomba peristáltica (Gilsonminipuls 3) operada a 5 rpm con un tubo Tygon® de 0.76 mm de diámetro interno para que la muestra circulara a una velocidad establecida a través de un canal de Teflón® de 0.8 mm de diámetro interno. Un imán de 5 x 3 mm (diámetro y espesor, respectivamente) y 0,3 Tesla (T) de potencia se colocó en un punto del canal a 1 mm de distancia del flujo. Este sitio constituyó el punto de focalización magnética (PFM) y simuló la zona hacia donde se direccionan las NPMs. Luego de pasar a través del PFM, la dispersión se bombeó hacia una celda de flujo de UV-Visible (Hellma, 18 µL) acoplada a un espectrofotómetro (Agilent Technologies 8453A).

Se implementó un sistema de agitación con el fin de evitar el agregado de las nanopartículas durante la realización del ensayo. Este sistema se elaboró mediante el acople vertical de una paleta PTFE a un ventilador de microprocesador (Intel®, DC 12V, 28 Fuerza G) y se ensambló en la parte superior del recipiente que contenía la muestra. Por otro lado, la temperatura se mantuvo a 37°C por implementación de un plato de cerámica (enchufe de mosquito Raid® para corriente alterna de 220V) que se colocó debajo del recipiente donde se ubicaba la suspensión de nanopartículas. Debido a que el SFC fue un sistema de flujo cerrado, la suspensión de NPMs de E2 luego de circular por el mismo, volvió al recipiente.

En la figura 6.1 se muestra un esquema del sistema de flujo continuo que se construyó para la realización del estudio. Se incluyen, además, imágenes del punto de focalización magnética y del recipiente con el sistema de agitación y calentador.

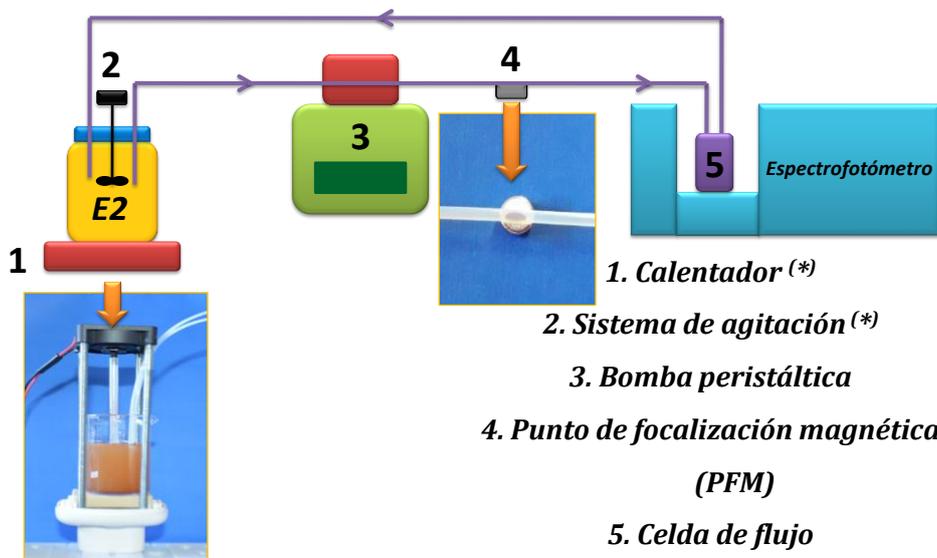


Figura 6.1 Sistema de flujo continuo. Las fotos muestran los sistemas de calentamiento y agitación (a la izquierda) y el punto de focalización magnética (a la derecha). Las flechas indican la dirección del flujo ($0.30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). El (*) señala que estos dispositivos son de fabricación propia en el laboratorio.

b-Ensayo de direccionamiento magnético in vitro.

Mediante la activación de la bomba peristáltica, una suspensión de E2 en buffer fosfato pH 7.4 de concentración $0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, se hizo fluir durante 45 min a través del canal de Teflón® con una velocidad de circulación de $0.30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Luego de pasar a través del PFM, la dispersión se bombeó hacia una celda de flujo de UV-Visible acoplada a un espectrofotómetro. De esta manera, la retención de las nanopartículas de E2 en el PFM se monitoreó en línea mediante medidas turbidimétricas realizadas a 440 nm en función del tiempo de ensayo. En la figura 6.2(a) se muestra un espectro UV-Vis correspondiente a E2. En el mismo puede observarse que la señal de absorbancia a 440 nm corresponde únicamente a la turbidez de la muestra ocasionada por las partículas coloidales. Este fue el motivo por el cual se seleccionó dicha longitud de onda (λ) como la óptima para realizar el seguimiento. Por otro lado, en la figura 6.2(b) se muestran los valores de absorbancia a 440 nm de dispersiones de E2 de diferente concentración donde se observa una relación lineal entre la concentración de E2 en dispersión y la señal turbidimétrica a 440 nm. Esto permitió considerar un descenso de este parámetro como indicativo de una disminución en la concentración de NPMs en la dispersión y por ende una medida indirecta de la acumulación de E2 en el PFM.

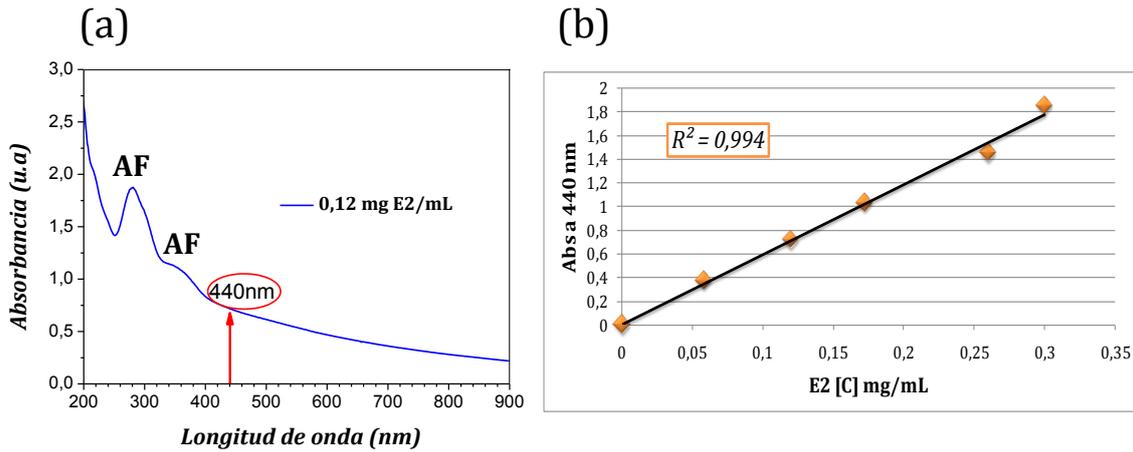


Figura 6.2 (a) Espectro UV-Vis de una muestra de E2. (b) Gráfico de absorbancia a 440 nm vs dispersiones de E2.

Como complemento de las medidas turbidimétricas, al final del ensayo se determinó el contenido de Fe en la masa de E2 retenida en el PFM mediante EAA. La eficiencia de E2 para acumularse en el PFM (%EF) se calculó de la siguiente manera:

$$\%EF = \left(\frac{Fe1}{Fe2} \right) \times 100$$

Donde Fe1 representa la cantidad de Fe retenido en el PFM al final del ensayo y determinado mediante EAA, y Fe2 constituye la masa total de Fe que circuló a través del sitio blanco durante el tiempo en que tuvo lugar la experiencia.

El valor de Fe2 se determinó teniendo conocimiento de: (i) la composición en términos del contenido de Fe de E2, (ii) la concentración de la dispersión que se utilizó, (iii) la velocidad de circulación y, (iv) el tiempo de ensayo.

6.2.2 Resonancia Magnética por Imágenes

Las determinaciones de la eficiencia de las muestras como agentes de contraste se realizaron en un resonador de uso clínico de 1.5T Phillips Achieva (iNOVA S.A) mediante ensayos denominados fantasmas. Estos consisten en emplear dispersiones acuosas de las NPMs e implementar una secuencia de adquisición de imágenes de acuerdo al tipo de contraste que se pretende evaluar (T_1 o T_2). En este caso se emplearon dispersiones de E2, E4 y E-Doxo en un rango de concentración entre 0 a 0.3 mmol.L⁻¹ de Fe. En la figura 6.3 se muestra una fotografía del

resonador utilizado junto al soporte donde se colocan las dispersiones para su posterior medición.

**Resonador de uso clínico de
1,5T Phillips Achieva**



Soporte de viales



Figura 6.3. Imagen de resonador magnético de uso clínico empleado para las mediciones (izquierda). Soporte donde se colocan los viales con las dispersiones a medir (derecha)

Se aplicó una secuencia de adquisición de imagen para ponderar el tiempo de relajación T_2 , mediante una secuencia spin echo (SE). Para ello, se mantuvo constante el tiempo de repetición (TR) en 2000 ms, mientras se fue variando el tiempo de eco (TE). En total se utilizaron 9 TE entre 30 y 270 ms con una variación de 30 ms entre cada uno de ellos. Para determinar el tiempo de relajación transversal (T_2) se estableció manualmente una región de interés (ROI) con el mismo área para cada muestra. Posteriormente, se realizó el cálculo de T_2 mediante el ajuste mono exponencial utilizando la siguiente ecuación[20].

$$y = A \cdot e^{\left(\frac{-TE}{T_2}\right)}$$

Donde “y” es la intensidad de señal, A es una constante, TE es el tiempo de eco y T_2 el tiempo de relajación transversal.

Con este dato, se procedió luego a calcular la relaxividad (r_2). Para ello se realizó la gráfica de $1/T_2$ (s^{-1}) vs concentración de Fe ($mmol.L^{-1}$). La pendiente de la recta resultante corresponde al valor r_2 . Como se explicará en mayor detalle en la sección de resultados, este parámetro r_2 puede considerarse como indicativo de la eficiencia de un compuesto para generar contraste negativo.

6.3. Resultados y Discusión

6.3.1 Evaluación *in vitro* de la capacidad de los nanosistemas para el direccionamiento mediado por un estímulo magnético.

Las condiciones que se utilizaron para el diseño del SFC y la realización del ensayo se fijaron en función de la bibliografía científica disponible, en cuanto a la aplicación de NPMs con fines de direccionamiento y liberación de fármacos en diversos modelos animales. En este sentido, se preparó una dispersión de concentración 0.3 mg de E2.mL⁻¹ ya que esta representa la concentración final de la dispersión en el sistema circulatorio de un ratón luego de la administración endovenosa[21]. Por otra parte, la selección de la velocidad de circulación, así como el diámetro interno del capilar se realizó de acuerdo a los trabajos de Asfer y col.[22] y Park y col.[19]. Por último, el tiempo de ensayo se fijó en 45 minutos. Se ha registrado que bajo la influencia de un campo magnético externo, cuando NPMs son inyectadas en el torrente sanguíneo, se necesitan entre 30 y 60 min para lograr su focalización en el sitio blanco. Este tiempo es variable dependiendo del modelo animal empleado y las propiedades fisicoquímicas de las NPMs[23,24].

En la literatura pueden encontrarse artículos de reciente publicación (años 2016-2019) relacionados con la evaluación, *in vitro*, de la capacidad de las nanopartículas magnéticas para ser focalizadas en un sitio mediante la aplicación de un campo magnético externo[19],[22],[24-28]. Sin embargo, la mayor parte de estos se caracterizan por el empleo de sistemas complejos para la evaluación de direccionamiento en términos de los métodos y equipamiento necesarios para la adquisición de datos.

Por ejemplo, Radon y col. presentaron el diseño de un sistema en flujo acoplado a un instrumento de espectroscopía de partículas magnéticas (MPS, del inglés “*magnetic particle spectroscopy*”) con el fin de cuantificar la eficiencia del direccionamiento magnético de diferentes NPMs comerciales. Sus resultados indican que alrededor de 50% del Fe total circulante se depositó en el sitio blanco cuando circularon dispersiones de NPMs en buffer PBS durante 120min[29].

Por otra parte, Hoshier y col. propusieron la utilización de actuadores electromagnéticos con el fin de generar la fuerza adecuada para el direccionamiento

de nanoformulaciones de sílica magnética de 800nm de DH. La utilización de una cámara permitió el monitoreo de la posición de las partículas a través del canal y la evaluación de su acumulación en el sitio blanco[1].

Cabe destacar que, a diferencia de los trabajos citados, en esta tesis se plantea el diseño de un SFC de implementación sencilla y simple en términos del método de adquisición de datos (espectroscopía UV-Visible).

En la figura 6.4 se muestran los datos obtenidos a partir del ensayo descrito en la sección 6.2.1b, en términos del % de descenso de la turbidez en función del tiempo de circulación de la dispersión de NPMs por el sistema en flujo.

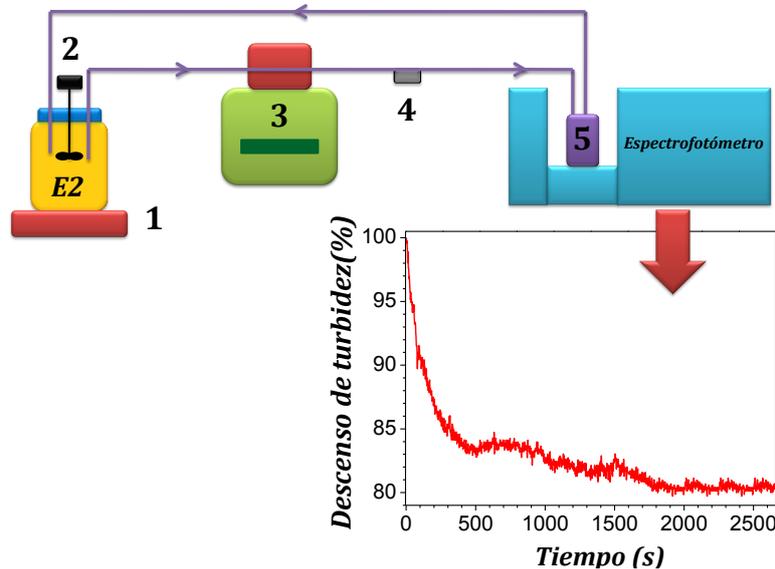


Figura 6.4 Descenso de la señal turbidimétrica (%) en función del tiempo (s)

Se tomó como referencia la señal detectada cuando se hizo circular una dispersión de E2 a través del SFC sin la aplicación del imán en el PFM. Dicha señal se consideró como la correspondiente al 100% de turbidez.

La figura 6.4 sugiere que la mayor concentración de nanopartículas es retenida durante los primeros 500 segundos de experiencia. Más allá de este período de tiempo, se observa un descenso menos marcado de la señal turbidimétrica.

Conforme a las medidas realizadas, un descenso del 20%, en la señal tuvo lugar luego de 45 minutos (2700 segundos) de ensayo, indicando una disminución de la cantidad de E2 en la dispersión debido a la retención de las mismas por el imán de

NdFeB ubicado en el PFM. Dicho 20 % corresponde a 1047 μ g de E2.

Con el fin de validar y confirmar este resultado, se realizó la cuantificación de E2 acumulada en el PFM a través de la determinación de Fe en la masa de NPMs acumulada, utilizando EAA. De esta forma, conociendo el contenido de Fe total de la masa de nanopartículas circulantes y la cantidad de Fe retenido en el PFM, y teniendo en cuenta que no existe otra fuente de Fe en el ensayo, fue posible relacionar directamente el contenido de Fe en el PFM con nanopartículas retenidas en el mismo.

Los resultados sugieren que alrededor de 1100 \pm 1.05 μ g de E2 fueron retenidos por el imán luego de 45 minutos, lo cual representa el 21% respecto del total de E2 que circuló a través del PFM. Estos resultados concuerdan perfectamente con los obtenidos indirectamente a través de medidas turbidimétricas.

Es importante remarcar que, a pesar de la facilidad, en términos de la implementación del SFC propuesto en este trabajo de tesis y la simplicidad del método de adquisición de datos (espectroscopía UV-Visible), los resultados obtenidos se encuentran en línea con los reportados en la literatura[28],[30].

En publicaciones más recientes, se encuentran descripciones de ensayos de direccionamiento *in vitro* combinados con estudios de direccionamiento *in vivo*[26],[28].

Como ejemplo de ello, podemos citar el trabajo realizado por Lee y col. quienes exploraron la influencia de grupos tioles libres presentes en la superficie de NPMs sobre la capacidad de retención magnética de las mismas[30]. De modo particular nombraron a estas nanoformulaciones MIONs (del inglés “*magnetic iron oxide nanoparticles*”). En el caso del estudio *in vitro* demostraron la acumulación de nanopartículas en el sitio de interés como consecuencia de la influencia magnética. Este resultado sirvió a los investigadores como punto de partida para avanzar hacia la evaluación del direccionamiento magnético empleando ratones. A partir de la información obtenida por Lee y col. en relación a: i-la dosis administrada al ratón (12 mg Fe/Kg de ratón), ii-la cantidad de Fe registrada en el cerebro del ratón una vez finalizado el estudio de direccionamiento (1085 μ g de Fe/g de cerebro) y, iii-la eficiencia de carga de sus nanosistemas (86.38 μ g de Doxo/g de Fe), fue posible

realizar un estudio comparativo entre los resultados de estos investigadores y los correspondientes a esta tesis. Los mismos se muestran en la tabla 6.1.

Tabla 6.1 Comparación de datos relacionados con los resultados informados por K. Lee y col. y los resultados *in vitro* obtenidos en este trabajo utilizando SFC.

Muestra	Tipo de ensayo	µg Fe retenidos en el PFM	Tiempo de ensayo (min)	% Fe retenido	µg Doxo de acuerdo a la cantidad de NPMs retenidas y al %CC*	Ref.
MIONS	<i>In vivo</i>	20	60	5.55	8.21	[34]
E2	<i>In vitro</i>	217	45	20	35-61	Este trabajo

*No se tiene en consideración el perfil de liberación del fármaco.

De la tabla 6.1 se desprende que E2 presenta excelente respuesta al estímulo magnético asegurando un contenido de NPMs satisfactorio en torno al sitio de interés. Es importante resaltar que si bien esta comparación es útil a fines estimativos, es de esperar que los niveles de acumulación alcanzados *in vitro* se reduzcan notablemente *in vivo*, con lo cual los valores de un orden de magnitud superiores registrados en estos ensayos respecto del trabajo de Lee, permiten inferir que, *in vivo*, podrían llegarse a obtener niveles adecuados empleando un modelo murino bajo las mismas condiciones.

De acuerdo a los datos incluidos en la tabla, la cantidad de Doxo que alcanzaría el sitio blanco se puede estimar conociendo la capacidad de carga de E y el porcentaje de liberación del fármaco partir de E-Doxo cuando la liberación se efectúa en un medio a pH 4.9 y en presencia de un campo magnético estático externo, tal y como se reportó en la ***sección 5.3.4.2 del Capítulo V***. Teniendo en cuenta entonces que (i) en el Capítulo V se empleó E-Doxo6 para los estudios de liberación, (ii) que el %CC de dicha formulación fue de 7.6%, (iii) que se retuvo el 21% de E2 circulante y que (iv) el % de liberación de Doxo a pH 4.9 y bajo influencia magnética fue del 11,5±0.32% al cabo de 1h, se determinó que la cantidad de Doxo que llegaría al sitio blanco sería alrededor de 7,4 µg, el cual correspondería a 0.95 µmol.L⁻¹ de fármaco (teniendo en cuenta los mL de dispersión de E2 que circularon

por el PFM durante los 2700 seg de ensayo). Estos resultados podrían considerarse satisfactorios si se toman como referencia los datos publicados por otros investigadores utilizando modelos *in vivo* y analizando los efectos terapéuticos de Doxo. Por ejemplo, Lee y col. en el mismo trabajo previamente citado no sólo evaluaron el direccionamiento *in vivo* de sus formulaciones, sino que además estudiaron la capacidad terapéutica de las mismas sobre células derivadas de glioma (tipo de tumor cerebral) a partir de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* (MTT). Los investigadores sugieren que debido a que la droga cargada en los MIONs muestra una citotoxicidad satisfactoria *in vitro*, la cantidad de Doxo acumulada en el tejido del tumor cerebral bajo la influencia de un campo magnético externo (8.21 μg), sería suficiente para inducir un efecto terapéutico considerable[30]. Es importante remarcar que estos autores no tuvieron en cuenta el perfil de liberación del fármaco a partir de los MIONs al momento de realizar los estudios *in vitro*.

Por otra parte, Augustin y col, investigaron los efectos citotóxicos de NPMs conjugadas con Doxo (Dox-Nps) en células HT29, derivadas de cáncer de colon humano. Los resultados con respecto al ensayo de proliferación de MTT indican que después de 72 hs de exposición a Dox-Nps y Doxo libre, la viabilidad de las células HT29 disminuyó significativamente de forma dosis dependiente. Curiosamente, Dox-Nps mostraron una mayor citotoxicidad ($\text{IC}_{50}=0.36 \mu\text{mol.L}^{-1}$), en comparación con la Doxo libre ($\text{IC}_{50}=0.757 \mu\text{mol.L}^{-1}$)[23].

Por lo tanto los datos recopilados en este capítulo, aunque *in vitro*, demostrarían la capacidad de los sistemas propuestos, no solo para acumularse en el sitio blanco, sino también para administrar cantidades adecuadas de fármaco, de acuerdo a las dosis terapéutica requerida. Este análisis se completará en el Capítulo VII, cuando se evalúe la biocompatibilidad y acción terapéutica (esta última *in vitro*) de la formulación E-Doxo.

6.3.2 Evaluación de E2, E4 y E-Doxo como agentes de contraste para el diagnóstico mediante RMI.

Se evaluó la capacidad de las diferentes NPMs como AC en el diagnóstico por imágenes mediante RM. En particular, como ya se mencionó, se exploró su capacidad para acortar los tiempos de relajación T_2 de los protones de agua circundantes en los tejidos biológicos[31]. En consecuencia, lo que se espera

visualizar es que la intensidad de señal disminuya (se oscurezca) en las regiones que contienen nanopartículas[32]

Los ensayos fantomas o *in vitro*, como los que se presentan en este capítulo, se utilizan normalmente como etapa preliminar a estudios *in vivo* o *ex vivo*, para estimar la capacidad de contraste en T_1 o T_2 de un AC[33-37].

Se obtuvieron imágenes ponderadas en T_2 de una serie de dispersiones de las NPMs en un equipo clínico de 1,5 T tal y como se indicó en la sección experimental. En la figura 6.5 se pueden observar las imágenes obtenidas para E2 y E4.

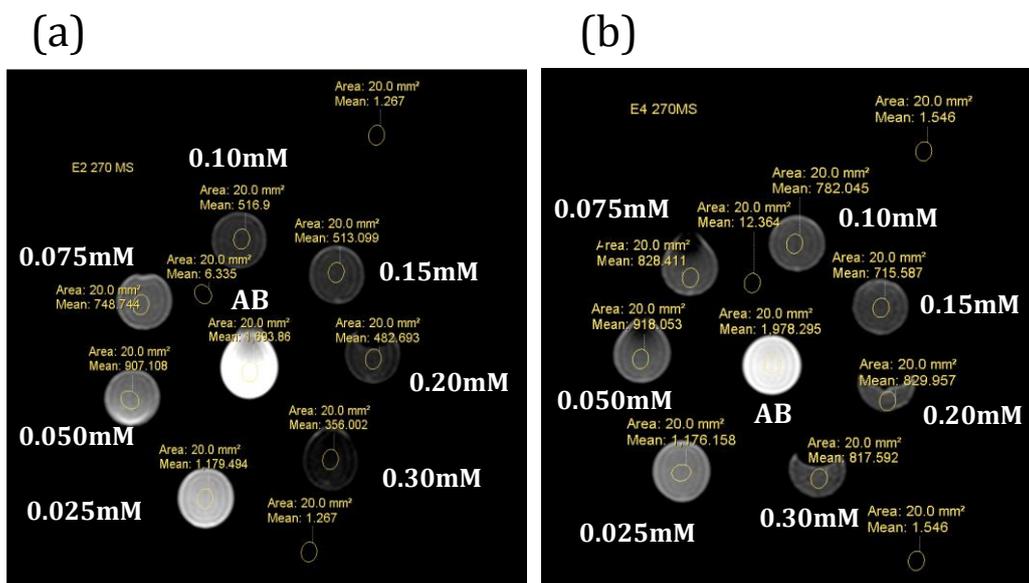


Figura 6.5. Imágenes ponderadas en T_2 (a) E2 y (b) E4 (TE = 270 ms; TR = 2000ms). En blanco se señalan las concentraciones, expresadas en mmol.L⁻¹, de las dispersiones analizadas.

Para ambas muestras, en el centro se observa la imagen correspondiente al AB. En sentido horario se muestran las imágenes correspondientes a las dispersiones en concentración creciente de Fe. Se aprecia que la intensidad de la señal de RMI disminuye considerablemente a medida que aumenta la concentración de las nanopartículas de 0 a 0.1 mmol.L⁻¹ Fe. Esto se visualiza como un oscurecimiento de las imágenes respecto de la referencia que corresponde al AB, como consecuencia de la disminución de la intensidad de la señal por la presencia de las NPMs.

Mediante el empleo de la ecuación detallada en la **sección 6.2.2** se realizó el

ajuste monoexponencial, obteniéndose las curvas de decaimiento de la intensidad de señal en función de la variación del TE que se muestran en la figura 6.6

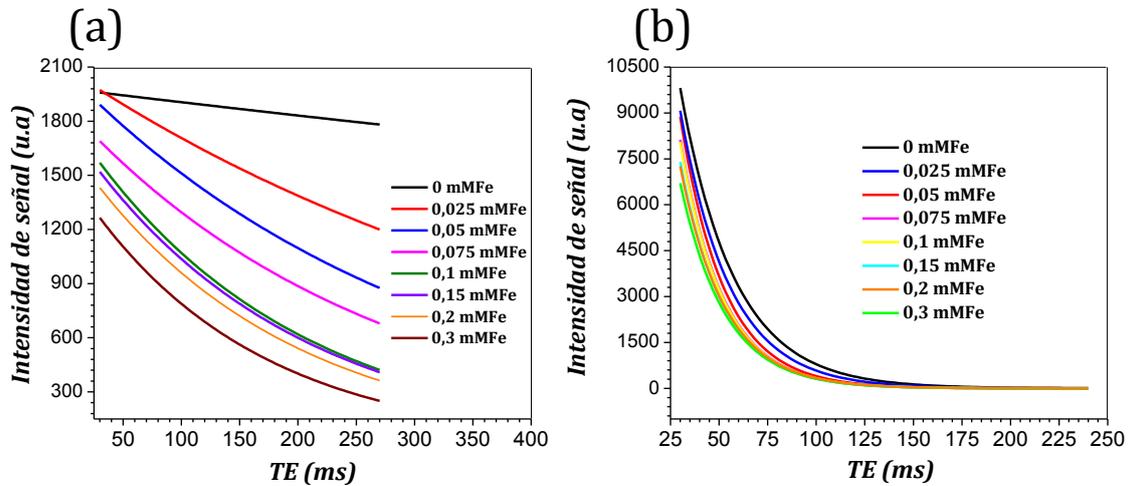


Figura 6.6. Curvas de decaimiento obtenidas para las diferentes concentraciones de (a) E2 y (b) E4.

Se observa que al aumentar la concentración de las nanopartículas, la curva de decaimiento de intensidad de señal es más pronunciada, lo que estaría indicando que las nanopartículas tienen la capacidad de acortar el tiempo de relajación T_2 [20]. Al comparar ambas figuras es posible evidenciar que los descensos son más abruptos en las curvas de T_2 correspondientes a E4. Esto estaría indicando que dicha formulación presenta una mayor capacidad para acortar los tiempos de relajación T_2 , con respecto a E2. Podría indicarse entonces, que E4 sería más eficiente que E2 para generar contraste negativo en las imágenes adquiridas por RM.

Una vez estimados los tiempos T_2 para ambas formulaciones, se procedió a graficar la relación existente entre la velocidad de relajación transversal ($R_2 = 1/T_2$) y la concentración de Fe. Las mismas se muestran en la figura 6.7.

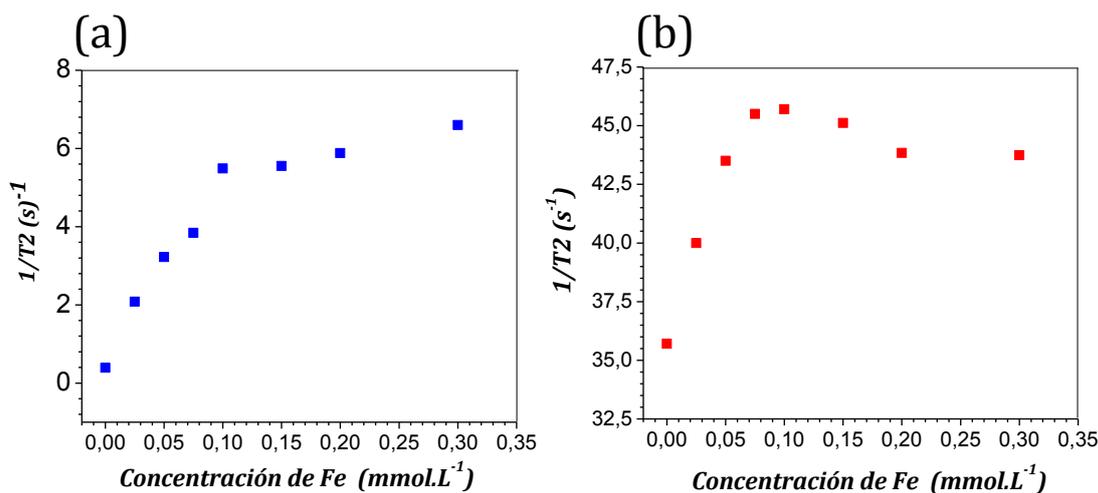


Figura 6.7. Inverso de T_2 vs concentración de Fe de las suspensiones de nanopartículas de (a) E2 y (b) E4.

Al graficar los valores de $1/T_2$ obtenidos para todas las concentraciones exploradas, se evidencia una curva de saturación. Para ambas formulaciones se observa que la dependencia de $1/T_2$ con la concentración de Fe, se mantiene lineal para un rango entre 0 y 0,1 mmol.L⁻¹ de Fe. Un comportamiento similar fue observado por el grupo de Hajdú para nanopartículas magnéticas cubiertas con ácido cítrico[38]. En su artículo los investigadores mencionan que los valores de T_2 van disminuyendo considerablemente a medida que la concentración de las nanopartículas aumenta. Sin embargo, a partir de cierta concentración (5 mg Fe.L⁻¹ = 0,09 mmol.L⁻¹ de Fe) el valor del tiempo de relajación transversal se mantiene casi constante. Aun así, en este artículo no se especifica una razón en particular por la cual se podría dar este comportamiento.

En nuestro caso, podría asumirse que debido a que las medidas no se realizaron inmediatamente luego de la dispersión de las muestras, el tiempo de espera podría provocar una pérdida parcial de la estabilidad de la dispersión que, aunque imperceptible a escala macro, podría afectar la concentración final de la misma. Por otra parte, se podría pensar en un efecto de saturación, es decir, más allá de 0.1 mmol.L⁻¹ al aumentar la concentración de las nanopartículas el efecto en el T_2 va siendo menor.

Una medida directa que permite estimar la eficiencia como AC es el parámetro de relaxividad o capacidad de relajación (r_2) definida como la velocidad de relajación del disolvente (agua) inducida por 1 mmol.L⁻¹ del ión activo del AC.

Matemáticamente, $r_2 = R2/cAC$, donde cAC es la concentración analítica del ión responsable del contraste[11].

Empleando entonces, sólo los datos de $1/T_2$ para el rango de concentraciones de Fe entre 0 y 0,1 mmol. L⁻¹ y sabiendo que la pendiente de la recta representa el valor de r_2 , se calculó la eficiencia de E2 y E4 como agentes de contraste. Las gráficas correspondientes se presentan en la figura 6.8.

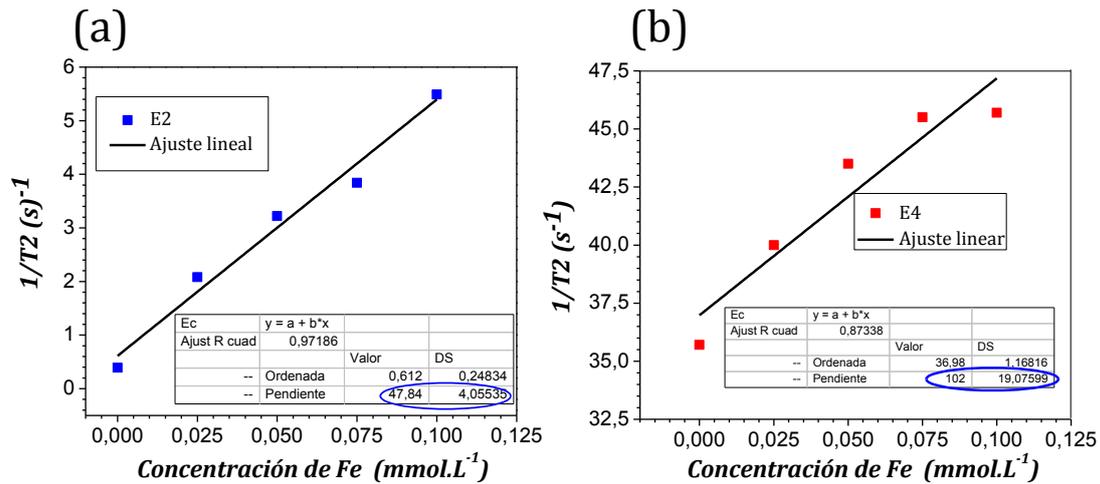


Figura 6.8 Dependencia lineal de la velocidad de relajación ($1/T_2$) con la concentración de Fe. Determinación del valor de relaxividad (r_2) (a) E2 y (b) E4.

De acuerdo a las gráficas presentadas en la figura 6.8 los valores de r_2 fueron de 47.84 ± 4.05 mmol⁻¹.L.s⁻¹ y 102 ± 19.07 mmol⁻¹.L .s⁻¹ para E2 y E4 respectivamente.

En la tabla 6.2 se comparan los valores de r_2 obtenidos en esta tesis con los correspondientes a AC comerciales aprobados o bajo juicio clínico con fines diagnósticos.

Tabla 6.2 Comparación entre los valores de r_2 de los AC comerciales y los obtenidos a partir de este trabajo

Nombre genérico	Nombre comercial	Recubrimiento	r_2 a 1.5T (mmol ⁻¹ .L.s ⁻¹)	Aplicación	Estado	Ref
Ferumoxtran-10	Combix® (EE.UU) Sinerem® (U.E)	Dextrano	65	Imágenes de ganglios linfáticos, imágenes de macrófagos, marcaje celular, imágenes del SNC*	En evaluación, bajo juicio clínico	[39]
Ferucarbotran	Resovist® (EE.UU, Japón, U.E) Clivist® (Francia)	Carboxidextrano	189	Marcaje celular, imágenes del SNC, detección de lesiones hepáticas focales pequeñas.	Aprobado por la UE en 2001. Se discontinuó su producción en 2009	[40]
Ferumoxide	Feridex I.V. (EE.UU) Endorem™ (U.E)	Dextrano	120	Detección de lesiones hepáticas	Aprobado por la FDA en 2001. Actualmente retirado del mercado	[41]
Ferumoxitol	Feraheme® (EE.UU) Rienso® (U.E)	Carboximetil-dextrano	89	Linfografía en pacientes con cáncer de próstata.	Aprobado por la FDA en 2001. Actualmente retirado del mercado europeo	[42]
E2	-----	-----	47.84±4.05	-----	-----	Este trabajo
E4	-----	-----	102.00±19.07	-----	-----	Este trabajo

SNC: Sistema Nerviosos Central

Para la formulación E4 se encontró un valor de r_2 bastante mayor que el de E2, que concuerda con la mayoría de las formulaciones reportadas en la tabla 6.2. Por otra parte, el valor de r_2 correspondiente a E2 aunque menor que el de otras NPMs similares, se compara con el valor r_2 del agente de contraste aprobado por la FDA, Ferumoxtran-10 o Combix[43] diseñado para detectar enfermedad metastásica en nodos linfáticos[44]. A pesar de que este agente había sido retirado del mercado por sus fabricantes, actualmente se está produciendo en los Países Bajos para detectar pequeñas metástasis en nodos linfáticos en pacientes con cáncer de próstata[39].

La mayor capacidad de E4, de actuar como AC negativo, respecto de E2 podría explicarse en términos de sus propiedades fisicoquímicas. Tal como se informó en el *Capítulo III*, la magnetización de saturación del núcleo magnético de E4 (MAG-4), resultó ser más elevada que la correspondiente al núcleo magnético de E2 (MAG-5). Concretamente, la M_s de MAG-4 es de 71.46 emu/g, mientras que el valor correspondiente a MAG-5 es de 35.35 emu/g. Se ha reportado que existe una relación directamente proporcional entre el valor de M_s y el correspondiente a r_2 [45,46]. Por ejemplo, el Ferumoxitol, un compuesto basado en partículas de óxido de hierro superparamagnético ultra pequeño utilizado para tratamiento de anemia y como agente de contraste para linfografía en pacientes con cáncer de próstata[42], presenta un M_s de 94 emu/g y un valor de r_2 de 89 mmol⁻¹.L.s⁻¹ a 1.5 T. Weiy col. compararon este valor con el de nanopartículas de óxidos de hierro extremadamente pequeñas basadas en maghemita. Estas presentaron un valor de M_s de 35 emu/g y por lo tanto, su r_2 fue menor que el correspondiente a Ferumoxitol (10.5mmol.L⁻¹s⁻¹). En el mencionado trabajo, los autores buscaron este efecto a fin de mejorar el perfil de las nanopartículas como agentes de contraste positivo[47].

El tamaño de las NPMs, la formación de agregados, el tipo de recubrimiento y la densidad del mismo, así como la cristalinidad, constituyen parámetros que pueden afectar la eficiencia como agente de contraste negativo de las nanopartículas, debido a que impactan sobre las propiedades magnéticas de las NPMs[46]. Se ha reportado que para suspensiones formadas por partículas de pequeño tamaño, r_2 aumenta con el tamaño de partícula. Por ejemplo, en la revisión realizada por Lee y col. para nanopartículas de tamaño 4, 6, 9 y 12 nm se ha encontrado que los valores de M_s son 25, 43, 80 y 120 emu/g y los correspondientes a r_2 son 78, 106, 130 y 218 mmol.L⁻¹.s⁻¹ respectivamente medidos a 1.5 T y temperatura ambiente. Esto se explica considerando que el momento magnético de una nanopartícula es proporcional a su volumen y la capacidad de relajación r_2 aumenta con el tamaño de la nanopartícula. La disminución del tamaño de partícula influye negativamente en el comportamiento magnético de la misma, de forma que se reduce la magnetización de saturación respecto al mismo material y mismo campo aplicado en partículas de tamaño mayor[46]. Esto se debe a que, aunque los espines interiores de las nanopartículas magnéticas están alineados la curvatura de la superficie en partículas de este tamaño es muy elevada, lo que hace que los espines de la

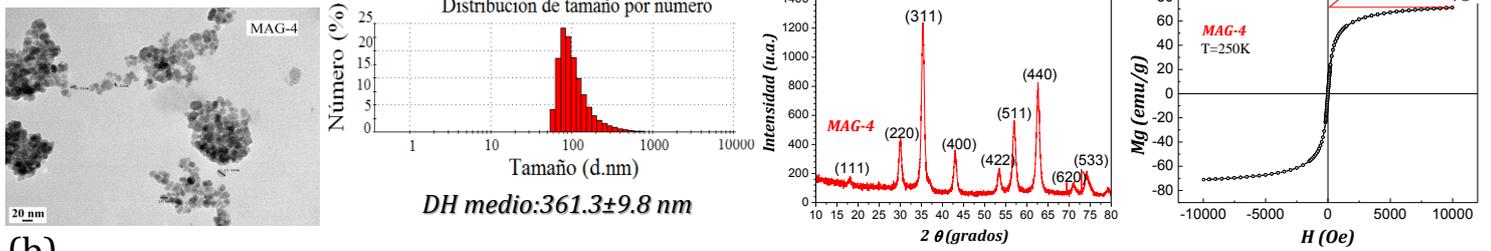
superficie no sean completamente colineales y por tanto se reduzca la magnetización total[48].

Sin embargo, por encima de un tamaño determinado, r_2 aumenta con el tamaño de agregado[49]. El agregado puede ser considerado como una esfera magnetizada donde las interacciones entre los distintos nanocristales producen elevado gradiente de campo magnético y, por consiguiente, un efecto dominante en r_2 [49]. El hecho de que las partículas no estén distribuidas uniformemente en el medio sino que se encuentran formando pequeños agregados, hace que en determinadas zonas existan diferencias de magnetización, creando gradientes de campo local que aceleran la pérdida de coherencia de fase de los espines de los protones que contribuyen a la señal y producen un aumento de r_2 [50].

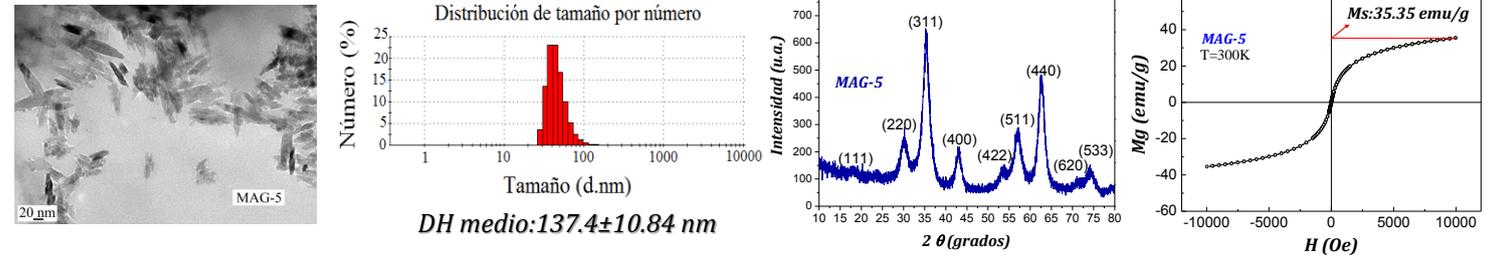
Por otra parte, se ha descrito que la capacidad de relajación puede mejorarse aumentando la cristalinidad del material. Por ejemplo, las nanopartículas de Fe/Fe₃O₄ cúbicas centradas en el cuerpo (bcc), exhiben un 50% más de magnetización que las nanopartículas de Fe/Fe₃O₄ amorfas[51]. Del mismo modo, el valor r_2 de bcc-Fe/Fe₃O₄ es más de 3 veces mayor que el de NPMs de Fe/Fe₃O₄ amorfo.

En la figura 6.9 se muestran comparativamente los datos correspondientes a tamaño (por TEM, y DH medido por DLS), cristalinidad (XDR) y propiedades magnéticas (VSM) obtenidos para los núcleos magnéticos MAG-4 y MAG-5, previamente reportados en el *Capítulo III* y que justificarían las diferencias las diferencias en los valores de r_2 determinados para cada formulación (E4 y E2, respectivamente).

(a)



(b)



Es necesario tener en cuenta que los resultados informados se obtuvieron a partir de formulaciones en medio acuoso. La relaxividad puede ser diferente cuando se emplea una dispersión de nanopartículas en un medio con características similares a las fisiológicas, o un órgano o tejido[52]. De acuerdo con esto, los valores de r_2 informados en esta tesis deben ser tomados como una aproximación para conocer el desempeño de las NPMs como herramientas de diagnóstico en RMI. Es importante remarcar que todas las formulaciones fueron diseñadas para acumularse selectivamente en tumores que sobreexpresen el receptor de folato. De esta manera, el efecto de contraste podría estar mejorando debido a la concentración preferencial de NPMs en el sitio blanco. Otros investigadores han verificado este comportamiento a través de experimentos *in vivo/in vitro*. Jiang y col. informaron que en tumores que sobreexpresan receptores de folato, se logró un mejor contraste con nanopartículas magnéticas conjugadas con ácido fólico en comparación con magnetita recubierta con carboximetildextrano[33]. Esta acumulación selectiva facilitaría la observación de un contraste entre tejidos patológicos y sanos.

El efecto de la incorporación del fármaco a la superficie de E2 sobre su capacidad como AC se evaluó a través de la comparación de los valores de T_2 registrados para dispersiones de E2 y E-Doxo usando una concentración de 0.2 mmol.L^{-1} de Fe. En la figura 6.10 se muestran comparativamente los valores de T_2 correspondiente a E2 y E-Doxo.

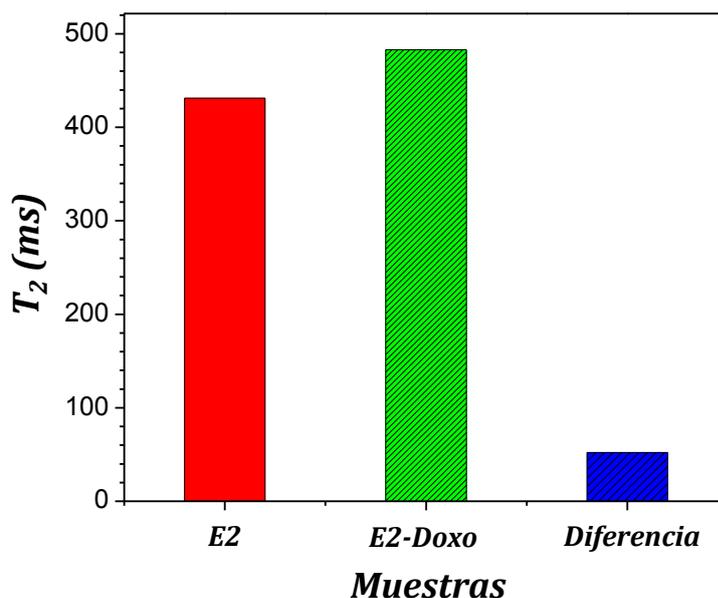


Figura 6.10. Representación del tiempo de relajación transversal (T₂) de E2 obtenida con y sin Doxo para una dispersión de concentración 0.2 mmol.L⁻¹ de Fe.

En la figura puede observarse que el tiempo de relajación transversal (T₂) evidenció cambios poco significativos, siendo ligeramente mayor cuando la formulación presenta Doxo cargada.

6.4- Conclusiones.

El análisis de los datos obtenidos a partir de las experiencias presentadas en este capítulo permitió poner de manifiesto, al menos *in vitro*, las buenas perspectivas en cuanto a la aplicación de las formulaciones sintetizadas como agentes teranósticos, dado que:

- Se demostró la capacidad de los nanosistemas de ser direccionados por la acción de un campo magnético estático externo y de suministrar cantidades adecuadas de fármaco, de acuerdo a la dosis terapéutica requerida.
- Ambos nanotransportadores, E2 y E4, actúan satisfactoriamente como agentes de contraste de tipo T₂ en RMI.
- La incorporación del fármaco no afectaría la actividad de agente de contraste propia del núcleo magnético del nanotransportador.

6.5- Agradecimientos.

Al Dr. Marcos Grünhut (INQUISUR-UNS/CONICET) por su colaboración en el diseño, armado y puesta en funcionamiento del SFC. Además, al Lic. Adolfo Giles (iNOVA) por la realización de las medidas de RMI en el equipo clínico y a la Dra. Ma. Gabriela Montiel Schneider (INQUISUR-UNS/CONICET) por su asesoramiento con la preparación y medición de las muestras para RMI y su ayuda en el análisis de los datos.

6.6- Referencias del capítulo.

- [1] Hoshidar A.K., Le T.A., Amin F.U., Kim M.O., et al. Studies of aggregated nanoparticles steering during magnetic-guided drug delivery in the blood vessels, *J. Magn. Magn. Mater.* 427, (2017) 181–187.
- [2] Lubbe A.S., Alexiou C., Bergemann C., Clinical applications of magnetic drug targeting, *J. Surg. Res.* 95, (2001) 200-206.
- [3] Alexiou C., Jurgons R., Magnetic Drug Targeting. *Magnetism in Medicine: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2007. p. 596-605.
- [4] Shapiro B., Kulkarni, S. Nacev A., Muro S., et al. Open challenges in magnetic drug targeting, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 7, (2015) 446-457
- [5] Cole A. J., David A. E., Wang J., Galbán C. J., et al. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 32, (2011) 6291–6301
- [6] Wang Y., Zhao R., Wang S., Liu Z., et al. In vivo dual-targeted chemotherapy of drug resistant cancer by rationally designed nanocarrier, *Biomaterials.* 75, (2016) 71–81
- [7] Chertok B., Moffat B. A., David A. E., Yu F., et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* 29, (2008) 487–496.
- [8] Prokop A., Davidson J.M., Nanovehicular intracellular delivery systems, *J. Pharm. Sci.* 97, (2008) 3518–3590.
- [9] Wang M., Thanou M., Targeting nanoparticles to cancer, *Pharmacol. Res.* 62, (2010) 90–99
- [10] Schleich N., Po C., Jacobs D., Ucar B., et al. Comparison of active, passive and magnetic targeting to tumors of multifunctional paclitaxel/SPIO-loaded nanoparticles for tumor imaging and therapy. *J. Control. Release.* 194, (2014)82–91
- [11] Estelrich J., Sánchez-Martín M.J., Busquets M.A, Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents, *Int. J. Nanomed.* 10, (2015) 1727–1741
- [12] Shen S., Wang S., Zheng R., Zhu X., et al. Magnetic nanoparticle clusters for photothermal therapy with near-infrared irradiation, *Biomaterials* 39, (2015) 67–74.
- [13] Chu M., Shao Y., Peng J., Dai X., et al. Near-infrared laser light mediated cancer therapy by photothermal effect of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles, *Biomaterials* 34, (2013) 4078–4088.
- [14] Yang K., Yang G., Chen L., Cheng L., et al. FeS nanoplates as a multifunctional nano-theranostic for magnetic resonance imaging guided photothermal therapy, *Biomaterials* 38, (2015) 1–9.
- [15] Chen C., Wang S., Li L., Wang P., et al. Bacterial magnetic nanoparticles for photothermal therapy of cancer under the guidance of MRI, *Biomaterials* 104, (2016) 352–360.
- [16] Smith B.R., Kempen P., Bouley D., Xu A., et al. Shape matters: intravital microscopy reveals surprising geometrical dependence for nanoparticles in tumor models of extravasation, *Nano Lett.* 12, (2012) 3369-3377
- [17] Smith B.R., Cheng Z., De A., Koh A.L., et al. Real-time intravital imaging of RGD-quantum dot binding to luminal endothelium in mouse tumor neovasculature, *Nano Lett.* 8, (2008) 2599-2606
- [18] Kong G., Braun R.D., Dewhirst M.W., Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticles

- delivery: effect of particle size, *Cancer Res.* 60, (2000) 4440-4445
- [19] Park J., Kadasala N. R., Abouelmagd S. A., Castanares M. A., et al. Polymer-iron oxide composite nanoparticles for EPR-independent drug delivery. *Biomaterials* 101, (2016) 285-295
- [20] Illés E., Szekeres M., Kupcsik E., Tóth I. Y., PEGylation of surfacted magnetite core-shell nanoparticles for biomedical application. *Colloids Surf. A.* 460, (2014) 429-440
- [21] Mosafer J., Abnous K., Tafaghodi M., Mokhtarzadeh A., et al. In vitro and in vivo evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 113, (2017) 60-74
- [22] Asfer M., Saroj S. K., Panigrahi P. K.. Retention of ferrofluid aggregates at the target site during magnetic drug targeting. *J. Magn. Magn. Mater.* 436, (2017) 47-56.
- [23] Augustin E., Czubek B., Nowicka A.M., Kowalczyk A., et al. Improved cytotoxicity and preserved level of cell death induced in colon cancer cells by doxorubicin after its conjugation with iron-oxide magnetic nanoparticles, *Toxicol. Vit.* 33, (2016) 45-53
- [24] Lim B.-K., Tighe E. C., Kong, S. D. The Use of Magnetic Targeting for Drug Delivery into Cardiac Myocytes. *J. Magn. Magn. Mater.* 473, (2019) 21-25
- [25] ChiBin Z., XiaoHui L., ZhaoMin W., ChangBao W. Implant-assisted magnetic drug targeting in permeable microvessels: Comparison of two-fluid statistical transport model with experiment. *J. Magn. Magn. Mater.* 426, (2017) 510-517.
- [26] Shirvalilou S., Khoei S., Khoei S., Raoufi N. J., et al. Development of a magnetic nano-graphene oxide Carrier for improved glioma-targeted drug delivery and imaging: In vitro and in vivo evaluations. *Chemico-Biological Interactions* (2018) doi:10.1016/j.cbi.2018.08.027
- [27] Silva L. H. A., Silva S. M., Lima E. C. D., Silva R. C., et al. Effects of static magnetic fields on natural or magnetized mesenchymal stromal cells: Repercussions for magnetic targeting. *Nanomed. Nanotechnol.* 14, (2018) 2075-2085
- [28] Wang F., Chen C., Chen Y., Wang P., et al. Magnetically targeted photothermal cancer therapy in vivo with bacterial magnetic nanoparticles. *Colloids Surf., B.* 172, (2018) 308-314
- [29] Radon P., Löwa N., Gutkelch D., Wiekhorst F., Design and characterization of a device to quantify the magnetic drug targeting efficiency of magnetic nanoparticles in a tube flow phantom by magnetic particle spectroscopy, *J. Magn. Magn. Mater.* 427, (2017) 175-180
- [30] Lee K., David A. E., Zhang J., Shin M. C., et al. Enhanced accumulation of theranostic nanoparticles in brain tumor by external magnetic field mediated in situ clustering of magnetic nanoparticles. *J. Ind. Eng. Chem.* 54, (2017) 389-397
- [31] Bjornerud A., Johansson L. The utility of superparamagnetic contrast agents in MRI: theoretical consideration and applications in the cardiovascular system. *NMR Biomed.* 17, (2004) 465-477
- [32] Kaittanis C., Santra S., Santiesteban O. J., Henderson T. J., et al. The Assembly State between Magnetic Nanosensors and Their Targets Orchestrates Their Magnetic Relaxation Response. *J. Am. Chem. Soc.* 133, (2011) 3668-3676
- [33] Bhattacharya D., Behera B., Sahu S. K., Ananthakrishnan R., et al. Design of dual stimuli responsive polymer modified magnetic nanoparticles for targeted anti-cancer drug delivery and enhanced MR imaging. *New J. Chem.* 40, (2016) 545-557
- [34] Jiang Q. L., Zheng S. W., Hong R. Y., Deng S. M., et al. Folic acid-conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hyperthermia and MRI in vitro and in vivo. *Appl. Surf. Sci.* 307, (2014) 224-233
- [35] Schleich N., Sibret P., Danhier P., Ucakar B., et al. Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging. *Int. J. Pharm.* 447, (2013) 94-101
- [36] Niu C., Wang Z., Lu G., Krupka T. M., et al. Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dual-mode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes. *Biomaterials* 34, (2013) 2307-2317
- [37] Huang Y., Mao K., Zhang B., Zhao Y. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics. *Mater. Sci. Eng. C.* 70, (2017) 763-771
- [38] Jedlovsky-Hajdú A., Tombácz E., Bányai I., Babos M., et al. Carboxylated magnetic nanoparticles as MRI contrast agents: Relaxation measurements at different field strengths. *J. Magn.*

Magn. Mater. 324, (2012) 3173–3180

[39] Fortuin A.S., Brüggemann R., van der Linden J., Panfilov I, et al. Ultra-small superparamagnetic iron oxides for metastatic lymph node detection: back on the block, Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. (2017) e1471.

[40] Maurea S., Mainenti P.P., Tambasco A., Imbriaco M., et al. Diagnostic accuracy of MR imaging to identify and characterize focal liver lesions: comparison between gadolinium and superparamagnetic iron oxide contrast media, Quant. Imaging Med. Surg. 4, (2014) 181–189

[41] Yokoo T., Wolfson T., Iwaisako K., Peterson M.R., et al. Evaluation of liver fibrosis using texture analysis on combined contrast-enhanced magnetic resonance images at 3.0T, BioMed. Res. Int. 2015 doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2015/387653>.

[42] Turkbey B., Agarwal H.K., Shih J., Bernardo M., et al. A phase I dosing study of ferumoxytol for MR lymphography at 3 T in patients with prostate cancer, Am. J. Roentgenol. 205, (2015) 64–69

[43] Sreeja V., Jayaprabha K. N., Joy P. A. Water-dispersible ascorbic-acid-coated magnetite nanoparticles for contrast enhancement in MRI. Appl Nanosci. 5, (2015) 435–441

[44] R. Jin, B. Lin, D. Li and H. Ai, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: design considerations and clinical applications. Curr. Opin. Pharmacol. 18, (2014) 18–27

[45] Shokrollahi H. Contrast agents for MRI. Mater. Sci. Eng. C. 33, (2013) 4485–4497

[46] Lee N., Hyeon T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents Chem. Soc. Rev. 41, (2012) 2575–2589

[47] Wei H., Bruns O. T., Kaul M. G., Hansen E. C., et al. Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive MRI contrast agents. Proc. Natl. Acad. Sci. 114, (2017) 2325–2330

[48] Gupta A, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials. 26, (2005) 3995-4021

[49] Roca A. G., Veintemillas-Verdaguer S., Port M., Robic C., et al. Effect of Nanoparticle and Aggregate Size on the Relaxometric Properties of MR Contrast Agents Based on High Quality Magnetite Nanoparticles. J. Phys. Chem. B. 113, (2009) 7033–7039

[50] Roch A.; Muller R. N.; Gillis P. Theory of proton relaxation induced by superparamagnetic particles. J. Chem. Phys. 110, (1999) 5403-5411

[51] Lacroix L.-M., Huls N. F., Ho D., Sun X., et al. Stable Single-Crystalline Body Centered Cubic Fe Nanoparticles. Nano Lett. 11, (2011) 1641-1645

[52] Amiri H., Bordonali L., Lascialfari A., Wan S. Protein corona affects the relaxivity and MRI contrast efficiency of magnetic nanoparticles, Nanoscale. 5, (2013) 8656-8676.

Capítulo VII

Estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar el comportamiento de las NPMs

Estudios in vitro e in vivo para evaluar el comportamiento de las NPMs

RESUMEN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos a partir de estudios, *in vitro*, realizados en la línea celular HCT116, derivadas de carcinoma colorrectal humano, con el objetivo de evidenciar el potencial terapéutico de los agentes teranósticos diseñados para el tratamiento de patologías oncológicas. Los efectos sobre la viabilidad celular se evaluaron mediante la prueba de exclusión de colorante azul de Tripano y la internalización efectiva de las NPMs se analizó cualitativamente mediante tinción con azul de Prusia. Aprovechando la fluorescencia de la molécula de Doxo, se realizaron estudios dinámicos de liberación del fármaco desde E-Doxo dentro de las células y se analizaron los cambios morfológicos celulares mediante microscopía de fluorescencia.

Por otra parte, se incluyen datos correspondientes a estudios *in vivo* empleando el modelo de *zebrafish* (o pez cebra) tendientes a evaluar la biocompatibilidad de las nanoformulaciones obtenidas a lo largo de esta tesis. El conjunto de resultados alcanzados e incluidos en este capítulo, permitirá avanzar hacia estudios en modelos animales superiores necesarios para validarlos por completo.

7.1 Introducción.

En capítulos anteriores se han descrito con suficiente detalle los requisitos que debe reunir una nanoformulación para que pueda ser definida como un agente terapéutico. Un requerimiento fundamental es el referido a su toxicidad y biocompatibilidad[1].

La evaluación de la biocompatibilidad representa una etapa imprescindible para avanzar hacia pruebas pre-clínicas y clínicas de las formulaciones diseñadas. Los estudios de nanomateriales realizados únicamente en cultivos celulares suelen presentar ciertas inconsistencias y subestimar los efectos de los mismos, razón por la cual la bioseguridad de estos debe analizarse, como complemento, también en modelos animales completos [2]. El modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*) se ha empleado con frecuencia para la evaluación de bioseguridad de NPMs y diversas nanoformulaciones, principalmente, antitumorales[3,4]. Dicha evaluación normalmente, incluye tanto el estudio de la toxicidad (efectos no específicos y no deseados de un fármaco o nanopartícula) como el de biocompatibilidad (capacidad de fármacos y/o nanopartículas de permanecer en contacto con un sistema vivo sin producir un efecto adverso). En este sentido, el *zebrafish* constituye un muy buen modelo porque, dependiendo del momento de la exposición a la formulación, se pueden estudiar tanto la toxicidad del desarrollo (etapa del embrión) como la biocompatibilidad (etapa de las larvas). Otras ventajas que se le reconocen a este modelo se relacionan con que es rápido, de alto rendimiento y rentable, ya que tienen un tamaño pequeño, una alta tasa de fertilización y un rápido desarrollo externo de embriones transparentes. Además, los sistemas cardiovascular, nervioso y digestivo del *zebrafish* guardan buena correlación con los modelos mamíferos[4]. A los 5 días posteriores a la fertilización (dpf), el cerebro, el corazón, el hígado, el páncreas, los riñones, el intestino y los sistemas sensoriales de larvas son completamente funcionales[5]. Por lo tanto, una administración en 5 dpf o posterior permite estudiar el efecto en órganos ya formados y funcionales (biocompatibilidad).

Otro aspecto importante para validar el potencial de las NPMs como terapéutico tiene que ver con su habilidad para proporcionar la concentración adecuada de fármaco que origine un efecto antiproliferativo similar o más eficiente que el provocado por la droga antitumoral libre. Para evaluar este aspecto se

seleccionó la línea celular de cáncer colorrectal, HCT116. Esta elección se basó en dos motivos fundamentales: en primera instancia, el cáncer colorrectal (CCR) se encuentra ubicado entre las primeras causas de mortalidad por enfermedad maligna en el mundo[6] y en cuanto a nuestro país, de acuerdo a un informe del Instituto Nacional del Cáncer, es el segundo más frecuente.

Por otro lado, si bien existen diferentes líneas celulares que pueden emplearse para estudios *in vitro* asociados al tratamiento de CCR humano[7,8], las células HCT116 muestran un fenotipo más agresivo respecto a otras líneas derivadas de CCR debido a mutaciones hiperactivadoras en los genes KRAS y PIK3CA, que son claves para la progresión del CCR[9]. Asimismo, se encuentra reportado que estas células sobreexpresan receptores de folato en su superficie[10,11].

En resumen, en el ***Capítulo V*** se demostró la capacidad de la nanoformulación E de incorporar un antineoplásico, la Doxorubicina, confiriéndole una potencial acción terapéutica. En el mismo capítulo se determinó la concentración de droga liberada en las distintas instancias simulando el medio plasmático y tumoral, respectivamente. En el ***Capítulo VI*** se confirmó, mediante ensayos *in vitro*, la capacidad de direccionamiento de las NPMs por acción de un campo magnético externo. También, se verificó el potencial de los mismos como agentes de contraste para RMI a través de ensayos fantomas.

En este capítulo se presentan los resultados alcanzados a partir de ensayos *in vitro* empleando la línea celular HCT116. Los estudios se centraron en evaluar la acción inhibitoria del crecimiento celular al administrar distintas dosis de E-Doxo. Se estudia la capacidad dual de estas NPMs para aumentar el ingreso de Doxo a las células tumorales debido a la presencia del AF en conjunto con la quimioterapia dirigida, como un aporte importante de esta tesis doctoral al campo de la nanomedicina.

Por otro lado, mediante el empleo de un modelo más complejo, multicelular, como son las larvas de *zebrafish*, se plantea analizar la biocompatibilidad de E y E-Doxo. Cabe destacar que el presente, constituye el primer estudio en donde se evalúa la biocompatibilidad de NPMs con núcleo de MAG en este modelo *in vivo*.

De esta manera, en conjunto con los resultados ya descritos en los Capítulos V y VI, sería posible estimar de una manera integral el potencial de E-Doxo como agente terapéutico.

7.2 Experimental.

En la figura 7.1 se muestra de manera simplificada el camino de reacción que permitió, de manera secuencial, obtener las formulaciones que se analizan en este capítulo. En resumen, el núcleo magnético (MAG) se trató con APTS para obtener MAG@APTS. Posteriormente, a MAG@APTS se le incorporó el ligando selectivo AF mediante anclaje covalente para obtener "E". Finalmente, Doxo se adsorbió sobre la superficie de "E" para dar lugar a E-Doxo.

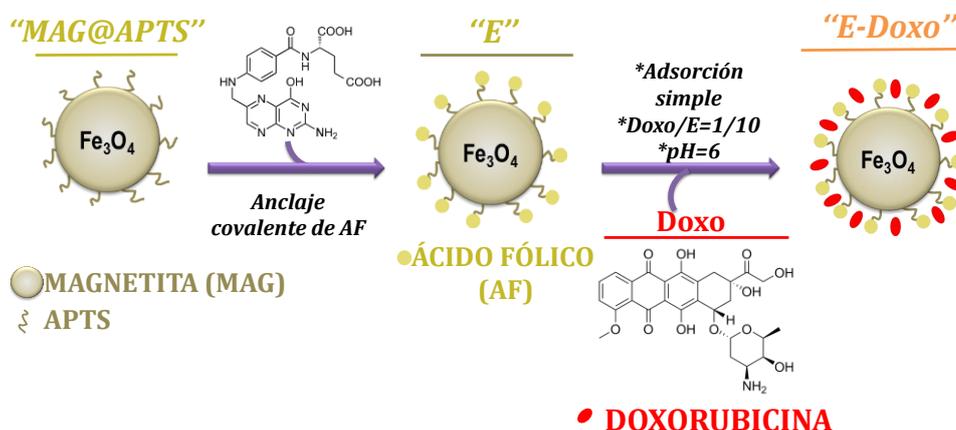


Figura 7.1 Esquema de síntesis de nanoformulaciones magnéticas.

7.2.1- Estudios *in vitro* de citotoxicidad e internalización.

7.2.1.1-Líneas celulares intestinales HCT116

Se empleó como modelo experimental la línea celular HCT116 derivada de carcinoma de colon humano adquirida de la ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas, Virginia).(Figura7.2).

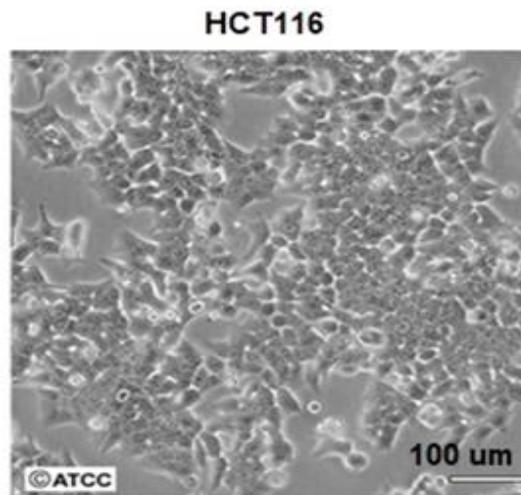


Figura 7.2 Línea celular derivada de CCR humano empleada como modelo experimental *in vitro*.

Las células se cultivaron a 37°C, bajo atmósfera de 5.5% de CO₂ en aire, en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor e irradiado, 1% de aminoácidos no esenciales, penicilina (100 UI.mL⁻¹), estreptomycin (100 mg.mL⁻¹) y gentamicina (50 mg.mL⁻¹). Los experimentos se realizaron cuando las células crecieron hasta llegar a una confluencia del 80%.

7.2.1.2 Ensayos de viabilidad celular.

Se estimó el número de células viables mediante el ensayo de exclusión del colorante azul de Tripano. Para ello, se sembraron 2x10⁴ células por triplicado para cada condición en multiplacas de 24 pocillos. Una vez alcanzado el nivel de confluencia apropiado, las células HCT116 se privaron de SFB por 24 hs y luego se incubaron en DMEM con 2 % SFB, y diferentes concentraciones de Doxo libre, de E-Doxo, de E y de MAG (según se informa en la tabla 7.1) durante 24hs. Luego del tratamiento las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron, se incubaron con el colorante azul de Tripano 0.4% y se contaron en una cámara Neubauer mediante su observación en un microscopio óptico. Se contaron las células por campo y se determinó el número de células que excluían el colorante (células viables) en cada condición.

7.2.1.3 Estudios de internalización de las nanoformulaciones.

Con el fin de evaluar la incorporación intracelular de las nanopartículas se realizaron diferentes ensayos.

a-Ensayos cualitativos de internalización mediante la técnica de azul de Prusia.

Se cultivaron 7×10^4 células HCT116 en cubreobjetos contenidos en placas de cultivo de 35mm de diámetro, durante 24 hs. Posteriormente se incubaron con una suspensión de E-Doxo en dosis de $1.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Doxo liberada por un período de tiempo entre 0.5 y 24 hs en medio de cultivo fresco. Las células se trataron en presencia o ausencia de NPMs y luego se lavaron para remover el exceso de NPMs con PBS. Se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se lavaron y se expusieron a ferrocianuro de potasio al 6% en HCl al 10%. El ferrocianuro de potasio en medio ácido es capaz de precipitar Fe en color azul. Como contraste se utilizó eosina. Los preparados se observaron utilizando un microscopio óptico equipado con una cámara Olympus.

b-Microscopía de fluorescencia

Las células HCT116 (7×10^4) se sembraron en cubreobjetos contenidos en placas de cultivo de 35mm de diámetro. Después del tratamiento con el fármaco o con E-Doxo ($1.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ final de Doxo) por un tiempo entre 0.5 y 24 hs, las células se lavaron dos veces con PBS atemperado y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente por 10 minutos. Se utilizó el marcador nuclear fluorescente DAPI (color azul) para observar los núcleos celulares. Se aprovechó la fluorescencia de Doxo y se obtuvieron imágenes de microscopía utilizando un microscopio de fluorescencia con una magnificación de $400\times$. De manera simultánea, sobre los mismos preparados se realizó un análisis de la variación de la morfología celular y nuclear como consecuencia del tratamiento con Doxo libre o E-Doxo.

En la tabla 7.1 se resumen los ensayos realizados *in vitro* usando la línea celular HCT116. Se prepararon suspensiones de NPMs con el fin de lograr dosis finales de 0.1, 0.5 y $1.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Doxo liberada para realizar estudios comparativos con las mismas dosis de droga libre. Para preparar las dispersiones se tuvieron en cuenta los datos de capacidad de carga de E-Doxo (%) y el porcentaje de

liberación de Doxo a pH 4.9 y en presencia del imán (ambos reportados en el **Capítulo V**). En particular en el ensayo de viabilidad donde se evaluaron las formulaciones MAG y E, se utilizaron suspensiones de NPMs de igual concentración a la correspondiente a la concentración máxima E-Doxo.

Tabla 7.1. Masas de NPMs o Doxo libre empleada en los ensayos *in vitro*

Técnica	[MAG] ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	[E] ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	[E-Doxo] ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	[Doxo] final liberada de E-Doxo en el ensayo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	[Doxo] libre comercial ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Ensayo de viabilidad	145	145	14.5	0.1	0.1
			72.5	0.5	0.5
			145	1.0	1.0
			-----	-----	5.0
Técnica de Azul de Prusia	-----	-----	145	1.0	-----
Microscopía de Fluorescencia	-----	-----	145	1.0	1.0

7.2.1.4. Análisis estadístico de los datos.

Los datos obtenidos de al menos dos experimentos independientes se presentaron como media \pm desviación estándar (DE). Se utilizó la prueba t de Student (de dos vías, igualdad de varianza) para determinar las diferencias significativas entre dos grupos de datos. Se consideraron como estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$ y $< 0,01$, que fueron indicados con asteriscos (* y **, respectivamente).

7.2.2- Estudios de biocompatibilidad en larvas de *zebrafish*.

7.2.2.1-Mantenimiento de los animales.

Los ejemplares adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*) se mantuvieron a 28.0 ± 1.0 °C en peceras dentro de un acuario con un ciclo de 14 hs de luz-10 hs de oscuridad. Los peces fueron alimentados con escamas secas (TetraMin PRO®) tres veces al día y una vez al día con artemias (*Artemia persimilis*). El agua en el acuario se aireó

constantemente y se mantuvo a un pH entre 7.0-8.0. En este estudio, las larvas se refieren a los animales post eclosión (más de 3 días posteriores a la fecundación (dpf)). En la figura 7.3 se esquematiza esto. Los embriones se obtuvieron por apareamiento natural y se criaron en medio E3 (NaCl 5.0mmol.L⁻¹, KCl 0.17 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 0.33 mmol.L⁻¹ y MgSO₄ 0.33 mmol.L⁻¹ en agua desionizada y 50.0 ppb de azul de metileno como fungicida). Para los estudios se seleccionaron aquellos huevos fertilizados que se encontraron en buenas condiciones. Las características de los huevos se determinaron con un estereomicroscopio Nikon SMZ800 (EE. UU.)

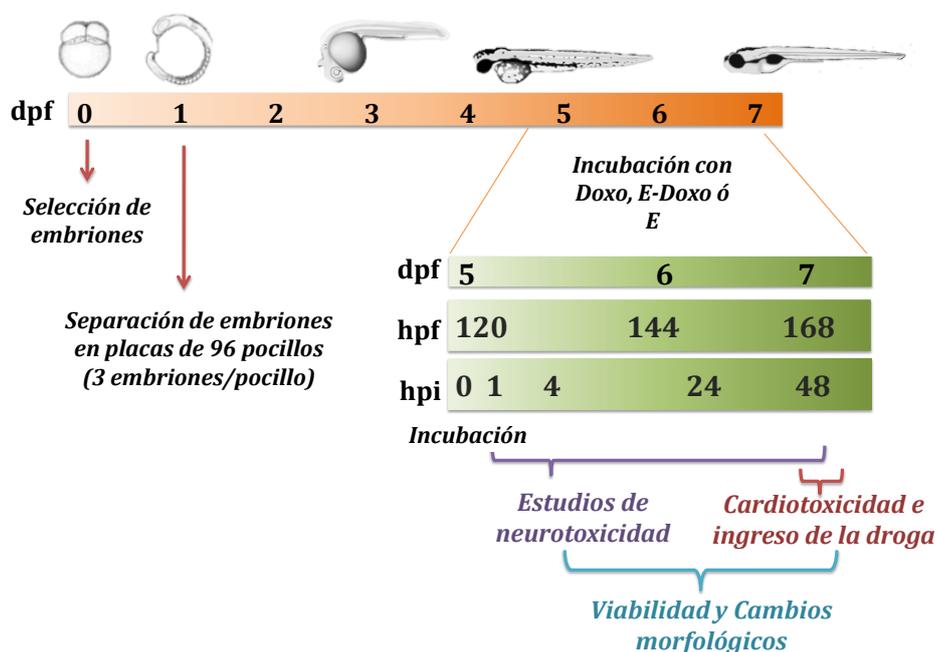


Figura 7.3. Esquema de desarrollo del *zebrafish* y ensayos de biocompatibilidad.

Para el tratamiento de larvas, se colocaron tres embriones de *zebrafish*, no eclosionados (1 dpf) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía medio E3 y se incubaron durante 4 días. A los 5 dpf, el medio se reemplazó por diferentes soluciones ó suspensiones de Doxo, E-Doxo, ó E según correspondiese. Se analizaron los efectos de las diferentes formulaciones sobre la viabilidad, el ritmo cardíaco y la morfología de las larvas a las 4, 24, y 48 hs posteriores a la incubación (hpi). Mientras que el movimiento espontáneo (parámetro de neurotoxicidad) se analizó a las 1, 4, 24 y 48 hpi. Por último, se analizó la captación de Doxo por parte de las larvas de *zebrafish* mediante microscopía óptica (a lo largo de todo el estudio) y de fluorescencia (a las 48 hpi).

7.2.2.2-Cumplimiento de las normas éticas.

Todos los procedimientos empleando larvas de *zebrafish* se realizaron en estricta conformidad con las directrices del Instituto Nacional de Salud para el cuidado y mantenimiento de animales. Los protocolos de estudio fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado Animal de la Universidad Nacional de Quilmes (CE-UNQ 2/2014) (Buenos Aires, Argentina) y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) (CICUAL-UNQ 013). -15 y 014-15).

7.2.2.3- Tratamiento.

Para el tratamiento de larvas, se colocaron tres embriones de *zebrafish* de 1 dpf en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con medio E3 y se incubaron durante 4 días. A los 5 dpf, el medio se reemplazó por 250 μL de diluciones seriadas al medio en medio E3 de Doxo ($3.12\text{-}50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), E-Doxo ($3.12\text{-}50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Doxo en $70.75\text{-}1132 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de E) ó E ($70.75\text{-}1132 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

7.2.2.4- Viabilidad.

La viabilidad se estudió a las 4, 24 y 48 hpi con las diferentes formulaciones por observación directa en un estereomicroscopio. Se consideró que las larvas estaban muertas cuando no se observaron latidos cardíacos. La viabilidad se expresó como un porcentaje de las larvas vivas con respecto al total de larvas por tratamiento ($n = 72$).

7.2.2.5- Neurotoxicidad.

El movimiento espontáneo se determinó en un sistema multicanal convertidor analógico a digital (WMicrotracker, Designplus SRL, Argentina) tal y como se describió en [3,4]. La actividad locomotora espontánea se determinó por 15 minutos a las 4, 24, 48 y 72 hpi a temperatura ambiente. El sistema está basado en tres haces infrarrojo que atraviesan cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Cada evento de actividad (definido como la cantidad de veces que las larvas atraviesan los haces de luz infrarrojos) fue calculado en tiempo real por un detector de fluctuaciones en el receptor de la señal. Las variaciones mayores al 3% fueron consideradas como eventos de actividad. La actividad de nado se calculó sumando el número de eventos

dados en 15 minutos. El movimiento espontáneo se expresó como el porcentaje de movimiento en cada tratamiento respecto del movimiento en el control de larvas no tratadas. Los cambios en los eventos espontáneos de actividad locomotora podrían reflejar la neurotoxicidad de los diferentes nanosistemas[12,13], así como un efecto morfológico o letal. Para cada ensayo, se utilizaron ocho réplicas técnicas y tres réplicas biológicas para cada dilución (n = 24)

7.2.2.6- Cardiotoxicidad.

El ritmo cardíaco de las larvas de *zebrafish* se evaluó luego de 48 hpi con Doxo, E-Doxo ó E. Cada larva de *zebrafish* se transfirió individualmente a un portaobjetos con carboximetilcelulosa sódica y se colocó bajo un estereomicroscopio trinocular. La frecuencia cardíaca se determinó contando el número de latidos cada 15 segundos y se expresó como latidos por minuto. Los resultados se expresaron como un porcentaje con respecto a la frecuencia cardíaca en el control de larvas no tratadas. Los experimentos se realizaron dos veces en nueve larvas por grupo (n = 18). La diferencia entre la frecuencia cardíaca de la condición control y las larvas tratadas se puede considerar como cardiotoxicidad[14].

7.2.2.7- Cambios morfológicos.

Las larvas se fotografiaron con una cámara Microsoft a las 4, 24 y 48 hpi para determinar posibles cambios morfológicos causados por Doxo, E-Doxo ó E. Entre los posibles cambios, se evaluaron varias alteraciones morfológicas como la columna doblada (o cuerpo arqueado), malformación de mandíbula o cola, necrosis en diversos tejidos (región opaca de cabeza, hígado, vitelo, corazón o cola), cabeza pequeña, yema vitelo opaco, vitelo sin consumir, vejiga natatoria desinflada, y/o edemas (pericardiales u abdominales). Los peces se clasificaron según el grado de anomalías morfológicas [0=sin efectos tóxicos visibles; 1=leve, una o dos anomalías morfológicas; 2=moderado, tres a cuatro anomalías; 3=severo, más de cuatro anomalías; y 4=muerto] (de acuerdo a una adaptación de lo publicado por Yang y col.[15]). A partir de la puntuación individual de cada larva, se calculó el promedio y desvió estándar de malformaciones para cada tratamiento. Se utilizaron nueve réplicas técnicas y dos réplicas biológicas para este ensayo (n=18).

7.2.2.8- Evaluación *in vivo* de la eficiencia del ingreso del fármaco.

Con el objetivo de estudiar la captación *in vivo* del fármaco, las larvas de *zebrafish* se trataron con distintas concentraciones de Doxo, E y E-Doxo (como se explica en la sección 7.2.2.3) y se fotografiaron en microscopio óptico a las 4, 24 y 48 hpi. Debido a su coloración, la Doxo aportó color rojo al tracto digestivo de las larvas, mientras que las E se observaron como agregados oscuros. De este modo, se pudo seguir tanto la captación de la droga libre como encapsulada en el tiempo, a partir de la observación directa de las larvas. Además, con el objetivo de cuantificar la captación del fármaco, las larvas se expusieron a $25.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Doxo libre o encapsulada (E-Doxo), respectivamente, y se fotografiaron en microscopio de fluorescencia (Cytation 5, EEUU) a las 48 hpi. Para ello, las larvas se excitaron a 589 nm y la intensidad de emisión a 647 nm (fluorescencia roja) se cuantificó con el programa Image-J. Ambos experimentos se realizaron dos veces en nueve larvas por grupo (n = 18).

7.2.2.9- Análisis estadístico de los estudios *in vivo*.

Los resultados se expresan como la media \pm DE. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism v6.0. Se utilizaron los análisis ANOVA de una vía o de dos vías, seguidos por el post-test de múltiples comparaciones de Dunnett, en función de los datos obtenidos. Las diferencias se consideraron significativas sólo cuando $p < 0,05$.

7.3 Resultados y Discusión.

7.3.1 Efecto de MAG, E, E-Doxo y Doxo libre sobre la viabilidad celular de las células HCT116.

Con el fin de determinar el potencial terapéutico de la formulación E-Doxo se evaluó su efecto sobre la viabilidad celular, y se lo comparó con el efecto causado por la droga libre. Paralelamente se analizaron los efectos sobre la viabilidad celular de las NPMs sin modificar, es decir el carozo magnético (MAG) y del nanotransportador E. Para ello se empleó el test de exclusión del azul Tripano, que se fundamenta en el hecho de que el colorante es capaz de ingresar a las células en vías de muerte o muertas, de modo que al final del ensayo las células teñidas son excluidas del conteo[16]. La selección del tipo de ensayo se realizó teniendo en cuenta que este test ha sido propuesto por Hoskins y col. como el principal método estándar para validar

la viabilidad celular después de la incubación con NPMs[17]. En tanto que la selección de las concentraciones de Doxo analizadas se realizó en función de datos recopilados de la bibliografía[18,19], y considerando los datos obtenidos a partir del estudio de direccionamiento presentado en el **Capítulo VI, sección 6.3.1** en el cual se estimó la concentración de Doxo que se podría liberar en el sitio blanco. Se ha demostrado que el fármaco Doxo, presenta un efecto antiproliferativo mediante la inducción de senescencia en las células de HCT116 cuando es administrado en dosis bajas ($0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$)[20], mientras que la apoptosis celular tiene lugar a concentraciones de fármaco más elevadas ($\geq 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$)[18].

Los resultados obtenidos a partir de este ensayo se muestran en la figura 7.4.

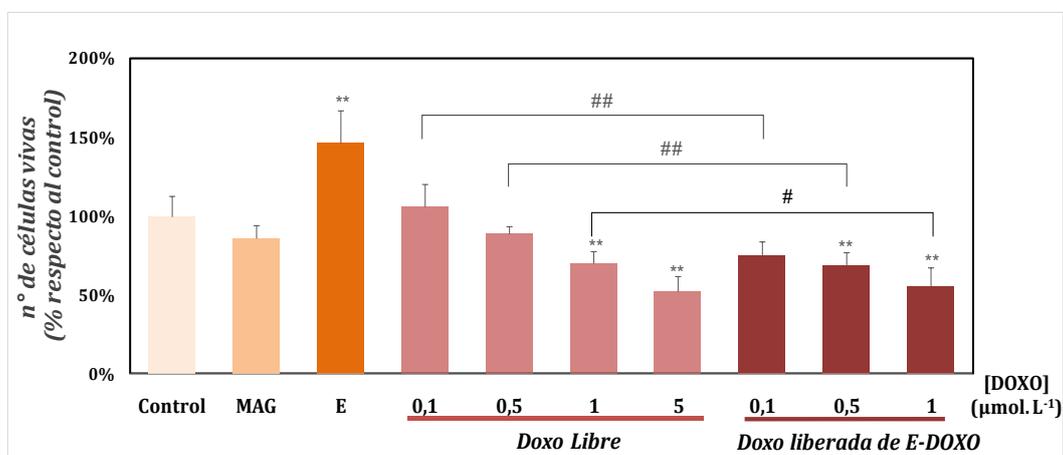


Figura 7.4 Efecto de MAG, E, E-Doxo y Doxo libre sobre la viabilidad de las células HCT 116.

Las dosis observadas en el gráfico corresponden tanto a la droga libre (barras centrales rosadas) como a la cantidad de droga capaz de ser liberada por E-Doxo en las condiciones de ensayo (barras derechas bordó) (ver tabla 7.1).

De los datos incluidos en la figura 7.4, se aprecia una disminución en el número de células vivas en aquellos cultivos tratados con Doxo en las dosis correspondientes a 1 y $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ respecto de la condición control. Dosis menores ($0.1-0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no ejercieron un efecto estadísticamente significativo en comparación con el número de células vivas del control.

Al emplear MAG y NPMs sin droga (E), se intentó elucidar el efecto sobre la viabilidad del carozo magnético y en particular la influencia de la cubierta de AF. Se observó, luego del recuento mediante el ensayo empleando el colorante azul de

Tripiano, que MAG no modifica el número de células viables. La adición de la formulación E al cultivo celular, resultó en un aumento notable del número de células vivas respecto del control, posiblemente debido a los efectos selectivos del AF (descritos en los *Capítulos IV y V*) y proliferativos de esta vitamina sobre células tumorales. Es conocido que el AF es utilizado por las células para sintetizar pirimidinas y purinas necesarias para la síntesis y el mantenimiento de los ácidos nucleicos (ADN, ARN). Además, tiene un papel clave en el metabolismo de un carbono para la metilación de moléculas esenciales (ADN, ARN y proteínas), y es un cofactor en una variedad de reacciones[21,22]. Es por esto que se requiere en la división celular, donde tiene un papel esencial en las condiciones en que son necesarias células de rápida proliferación, como ocurre en el caso de patologías oncológicas[23,24]. De esta manera la administración de E, no sólo favorecería el ingreso a la célula de las NPMs mediante la endocitosis mediada por receptor, sino que además el AF que se libera en el interior, podría ser utilizado por la célula acelerando de esta forma su proliferación.

No obstante, cuando las células se incubaron en presencia de NPMs funcionalizadas con AF y cargadas con la droga antitumoral (E-Doxo) se observó que el número de células vivas se reduce significativamente respecto del control para todas las dosis evaluadas y que existe una relación dosis dependiente. Además los resultados revelaron que, en cada caso, el número de células vivas disminuye respecto de la misma dosis empleando droga libre. Es interesante destacar que con dosis mucho más bajas de Doxo liberada a partir de E-Doxo (cinco veces menores), se consiguió un nivel de muerte celular comparable al alcanzado con la máxima dosis de Doxo libre.

Estos datos sugieren por un lado que la droga mantiene su efecto citotóxico aún luego de ser adsorbida al nanotransportador “E” y por otro lado que la selectividad dada por el AF mejoraría notablemente dicho efecto sobre las células de cáncer colorrectal.

En este sentido, se ha reportado que el fármaco Doxo, cuando se encuentra como droga libre, ingresa a la célula por difusión simple a través de la membrana celular[25]. Sin embargo, su incorporación a un transportador funcionalizado con un ligando selectivo, favorece el ingreso celular del fármaco debido al transporte activo

mediado por receptor[26,27]. Esto explicaría por qué frente a la exposición de una misma dosis de Doxo el efecto citotóxico es significativamente mayor cuando la misma es administrada vía E-Doxo que cuando se ingresa como droga libre.

Resultados análogos a los obtenidos en esta tesis, han sido descriptos previamente. Gautier y col. informaron una viabilidad del 50% en células MCF-7 (línea celular de adenocarcinoma de mama humano) tratadas con $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DOX-PEG-MNP, aunque estos efectos fueron observados luego de 96 hs de incubación[28]. Asimismo, el grupo de Tomankova y col. detectaron una viabilidad del 80% (respecto del control) de las células MCF-7 tratadas con Doxo unida a nanoclusters superparamagnéticos de óxido de hierro, empleando concentraciones de droga entre $0.5\text{-}5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ y realizando el ensayo durante 24 hs. En este caso los investigadores emplearon el ensayo colorimétrico MTT[29]. Otros autores han informado que la viabilidad de las células HeLa (línea celular derivada de cáncer cérvico-uterino) se reduce a valores cercanos a los obtenidos en esta tesis cuando las mismas se trataron con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro funcionalizadas con AF cargadas con Doxo en concentraciones mucho más elevadas que la estudiadas en esta tesis ($20 \mu\text{mol. L}^{-1}$) y empleando tiempos de incubación más prolongados (48 y 72 h)[30,31]. Respecto a la línea celular HCT116, Licciardi y colaboradores informaron valores de viabilidad celular de alrededor de 48% luego de 24hs de incubación con una cantidad de NPMs que representaba una concentración final de Doxo de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Esta formulación estaba constituida por nanopartículas superparamagnéticas cubiertas con polímeros anfífilicos, funcionalizadas con AF y cargadas con Doxo[11]. En resumen, de acuerdo a los resultados alcanzados y lo reportado en bibliografía puede indicarse que las nanoformulaciones obtenidas resultaron muy eficaces, en términos del efecto de Doxo.

A partir de estos datos, es posible evidenciar que el efecto citostático de Doxo anula la proliferación inducida por el AF contenido en la nanopartícula. En este sentido, Almeida y col. realizaron estudios de viabilidad celular sobre cultivos de células MCF-7 empleando la técnica de MTT y RT-qPCR, con el fin de evaluar si la administración conjunta de AF y Doxo generaba una disminución del efecto antiproliferativo del fármaco. Sus resultados indican que si bien existe un cambio en los perfiles de expresión génica de las células MCF-7 como consecuencia de la

administración de AF, esto no influyó en los efectos citotóxicos propios de Doxo, debido probablemente a un cambio en la ruta de muerte celular[32].

Para tratar de comprender y justificar los resultados de viabilidad se realizaron estudios tendientes a evaluar, desde el punto de vista cualitativo, algunos aspectos relacionados con la internalización de las NPMs de E-Doxo.

Para ello se emplearon dos técnicas complementarias: i) Azul de Prusia y ii) microscopía de fluorescencia.

En la figura 7.5 se muestran las imágenes correspondientes a las células tratadas con el colorante azul de Prusia en presencia o ausencia de E-Doxo en dosis final de droga liberada de $1 \mu\text{mol. L}^{-1}$ por un período de entre 0.5 y 24 horas.

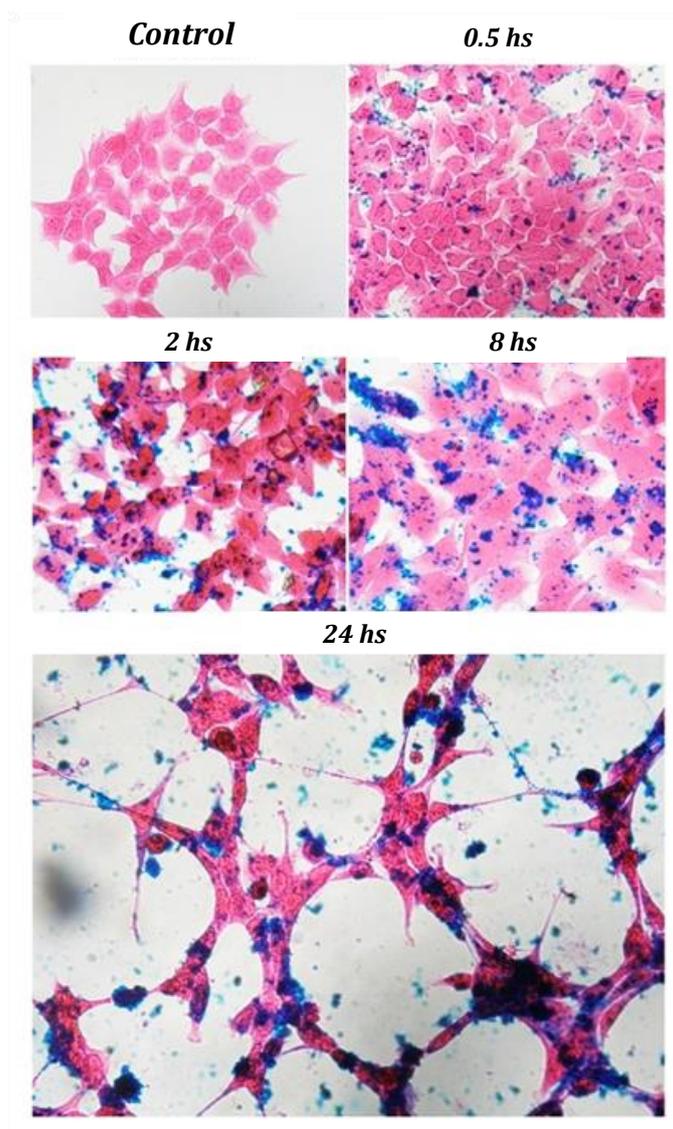


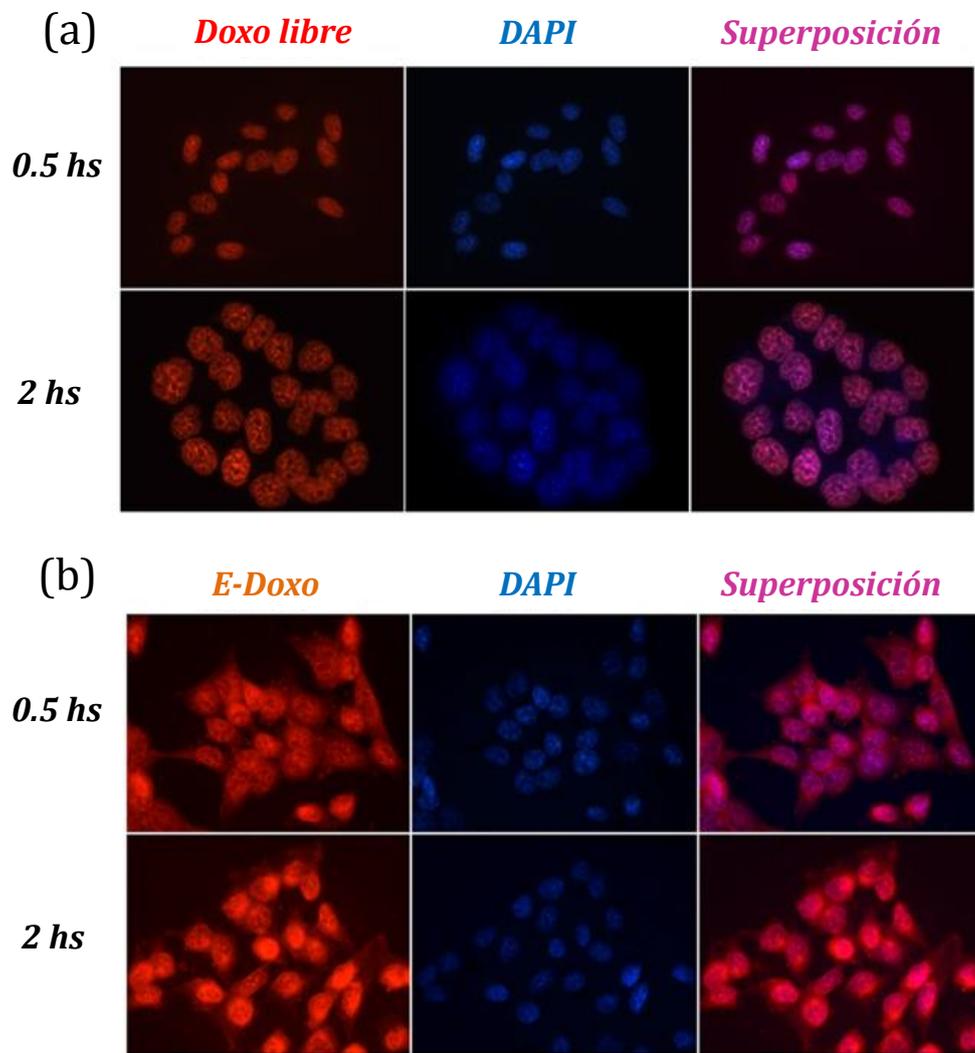
Figura 7.5 Células HCT116 incubadas con E-Doxo (concentración de Doxo final liberada=1 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) a distintos tiempos de incubación, y teñidas con azul de Prusia. (Magnificación 400x)

Como se indicó en la [sección 7.2.1.3a](#) el ferrocianuro de potasio en medio ácido es capaz de precipitar el Fe en color azul. En la figura 7.5 se observa, como era de esperarse, ausencia de hierro precipitado en aquellas células que no fueron tratadas con E-Doxo (condición control). En el caso de las células tratadas, puede apreciarse, en términos cualitativos, que la cantidad de hierro intracelular va aumentando a medida que el tiempo de exposición avanza.

Cabe destacar que se produce un incremento del tamaño celular luego de 8 hs de tratamiento. Una vez alcanzadas las 24 hs se detecta una disminución en el número de células por campo, y además las mismas emiten proyecciones de la

membrana plasmática que estarían acompañadas por citosol. Muchas de estas proyecciones se conectan con otras células de la misma morfología.

Aprovechando que la Doxo es fluorescente al ser excitada con luz verde y emite en el rojo, fue posible observar las células tratadas con E-Doxo (concentración final de Doxo=1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) mediante microscopia de fluorescencia, como técnica complementaria al Azul de Prusia para evaluar cualitativamente la internalización. Se utilizó el marcador nuclear fluorescente DAPI (de color azul) para observar los núcleos celulares y el ensayo se prolongó entre 0.5 y 24 hs. En la figura 7.6 se muestran las imágenes obtenidas a partir del ensayo.



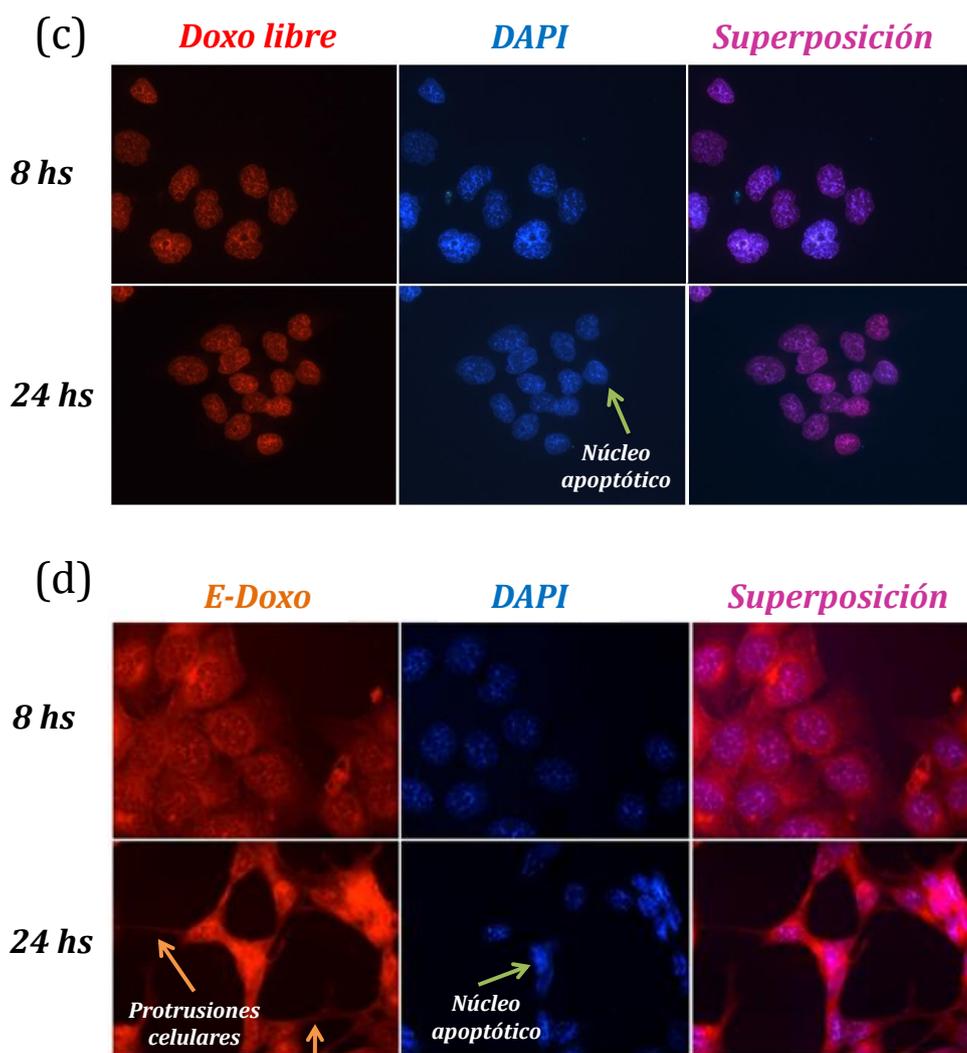


Figura 7.6 Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células HCT 116 incubadas con Doxo libre ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) o E-Doxo ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ = concentración final de Doxo liberada). De (a) a (d) se observan las imágenes adquiridas a diferentes tiempos de exposición. Las células indicadas por flechas con cromatina fragmentada, condensada y teñida intensamente son típicas de apoptosis. (Magnificación 400x)

En la figura 7.6 (a) y (b) se muestra que luego del tratamiento por 0.5 y 2 hs, la Doxo libre se localiza exclusivamente en el núcleo celular, en cambio la distribución de la Doxo cambia al ser componente de las E-Doxo pudiendo observarse también a nivel del citosol.

No se visualizan cambios significativos en la morfología del núcleo debido a uno u otro tratamiento mediante esta técnica a estos tiempos, lo cual coincide con lo que se observó a través de la técnica de Azul de Prusia.

En las figuras 7.6 (c) y (d) se aprecia que luego de 8 hs de tratamiento existe un aumento en el tamaño del núcleo, tanto por la presencia de la Doxo libre como de las NPMs de E-Doxo. Este incremento se debe a las mitosis aberrantes e incompletas inducidas por la Doxo que conducen a la poliploidía, las cuales generan acumulación de ADN que más tarde desencadenará la senescencia celular y posiblemente la muerte por apoptosis[20]. Al comparar las figuras 7.6 (a) y (c), se observa que cuando el tratamiento se realiza con Doxo libre, esta se localiza exclusivamente a nivel nuclear independientemente del tiempo de incubación explorado. Sin embargo, al comparar las figuras 7.6 (b) y (d), las NPMs de E-Doxo luego de 24hs, continúan situadas en el citoplasma, liberando el fármaco progresivamente, el cual se irá acumulando en el núcleo celular.

Las diferencias encontradas a partir de la incubación de las células con Doxo ó E-Doxo se acentúan a las 24 hs. A partir de ese tiempo se detectan cambios morfológicos profundos en las células asociados a la presencia de nanopartículas. Se observan núcleos más picnóticos correspondientes con estadios apoptóticos, y se evidencian protusiones de la membrana plasmática. Para confirmar si estos cambios morfológicos están acompañados por una reestructuración citoesqueletaria, deberían emplearse anticuerpos que reconozcan componentes del citoesqueleto celular tales como actina o tubulina. [33]. Es importante resaltar que estos resultados coinciden con los encontrados previamente a partir de la técnica azul de Prusia.

A partir de estos resultados, es evidente que el tratamiento con las nanopartículas cargadas con Doxo no solo disminuye el número de células vivas sino que también produce cambios estructurales a nivel celular que no son observados por el uso de Doxo libre.

La sumatoria de los datos obtenidos a partir de la aplicación estas dos técnicas permitiría indicar que el aumento de la citotoxicidad observada con las nanopartículas E-Doxo en comparación con la droga libre, incluso en las concentraciones más bajas, a iguales períodos de tratamiento sería resultado de la captación de las NPMs (y por ende de la droga) por parte de las células tumorales. Además permitiría confirmar que efectivamente las E-Doxo ingresan a la célula y liberan el fármaco sin producir una liberación de Doxo significativa previo a su internalización. Estos resultados concuerdan con investigaciones reportadas por

otros autores. En este sentido, Rajkumar y col. evaluaron la internalización en células HeLa de nanopartículas funcionalizadas con AF y cargadas con Doxo (IO-MMA-DOX-PEG-OCH₃/FA) y la compararon con la correspondiente al fármaco libre y a la formulación sin AF. Sus resultados muestran que la intensidad de la fluorescencia de Doxo en la región del citosol aumentó y la acumulación de Doxo en el núcleo se hizo más evidente cuando se emplearon nanoformulaciones funcionalizadas con AF[31]. En la misma línea se encuentran los datos presentados por Li y col, quienes analizaron la captación de NPMs en células HeLa y HepG2 (línea celular de cáncer de hígado) empleando microscopía por fluorescencia. Ellos observaron un incremento en la internalización, de entre 2 y 4 veces, al incubar las células con nanoformulaciones que contenían AF respecto de aquellas que sólo se encontraban cargadas con la droga[27]. Se ha reportado además, que el AF aumenta 2.5 veces la presencia de NMPs en el interior de células derivadas de glioblastoma de rata (línea celular C6), dejando clara evidencia del papel del AF en la captación celular, el ingreso de fármaco y el aumento del potencial terapéutico respecto de la droga libre. Cabe destacar que estos resultados se alcanzaron empleando las dos técnicas propuestas aquí para evaluar la internalización[34].

7.3.2. Evaluación *in vivo* de la biocompatibilidad de Doxo, E y E-Doxo: Análisis de viabilidad, actividad locomotora, ritmo cardíaco, y cambios morfológicos de las larvas de *zebrafish*.

Con el fin de determinar la biocompatibilidad de las nanoformulaciones obtenidas, se evaluó el efecto de Doxo, E y E-Doxo sobre la viabilidad, la actividad locomotora, el ritmo cardíaco, y los cambios morfológicos de las larvas de *zebrafish*.

En primera instancia, se procedió a la selección de las concentraciones de Doxo, E y E-Doxo para realizar los ensayos correspondientes. Para ello se tomaron como referencia datos obtenidos de recopilación bibliográfica. De acuerdo al trabajo de Jovic y col. el fármaco muestra, en el plasma, una vida media inicial de aproximadamente 8 minutos, seguida por una vida media terminal de alrededor de 30 hs. La mayor exposición de los órganos al fármaco se produce durante el fase terminal en la que las concentraciones de Doxo en plasma son inferiores a 0,054 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [35]. Con el objetivo de evaluar concentraciones intermedias, se utilizaron dosis entre 3,12 y 50,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Doxo.

Por otro lado, como se comentó en el **Capítulo VI** se comercializan nanopartículas de óxido de hierro como agentes de contraste T₂ para RMI (aprobados por la FDA) que son biocompatibles en las dosis terapéuticas[36]. La dosis clínica de NPMs es la que se corresponde con 45 μmol Fe.kg total⁻¹ [37]. Por ejemplo, la dosis clínica para el agente de contraste AMI-121 está entre 84-220 μg Fe.ml⁻¹ y para OMP es de 500 μg Fe.ml⁻¹[38]. Por ello, para llevar a cabo los ensayos presentados en esta sección del capítulo se emplearon concentraciones equivalentes entre 20 y 280 μg Fe.ml⁻¹, que corresponden a 70.75-1132 μg.mL⁻¹ de E. En el caso de E-Doxo, se emplearon concentraciones entre 3.12 μg.mL⁻¹ de Doxo en 70.75 μg.mL⁻¹ de E y 50.0 μg.mL⁻¹ de Doxo en 1132 μg.mL⁻¹ de E.

La viabilidad de las larvas de *zebrafish* de 5dpf se estudió a las 4, 24 y 48 hpi. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.7. La viabilidad se expresa como el porcentaje de larvas vivas con respecto al total de larvas, y los datos se muestran como media ± DE. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba ANOVA de dos vías seguida de las comparaciones múltiples de Dunnett.

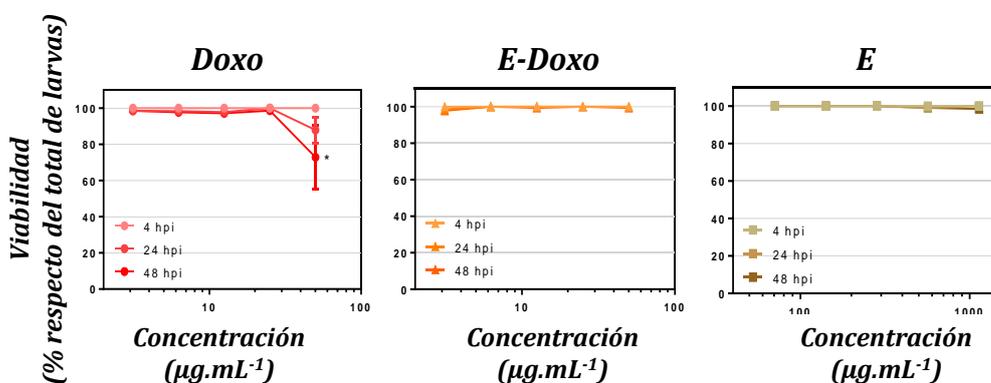


Figura 7.7 Viabilidad de larvas de *zebrafish* expuestas a Doxo, E-Doxo ó E.

Es posible evidenciar a partir de los datos presentados en la figura 7.7 que ninguno de los tratamientos redujo la viabilidad de las larvas, excepto en el que se utilizaron 50.0 μg.mL⁻¹ de Doxo, el cual produjo una mortalidad significativa del 27% de las larvas a las 48 hpi. La administración de 50.0 μg.mL⁻¹ de E-Doxo no redujo la viabilidad, lo cual es indicativo de una reducción en la toxicidad generalizada del fármaco cuando se encuentra formando parte de la nanoformulación E-Doxo.

Por otro lado, se estudió el movimiento espontáneo de las larvas expuestas a los diversos tratamientos a 1, 4, 24 y 48 hpi. En este sentido, la cuantificación de la

actividad locomotora es un parámetro que permite la predicción de efectos neurotóxicos en larvas de *zebrafish*[12,13]. El aumento o reducción del movimiento espontáneo con respecto al control podría ser indicativo de efectos adversos en uno o más componentes de la compleja red neuronal que gobierna el sistema locomotor temprano o podría deberse a un efecto morfológico o letal.

Los resultados de este ensayo se grafican en la figura 7.8.

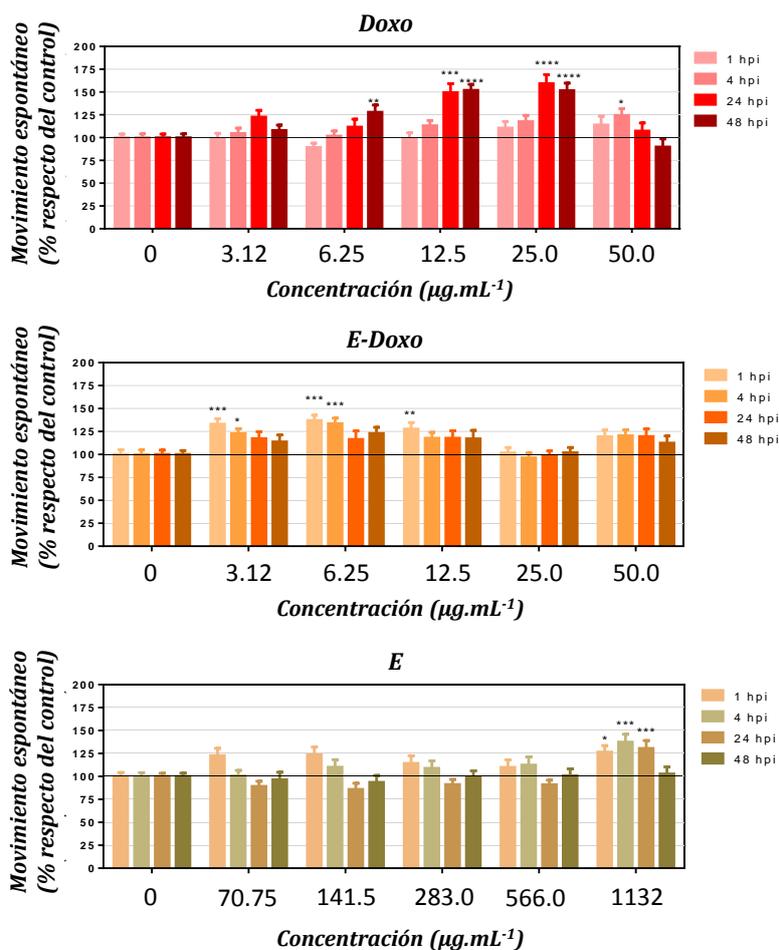


Figura 7.8 Neurotoxicidad de Doxo, E-Doxo y E estudiados como cambios en el movimiento espontáneo en larvas *de zebrafish*.

El movimiento espontáneo estudiado a diferentes tiempos se expresó como un porcentaje respecto del movimiento espontáneo en las larvas control no tratadas. Los valores se muestran como media \pm DE. Las diferencias significativas con respecto al control se analizaron mediante la prueba ANOVA de dos vías seguida por el post-test de comparaciones múltiples de Dunnett (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

A partir de los datos que se muestran en la figura 7.8, se aprecia que el tratamiento con $3.12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Doxo no produjo cambios significativos en la actividad locomotora con respecto al control. Mientras que el tratamiento con $6.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Doxo produjo una hiperactividad significativa a 48 hpi, las dosis de 12.5 y $25.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Doxo provocaron un aumento del movimiento espontáneo desde 24 hpi. Por otro lado, el tratamiento con $50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Doxo incrementó significativamente la actividad locomotora a las 4 hpi, pero no a las 24 y 48 hpi. Estos hallazgos pueden explicarse considerando que a las 24 y 48 hpi, algunas larvas incubadas con esta concentración de fármaco estaban hiperactivas, mientras que otras empezaron a morir (ya que se observó letalidad anteriormente) y los movimientos promedios son más bajos que con las otras concentraciones. Según Tacar y colaboradores, la neurotoxicidad causada por Doxo es indirecta porque este medicamento no puede cruzar la barrera hematoencefálica[39]. Sin embargo, la larva de *zebrafish* no tiene una barrera hematoencefálica completamente funcional hasta los 10 dpf, por lo que en este modelo animal, la Doxo podría generar efectos directamente en el cerebro larvario.

En el caso de E-Doxo, las concentraciones más bajas (3.12 , 6.25 y $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), produjeron una hiperactividad significativa en un tiempo más corto (1 y 4 hpi) con respecto al fármaco libre. Este resultado podría interpretarse como una mayor llegada de Doxo al cerebro, mediado por el nanotransportador E, lo que desencadena un efecto más rápido a concentraciones más bajas que el fármaco libre. Por último, se determinó que la nanoformulación E no produce ningún cambio significativo respecto del control en concentraciones entre 70.75 a $566.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

El fármaco Doxorubicina es responsable de las alteraciones estructurales en los cardiomiocitos del corazón, alargándolos y produciendo efectos cardiotóxicos severos[39]. Por ello se estudió la influencia de las diferentes formulaciones sobre el ritmo cardíaco de las larvas a las 48 hpi y los datos recopilados se grafican en la figura 7.9.

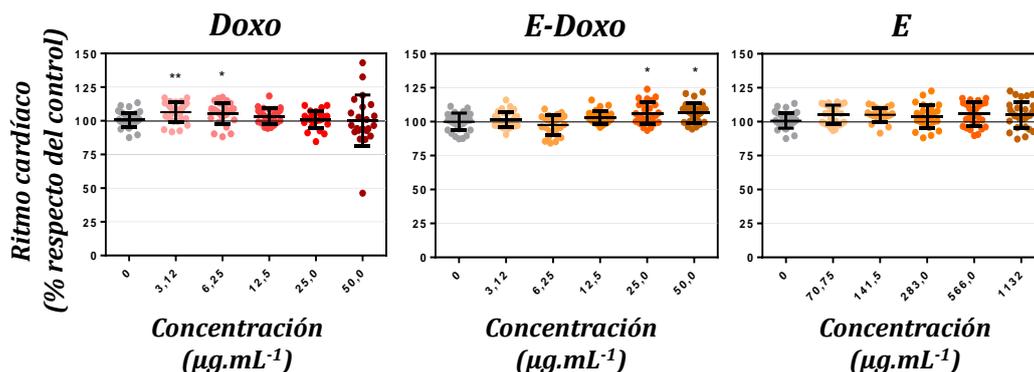


Figura 7.9 Evaluación de los efectos de Doxo, E-Doxo y E sobre la frecuencia cardíaca de larvas de *zebrafish*.

La frecuencia cardíaca se midió a las 48 hpi y se expresó como el porcentaje de latidos cardíacos en las larvas tratadas con respecto al latido cardíaco en las larvas control (sin tratar). Los valores se muestran como media \pm DE. Las diferencias significativas con respecto al control se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de las comparaciones múltiples de Dunnett (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

A partir de los gráficos que se presentan en la figura 7.9, se evidencia que el tratamiento con 3.12 y 6.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Doxo aumentó significativamente la frecuencia cardíaca de las larvas, mostrando un efecto cardiotóxico. Las concentraciones más altas de la droga libre no produjeron cambios notables en la frecuencia cardíaca, aunque como se mostró anteriormente produjeron efectos neurotóxicos. Contrariamente a estos resultados, solo el tratamiento con 25.0 y 50.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de E-Doxo aumentó el ritmo cardíaco. Finalmente, el nanotransportador E no produjo alteraciones cardíacas en ninguna de las concentraciones exploradas, lo que demuestra la biocompatibilidad de esta nanoformulación.

En resumen puede indicarse que, E no redujo la viabilidad ni mostró efectos neuro- ó cardiotóxicos en las concentraciones estudiadas sobre las larvas de *zebrafish*.

Se estudiaron, además, los cambios morfológicos a tiempos fijos durante 48 hs de tratamiento con Doxo, E-Doxo y E. Los resultados se presentan en las figuras (k), (l) y (m) del **Anexo II** y revelan alteraciones morfológicas en las larvas, asociadas principalmente a Doxo.

En particular, en la figura 7.10 se muestran los datos obtenidos a partir de la clasificación de las larvas de acuerdo al grado de daño producido por Doxo, E y E-Doxo luego de 48hs de incubación.

Los cambios morfológicos se puntuaron según el grado de anomalías de las larvas a las 48 hpi. Los valores se muestran como media \pm DE. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía seguida del post-test de comparaciones múltiples de Dunnett(**** $p < 0.0001$). Los peces se clasificaron según el grado de anomalías morfológicas [0=sin efectos tóxicos visibles; 1=leve, una o dos anomalías morfológicas; 2=moderado, tres a cuatro anomalías; 3=severo, más de cuatro anomalías; y 4=muerto] (de acuerdo a una adaptación de lo publicado por Yang y col.[15]). Varias alteraciones morfológicas como la columna doblada, la malformación de la mandíbula, el hígado opaco, vitelo no consumido, y la vejiga natatoria desinflada fueron las observadas al realizar la clasificación.

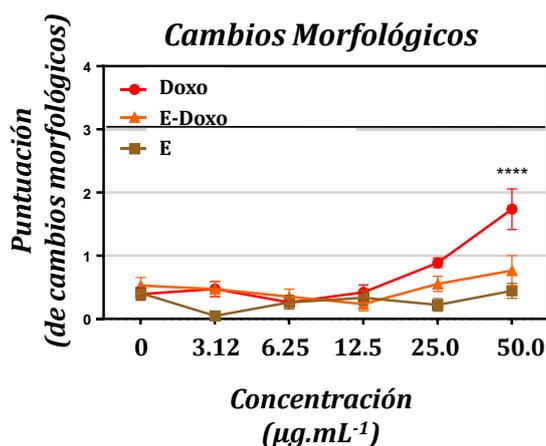


Figura 7.10 Anomalías morfológicas evidenciadas en larvas de *zebrafish* expuestas a Doxo, E-Doxo, ó E.

A partir de los datos presentados en la figura 7.10, se evidencia que el tratamiento con 50.0 µg.mL⁻¹ de Doxo produjo anomalías morfológicas significativas con respecto al control de larvas no tratadas. Sin embargo E y E-Doxo no produjeron cambios morfológicos significativos en comparación con las larvas de la condición control, independientemente de las concentraciones analizadas.

7.3.3- Estudio comparativo del ingreso del fármaco *in vivo*

En paralelo a los cambios morfológicos, se estudió la captación de Doxo por parte de las larvas mediante microscopía óptica y de fluorescencia. En particular, en la figura 7.11 se presentan comparativamente las imágenes de ejemplares de larvas de *zebrafish* observados con microscopía óptica luego de la incubación con una única concentración de Doxo ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), E-Doxo ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Doxo en $566.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de E) y E ($566.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente durante 4, 24 y 48hs. En las imágenes el fármaco Doxo puede observarse como una coloración roja en el sistema digestivo de las larvas

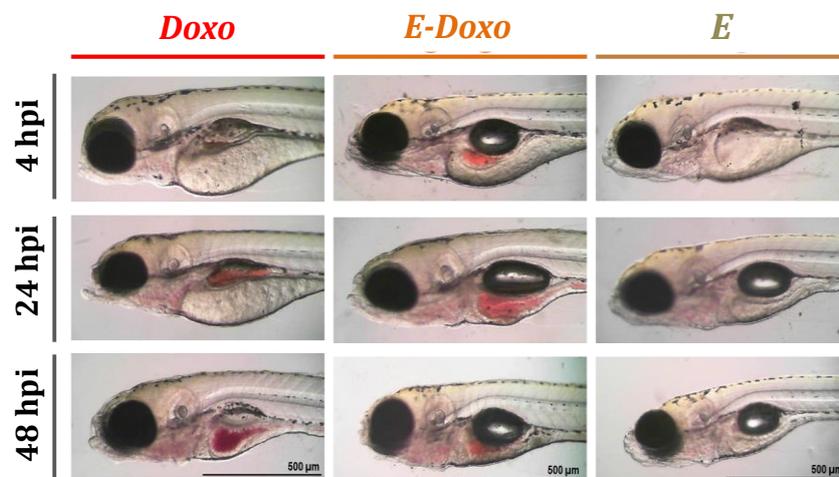


Figura 7.11 Evaluación de la captación *in vivo*, estudiada mediante microscopía óptica en larvas de *zebrafish*. ***Barras de escala:*** 500 μm .

En la figura 7.12 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia y los datos referidos a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia roja en el sistema digestivo de la larva.

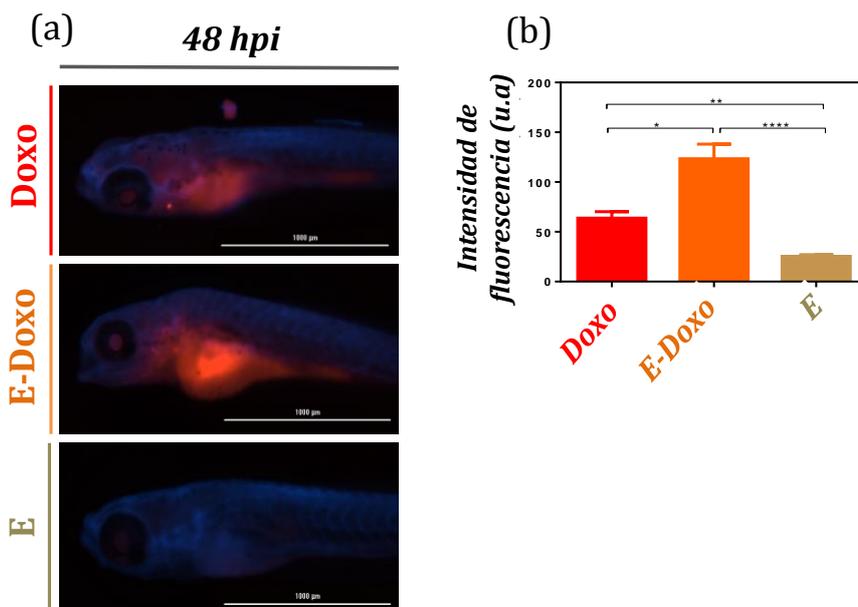


Figura 7.12 Evaluación de la captación *in vivo* estudiada mediante microscopía de fluorescencia en larvas de *zebrafish*. **Barras de escala:** 1000 µm

En la figura 7.12(a) el fármaco puede visualizarse como una fluorescencia roja en el sistema digestivo de las larvas expuestas a Doxo (25.0 µg.mL⁻¹) y E-Doxo (25.0 µg.mL⁻¹ de Doxo en 566.0 µg.mL⁻¹ de E) luego de 48 hpi. Por otra parte, en la figura 7.12(b) se muestran los resultados asociados a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia roja en el sistema digestivo de las larvas utilizando el programa image-J. Los valores se muestran como la media ± DE. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido del post-test de múltiples comparaciones de Dunnett(* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

Por microscopía óptica, se observó que E-Doxo mejoró la absorción del fármaco a tiempos más cortos. A las 4 hpi, las larvas tratadas con 25.0 µg.mL⁻¹ de E-Doxo tenían una coloración roja en el sistema digestivo, mientras que en las tratadas con 25.0 µg.mL⁻¹ de Doxo libre, no se observó este efecto. Además, se puede evidenciar un retraso en el crecimiento de las larvas tratadas con 25.0 µg.mL⁻¹ de Doxo a partir de su vitelo menos consumido a las 24 hpi respecto del control. A las 48 hpi, se observó una importante absorción del fármaco tanto en las larvas tratadas con Doxo libre como en aquellas tratadas con E-Doxo.

Mediante microscopía de fluorescencia se cuantificó la intensidad de la fluorescencia en la zona del vitelo o del sistema digestivo. Se observó que aquellas

larvas tratadas con E-Doxo presentaron una emisión significativa con respecto a las incubadas en presencia de Doxo libre ó de E (que se empleó como control para descartar la auto-fluorescencia propia de la larva). Los resultados aquí descriptos, concuerdan parcialmente con aquellos obtenido por Yao y col, quienes observaron una fluorescencia correspondiente a Doxo en el ojo, el intestino y el hígado de larvas de pez zebra de 6-dpf[40].

7.4 Conclusiones

A partir de los estudios de viabilidad e internalización de la formulación E-Doxo en la línea celular HCT116 es posible indicar que:

1) el aumento de la citotoxicidad observada con las nanopartículas E-Doxo en comparación con la droga libre, incluso en las concentraciones más bajas a iguales períodos de incubación, sería resultado de la mayor captación de las nanopartículas por parte de las células tumorales.

2) las NPMs ingresan a la célula y liberan el fármaco, sin producir una liberación significativa del mismo previo al ingreso celular.

Los estudios realizados en el modelo *in vivo* permitieron establecer que:

1) el tratamiento durante 48 hs con $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de Doxo resultó en la muerte del 27% de las larvas y en el desarrollo de anormalidades morfológicas significativas, mientras que el tratamiento con E-Doxo y E no redujo la viabilidad y no causó anormalidades del desarrollo en ninguna de las concentraciones estudiadas.

2) se evidenció que E-Doxo redujo la cardiotoxicidad causada por el fármaco libre y además promovió una captación significativa de Doxo por las larvas de *zebrafish* a tiempos más cortos

3) la nanoformulación E en las concentraciones testeadas no produjo efectos tóxicos de ningún tipo en las larvas de *zebrafish*, lo que resalta su biocompatibilidad como nanotransportador, siendo *per se* un aporte al área de la nanomedicina.

4) E-Doxo representa una nanoformulación biocompatible para la distribución del fármaco Doxorubicina.

En conjunto, los estudios *in vitro* e *in vivo*, reportados en este capítulo dan indicios que la formulación E-Doxo contaría con la capacidad terapéutica y de biocompatibilidad necesarias para constituir un agente teranóstico.

7.5 Agradecimientos.

A la doctorando Daniela Igartúa y a su directora, la Dra. Ma. Jimena Prieto (Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Grupo de Biología Estructural y Biotecnología, IMBICE, CONICET), por la realización de los ensayos de biocompatibilidad en el modelo de *zebrafish*, el procesamiento de los datos y su buena predisposición para la discusión de los mismos. A las Dras. Ma. Julia Martín (INQUISUR-UNS/CONICET) y Claudia Gentili (INBIOSUR- UNS/CONICET) por los ensayos llevados a cabo en células HCT116 y su invaluable asesoramiento en el análisis de los datos.

7.6 Referencias del capítulo.

- [1] Schleich N., Danhier F., Pr at, V. Iron oxide-loaded nanotheranostics: Major obstacles to in vivo studies and clinical translation. *J. Control. Release.* 198, (2015) 35–54.
- [2] Valdiglesias V., Fern andez-Bert olez N., Kili  G., Costa C., et al. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 38, (2016) 53–63
- [3] Igartúa D.E., Calienni M.N., Feas D.A., Chiamaroni N.S., et al. Development of Nutraceutical Emulsions as Risperidone Delivery Systems: Characterization and Toxicological Studies, *J. Pharm. Sci.* 104, (2015) 4142–4152.
- [4] Igartúa D.E., Martinez C.S., Temprana C.F., Alonso S. del V., et al. PAMAM dendrimers as a carbamazepine delivery system for neurodegenerative diseases: A biophysical and nanotoxicological characterization, *Int. J. Pharm.* 544, (2018) 191–202.
- [5] de Esch C., Sliker R., Wolterbeek A., Woutersen, et al. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, (2012) 545–553
- [6] Siegel RL, Miller KD, Jemal A Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65, (2015) 5–29.
- [7] Augustin E., Czubek B., Nowicka A.M., Kowalczyk A., et al. Improved cytotoxicity and preserved level of cell death induced in colon cancer cells by doxorubicin after its conjugation with iron-oxide magnetic nanoparticles, *Toxicol. Vitr.* 33, (2016) 45–53.
- [8] Manju, S., Sreenivasan, K. Gold nanoparticles generated and stabilized by water soluble curcumin–polymer conjugate: Blood compatibility evaluation and targeted drug delivery onto cancer cells. *J. Colloid Interface Sci.* 368, (2012) 144–151.
- [9] Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines (2013). *Oncogenesis* 2: e71
- [10] Banerjee A., Pathak S., Subramaniam V., Murugesan R. et al., Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. *Drug Discov. Today.* 22, (2017) 1224–1232.
- [11] Licciardi M., Scialabba C., Puleio R., Cassata G., Cicero, et al. Smart copolymer coated SPIONs for colon cancer chemotherapy. *Int. J. Pharm.* 556, (2019) 57–67.
- [12] Prieto M., Gutierrez H.C., Arévalo R.A., Chiamaroni N.S., et al. Effect of risperidone and fluoxetine on the movement and neurochemical changes of zebrafish. *Open J. Med. Chem.* 2, (2012) 129–138

- [13] Selderslaghs I.W.T., Hooyberghs J., Blust R., Witters H.E., Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicol. Teratol.* 37, (2013) 44–56. Supplement C.
- [14] Berghmans S., Butler P., Goldsmith P., Waldron G., et al., Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function-potential safety screens for early drug discovery. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 58, (2008) 59–68.
- [15] Yang Y., Ma H., Zhou J., Liu J., et al, Joint toxicity of permethrin and cypermethrin at sublethal concentrations to the embryo-larval zebrafish. *Chemosphere* 96, (2014) 146–154.
- [16] http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf
- [17] Hoskins C, Wang L, Cheng WP, Cuschieri A. Dilemmas in the reliable estimation of the in-vitro cell viability in magnetic nanoparticles engineering: which tests and what protocols? *Nanoscale Res Lett.* 7, (2012) 1-12.
- [18] Lüpertz R., Wätjen W., Kahl R., Chovolou Y. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology* 271, (2010) 115–121.
- [19] Kaeser M. D., Pebernard S., Iggo R. D. Regulation of p53 Stability and Function in HCT116 Colon Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 279, (2004) 7598–7605.
- [20] Sliwinska M. A., Mosieniak G., Wolanin K., Babik A., et al. Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev.* 130, (2009) 24–32.
- [21] Bailey R.L., Looker A.C., Lu Z., Fan R., et al., B-vitamin status and bone mineral density and risk of lumbar osteoporosis in older females in the United States. *Am J Clin Nutr.* 102, (2015) 687-694.
- [22] Crider K.S., Yang T.P., Berry R.J., Bailey L.B., Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Adv. Nutr.* 3, (2012) 21-38.
- [23] Santos C., Gomes P., Duarte J. A., Almeida M. M., et al. Development of Hydroxyapatite nanoparticles loaded with folic acid to induce osteoblastic differentiation. *Int. J. Pharm.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.035>.
- [24] Ahmed T., Fellus I., Gaudet J., MacFarlane A. J., Fontaine-Bisson B., et al. Effect of folic acid on human trophoblast health and function in vitro. *Placenta* 37, (2016) 7-15.
- [25] Kim J., Lee J.E., Lee S.H., Yu J.H., et al. Designed Fabrication of a Multifunctional Polymer Nanomedical Platform for Simultaneous Cancer-Targeted Imaging and Magnetically Guided Drug Delivery. *Adv. Mater.* 20, (2008) 478–483.
- [26] Huang Y., Mao K., Zhang B., Zhao Y. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics. *Mater. Sci. Eng. C-Mater.* 70, (2017) 763–771.
- [27] Li X., Zhao X., Pardhi D., Wu Q., et al. Folic acid modified cell membrane capsules encapsulating doxorubicin and indocyanine green for highly effective combinational therapy in vivo. *Acta Biomater.* 74, (2018) 374–384.
- [28] Gautier J, Munnier E, Paillard A, Hervé K, Douziech-Eyrolles L, Soucé M, Dubois P, Chourpa I. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. *Int J Pharm.* 423, (2012) 16-25.
- [29] Tomankova K, Polakova K, Pizova K, Binder S, et al. In vitro cytotoxicity analysis of doxorubicin-loaded/superparamagnetic iron oxide colloidal nanoassemblies on MCF7 and NIH3T3 cell lines. *Int J Nanomedicine.* 10, (2015) 949-961.
- [30] Jaimes-Aguirre L., Morales-Avila E., Ocampo-García B. E., Medina L. A., et al. Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide)/poly(L-γ-glutamic acid) nanoparticles conjugated to folic acid for targeted delivery of doxorubicin. *Mater. Sci. Eng. C-Mater.* 76, (2017) 743–751.
- [31] Rajkumar S, Prabakaran M, Multi-functional nanocarriers based on iron oxide nanoparticles conjugated with doxorubicin, poly(ethylene glycol) and folic acid as theranostics for cancer therapy, *Colloids Surf. B* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.051>
- [32] Almeida M., Tempesta de Oliveira X. M., Baranoski A., Mantovani M. S. Effects of folic acid on the antiproliferative efficiency of doxorubicin, camptothecin and methyl methanesulfonate in MCF-7 cells by mRNA endpoints. *Saudi J Biol Sci.* 25, (2018) 1568–1576.

- [33] Atkin-Smith G. K., Poon I. K.H. Disassembly of the Dying: Mechanisms and Functions. *TICB* 1281-1295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.011>)
- [34] Minaei S. E., Khoei S., Khoee S., Reza karimí M.. Tri-block copolymer nanoparticles modified with folic acid for temozolomide delivery in glioblastoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 108, (2019) 72–83.
- [35] Jović D., Seke M.N., Djordjevic A.N., Mrđanović J.Ž., et al. Fullerenol nanoparticles as a new delivery system for doxorubicin. *RSC Adv.* 6, (2016) 38563–38578.
- [36] Kayal S., Ramanujan R. Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Mater. Sci. Eng. C* 30, (2010) 484–490.
- [37] Corot C., Robert P., Idée J.-M., Port M.,. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, (2006) 1471–1504.
- [38] Wang Y.-X.J., Hussain S.M., Krestin G.P.,. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.* 11, (2001) 2319–2331.
- [39] Tacar O., Sriamornsak P., Dass C.R.. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, (2013) 157–170.
- [40] Yao Y., Sun S., Fei F., Wang J. et al.. Screening in larval zebrafish reveals tissue-specific distribution of fifteen fluorescent compounds. *Dis. Model. Mech.* 10, (2017) 1155–1164.

Capítulo VIII

Conclusiones y trabajo a futuro

Conclusiones y trabajo a futuro

El trabajo de Tesis presentado se enmarca en una línea de investigación tendiente a desarrollar nanopartículas magnéticas con funciones múltiples para el diagnóstico y la terapia de enfermedades de impacto social, denominados también agentes teranósticos. Esta Tesis se orientó, en particular, al estudio de dichos nanosistemas como potenciales herramientas para enfermedades oncológicas.

1-Síntesis de NPMs con propiedades adecuadas para aplicaciones biomédicas.

- Se sintetizaron nanopartículas magnéticas, constituidas fundamentalmente por magnetita, a partir del empleo de la técnica de co-precipitación y su variante reducción precipitación.
- La técnica de co-precipitación resultó ser la más adecuada para obtener NPMs de MAG con mejores propiedades en vista de las futuras aplicaciones que se pretenden para las mismas.
- Empleando la técnica de co-precipitación, fue posible la síntesis de NPMs con propiedades controladas mediante la modificación apropiada de variables experimentales asociadas a dicha técnica. En particular, se observó que la concentración de SDS y el orden de agregado de los reactivos ejercen amplia influencia sobre las propiedades finales de las NPMs.
- Todas las formulaciones obtenidas fueron hidrofílicas, propiedad que se justificó en términos del mecanismo de estabilización que ejerció el SDS. Todas las formulaciones obtenidas por co-precipitación y estabilizadas con SDS resultaron estables en dispersión acuosa durante, al menos, 30 días.
- Por último, los nanosistemas preparados exhiben propiedades magnéticas satisfactorias según los requerimientos de las aplicaciones biomédicas.

- A partir del trabajo exploratorio descrito surgieron dos formulaciones como las más aptas para continuar avanzando en el diseño de las NPMs multifuncionales capaces de actuar como agentes teranósticos: **MAG-5** y **MAG-4**.

2-Modificación de las NPMs con AF para conferirles propiedades de selectividad frente a células tumorales.

- Se exploraron dos metodologías de incorporación del AF: adsorción simple y acoplamiento covalente.

- A partir de una exhaustiva caracterización, se confirmó la incorporación del ligando AF a la superficie de las NPMs a través de ambos métodos de síntesis.

- Se seleccionó el anclaje covalente como la técnica más apropiada para la funcionalización de las NPMs. En particular, aquella llevada a cabo con una relación nominal de $MAG@APTS/AF=1/1$ y que dio lugar a **E2**.

- Los resultados de la caracterización y de un análisis teórico complementario, sugirieron que el enlace APTS-AF podría darse a través de cualquiera de los dos grupos carboxilatos del AF, dejando disponible al grupo que no reacciona, para el anclaje de otra molécula (por ejemplo, un agente terapéutico). Además, el grupo selectivo del AF (anillo PT) no participaría del enlace, de modo que quedaría disponible para interactuar con los α RF sobreexpresados en la superficie de células tumorales.

- Se corroboró la estabilidad de las formulaciones en términos de la retención del AF

- Se logró conferir a los nanosistemas capacidades adicionales para la vectorización activa más allá de las propiedades magnéticas propias del núcleo superparamagnético de MAG.

3-Incorporación del agente terapéutico

- A través de la técnica de adsorción simple se logró incorporar satisfactoriamente el fármaco Doxo a E2, completando de esta manera la secuencia de etapas necesarias para la obtención de una formulación con potenciales aplicaciones como teranóstico.

- Se determinó el posible mecanismo de interacción entre el AF de la superficie de E y Doxo, dejando en claro que el grupo PT no participa en la misma.
- Los estudios orientados a examinar la liberación de la droga desde las NPMs revelaron que se alcanzan niveles satisfactorios del fármaco, suficientes para cumplir con su rol terapéutico.
- Se demostró que el perfil de liberación es sensible al pH del medio y a la presencia de un campo magnético externo. En este sentido, se verificó la importancia del estímulo del campo magnético no solo para la vectorización sino para inducir la liberación de la droga.

4-Análisis de las capacidades del agente teranóstico mediante ensayos in vitro.

- Se verificó la habilidad para el direccionamiento y acumulación de las NPMs mediada por el estímulo de un imán, empleando un sistema en flujo continuo bajo condiciones que simulan el medio fisiológico.
- Se halló una muy buena eficiencia de los nanosistemas para generar contraste negativo al emplearse como medio de contraste para diagnóstico por imagen, mediante RMI usando ensayos fantoma.

5-Evaluación de la viabilidad, biocompatibilidad y acción terapéutica

- Se determinó la viabilidad celular, capacidad de internalización y potencial selectividad de las NPMs modificadas con AF en líneas de cultivo celular de cáncer colorrectal.
- Se encontró que la acción terapéutica de la Doxorubicina administrada a través de las NPMs es mucho más efectiva
- Se determinó la biocompatibilidad de las nanoformulaciones obtenidas a lo largo de esta Tesis mediante ensayos *in vivo*.

A modo de conclusión final se puede mencionar que se han cumplido satisfactoriamente los objetivos enunciados al principio de este trabajo de Tesis. A través del trabajo secuencial propuesto fue posible obtener una plataforma a base de NPMs multifuncionales, con amplio potencial para aplicarse como agentes teranósticos para el diagnóstico, seguimiento evolutivo y tratamiento de patologías

oncológicas.

6-Proyección de trabajo futuro

A partir del caudal de conocimientos recopilado a lo largo de esta tesis se proponen distintas líneas en cuanto al trabajo futuro:

➤ Completar los estudios tendientes a verificar las capacidades de las NPMs preparadas como agentes teranósticos.

1. Se completarán los estudios *in vitro* con el fin de analizar de manera más rigurosa y completa la acción selectiva del AF para la acumulación activa de las NPMs en las zonas de interés. Para ello, se trabajará con las formulaciones diseñadas y caracterizadas en esta Tesis en co-cultivos de células tumorales y células sanas (como fibroblastos). Estas actividades serán desarrolladas en el marco del plan de beca posdoctoral de la Dra. María Julia Martín.

2. Se pretende estudiar la biocompatibilidad, biodistribución y acción terapéutica de los agentes teranósticos en un modelo animal superior (modelo murino). Paralelamente, estos ensayos serán útiles para examinar la capacidad de las NPMs como medio de contraste para RMI a través de ensayos *ex vivo* e *in vivo*.

➤ Diseño de otros agentes teranósticos.

Sobre la base de los estudios y los procedimientos de síntesis y acoplamiento de moléculas optimizados a lo largo de este trabajo, se plantea la posibilidad de diseñar agentes teranósticos a base de NPMs-AF incorporando otros modificantes para potenciar su función. En particular se prevé utilizar hidroxiapatita (HA), que constituye un compuesto de gran interés como modificante de NPMs destinadas al área biomédica debido a que su estructura química es comparable al componente inorgánico del sistema óseo. Sus aplicaciones tanto en la regeneración como en la preparación de implantes óseos han sido ampliamente difundidas desde hace varias décadas. Sin embargo, su utilización como componente de sistemas de liberación de fármacos para diferentes patologías es un tema de investigación mucho menos explorado. En relación a esto, la presencia de HA, una molécula fisiológicamente aceptable,

reduciría las posibilidades de rechazo y eliminación de las NPMs y ofrecería un espectro de utilización versátil que incluye la vía tópica, oral e intravenosa.

La sinergia de AF y HA ha sido verificada en la fabricación de sistemas de liberación de antitumorales como Paclitaxel. Si a esto se le suma la contribución de la fase magnética de orientar y dirigir al nanocarrier al sitio de interés, podría obtenerse una plataforma nanotecnológica multifuncional que no ha sido aún suficientemente explorada y que aparenta ser muy promisorio para el tratamiento de distintos tipos de tumores. La posibilidad de aplicar estos dispositivos a una patología específica, como el cáncer, realizando ensayos *in vitro* e *in vivo* de toxicidad y bioacumulación, podría contribuir fuertemente al desarrollo de esta tecnología novedosa y representaría un primer paso hacia un posterior estudio de los sistemas desde el punto de vista terapéutico.

Anexo I

Resultados complementarios al Capítulo III

Anexo I: Resultados complementarios al Capítulo III

En este apartado se incluyen datos secundarios correspondientes al Capítulo III. Particularmente se trata de resultados asociados a la caracterización de formulaciones de NPMs obtenidas por co-precipitación empleando distintas variables experimentales.

-Efecto de la luz visible

En la figura (a) se muestra el difractograma correspondiente a MAG-6, mientras que en la figura (b) se presenta el espectro FTIR obtenido para esta muestra. Puede observarse que tanto en presencia como en ausencia de luz visible el patrón cristalino que se obtiene corresponde a la espinela inversa de magnetita (y eventualmente algo de maghemita). En la fig (b), se observan las señales asociadas a las vibraciones de tensión del enlace Fe-O y vibraciones de tensión correspondientes a los enlaces $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ y $\nu_s(\text{CH}_2)$ del surfactante y $\nu(\text{O-H})$ del agua fisisorbida. Por último en la figura (c) se muestra comparativamente la composición, en términos de %Fe, de MAG-1 y MAG-6. Claramente puede evidenciarse que el contenido de Fe de la muestra no ha sufrido variaciones significativas, lo que sugiere que la concentración de SDS ligada a la superficie de las NPMS no depende de la incidencia de la luz visible.

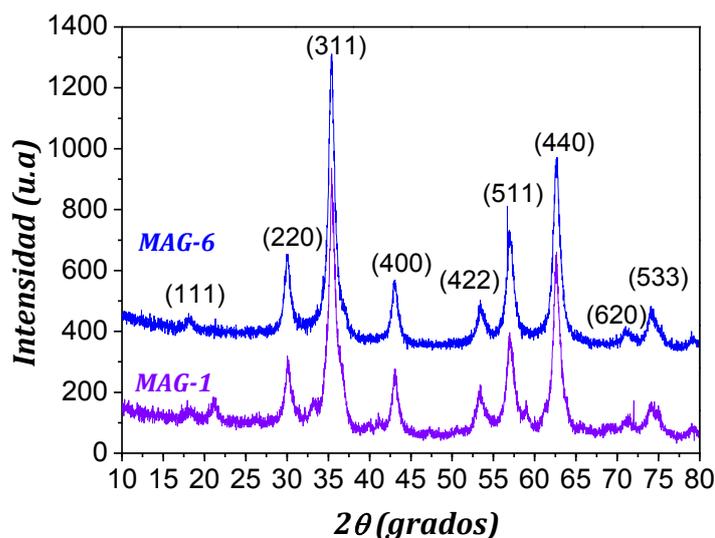


Figura (a) Comparación de los difractogramas de MAG-1 y MAG-6.

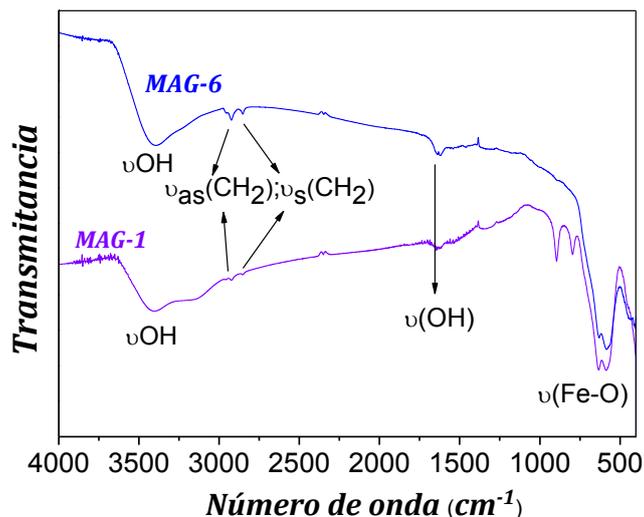


Figura (b) Espectros FTIR de MAG-1 y MAG-6

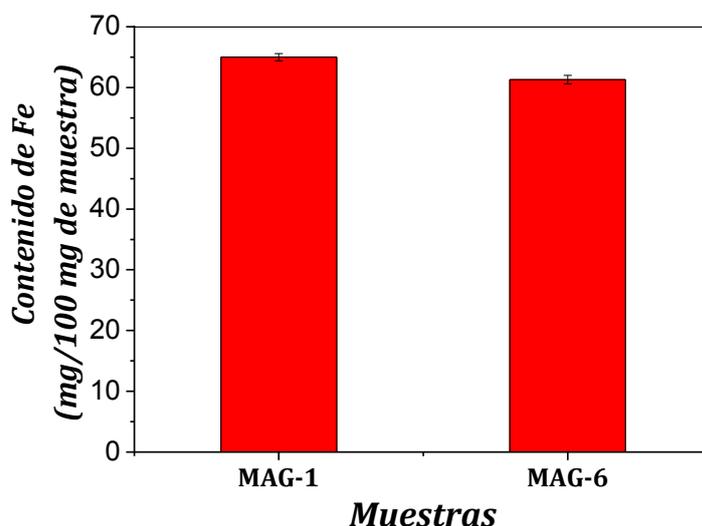


Figura (c). Composición de las muestras MAG-1 y MAG-6 en términos del contenido de Fe.

-Efecto del tipo de base utilizada

En la figura (d) se presentan comparativamente el espectro FTIR de MAG-1 y MAG-4. En el espectro correspondiente a MAG-4 se detecta la presencia de la típica banda de $\nu(\text{Fe-O})$, así como también las bandas asignadas al surfactante: $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$. Por otro lado, en las figuras (e) y (f) se comparan gráficamente los valores de ζ pot y DH de MAG-1 y MAG-4. Puede evidenciarse claramente que estas características no se modificaron como consecuencia del cambio de agente precipitante, indicando que ambos parámetros sólo se encuentran afectados por la presencia del surfactante. Por

último, en la figura (g) se presentan los datos de composición de MAG-4 en términos del contenido de Fe, determinado por EAA. Al comparar este dato con el correspondiente a MAG-1, se establece que en ambos casos las muestras presentan un contenido de Fe similar, lo que nuevamente sugiere que existe una concentración límite de SDS que puede ligarse a la superficie de las NPMs.

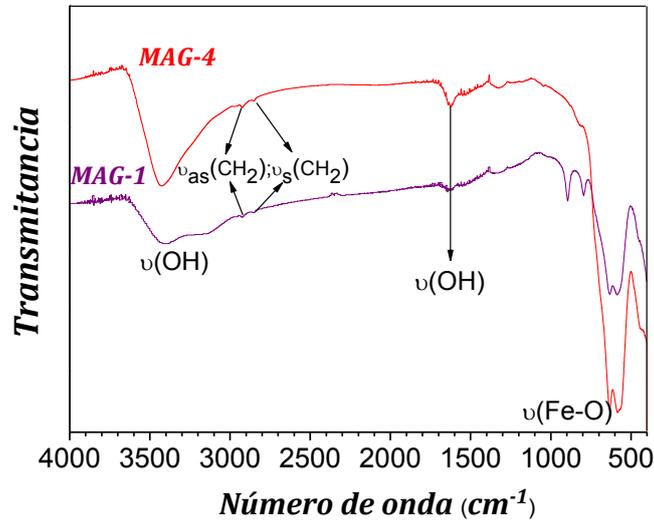


Figura (d) Espectros FTIR de MAG-1 y MAG-4

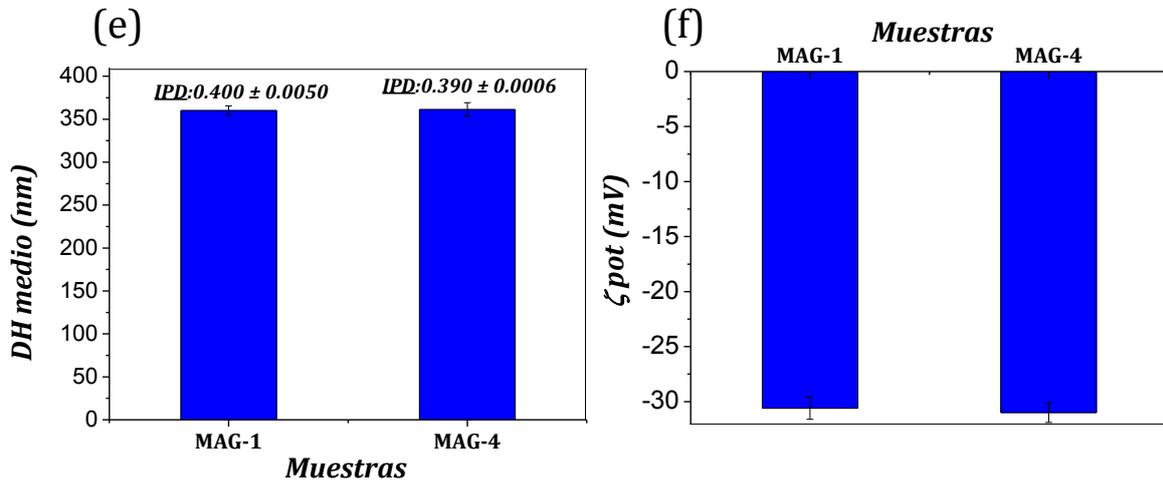


Figura (e) Comparación de DH de MAG-1 y MAG-4. (Inserto en el gráfico se muestran los valores de IPD) (f) Comparación de ζpot de MAG-1 y MAG-4.

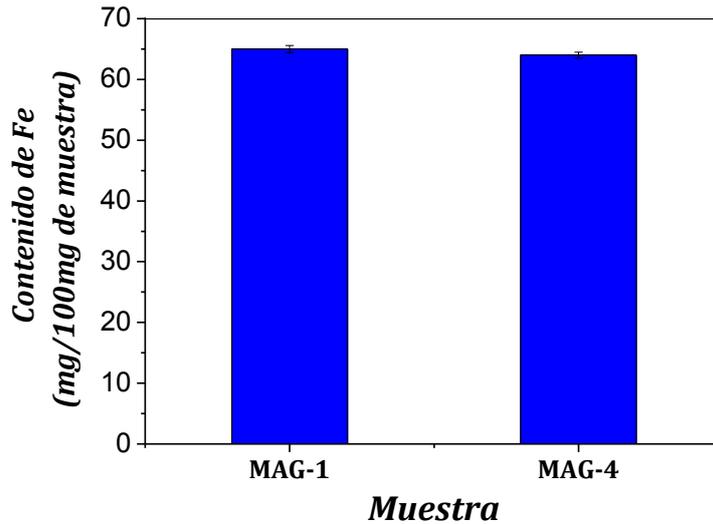


Figura (g). Composición de las muestras MAG-1 y MAG-4 en términos del contenido de Fe.

-Efecto del volumen final de reacción

En este caso, no se realizó la caracterización estructural de MAG-9 por difracción de rayos x ya que como el pH final alcanzado fue superior a 10, y la muestra obtenida fue un precipitado de color oscuro semejante al obtenido para MAG-4, se presume que la misma estuvo mayoritariamente constituida por magnetita/maghemita. Además, la muestra respondió de la misma manera que MAG-4 frente a la acción de un campo magnético externo, por lo que tampoco se realizaron medidas de VSM. En la figura (h) se presentan los sólidos correspondientes a MAG-4 y MAG-9, mientras que en la figura (i) se muestra comparativamente la respuesta de MAG-4 y MAG-9 a la influencia de un campo magnético externo, como medida cualitativa del magnetismo de esta formulación.

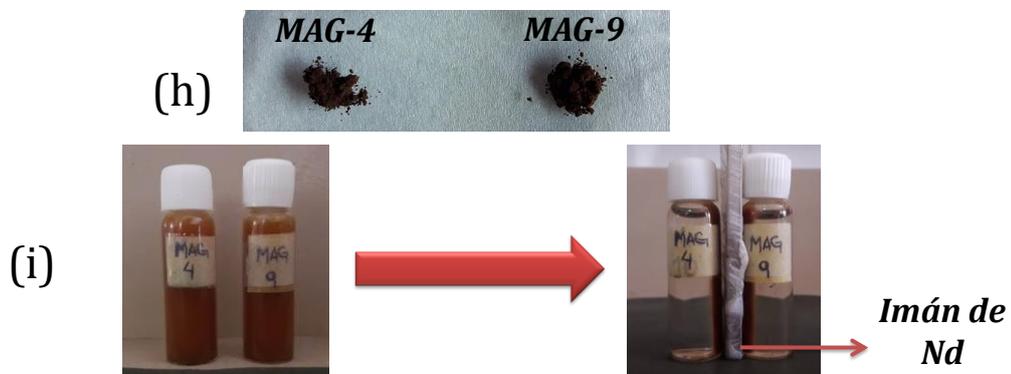


Figura (h) Imágenes correspondientes a los sólidos MAG-4 y MAG-9. (i) Respuesta a la influencia de un campo magnético externo de ambas muestras.

En la figura (j) se presentan comparativamente los espectros FTIR de MAG-4 y MAG-9. En ambos espectros se detecta la presencia de la típica banda de $\nu(\text{Fe-O})$, así como también las bandas asignadas al surfactante: $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$.

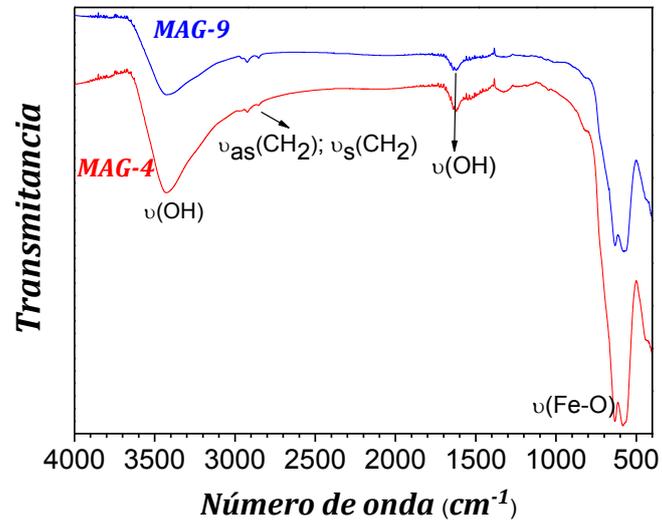


Figura (j) Espectros FTIR de MAG-4 y MAG-9

Anexo II

Resultados complementarios al Capítulo VII

Anexo II: Resultados complementarios al Capítulo VII

-Análisis de cambios morfológicos

En este apartado se incluyen datos secundarios correspondientes al Capítulo VII. Particularmente se trata de resultados asociados al análisis de los cambios morfológicos en las larvas de *zebrafish* estudiados a tiempos fijos durante 48 hs de tratamiento con Doxo, E-Doxo ó E.

Las larvas de zebrafish de 5 dpf se expusieron a diferentes concentraciones de Doxo ($3.12-50.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Se fotografiaron las larvas y se estudiaron los cambios morfológicos a las 4, 24 y 48 hpi. Los mismos se indican con flechas violetas. La Doxo puede verse como una coloración roja en el sistema digestivo de las larvas. En forma paralela, se evaluó la captación de la formulación por parte de las larvas de zebrafish.

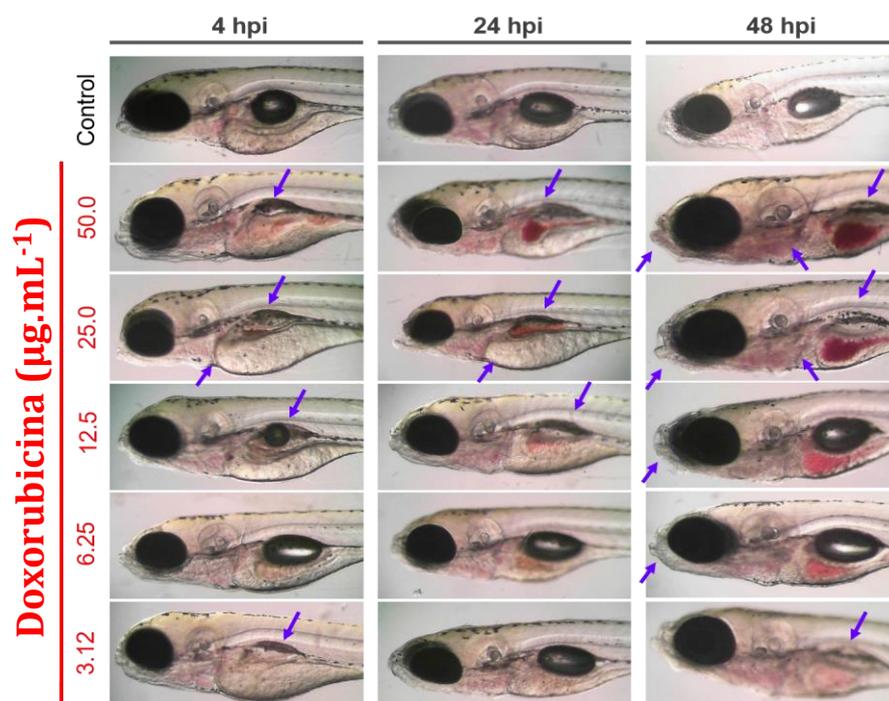


Figura (k) Evaluación de cambios en la morfología, estudiada mediante microscopía óptica en larvas de *zebrafish*.

Las larvas de zebrafish de 5 dpf se expusieron a diferentes concentraciones de E-Doxo (3.12-50.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Doxo en 70.75-1132 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de E). Se fotografiaron las larvas y se estudiaron los cambios morfológicos a las 4, 24 y 48 hpi. La Doxo puede verse como una coloración roja en el sistema digestivo de las larvas y las NPMs como agregados oscuros. En forma paralela, se evaluó la captación de la formulación por parte de las larvas de zebrafish.

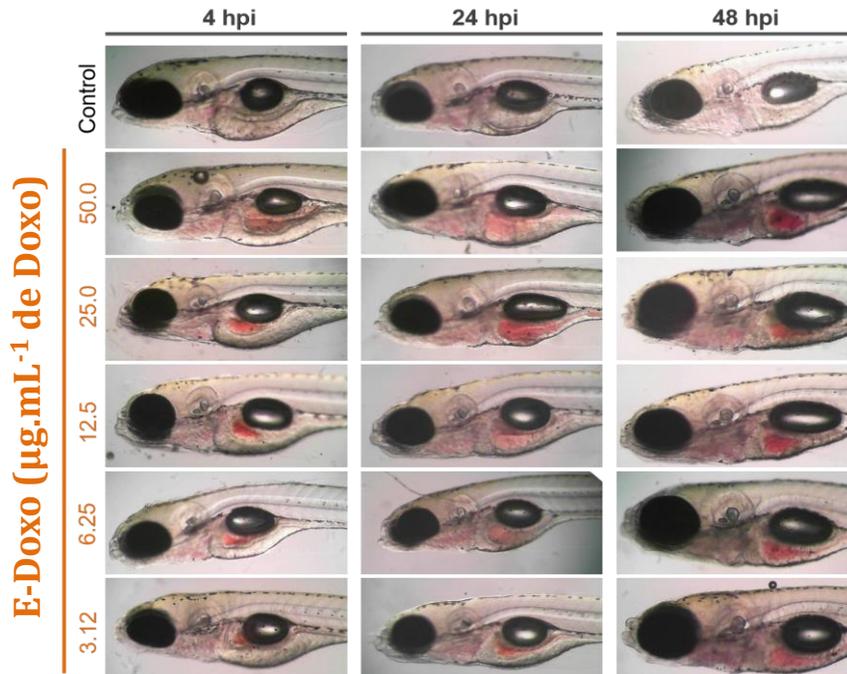


Figura (I) Evaluación de cambios en la morfología, estudiada mediante microscopía óptica en larvas de *zebrafish*.

Las larvas de zebrafish de 5 dpf se expusieron a diferentes concentraciones de E (70.75-1132 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Se fotografiaron las larvas y se estudiaron los cambios morfológicos a las 4, 24 y 48 hpi. Los cambios morfológicos fueron marcados con flechas. Las NPMs pueden observarse como agregado oscuros en el sistema digestivo de las larvas.

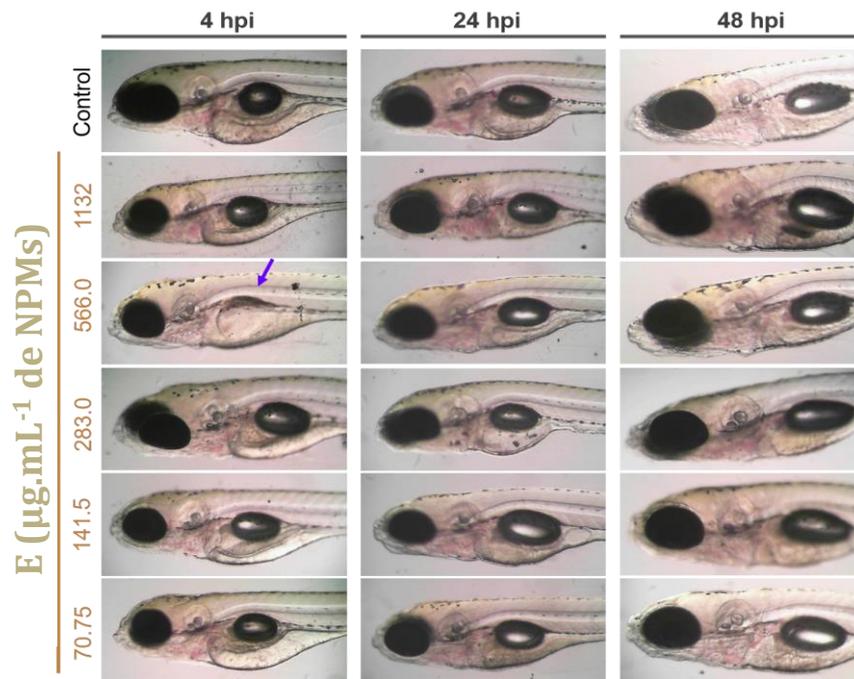


Figura (m) Evaluación de cambios en la morfología, estudiada mediante microscopía óptica en larvas de *zebrafish*.

A partir del análisis de estas tres figuras puede detectarse que varias alteraciones morfológicas como columna doblada, malformación de la mandíbula, hígado opaco, vitelo no consumido y vejiga natatoria desinflada, tuvieron lugar en las larvas tratadas con Doxo, pero no en aquellas tratadas con E-Doxo ó E.

Producción científica

Producción científica

Publicaciones en Revistas con Referato

- ✓ “Simple and novel strategies to achieve shape and size control of magnetite nanoparticles intended for biomedical applications” **Pamela Azcona**, Roberto Zysler, Verónica Lassalle. Colloids and Surfaces A. Vol. 504, (2016), 320-330.
- ✓ “Fabrication of folic acid magnetic nanotheranostics: An insight on the formation mechanism, physicochemical properties and stability in simulated physiological media” **Pamela Azcona**, Ignacio López-Corral, Verónica Lassalle. Colloids and Surfaces A. Vol. 537, (2018), 185-196.
- ✓ “Folic acid magnetic nanotheranostics for delivering doxorubicin: Toxicological and biocompatibility studies on Zebrafish embryo and larvae” Daniela Igartúa, **Pamela Azcona**, Carolina Martinez, Silvia del Valle Alonso, Verónica Lassalle, María Jimena Prieto. Toxicology and Applied Pharmacology. Vol. 358, (2018), 23–34.
- ✓ “Stimuli-responsive nanotheranostics intended for oncological diseases: *in vitro* evaluation of their target, diagnostic and drug release capabilities”. **Pamela Liliana Azcona**, María Gabriela Montiel Schneider, Marcos Grünhut and Verónica Leticia Lassalle. New J. Chem. Vol. 43, (2019), 2126-2133.

Trabajos en evaluación en Revistas con Referato

- ✓ “Simple-multifunctional magnetic nanosystem as theranostics: drug loading for high impact diseases and biocompatibility”. **Pamela Azcona**, Gabriela Montiel Schneider, Adrián Campelo, Virginia Massheimer, Mariela Agotegaray, Verónica Lassalle.

Presentaciones a Congresos

Congresos Internacionales

- ✓ “Biocompatible magnetic nanoparticles based on iron oxide and arabic gum with potential in the treatment of inflammatory diseases” **Azcona Pamela**, Agotegaray Mariela, Horst Fernanda, Lassalle Verónica. Presentación en modalidad póster en el 8^{vo} Congreso Latinoamericano de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de

Tejidos. Rosario. Santa Fé. Argentina. (20/08/2014 a 23/08/2014) (Trabajo extendido).

- ✓ “Subacute tissue biodistribution of magnetic nanoparticles functionalized with chitosan intended for drug delivery systems”. Agotegaray Mariela, Azcona Pamela, Zysler Roberto, Campelo Adrián, Massheimer Virginia, Gumilar Fernanda, Minetti Alejandra, Lassalle Verónica. Presentación en modalidad póster en el 8^{vo} Congreso Latinoamericano de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos. Rosario. Santa Fé. Argentina. (20/08/2014 a 23/08/2014) (Resumen).
- ✓ “Preparación de biocatalizadores empleando soportes magnéticos nanoparticulados: Influencia del tipo de modificante de la fase magnética sobre la actividad catalítica”. Nicolás Paula, Agotegaray Mariela, Azcona Pamela, Lassalle Verónica, Ferreira María Luján. Presentación en modalidad póster en el XIX Congreso Argentino de Catálisis VIII Congreso de Catálisis del Mercosur. Bahía Blanca. Argentina (21/09/2015 a 23/09/2015) (Trabajo extendido).
- ✓ “Folic acid conjugated magnetic nanoparticles as theranostics: An insight on their behavior in simulated physiological media”. Azcona Pamela, Lassalle Verónica. Presentación en modalidad póster en el Summer School & International Workshop on Advanced Materials Challenges for Health and Alternative Energy Solutions. Colonia. Alemania (31/08/2016 a 3/09/2016). (Resumen).
- ✓ “Doxorubicin loaded magnetic nanotheranostic: Evaluation on the loading capability, their retention during drug targeting and in vivo toxicity”. Azcona Pamela, Igartúa Daniela, Alonso Silvia del Valle, Prieto María Jimena, Grünhut Marcos, Lassalle Verónica. Presentación en modalidad póster en la VII International Conference on Science and Technology of Composite Materials. COMAT 2018. Bahía Blanca. Buenos Aires. Argentina. (25/04/2018 a 27/04/2018). (Resumen).
- ✓ “Folic acid magnetic nanotheranostic reduced the toxicity caused by Doxorubicin in zebrafish larvae model”. Igartúa Daniela, Azcona Pamela, Martinez Carolina, Alonso Silvia del Valle, Lassalle Verónica, Prieto María Jimena. Presentación en modalidad póster en el V Latin American Zebrafish Network Course and Symposium. Cuernavaca. Mexico. (4/05/2018 A 12/05/2018). (Resumen).

Congresos y Jornadas Nacionales

- ✓ “Control de la morfología de nanopartículas de magnetita estabilizadas con dodecil sulfato de sodio.” **Azcona Pamela**, Lassalle Verónica. Presentación en modalidad póster en el V Encuentro Argentino de Materia Blanda. La Plata. Buenos Aires. Argentina (15/09/2014 a 17/09/2014). (Resumen).
- ✓ “Nanopartículas de magnetita estabilizadas con dodecilsulfato de sodio: Control de la forma y el tamaño en función de las condiciones de co-precipitación” **Azcona Pamela**, Lassalle Verónica. Presentación en modalidad póster en el XIX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Buenos Aires. Argentina (12/04/2015 a 15/04/2015) (Resumen)
- ✓ “Nanopartículas Magnéticas e Hidrogeles en Biomedicina” Agotegaray Mariela, Horst Fernanda, **Azcona Pamela**, Lassalle Verónica. Presentación oral en las XXIII Jornadas Científicas “Dr. J. C. Plunkett”. Bahía Blanca. Buenos Aires. Argentina, (24/11/2015 a 26/11/2015).
- ✓ “Nanopartículas Magnéticas funcionalizadas con Ácido Fólico: Síntesis de formulaciones con potenciales aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de patologías oncológicas” **Azcona Pamela**, Lassalle Verónica. Presentación en modalidad póster en el XVI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados. CABA. Buenos Aires. Argentina (11/05/2016 a 13/05/2016). (Resumen).
- ✓ “Implementación de diferentes formulaciones magnéticas en el encapsulamiento de drogas oncológicas” **Azcona Pamela**, Agotegaray Mariela, Gessner Isabel, Mathur Sanjay, Lassalle Verónica. Presentación en modalidad póster en el VI Nano-Córdoba. Villa Carlos Paz. Córdoba. Argentina. (19/05/2017 a 20/05/2017).(Resumen)
- ✓ “Nanopartículas magnéticas como Teranósticos: Estudio Teórico-Experimental sobre interacciones funcionalizante-fármaco”. **Azcona Pamela**, López Corral Ignacio, Lassalle Verónica. Presentación en modalidad póster en el XVII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados. NANO 2017. Bariloche. Río Negro. Argentina. (22/05/2017 a 24/05/2017).(Resumen)

- ✓ “Nanoagentes de contraste para diagnóstico y monitoreo de enfermedades de alto impacto social”, Montiel Schneider M. Gabriela., **Azcona Pamela**, Lassalle Verónica. Presentación oral en las XXV Jornadas Científicas “Dr. J. C. Plunkett”. Bahía Blanca. Buenos Aires. Argentina. (25/09/2017 a 29/09/2017).

- ✓ “Nanopartículas magnéticas recubiertas con ácido fólico reducen la toxicidad de doxorubicina en embriones y larvas de Zebrafish” Igartúa Daniela, **Azcona Pamela**, Martinez Carolina, Alonso Silvia del Valle, Lassalle Verónica, Prieto María Jimena. Presentación en modalidad póster en la 3^{ra} Reunión de Jóvenes Investigadores de CyT. Universidad Nacional de Quilmes.2018. Quilmes. Buenos Aires. Argentina. (30/08/2018 a 31/08/2018).(Resumen)