

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE
NANOPLATAFORMAS BIOPOLIMÉRICAS DE
QUITOSANO/CISPLATINO Y QUITOSANO
TIOLADO/CISPLATINO MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA Y
SU POSIBLE APLICACIÓN COMO TRANSPORTADORES DE
UN FÁRMACO”**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

1942
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

JULIAN PIRI SANTANA

Hermosillo, Sonora

Marzo del 2017

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Julián Piri Santana, le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. Reynaldo Esquivel González

Presidente

Dra. Aracely Angulo Molina

Secretario

Dra. Iliana Celina I. Muñoz Palma

Vocal

Dr. Gerardo Trinidad Paredes Quijada

Suplente

Hermosillo, Sonora, México.

Marzo del 2017

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de corazón a la Universidad de Sonora, por abrirme las puertas de su sabiduría y haberme formado académicamente.

A mi director de tesis Dr. Reynaldo Esquivel González mi más amplio y sincero agradecimiento por la confianza depositada en mí, por convertirse en un amigo, por su paciencia, su esfuerzo, su tiempo, dedicación y dirección

A mis sinodales, por su tiempo, consejos, guía y apoyo a lo largo de la revisión de este trabajo. Un gusto ser asesorado por ustedes, personas que ayudan a la comunidad estudiantil a cumplir sus metas académicas.

A mi esposa, estuviste conmigo para recorrer todo este camino desde el principio de mi licenciatura. La ayuda, el apoyo brindado ha sido de gran importancia. Gracias por ser una excelente esposa, amiga y mamá para nuestra pequeña, no imagino esta vida de una manera diferente, como siempre lo hemos dicho, no hay mejor equipo que tú y yo tomados de la mano, te amo.

A mi pequeña hija Isabella, en mi corazón solo existe amor para dos personas que son tu Madre y tú, ella siempre será el amor de mi vida y tú la hija adorada que siempre soñé tener en mis brazos. Gracias por hacerme disfrutar todos los días con tus ocurrencias y sonrisas

A mis padres, me siento muy orgulloso de tenerlos como padres, gracias por ser unas personas maravillosas, soy lo que soy gracias a sus esfuerzos y sus sacrificios. Les agradezco por todo el amor que siempre me han dado, gracias a ustedes soy feliz. A mi hermano, que siempre ha sido un ejemplo a seguir gracias por tus consejos mi más sincera admiración.

A mis amigos de la licenciatura, por hacer amena mi estancia en la universidad, por tantas frases y palabras poco ortodoxas que se escuchaban en las aulas donde solíamos llevar clases.

A la familia de mi esposa porque me hacen sentir uno más de ustedes, muchas gracias por su apoyo brindado a mí y a Isabella en todo momento.

DEDICATORIA

A Dios y a mi familia, porque con su apoyo y amor he podido culminar con éxito esta obra.

CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN	2
AGRDECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
LISTA DE FIGURAS	9
OBJETIVOS	11
Objetivo General	11
Objetivos Particulares	11
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	15
1.1. Historia de la nanotecnología	15
1.1.1 Nanotecnología y nanociencia	16
1.1.2 Propiedades a escala nanométrica	18
1.1.3 Ejemplos de aplicaciones en nanotecnología	19
1.1.4 Sistemas nanoestructurados	20
1.1.4.1 Síntesis de sistemas nanoestructurados	22
1.2. Cáncer	23
1.2.1 Epidemiología del cáncer en México	23
1.2.2 Patología del cáncer de mama	25
1.2.3 Prevención del cáncer de mama	26
1.2.4 Detección temprana de cáncer de mama	26

1.2.5	Diagnóstico del cáncer de mama	27
1.2.6	Tratamiento del cáncer de mama	27
1.2.7	Medicamentos antineoplásicos	27
1.2.7.1	Cisplatino	28
1.3.	Transportadores de fármacos	29
1.3.1	Liposomas	32
1.3.2	Micelas	33
1.3.3	Dendrímeros	34
1.3.4	Nanopartículas metálicas	34
1.3.5	Nanotubos de carbono	35
1.4.	Nanopartículas poliméricas	36
1.4.1	Quitosano	37
1.4.2	Quitosano modificado químicamente con grupos tiol	38
1.4.3	Síntesis de nanopartículas a base de quitosano	39
1.4.3.1	Gelificación ionotrópica	40
1.5.	Caracterización físico-química de nanopartículas	41
1.5.1	Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta y visible	42
1.5.2	Dispersión dinámica de la luz	44
1.5.3	Potencial zeta	44
1.5.4	Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier	45
1.5.5	Resonancia magnética de protón ^1H RMN	46
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS		47
2.1.	Materiales	47

2.2.	Metodología	48
2.2.1	Preparación de solución tampón	48
2.2.2	Preparación de solución de tripolifosfato de sodio	48
2.2.3	Preparación de solución de ácido acético	48
2.2.4	Preparación de solución de hidróxido de sodio	48
2.2.5	Preparación de solución de cisplatino	49
2.2.6	Curva de calibración de cisplatino	49
2.2.7	Síntesis de quitosano tiolado	49
2.2.8	Síntesis de nanopartículas quitosano-cisplatino	51
2.2.9	Síntesis de nanopartículas quitosano tiolado-cisplatino	52
2.3.	Caracterización fisicoquímica	53
2.4.	Diagrama resumen de metodología	54
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		55
3.1.	Modificación química del polímero natural quitosano de bajo peso molecular	55
3.2.	Caracterización estructural de QSH mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	55
3.3.	Caracterización estructural de QSH mediante resonancia magnética de protón ¹H-RMN (D₂O/DCI)	58
3.4.	Efecto de la relación molar Q/TPF sobre el tamaño de nanoplataforma	60
3.5.	Efecto de la relación molar QSH/TPF sobre el tamaño de nanoplataforma	63
3.6.	Estudio del efecto de la relación molar Q/TPF y QSH/TPF sobre el potencial Zeta de nanoplataforma	65

3.7. Estudio del efecto de la relación molar Q/TPF y QSH/TPF sobre la eficiencia de atrapamiento de fármaco antineoplásico Cisplatino	68
3.8. Micrografías de nanoplateformas de configuración Q/TPF y QSH/TPF en microscopio electrónico de transmisión (TEM)	71
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	74
CAPÍTULO 5. RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Richard Phillips Feynman, premio nobel de física 1965	16
2	La nanotecnología como una ciencia multidisciplinaria	17
3	Tamaños y comparaciones a escala nanométrica	18
4	Esquematzación de materiales con confinamiento en sus dimensiones. (a)Material en volumen o bulto, (b) material en capa, (c) material en hilo cuántico y (d) material en punto cuántico	21
5	Esquematzación gráfica de los dos métodos para preparar nanopartículas	22
6	Esquematzación del ciclo celular	24
7	Estructura esquemática representativa de una molécula de Cisplatino	28
8	Sitio de unión al ADN del fármaco antineoplásico Cisplatino	29
9	Materiales nanoestructurados para el transporte de nuevos fármacos	31
10	Esquematzación de la estructura de un liposoma con fármaco en su interior	32
11	Ejemplo de estructura micelar esférica	33
12	Representación esquemática de la síntesis de Dendrimeros	34
13	Esquema de nanopartícula de plata conteniendo iones borohidruro	35
14	Representación del enrollamiento de un nanotubo de Carbono	36
15	Representación de Quitosano donde "a" y "b" son las fracciones molares de glucosamina y N-acetilglucosamina dentro del polímero	37
16	Estructura esquemática representativa de quitosano tiolado	39
17	Diferentes metodologías para la preparación de nanopartículas de quitosano	40
18	Esquematzación de la preparación para la formación de nanopartículas de quitosano por el método de gelificación iónica	41

19	Esquema del espectro de luz visible	43
20	Componentes principales de equipo ultravioleta-visible	43
21	Metodología de reacción para la síntesis de modificación de quitosano por grupos tiol.	50
22	Ilustración esquemática para la preparación de nanopartículas de quitosano/Cisplatino	52
23	Diagrama representativo de la metodología seguida	54
24	Espectro infrarrojo por transformada de Fourier en donde se muestran las señales representativas de quitosano nativo (a) y quitosano modificado con grupos tiol (b)	57
25	Espectro de resonancia magnética de protón ¹ H-RMN en donde se muestran las señales representativas de quitosano nativo (a) y quitosano modificado con grupos tiol (b)	59
26	Gráfica de estudio del efecto del radio molar de Q/TPF sobre el tamaño de partícula determinado por DDL	61
27	Gráfica de estudio del efecto del radio molar de QSH/TPF sobre el tamaño de partícula determinado por DDL	64
28	Gráfica de estudio del efecto del radio molar de Q/TPF (QT _x) y QSH/TPF(QSHT _x) sobre el potencial zeta (mV) de partícula	66
29	Gráfica de estudio del efecto del radio molar de Q/TPF (QT _x) y QSH/TPF(QSHT _x) sobre la eficiencia de atrapamiento (%) de partícula determinado por un método indirecto de espectroscopía ultravioleta-visible	69
30	Morfología de nanoplateforma Q/TPF en Microscopio electrónico de transmisión FEI-Titán G2	72
31	Morfología de nanoplateforma QSH/TPF en Microscopio electrónico de transmisión FEI-Titán G2	73

OBJETIVOS

Objetivo General

Sintetizar nanoplateformas de configuración Quitosano/cisplatino (Q/Cis) y Quitosano tiolado/cisplatino (QSH/Cis) mediante la técnica de gelación ionotrópica, y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas.

Objetivos Particulares

1. Realizar la modificación estructural del polímero quitosano con la adición de grupos tiol, llevar a cabo su Caracterización estructural.
2. Sintetizar nanopartículas de quitosano nativo y quitosano modificado con grupos tiol por el método de gelación ionotrópica, cargadas con cisplatino.
3. Evaluar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas.
4. Cuantificar la capacidad de atrapamiento de las nanoplateformas Q/Cis y QSH/Cis.
5. Estudiar el efecto de las condiciones de concentración de agente entrecruzante iónico tripolifosfato de Sodio (TPF).

RESUMEN

Recientemente se han realizado diversos estudios con avances sobresalientes en investigación de nanotecnología y nanociencia para su aplicación en biomedicina. Existe un optimismo notable en que esta tecnología proveerá de novedosas herramientas para diagnóstico y tratamiento de enfermedades. La esperanza se centra en que las partículas, los dispositivos y los materiales sean diseñados de manera que, puedan tener interacción con los materiales biológicos de una manera más eficiente, directa e incluso precisa, esto debido a que por sus dimensiones tienen la capacidad de acceder a ciertas áreas del cuerpo de difícil acceso como el cerebro y células individuales. De acuerdo a este contexto el objetivo del presente trabajo fue la síntesis y caracterización fisicoquímica de nanoplateformas de configuración Q/Cis y QSH/Cis, así mismo, se planteó evaluar su potencial aplicación en la liberación e internalización de fármaco. Para esto se propuso el método de síntesis por gelificación iónica con diferentes relaciones molares de quitosano y entrecruzante aniónico, de esta manera mediante la interacción electrostática del compuesto inorgánico con quitosano, se formó espontáneamente la encapsulación de fármaco antineoplásico cisplatino. De acuerdo a lo anterior se sintetizaron nanoplateformas biopolímero-fármaco, las cuales fueron caracterizadas físico químicamente en el equipo Zetasizer nano Zs en el cual se obtuvieron resultados de distribución de tamaño de 332.20 nm en promedio, y su potencial zeta el cual fue 30.62 mV en promedio para nanoplateformas de configuración Q/Cis, y para nanoplateformas de QSH/Cis los resultados fueron 201 nm en su distribución promedio de tamaño y de 21.30 mV para potencial zeta. La eficiencia de atrapamiento de las nanoplateformas se midió indirectamente por espectroscopia ultravioleta-visible, dando como promedio de porcentaje 39.10% para nanoplateformas Q/Cis y 57.76% para nanoplateformas QSH/Cis. En consideración a estos resultados se hizo un análisis para evaluar el efecto de las concentraciones y relaciones molares mostrando que, las síntesis con mejores condiciones para llegar a ser propuestas como sistema de liberación de fármacos fueron las nanopartículas de configuración QSH/Cis y en el conjunto la relación molar 1:5.1 de QSH/TPF. En consideración a lo anterior, el desarrollo y síntesis de nanoplateformas biopolímero-fármaco resulta una propuesta interesante y con potencial aplicación en el campo de biomedicina. Cabe destacar que al modificar el biopolímero con la adición de grupos tiol se exhiben mejores propiedades fisicoquímicas, lo cual le confiere a las nanoplateformas un incremento de sus capacidades.

INTRODUCCIÓN

Avanzando en el tiempo la nanotecnología nos permite investigar nuevas características de átomos y moléculas con una perspectiva impresionante. Su actual impacto en la generación de conocimiento y tecnología para diversos problemas es indudable, teniendo incidencia notoria en diversos sectores y actividades productivas. Además, siendo una ciencia multidisciplinaria capaz de integrar varios conocimientos a un campo de estudio, llevando su potencial a nanomedicina, resulta una propuesta interesante y de gran avance para enfrentar enfermedades de relevancia a nivel nacional, y con esto impulsar el bienestar y el desarrollo de nuestro país. Una problemática actual en el sector salud es el cáncer de mama, el cual es el más frecuente en las mujeres tanto en países desarrollados como en desarrollo. Aunque existen estrategias de prevención que reducen en consideración los casos, no se ha logrado disminuir de manera significativa su tasa de mortalidad. En México es causante de aproximadamente 6000 defunciones al año en mujeres de 25 años o más. Considerada así la primera causa de muerte por neoplasia maligna. Es por esto que es importante enfocar estudios en diagnóstico y tratamiento de forma apremiante (INSP 2011).

Entre los agentes anticancerígenos eficaces para muchas neoplasias malignas se encuentra cisplatino, el cual se une covalentemente a ADN perjudicando la proliferación celular e induciendo apoptosis. Sin embargo, su régimen de tratamiento en el campo clínico necesita ser mejorado o modificado, debido a su toxicidad grave contra el cuerpo humano, ya que produce nefrotoxicidad aguda, y neurotoxicidad crónica. Recientemente se ha reportado que incorporando el fármaco a una nanopartícula puede aumentar la acumulación en su sitio de acción y al mismo tiempo reducir los efectos secundarios causados por la exposición sistémica. El diseño para la liberación selectiva de fármacos es un método que brinda protección del compuesto, por lo cual, aumenta el tiempo en circulación y la dosis activa antes de alcanzar su objetivo (Curtis y col., 2016; Kai y col., 2015; Lee y col., 2013; Sánchez-Cano y Hannon 2009).

Con características particulares, las nanopartículas presentan ventajas sobre otras formas de suministro convencionales, debido a que el tamaño de estas es determinante en una entrega selectiva de medicamentos y su internalización celular. Quitosano es un polisacárido lineal natural policatiónico obtenido por N-desacetilación parcial de quitina; el cual muestra múltiples propiedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas y curativas en heridas, además, de ser biodegradable y con mucoadhesión, por todo ello se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos, como por ejemplo,

nanopartículas de metrotexato cargadas en quitosano (Cerchiara y col., 2015; Goycoolea, 2009; Hashad y col., 2016; Sarwar y col., 2015).

Quitosano tiolado es un nuevo derivado de la síntesis de quitosano, cuyas propiedades de partícula muestran una fuerte cohesión dando como resultado una mayor estabilidad. Por lo cual esta modificación puede ser determinante en características biológicas y funcionales. De acuerdo a estos argumentos se propone desarrollar nanoestructuras novedosas de biopolímero/fármaco, funcionales en carga y liberación controlada de medicamentos en la etapa de tratamiento, siendo capaces de tener participación en procesos teranósticos a nivel celular (Goycoolea, 2009; Martien y col., 2017).

En este trabajo se describe la síntesis de novedosas nanoplataformas biopoliméricas de Q/Cis y QSH/Cis por el método de gelificación iónica.

Capítulo 1. ANTECEDENTES

1.1 Historia de la nanotecnología

La primera persona que utiliza el concepto de “nanotecnología” fue el físico Norio Taniguchi para describir su trabajo titulado “On the basic concept of nano-technology” expuesto en el año de 1974 (Chiancone, 2012).

En el año 1959 el Dr. Richard Feynman (figura 1), impartió en el Instituto de Tecnología de California su conferencia titulada “hay mucho espacio en el fondo” la cual es considerada como el punto de inflexión conceptual de la visión de la nanotecnología. Durante esta plática propuso los cimientos para abordar este nuevo campo de estudio, lo que significaría mucho tiempo después un mundo nanotecnológico. En esta plática Feynman expuso sus ideas de controlar, manipular, y fabricar objetos en pequeñas dimensiones. De acuerdo a su discurso expresaba *“Los principios de la física, tal como yo los veo, no niegan la posibilidad de manipular las cosas átomo por átomo. Al no violar ninguna ley, no hay motivo para que no pueda hacerse”*. A lo que también agrego *“En el mundo de lo muy, muy pequeño, muchas cosas nuevas podrán suceder, porque los átomos se comportan de manera distinta a como lo hacen los objetos a mayor escala, pues deben satisfacer las leyes de la mecánica cuántica”*. Y finalizaba expresando *“A nivel atómico, aparecen nuevos tipos de fuerza, nuevas posibilidades, nuevos efectos”* (Chiancone, 2012; Gelfert, 2012; Rogers y col., 2014).

En los años siguientes gracias a los avances y descubrimientos de herramientas experimentales fue posible la observación y manipulación de átomos. En 1982 con la invención del microscopio de barrido de efecto túnel, al igual que en 1985 la invención del microscopio de fuerza atómica el cual puede operar muestras biológicas para mostrar los efectos de las fuerzas atómicas. También en ese mismo año se dio el descubrimiento de los fullerenos los cuales pueden considerarse como esferas estables de 60 átomos de Carbono de dimensiones nanométricas. Años más tarde en 1991 sucedió el descubrimiento de nanotubos de Carbono por el físico japonés Sumio Iijima, los cuales son considerados con propiedades eléctricas no usuales y una fortaleza superior a la del acero, además, tienen la capacidad de encapsular materiales lo que amplifica su campo de estudio en diversos temas como, salud, electrónica o informática. Más recientemente en el año 2002 se desarrolló un novedoso microscopio electrónico con un alto poder de resolución que alcanza el radio de un átomo de Hidrogeno (Chiancone, 2012).

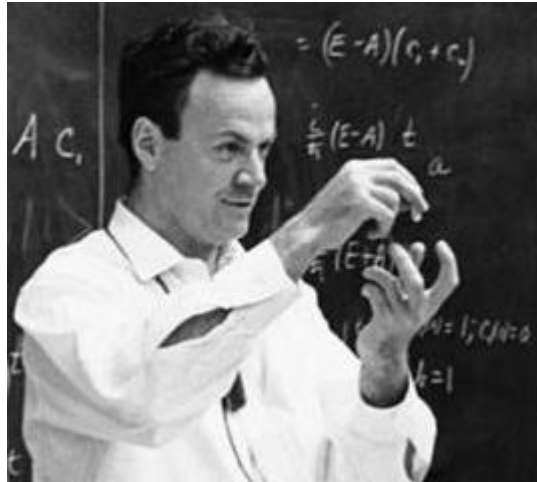


Figura 1. Richard Phillips Feynman, premio nobel de física 1965.

Fuente: Investigación y Ciencia, 2013.

1.1.1 Nanotecnología y nanociencia

Se puede definir a la nanotecnología como la capacidad técnica para la construcción, producción o diseño de dispositivos y estructuras en escala atómico molecular es decir nanométrica, con características novedosas. Al ser una tecnología multidisciplinaria involucra la integración de todos los campos de la química, como, química orgánica, química inorgánica, química analítica y química teórica, además de otras áreas científicas como biología, ciencias de materiales y física, como se observa en la figura 2 (Bawa y col., 2005; Cebada, 2002).

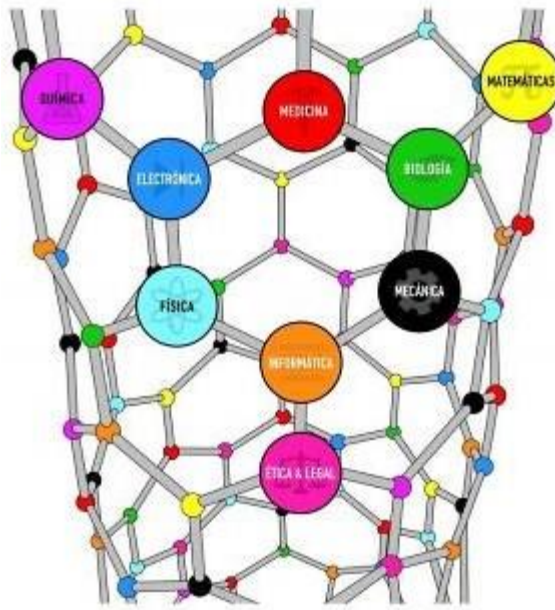


Figura 2. La nanotecnología como una ciencia multidisciplinaria.

Fuente: Risk, 2015.

Una definición de nanociencia es la integración de metodologías y conocimientos para la fabricación, caracterización y estudio de estructuras funcionales en el intervalo de dimensiones nanométricas. Las caracterizaciones de estos nuevos materiales incluyen análisis de propiedades físicas, químicas, mecánicas, magnéticas, eléctricas u ópticas, así como el estudio de la interacción de estas características con otras nanoestructuras (Cebada, 2002).

Existe un consenso en la comunidad científica de emplear la nanociencia y nanotecnología para involucrar tanto la investigación y el desarrollo tecnológico a nivel atómico, molecular y macromolecular a intervalos de 1-100 nm; así como la creación y utilización de estructuras, equipos y sistemas con propiedades novedosas y por último la habilidad de controlar y manipular esas moléculas a escala atómica. De esta manera durante los últimos años han existido diversas investigaciones centradas en semiconductores, microelectrónica y polímeros, estos últimos tienen importante atención entre grupos de estudio de la comunidad científica como por grupos de nuestra universidad. La importancia de su estudio está basada en la búsqueda de aplicaciones

potenciales de estos materiales en biomedicina (Bonaccorsi, 2007; Cebada, 2002; Rogers y col., 2014).

1.1.2 Propiedades a escala nanométrica

Hablando de dimensiones un nanómetro corresponde a una milésima de millonésima de un metro y el prefijo “nano” tiene el significado “enano” en griego. Para tener una visión de lo que esto representa se muestra la figura 3, en la cual se esquematizan tamaños y comparaciones de diversos sistemas cotidianos en el ámbito de la ciencia (Ranjan y col., 2014; Risk, 2015).

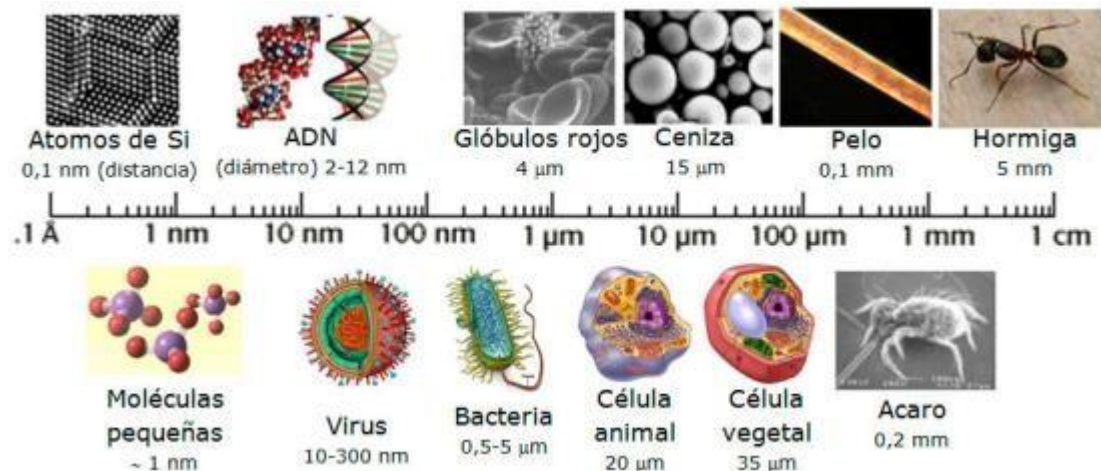


Figura 3. Tamaños y comparaciones a escala nanométrica.

Fuente: Britto y col., 2012.

Hasta la naturaleza nos evidencia máquinas moleculares biológicas las cuáles sirven como inspiración en la innovación de materiales a dicha escala, por ello se piensa en la nanotecnología como un potencial avance para la resolución de múltiples problemas, gracias a sus diversas aplicaciones ayudará al desarrollo de servicios en escala nanométrica, lo que lo convierte en un interesante desafío muy prometedor (Chávez-Castillo y col., 2016; Risk, 2015).

Las causas de las nuevas características de estos sistemas nanoestructurados no son de descubrimiento reciente, ya que con el desarrollo de la mecánica cuántica en la primera mitad del siglo XX se tenía conocimiento de ello. Sin embargo, nos interesa destacar el incremento de relación superficie-volumen. Esto se puede explicar de la siguiente manera: si se tiene partículas de un material con una superficie determinada, y, lo empezamos a llevar a escala nanométrica crecerá la superficie por unidad de masa, esta característica les confiere gran utilidad a diversos materiales (Chiancone, 2012).

También, a dimensiones nanométricas hay un marcado dominio de efectos cuánticos en los materiales, por lo cual resulta la aparición de cambios cualitativos en sus características. Se considera como nanomaterial a aquel, que tenga al menos en una de sus dimensiones un tamaño menor a cien nanómetros, de esta manera, es posible construir materiales tridimensionales, bidimensionales y unidimensionales (Chiancone, 2012; Ranjan y col., 2014).

1.1.3 Ejemplos de aplicaciones en nanotecnología

En el campo de la salud actualmente se desarrollan nanopartículas de plata con propiedades bactericidas para diversas aplicaciones, sistemas destinados a llevar principios activos a moléculas o células diana seleccionadas, encapsulación de nanomateriales, nanosensores, biomembranas artificiales etc. También se diseñan telas para vestimenta con propiedades bactericidas o repelentes al igual que productos deportivos con mayor elasticidad y resistencia. En electrónica se desarrollan nuevos circuitos para mejorar el procesamiento de datos y capacidad de almacenamiento. En la industria de la construcción hay novedades en la fabricación de pinturas y aislantes térmicos. En el sector industrial se fabrican sistemas de extracción de contaminantes del aire y del agua (Chiancone, 2012; Ranjan y col., 2014).

De acuerdo a esto, se evidencia una apremiante exigencia para seguir el desarrollo, la manipulación y construcción de materiales en escalas nanométricas. Es decir, proponer estructuras y sistemas cuyos tamaños oscilen desde 1 a 999 nm (Cebada, 2002).

1.1.4 Sistemas nanoestructurados

La reducción a escalas nanométricas no solo impacta en el tamaño de los materiales, sino que se adentra a un intervalo de dimensiones que nos lleva a estudiarlos desde un punto de vista cuántico, lo cual tiene una diferencia notoria en las características físicas y químicas que presentan estos en comparación con sus propiedades macroscópicas. Por esta razón la comunidad científica asegura que esta transición de dimensiones a escalas nanométricas es un cambio determinante en la producción de nuevos materiales. La nanotecnología implica un marcado cambio de la mecánica clásica a la mecánica cuántica al tratar con materiales de tamaños cercanos a las distancias interatómicas, es de importancia atender conceptos como fuerzas de interacción, fuerzas de enlace y uniones químicas debido a que se trabaja con sistemas de mayor complejidad (Arias, 2005; Rogers y col., 2014).

Las características de un material están en dependencia del ordenamiento de sus átomos, condiciones de presión y temperatura, sus enlaces, y la densidad de carga del material, esto último se define como la distancia promedio en la cual una carga se desplaza colisionando con otras para poder llevar su libre desplazamiento al interior del material. Dichas cargas al ser sometidas a un confinamiento pueden dar lugar a modificaciones del material. Ejemplo de ello es la figura 4, la cual muestra una esquematización a dimensiones y escalas que pueden sufrir los materiales. En la figura 4-a no existe tal confinamiento de átomos y cargas por lo cual estos se encuentran en todo el material y sus cargas se mueven infinitamente en el volumen total de este. Las características físicas de dichos materiales son las tradicionalmente conocidas como propiedades en bulto (Arias, 2005).

Así bien, si se reduce en una dimensión (figura 4-b), como por ejemplo el ancho entonces obtenemos materiales con una capa delgada en su geometría. De este modo han sido reportadas propiedades totalmente distintas a las propiedades de materiales en bulto. Como por ejemplo Acosta-Díaz y col., en el año 2009 trabajaron las características estructurales y morfológicas de películas de Óxido de tungsteno sintetizadas por el método sol-gel y reportaron la formación de cristales con longitudes de cientos de nanómetros agrupadas en estructuras complejas, mejorando con esto la adherencia y homogeneidad de las películas

Continuando con la reducción de dimensiones y confinamiento en dos dimensiones (figura 4-c) se forman lo que se conoce como hilos cuánticos, de modo que el movimiento de las cargas en estos materiales está limitado a una sola dimensión, ejemplo de ello tenemos a trabajos

realizados donde se estudiaron aplicaciones potenciales de los hilos cuánticos, en interacciones de estos con la luz, lo cual podría ser útil para el desarrollo de futuras generaciones de sensores ópticos (Gómez-Campos y col., 2009)

Al final es posible reducir aún más las dimensiones del material (figura 4-d), resultando de esta manera lo que se denominan puntos cuánticos, en este caso se habla de geometrías con limitaciones en sus tres dimensiones, las cuales están siendo de gran interés por sus características y propiedades físicas para posibles aplicaciones futuras que pueden ser generadas gracias a la nanotecnología. En la actualidad la comunidad científica y los grupos de investigación centran sus esfuerzos en tratar de reproducir los dispositivos conocidos en macro escala, pero ahora llevarlos a escala nanométrica (Arias, 2005).

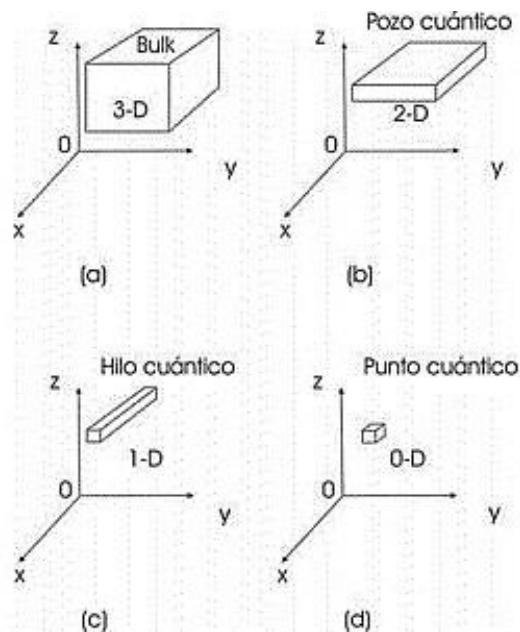


Figura 4. Esquematización de materiales con confinamiento en sus dimensiones. (a) Material en volumen o bulto, (b) material en capa, (c) material en hilo cuántico y (d) material en punto cuántico.

Fuente: Arias 2005.

1.1.4.1 Síntesis de sistemas nanoestructurados. Los métodos de síntesis de nanomateriales generalmente se dividen en dos categorías “bottom-up” (de abajo hacia arriba o “top-down” (de arriba hacia abajo), como se observa en la figura 5. Este último método es efectuado a partir de materiales con grandes dimensiones los cuales son reducidos hasta lograr alcanzar tamaños nanométricos lo cual se lleva a cabo a través de métodos físicos como el desgaste o la molienda. El método bottom-up se basa en la construcción de nanoestructuras a partir de moléculas o átomos en soluciones líquidas o gaseosas, una analogía semejante a la síntesis de ADN, estructuras celulares o proteínas en sistemas biológicos (Flores, 2014; Zhang y col., 2014).

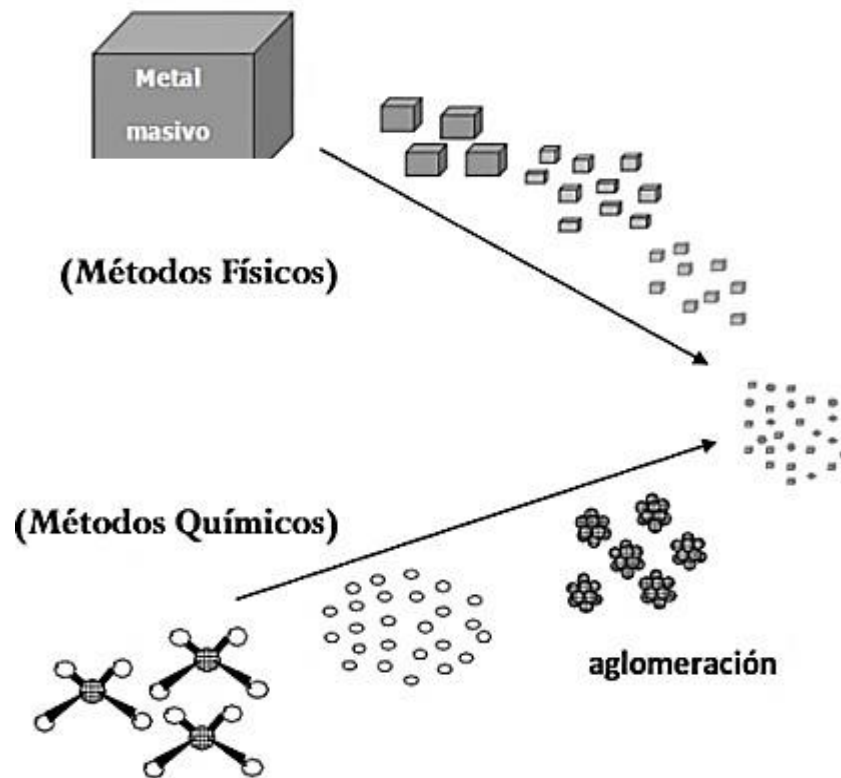


Figura 5. Esquematización gráfica de los dos métodos para preparar nanopartículas.

Fuente: Colonia, 2013.

1.2 Cáncer

Actualmente, México presenta una marcada transición epidemiológica con un aumento de enfermedades no transmisibles como, hipertensión arterial, obesidad, diabetes y cáncer, las cuales son las primeras causas de morbilidad en nuestro país (Sistema nacional de vigilancia epidemiológica, 2014).

La enfermedad de cáncer se origina en una célula a nivel de su ciclo celular esquematizado en la figura 6, este comprende etapas definidas perfectamente, en las cuales, se lleva a cabo la duplicación de la información genética y de este modo da paso a la replicación celular. En dicho ciclo existen puntos de control o verificación, de este modo, cuando la información genética no se encuentra en buen estado, es detectado por esos puntos y como consecuencia se activan una serie de señales en cascada que conducen a la apoptosis celular. Por otro lado, en una célula cancerosa los puntos de verificación son incapaces de reconocer el daño genético, debido a que se encuentran alterados, de esta manera se permite que una célula con mutación genere otra célula igual. Las alteraciones de estos mecanismos pueden ocurrir directamente desde el ADN o por medio de mecanismos que resultan de una transcripción anormal en los genes (Angulo y col., 2013; Cruz y col., 2014; Vermeulen y col., 2003).

Todo esto tiene como resultado un desbalance entre los procesos de replicación y apoptosis, entonces, nuestro cuerpo genera más células de las que en realidad necesita para seguir realizando sus funciones, lo que ocasiona una masa celular que normalmente se conoce como tumor (López y col., 2012; Vermeulen y col., 2003).

1.2.1 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama actualmente se muestra como un problema de salud pública con tintes epidemiológicos, lo cual repercute negativamente a millones de pacientes y familiares en el mundo, derivando problemas como cambios en la calidad de vida, y carga económica, tanto para los sistemas de salud como para la sociedad en general (Golubnitschaja y col., 2016).

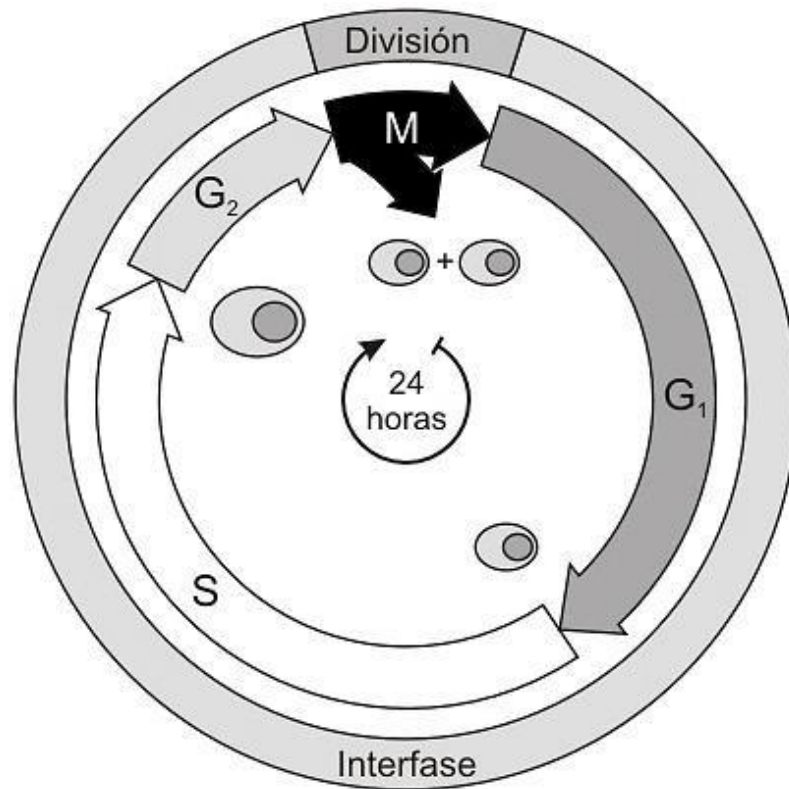


Figura 6. Esquematación del ciclo celular. S: Síntesis. G₂-intervalo 2: Gap 2. M: Mitosis. G₁: Gap 1-intervalo 1

Fuente: Silva-Márquez y col, 2011.

A nivel mundial es frecuente, y se posiciona como la segunda neoplasia maligna en la población. Datos estimados muestran 1.67 millones de nuevos diagnósticos anualmente, estos representan el 25 % de los casos de cáncer en mujeres. Con aproximadamente 152,000 nuevos diagnósticos anuales es considerado también como la primera causa de muerte por neoplasia maligna en la mujer latinoamericana, con índices de incidencia más alta en países sudamericanos como Argentina y Uruguay (SSA, 2015).

Atendiendo nuestro país, desde el año 2006 el cáncer de mama desplazó al cáncer cérvico uterino, para pasar a ser la principal causa de muerte por cáncer en la mujer. Se estiman aproximadamente 20,000 nuevos casos anuales. Durante el año 2013 se registraron 5,405 defunciones. Con una tasa de mortalidad de 22.6 % en Sonora, solo por detrás de Coahuila cuya tasa fue de 24.2%. Los datos muestran una tendencia en orden ascendente, por lo cual es

considerado la principal causa de muerte por tumor maligno tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados, el aumento de la incidencia se puede explicar por una mayor incidencia de la enfermedad, el envejecimiento de la población y la poca facultad de los sistemas de salud de responder con iniciativas adecuadas (SSA, 2015).

Las estadísticas nos proporcionan información útil como, las personas que reciben un tratamiento de cáncer y el número de defunciones por enfermedad al año, al igual que también nos hablan de diferencias entre grupos de personas definidas por edad, grupo racial y ubicación geográfica. Así mismo ayudan a establecer bases para que gobiernos, profesionales de salud e investigadores se comprometan con las repercusiones que esta enfermedad presenta y abordarla de manera conjunta diseñando modelos y planes de trabajo acordes (INCAN, 2016).

1.2.2 Patología del cáncer de mama

Debido a que la comprensión exacta de la patogénesis del cáncer de mama es en demasía extensa, nos brinda la oportunidad de estudiarla en posteriores trabajos, por lo cual solo se tratará en este de manera somera. Aun así, es necesario conocer algunos puntos importantes para la comprensión de la enfermedad (Wang y col., 2014).

Las múltiples causas de la etiología de cáncer implican diversos factores como mecanismos hormonales, biológicos, ambientales, estilos de vida, exposición a carcinógenos e historia familiar. De acuerdo a estudios este último constituye entre el 3 y 10% de los casos. A nivel genético es sabido que mutaciones en genes como BRCA 1 y BRCA 2 participan en un incremento en el riesgo de desarrollar esta neoplasia maligna (Informe mundial sobre el cáncer, 2014; Wang y col., 2014).

En 1990 se descubrió el primer gen de susceptibilidad al cáncer de mama llamado BRCA 1. Después de la identificación de este gen se observó que un patrón hereditario no mostraba mutaciones, por lo que se sospechó la existencia de un segundo gen susceptible, que se confirmó con la identificación del gen BRCA 2. La organización mundial de la salud incentiva la lucha contra el cáncer de mama con programas y políticas adecuadas para la sensibilización de la población en general sobre esta enfermedad. Esto incluye la prevención, la detección prematura, el diagnóstico, el tratamiento y la rehabilitación de los pacientes (Informe mundial sobre el cáncer, 2014; OMS, 2015).

1.2.3 Prevención del cáncer de mama

Se propone y es bien sabido que la modificación de estilos de vida en cuanto a una alimentación saludable, control de sobrepeso, menor consumo de sustancias nocivas como el alcohol o el tabaco y la actividad física ayudan a una prevención integradora eficaz contra enfermedades no transmisibles (OMS, 2015).

1.2.4 Detección temprana del cáncer de mama

La detección de la enfermedad en su primera etapa es clave. La mayoría de los casos se detectan tarde. Se estima que sólo el 10% se detectan en la etapa I, cuando es probable una cura con un tratamiento adecuado. Existen dos métodos para llevar a cabo la detección precoz de la enfermedad los cuales son: mediante el conocimiento de los primeros síntomas y signos en la población sintomática mediante la autoexploración mamaria, como una medida de prevención en la cual las mujeres se responsabilizan de su propia salud, fomentando la toma de conciencia para evitar situaciones de riesgo de la enfermedad. Y el segundo método por medio de pruebas de cribado, es decir el tamizaje de una población asintomática, cuyo fin es detectar anomalías indicativas de cáncer presentes en las personas. Así mismo, la mamografía ha revelado ser eficaz, logrando reducir la mortalidad de cáncer de mama en un 20-30% en mujeres mayores de 50 años. Aunque es factible disminuir el número de diagnósticos mediante medidas preventivas, aun no es posible eliminar la totalidad de los casos, por lo cual es fundamental seguir con estrategias y programas cuyos fines sean mejorar el pronóstico y la supervivencia de los pacientes (OMS, 2015; Magaña-Valladares y col., 2016).

1.2.5 Diagnóstico del cáncer de mama

La detección por exploración clínica es difícil en los primeros estadios de la enfermedad, generalmente solo es posible llevarse a cabo por imagenología. De acuerdo a esto la mastografía es la técnica de imagen más utilizada para ello, la cual tiene una sensibilidad alrededor del 90%, sin embargo, su aplicación no está al alcance del total de la población. Otra técnica utilizada para el diagnóstico es la imagen por resonancia magnética la cual tiene una mayor sensibilidad, pero muestra una baja especificidad, y su costo la hace prácticamente imposible para la población promedio. Debido a la difícil cobertura de estas técnicas para el total de la población el 70% de los casos de cáncer de mama en el país se diagnostican en etapas avanzadas de la enfermedad, lo cual crea un panorama difícil en el tratamiento y pronóstico del paciente. De acuerdo a esto es necesario la implementación y desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas, accesibles a la mayor población posible (INCAN, 2011).

1.2.6 Tratamiento del cáncer de mama

Un correcto diagnóstico es fundamental para llevar a cabo un tratamiento eficaz y adecuado, dicho tratamiento al ser específico para cada tipo de cáncer puede abarcar diferentes modalidades las cuales pueden ser, quimioterapia, radioterapia o cirugía, todas encaminadas a un único objetivo principal que radica en prolongar la vida de manera considerable o mejor aún, curar la enfermedad; así mismo, mejorar la calidad de vida de los pacientes (OMS, 2015).

1.2.7 Medicamentos antineoplásicos

El objetivo principal de los agentes quimioterapéuticos es destruir las células cancerosas, preservando lo más posible las células sanas. Sin embargo, tras el régimen de tratamiento la mayoría de los agentes quimioterapéuticos actúan de manera no específica, dañando de esta forma tanto células malignas como normales, en particular, las células del sistema capilar y las gastrointestinales debido a que son de rápido crecimiento, lo cual explica la mayoría de los efectos secundarios como pérdida de cabello y náuseas. Existe una gran variedad de compuestos

activos utilizados para el tratamiento de cáncer y su clasificación se describe de acuerdo a la función de interferencia realizada por su mecanismo de acción en diferentes etapas de síntesis de ADN, así como la transcripción y traducción. Durante este trabajo se estudió la formación de nanopartículas de quitosano y quitosano tiolado encapsulando antineoplásico cisplatino descrito en el siguiente apartado (Almeida y col., 2005; Wang y col., 2012).

1.2.7.1 Cisplatino

El medicamento antineoplásico cisplatino es un compuesto basado en platino (figura 7), considerado como uno de los más ampliamente utilizados para el tratamiento de cáncer. Fue descubierto en el año de 1965 tras pruebas iniciales sobre inhibición celular de *Escherichia coli*, hallazgo que posteriormente llevó a experimentos en células humanas *in vitro* e *in vivo*, de manera que sus resultados lo mostraron como un potente agente contra el cáncer (Dasari y col., 2014; Markowska y col., 2015).

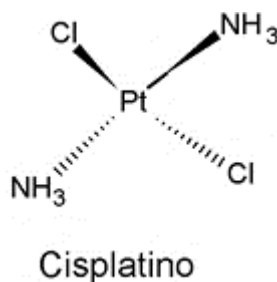


Figura 7. Estructura esquemática representativa de una molécula de Cisplatino.

Fuente: Centro Nacional de Información sobre Biotecnología.

Tras una serie de estudios preclínicos con los cuales se demostró su eficacia contra células cancerosas humanas, se aprobó su uso para el tratamiento de cáncer de vejiga y cáncer

testicular en el año de 1978. Desde entonces ha permanecido siendo el medicamento de primera línea para el tratamiento de varios tumores que no son operables o no pueden ser tratados mediante radioterapia. Químicamente cisplatino se construye a partir de un átomo de platino, dos iones cloruro, y dos moléculas de amoníaco (Dasari y col., 2014; Markowska y col., 2015).

El mecanismo de acción de la citotoxicidad de cisplatino sucede ejerciendo una función como agente de alquilación, el platino se coordina a la guanina y adenina, con un mayor porcentaje de coordinación a dos guaninas consecutivas de la misma cadena como se muestra en la figura 8, con lo cual se forma entrecruzamientos en el ADN, posteriormente se impide una correcta replicación y transcripción de este, además induce perturbaciones en los mecanismos de transporte celular, inhibición de ATPasa e inducción de daño mitocondrial. Todos estos mecanismos dan como resultado la detención del ciclo celular lo cual conduce a las células a apoptosis y finalmente muerte celular (Babu y Ramesh, 2015; Dasari y col., 2014;).

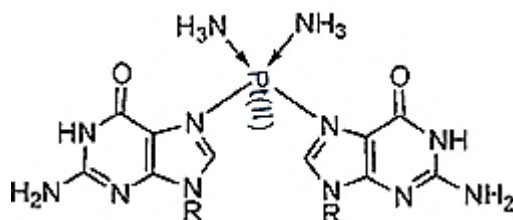


Figura 8: Sitio de unión al ADN del fármaco antineoplásico Cisplatino.

Fuente: ATDBio Ltd, 2005.

1.3 Transportadores de fármacos

Actualmente existe gran interés en el campo de la biomedicina para diseñar nuevos sistemas terapéuticos y de diagnóstico, entre estos las nanopartículas ocupan un lugar importante cuyas características como, sus dimensiones, la relación superficie/volumen, el cambio de propiedades físico químicas y su posibilidad de alcanzar compartimientos a nivel celular. A la par de esto,

recientemente se ha informado que la terapia con nanopartículas ofrece novedosos sistemas de tratamiento quimioterapéuticos, que muestran una baja citotoxicidad los cuales pueden administrarse como coadyuvantes en conjunto con otros fármacos, de esta manera ser más selectivos, seguros y eficaces para los pacientes. Las características y nuevas propiedades de las nanopartículas dependen en gran manera de los métodos de preparación, las concentraciones usadas y la relación molar entre los reactantes (Caldero y col., 2016; Miller y Weissleder, 2016).

El campo de la salud humana, y, específicamente el ámbito de la terapia, se enfrenta constantemente a nuevos desafíos, por lo cual, es de importancia que los medicamentos actúen de forma rápida, de acuerdo a ello se buscan novedosos sistemas de administración y liberación de fármacos aplicados a ciertas enfermedades. El desarrollo y la implementación de nanoestructuras como transportadores, hoy en día es una línea de extensa investigación ante la comunidad científica a nivel mundial. En este contexto se han utilizado y probado diversos materiales, por citar algunos, liposomas, nanopartículas, conjugados poliméricos, micelas, dendritas, nanotubos de carbono y nano esferas (figura 9). En ocasiones estos materiales muestran mejores propiedades como candidatos en el transporte de fármacos (Loera-Serna y col., 2012; Wang y col., 2012).

Un fármaco es una sustancia química que tiene la capacidad de controlar, tratar, prevenir, modificar o curar, algunos procesos fisiológicos no deseados. La existencia más común de diferentes tipos de fármacos es de origen orgánico. Existen distintas vías de administración de estos como son: intravenosa, intramuscular, nasal, inhalación, y, como vía más segura, conveniente y menos costosa la vía oral (Loera-Serna y col., 2012, Oropesa-Núñez y Jáuregui-Haza., 2012).

Así también existen diversos factores que disminuyen la biodisponibilidad de los fármacos, ejemplo de ello es la interacción con el medio biológico, la degradación enzimática o la falta de penetración celular. En algunos casos es conocido que llegan a dañar órganos sanos como por ejemplo durante la administración de fármacos antineoplásicos, estos no son capaces de reconocer las células sanas que se dividen con rapidez similar a las células cancerosas, lo cual lleva a efectos secundarios en la mayoría de los tratamientos contra cáncer. Es por esto que con el actual impacto de la nanotecnología se estudia el uso de nanomateriales inteligentes para controlar diversas características de los fármacos como los efectos secundarios, la degradación, la concentración y la toxicidad De este modo se puede llevar a cabo la optimización de su administración. De acuerdo a esto los materiales inteligentes serán los que presenten y cumplan

con las siguientes funciones: Transportar el fármaco activo sin modificación hasta la célula diana, liberar la sustancia química de forma dosificada, ser biocompatible, no generar residuos tóxicos, eliminarse completamente una vez haya sido liberado todo el fármaco, incrementar la vida útil del fármaco y por supuesto poseer dimensiones nanométricas (Loera-Serna y col., 2012; Wang y col., 2012).

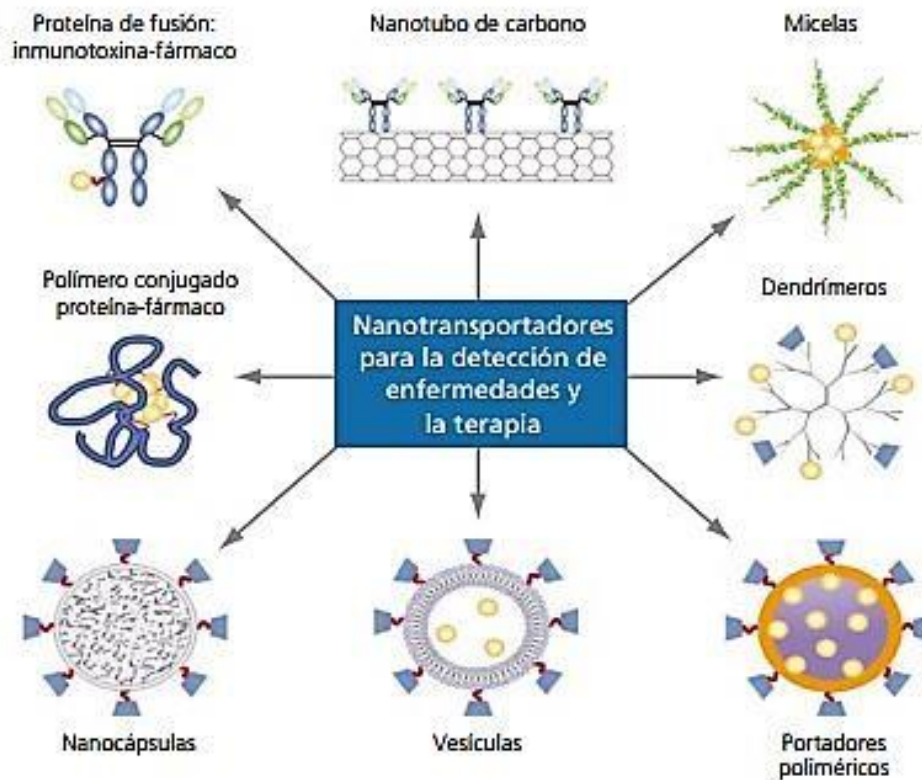


Figura 9. Materiales nanoestructurados para el transporte de nuevos fármacos.

Fuente: Ventosa, 2011.

1.3.1 Liposomas

Los liposomas son sistemas coloidales cuyas dimensiones oscilan cerca de los 1000 nanómetros se utilizan como transportadores por su capacidad espontánea de formación cuando ciertos lípidos son hidratados en medios acuosos (figura 10). De acuerdo a esto consisten en un componente hidrófilo atrapado en bicapas de lípidos por lo cual son compuestos biocompatibles y biodegradables en esto se basa el interés en ellos. Los fármacos se internan comúnmente en la parte acuosa de los liposomas, ejemplo de principios activos que se han logrado encapsular son: esteroides, vacunas, fármacos antimicrobianos y material genético (Rangel-Corona y col., 2004; Wang y col., 2012).

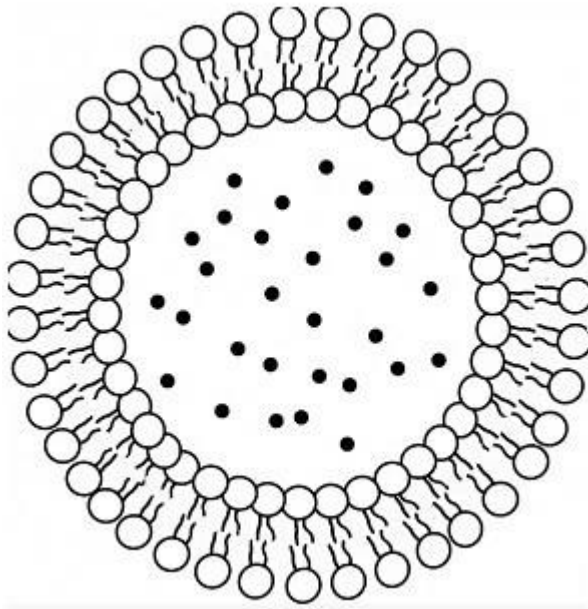


Figura 10. Esquemización de la estructura de un liposoma con fármaco en su interior.

Fuente: Castro, 2012.

1.3.2 Micelas

Un material similar que ha sido ampliamente evaluado para la encapsulación de fármacos son las micelas (figura 11), las cuales son formaciones de moléculas hidrofóbicas con capacidad para solubilizar sustancias lipofílicas, las cuales son rodeadas por extremos hidrofílicos. Como en la mayoría de los sistemas nanoestructurados, el tamaño, la funcionalización de la superficie y la carga depende directamente del método de síntesis. Los materiales anteriores, tanto liposomas como micelas pueden transportar diferentes tipos de fármacos, sin embargo, se ha mostrado que no resuelven los problemas de administración controlada ya que en la mayoría de los casos liberan el fármaco antes de llegar al lugar indicado (Loera-Serna y col., 2012; Oropesa-Núñez y Jáuregui-Haza., 2012, Wang y col., 2012).



Figura 11. Ejemplo de estructura micelar esférica.

Fuente: Lucio Porto, 2010.

1.3.3 Dendrimeros

Los Dendrimeros son macromoléculas de tipo globular sumamente ramificadas, las cuales contiene un núcleo central con capacidad de enlazar grupos funcionales específicos, así como fármacos (figura 12). La alta complejidad de estos nanomateriales ayuda a una mayor retención de concentración de fármaco, así mismo se puede controlar su liberación de mejor manera. Una desventaja de estos materiales es que su método de síntesis es a través de varias etapas lo cual hace sumamente costosa su producción a gran escala (Avti y Kakkar, 2013; Wang y col., 2012).

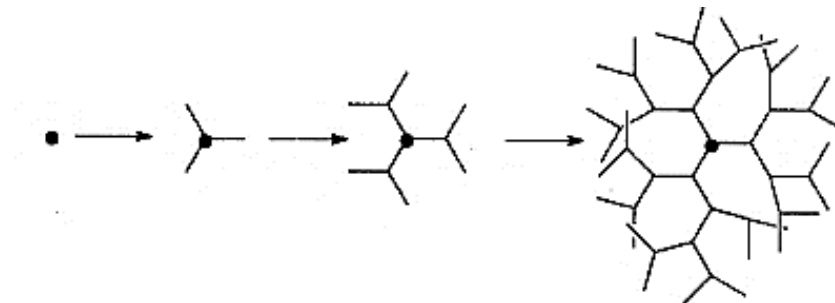


Figura 12. Representación esquemática de la síntesis de Dendrimeros.

Fuente: Montanari y col., 1998.

1.3.4 Nanopartículas metálicas

Se han preparado nanopartículas metálicas (figura 13) como materiales que son funcionalizados para introducir fármacos, por ejemplo, nanopartículas de oro o de plata en terapias foto térmicas. Dichas dimensiones de nanopartículas están en el rango de 100 a 200 nanómetros o incluso en tamaños menores de 50 nm al estructurarse en forma de cascarones. No obstante, el uso de nanopartículas metálicas presenta varios inconvenientes como su baja o nula biodegradabilidad,

por lo que pueden acumularse en diferentes partes del organismo lo cual puede causar toxicidad a largo tiempo (Loera-Serna y col., 2012; Wang y col., 2012).

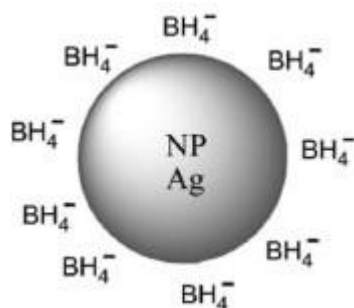


Figura 13. Esquema de nanopartícula de plata conteniendo iones borohidruro.

Fuente: Melo y col., 2012.

1.3.5 Nanotubos de Carbono

Los nanotubos de Carbono (figura 14) son una red hexagonal cilíndrica compuesta por átomos de Carbono, su forma es similar a si una delgada lamina de grafito se enrollara sobre sí misma. Como característica fundamental es que presentan una relación diámetro-longitud sumamente elevada, su diámetro es en dimensiones nanométricas y su longitud puede llegar a variar desde unas micras a centímetros. Estas nanoestructuras se utilizan para el encapsulamiento de fármacos ya que no modifican las propiedades físicas y químicas del activo y muestran una alta resistencia a la degradación durante el transporte a través del cuerpo, así como la fácil penetración a través de las membranas celulares debido a su reducida dimensión, también la biocompatibilidad de su formación que le confiere el Carbono es de gran utilidad ya que se descomponen y son excretados después de la liberación de fármaco. Sin embargo, es difícil lograr una adecuada dosificación debido que no existe una conexión química entre los nanotubos y el fármaco por esto no puede ser controlada (Martínez y col., 2012; Patel y col., 2014).

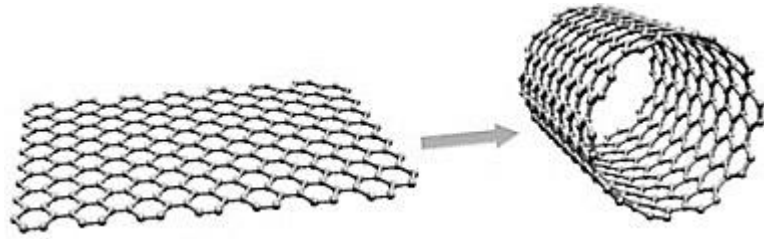


Figura 14. Representación del enrollamiento de un nanotubo de Carbono.

Fuente: Castaños, 2016.

1.4 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas basadas en polímeros naturales o sintéticos son ampliamente utilizadas como transportadores de fármacos, ejemplo de ello es lo reportado por Ping Wu y col., los cuales trabajaron en un nuevo sistema de entrega de nanopartículas de quitosano conjugadas con metrotexato en el año 2009, así mismo polímeros multifuncionales siguen en desarrollo como este tipo de conjugados o como portadores, el control del tamaño de estos se lleva a cabo mediante los métodos de síntesis variando las concentraciones del polímero, el estabilizante o el activo. Las nanopartículas poliméricas brindan protección al fármaco lo cual permite una liberación controlada en base a la velocidad de degradación del recubrimiento del polímero, lo que evita que el fármaco sea absorbido antes de llegar a su sitio blanco. Debido a las dimensiones nanoparticuladas se aumenta la difusión a través de membranas biológicas al igual que les confiere biodegradabilidad ya que su reducido tamaño facilita la eliminación (Loera-Serna y col., 2012; Wang y col., 2012).

1.4.1 Quitosano

Los polisacáridos son polímeros naturales con una amplia versatilidad de propiedades físicas, químicas y funcionales presentes en sistemas biológicos, de este modo pueden formar parte de su estructura o participar en el almacenamiento de energía entre otros procesos. Actualmente hay una mayor tendencia a explotar ciertas familias de polisacáridos ya que poseen propiedades interesantes en distintos sectores como en el área biomédica, textil, cosmética, farmacéutica, etc. Ejemplo de ello son derivados de celulosa y almidón. Siguiendo esta tendencia, especialmente algunos biopolímeros combinan sus características fisicoquímicas para tener la capacidad de formar sistemas micro y nanoparticulados lo que los hace atractivos como una nueva generación de nanopartículas coloidales poliméricas que son útiles en el área de nanomedicina (Goycoolea, 2009).

Quitosano es un amino polisacárido obtenido por N-desacetilación termoalcalina de la quitina, la cual es una sustancia aislada de desechos de crustáceos. Químicamente se define como un polisacárido formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa y 2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1-4), figura 15. Las unidades del tipo (b) son las que a menudo están presentes en menor relación que las del tipo (a) y su contenido en comparación a la de la suma total de unidades se define como grado de acetilación lo cual se expresa como porcentaje (Castillo y col., 2014).

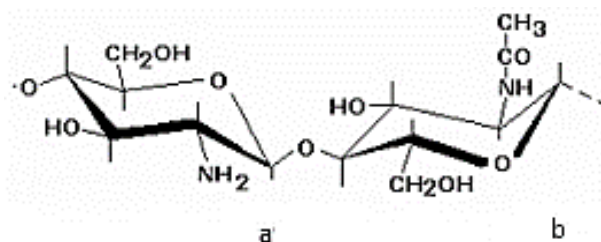


Figura 15. Representación de Quitosano donde "a" y "b" son las fracciones molares de N-glucosamina y N-acetilglucosamina dentro del polímero.

Fuente: Cárdenas, T. G. 2010.

Abordando sus características físico químicas, el quitosano es un biopolímero soluble, la mayoría de los ácidos en solución acuosa lo disuelven, siendo los más utilizados para este propósito, ácido fórmico y ácido acético. El carácter policatiónico proviene de la protonación de grupos amino, de este modo su solubilidad se explica por el aumento de la polaridad a lo largo de su cadena y el grado de repulsión electrostática, lo cual le permite formar estructuras micro y nanoparticuladas, hidrogeles y también películas biológicas en estas condiciones. También este carácter policatiónico se relaciona a su gran afinidad para asociar macromoléculas utilizadas en terapia como insulina, heparina, ARN de transferencia etc., y proporciona características antigénicas ante la degradación hidrolítica y enzimática (Leon y col., 2013; Mourya y col., 2008).

1.4.2 Quitosano modificado químicamente con grupos tiol

El quitosano se ha estudiado también debido a su susceptibilidad a modificaciones químicas, esto es de interés porque su estructura o esqueleto principal tras la modificación no cambia, manteniendo de esta manera las propiedades biológicas y fisicoquímicas, sin embargo, la adición de grupos para su funcionalización le confiere nuevas y mejoradas propiedades. La formación de nanopartículas a base de quitosano se ha estudiado con diversos mecanismos de modificación química, como oligomerización, carboxialquilación, acilación, alquilación, sulfatación, fosforilación y tiolación. Mediante dichas modificaciones se extiende la gama de materiales para distintas aplicaciones y campos de estudio como farmacéutica, biotecnología y biomedicina (Mourya y col., 2008).

El quitosano tiolado es un nuevo derivado de síntesis de quitosano (figura 16), cuyas propiedades de partícula muestran una fuerte cohesión dando como resultado una mayor estabilidad. Estudios muestran que el grado de modificación de entre 25 a 250 grupos tiol por milimol/gramo de quitosano mejora notablemente las propiedades de mucoadhesión, por lo cual esta modificación puede ser determinante para las características biológicas y funcionales (Goycoolea, 2009; Martien y col., 2017; Mourya y col., 2008).

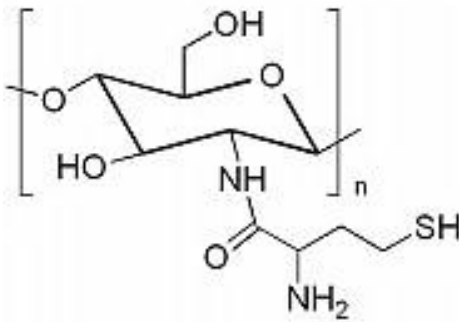


Figura 16. Estructura esquemática representativa de quitosano tiolado.

Fuente: Devaraj y col., 2013.

1.4.3 Síntesis de nanopartículas a base de quitosano

La producción de nanopartículas de quitosano se realiza de acuerdo a una aproximación de tipo bottom-up (de abajo hacia arriba), a consecuencia de procesos de entrecruzamiento y auto asociación, donde, surge una ordenación de las cadenas del biopolímero en dimensiones nano estructurales como resultado de interacciones intra e intermoleculares que pueden ser o no de tipo covalente. En este sentido las nanopartículas del compuesto activo pueden ser atrapadas en la matriz polimérica. Los métodos de preparación más utilizados para la síntesis de nanopartículas a base de quitosano se representan en la figura 17. Usualmente suelen llevarse a cabo una combinación de metodologías, ejemplo de esto es la síntesis de nanopartículas por coacervación para posteriormente tratarlas por entrecruzamiento covalente. Un punto a destacar es que solo unas cuantas metodologías ofrecen real aplicación en el desarrollo de sistemas propuestos para la farmacoterapia, a pesar de que existen una gran diversidad de métodos establecidos y de agentes químicos disponibles, esto debido a la rigurosa regulación que existe en los excipientes para la liberación de fármacos (Goycoolea, 2009; León y col., 2013).

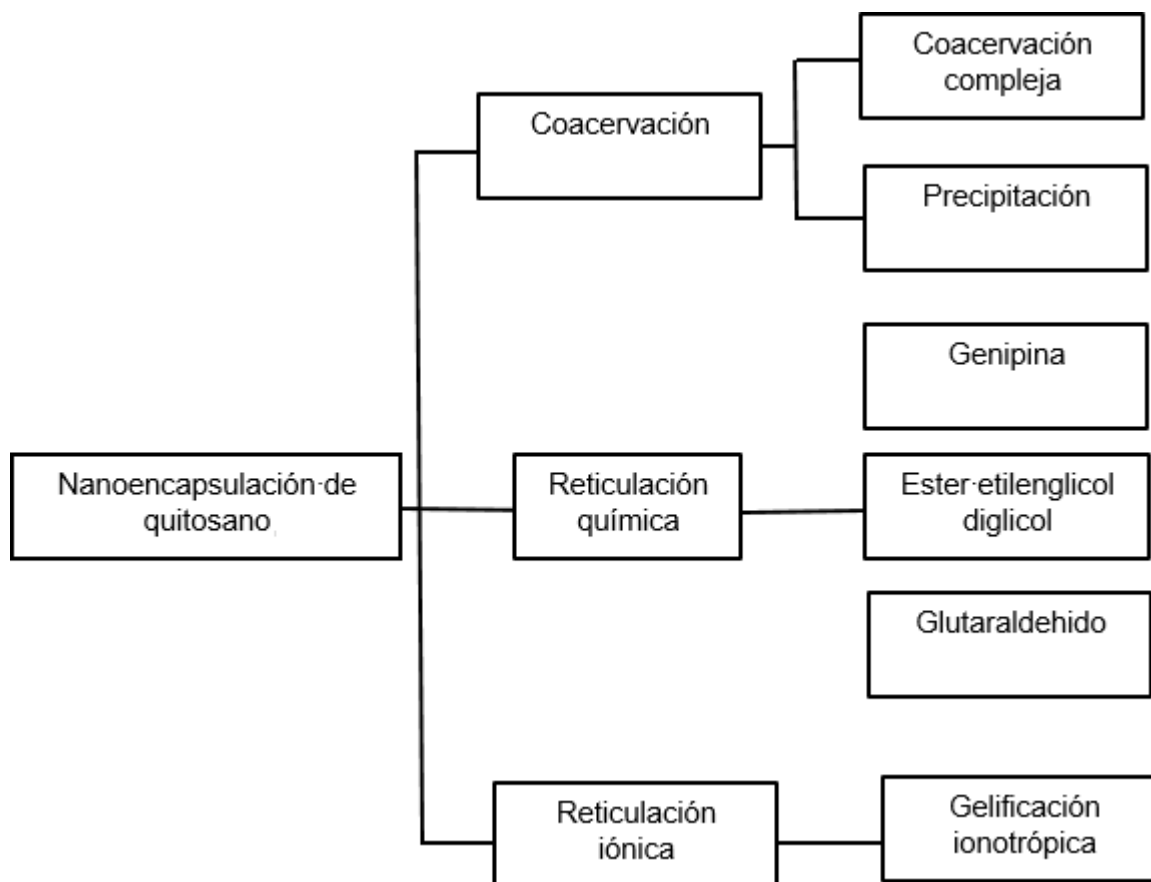


Figura 17. Diferentes metodologías para la preparación de nanopartículas de quitosano.

Fuente: Goycoolea, 2009.

1.4.3.1 Gelificación ionotrópica. En el año de 1997 se estudió la preparación de nanopartículas de quitosano con tripolifosfato de Sodio (TPF), a través de gelificación iónica, un mecanismo que no implica el uso de altas temperaturas o solventes orgánicos que puedan generar residuos de difícil tratamiento, de este modo se describe un proceso biodegradable y biocompatible que propone la formación de nanopartículas por la interacción electrostática entre TPF y los grupos amino de quitosano lo cual se esquematiza en la figura 18 (Leon y col., 2013).

De acuerdo al método de gelificación ionotrópica, su eficiencia depende directamente de la masa molecular y el grado de desacetilación del biopolímero. El biopolímero gelifica en presencia de una solución acuosa de TPF, debido a que se disocia en agua y se hidroliza generando iones, los cuales interaccionan con el polímero por desprotonación o por

entrecruzamiento con los aniones de TPF. En este sentido existirán un mayor número de grupos amino protonados en una solución acida de quitosano cuanto mayor es su peso molecular. De esta manera un número mayor de cargas positivas pueden llevar a cabo la interacción electrostática con las cargas de un anión multivalente, lo que se traduce a un mayor entrecruzamiento. Se ha reportado el estudio de matrices de conjugados quitosano/TPF encapsulando albumina sérica, ácido ascórbico y compuestos fenólicos (Konecni y col., 2012, Rodriguez-Hamamura y col., 2010).

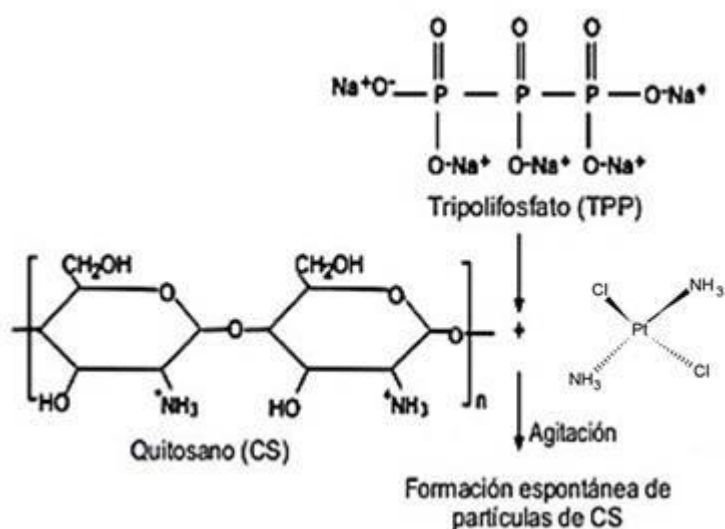


Figura 18. Esquematización de la preparación para la formación de nanopartículas de quitosano por el método de gelificación iónica.

Fuente: Rodriguez-Hamamura, 2010.

1.5 Caracterización físico-química de nanopartículas

El avance de la nanotecnología está sumamente ligado al desarrollo de técnicas y equipos de caracterización de los materiales a estudiar, gran parte de estas caracterizaciones son debido al perfeccionamiento de las ya existentes, ejemplo de ello es la microscopía, ya que actualmente

con el microscopio de transmisión y de alta resolución, se tiene la capacidad de llevar a cabo la visualización de partículas atómicas de manera práctica. La utilización de otras técnicas que serán descritas en los siguientes apartados como, espectroscopia ultravioleta-visible, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, resonancia magnética de protón ^1H y microscopia electrónica de barrido con sus avances de acuerdo a su poder de resolución, nos han permitido detectar forma y tamaño de nanopartículas, su composición química, cambios de fase cristalina y el estado o defectos estructurales a nivel atómico por lo cual la comprensión de éstas es de gran validez al momento de caracterizar novedosos materiales (Gómez-Villalba y col., 2011).

1.5.1 Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-vis)

La técnica espectroscópica de absorción de luz ultravioleta es una de las más usuales empleadas en varios tipos de análisis químicos. La información cualitativa y cuantitativa brindada por las medidas de longitudes de onda entre el espectro de luz visible y ultravioleta posee una amplia aplicación en la caracterización de materiales de una gran variedad de moléculas orgánicas o inorgánicas. Una molécula es activa en el espectro visible para longitudes de onda entre 380 y 780 nm, es decir, debe de ser coloreada y absorber a ciertas longitudes de onda así mismo transmitir la luz a las longitudes de onda restantes. Como ejemplo una solución es verde debido a que dentro de la región visible absorbe radiación en el rango de 620 a 800 nm, en este rango la longitud de onda se encuentra en el color rojo del visible, por lo tanto, esta sustancia absorbe el color rojo y transmite los colores complementarios que dan origen al color verde que se observa a simple vista. La figura 19 muestra el espectro en la región visible de la radiación electromagnética (Flores, 2014).

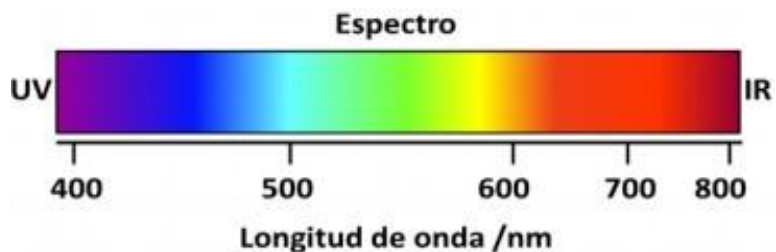


Figura 19. Esquema del espectro de luz visible.

Fuente: Flores 2014.

El principio de esta técnica radica en la absorción de la radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando el ascenso de un electrón de su estado basal a un estado excitado, cuando la radiación de una longitud de onda incide sobre la muestra se produce la absorción parcial de la misma. De esta manera se posibilita la relación de la cantidad de especie activa que está presente en la muestra. Los componentes que integran un equipo de espectroscopia ultravioleta-visible son y se esquematizan en la figura 20: Fuente de radiación, sistema óptico, compartimiento para muestras y detector (Flores, 2014).

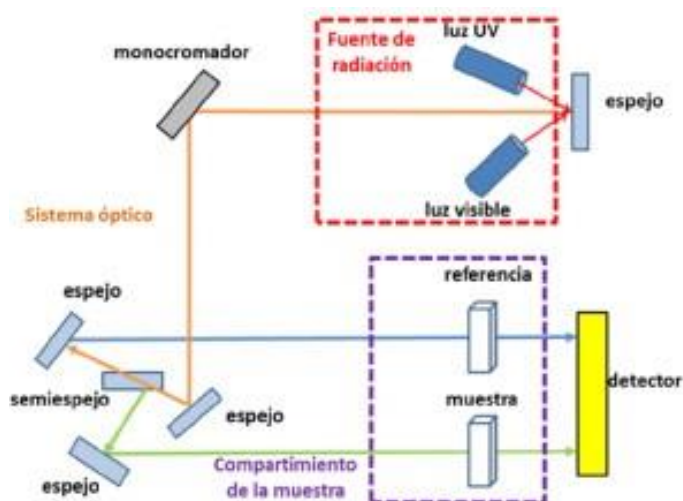


Figura 20. Componentes principales de equipo ultravioleta-visible.

Fuente: Flores, 2014.

La concentración c , de la solución absorbente esta linealmente relacionada con la absorbancia, de acuerdo a la ley de Lambert-Beer.

$$A = -\log T = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Donde A , es la absorbancia medida, b , es el diámetro de la celda usada y ϵ , el coeficiente de extinción molar. La técnica de espectroscopia ultravioleta-visible tiene utilidad en análisis cualitativos y cuantitativos, en estos últimos la aplicación de la ley de Lambert-Beer para la determinación de concentraciones de sustancias que absorben por medio de la cantidad de radiación absorbida o transmitida. En el presente trabajo se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer. Al igual que se utilizaron celdas de cuarzo de 1 centímetro de diámetro para cuantificar la concentración de los sistemas biopolímero-fármaco (Flores, 2014).

1.5.2 Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz (DDL), es una técnica físico-química empleada para la determinación de distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución. En comparación con la dispersión de luz estática, para determinar el tamaño de las partículas no tiene en cuenta la dependencia del ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo. Es decir, la luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles y a consecuencia del movimiento browniano de estas, las posiciones relativas de las partículas varían constantemente lo cual provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. De este modo si las partículas se mueven rápidamente también se acelera la variación de la intensidad de dispersión, en el caso contrario, partículas grandes lleva a variaciones más lentas (Cuadros-Moreno y col., 2014).

1.5.3 Potencial Zeta

Los coloides están en todas partes y la medición del potencial zeta puede ser utilizado para su conocimiento y control. Entre ellos pueden incluirse complejos sistemas biológicos como la sangre o sistemas funcionales como las pinturas. Las suspensiones coloidales son comúnmente

acuosas, aunque también pueden ser utilizadas suspensiones no acuosas. El coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. La caída del potencial y la distancia desde el coloide es un indicador de la fuerza repulsiva entre estos en función de la distancia a las cuales estas fuerzas entran en juego. Un punto de particular de interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la capa de Stern, el cual es conocido como el potencial zeta, dicho potencial es importante ya que puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse (figura 21). El conocimiento del potencial zeta es una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre estos (Mayoral y col., 2014; Sze y col., 2003).

1.5.4 Espectroscopia Infrarrojo por transformada de Fourier

La región del infrarrojo en el espectro electromagnético abarca la radiación con longitudes de onda de 0.78 a 1,000 μm y números de onda comprendidos entre 12,800 y 10 cm^{-1} . Se divide en tres regiones llamadas infrarrojo cercano, medio y lejano, según las aplicaciones y técnicas experimentales. El principio de la técnica de la espectroscopia está basado en la excitación de los modos de rotación y vibración de los enlaces entre los átomos que conforman el material, estos al ser irradiados con un haz, absorben radiación de una o varias longitudes de onda las cuales son características de cada molécula, bajo este fundamento es posible identificar específicamente cada una de estas. Los espectros de diferentes moléculas se explican como el resultado de distintos cambios energéticos ocasionados por transiciones de unos estados vibracionales y rotacionales a otros, como consecuencia de esto la molécula sufre un cambio neto en el momento dipolar y bajo estas circunstancias se provocan cambios en la amplitud de su movimiento. De este modo si la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia de la vibración de la molécula se lleva a cabo la absorción de radiación antes mencionada (Farfán y col., 2006; Gómez y Murillo, 2012).

1.5.6 Resonancia magnética de protón H1-RMN

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una espectroscopía de absorción la cual se basa en la absorción de energía por un núcleo magnético activo, el cual se encuentra en un campo magnético y por efecto de la energía mencionada cambia su orientación. Es una herramienta analítica que proporciona gran información sobre la estereoquímica y estructura molecular, al no ser una técnica destructiva su aplicación abarca todas las áreas de la química y biología. Las partes fundamentales de un espectrómetro de RMN son: Un imán superconductor el cual es necesario para suministrar el campo magnético principal, un oscilador de radiofrecuencias el cual proporciona la energía para cambiar la orientación de los núcleos, un detector de señales y un sistema informatizado el cual administra el equipo. La caracterización de nuestro trabajo se llevó a cabo en un equipo RMN de núcleo activo de protón (^1H), sin embargo, existen más núcleos activos como Carbono (^{13}C), Nitrógeno (^{15}N) y Flúor (^{19}F). La representación de los espectros generados de la intensidad de la absorción con respecto a la frecuencia de resonancia se realiza generalmente a través del parámetro δ y presentan señales cuya forma, tamaño y posición se encuentran relacionados con la estructura molecular. Y tras el análisis detallado de estos se obtiene información valiosa sobre la estructura de la molécula (Rodríguez y col., 2016).

Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En ésta sección se describirá la metodología empleada en el presente trabajo. La cual se divide en materiales y métodos, los primeros se mencionarán en forma de lista, dando a conocer los reactivos utilizados a lo largo de la síntesis de nanopartículas.

La parte de metodología se realizó por etapas, primeramente, se describe la preparación de soluciones en las concentraciones utilizadas. Seguido se hace referencia en esquema a la síntesis de quitosano modificado con la adición de grupos tiol y su caracterización estructural mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) y resonancia magnética de protón $^1\text{H-RMN}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$). Después de la reacción de modificación del polímero natural y su caracterización estructural, se procedió a realizar la síntesis de nanopartículas por gelificación iónica usando distintas relaciones molares de Q/TPF y QSH/TPF con una concentración igual y conocida de Cisplatino. Para finalizar se evaluaron propiedades físico químicas de las nanopartículas sintetizadas, como, DDL, potencial zeta y eficiencia de atrapamiento. Como estudio complementario se realizaron micrografías en microscopio electrónico de transmisión.

2.1 Materiales

Para la síntesis de nanopartículas se utilizaron los siguientes reactivos:

1. Quitosano marca Aldrich, pureza de 85%.
2. Hidrocloruro de cisplatino marca Aldrich
3. Solución buffer PBS
4. Solución de hidróxido de sodio (NaOH) marca Aldrich 1 M
5. Solución de ácido acético (CH_3COOH) marca Aldich 2%
6. Solución de tripolifosfato de sodio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) marca Aldrich [0.5 mg/mL]
7. Orto-fenilendiamina ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$) marca Aldrich
8. Dimetilformamida ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$) marca aldrich

2.2 Metodología

2.2.1 Preparación de solución tampón

Para la Preparación del sistema buffer de fosfatos pH 7.0 se pesaron 6.8 mg de Fosfato de Sodio monobásico y 8.9 mg de Fosfato de Sodio dibásico para la elaboración de 100 mL de solución.

2.2.2 Preparación de solución de tripolifosfato de Sodio (TPF)

La preparación de solución TPF se realizó pesando 50 mg de reactivo llevándolo a un volumen de 100 mL de agua ultrapura. Posteriormente se pasó a enfriamiento entre 2-5 °C durante dos horas antes del uso de la solución.

2.2.3 Preparación de solución de ácido acético

Trabajando dentro de campana de flujo laminar se llevó a cabo la preparación de solución de ácido acético, donde se tomaron 2 mL de reactivo y se aforaron a un volumen de 100 mL

2.2.4 Preparación de Hidróxido de Sodio

Para la preparación de solución de hidróxido de sodio se pesaron 8 g de reactivo para la elaboración de 100 mL.

2.2.5 Preparación de solución de Cisplatino

Se realizó la preparación de solución pesando 10 mg de fármaco antineoplásico cisplatino y se colocaron en un matraz aforado con volumen de 100 mL el cual contenía una solución ácida para su disolución.

2.2.6 Curva de Calibración de Cisplatino

Para la construcción de la curva de calibración de cisplatino se preparó una solución de cisplatino de concentración 100 $\mu\text{g/mL}$ en ácido acético al 2%, y se llevó a agitación vigorosa hasta su completa disolución. Posteriormente se dio tratamiento a, las muestras de concentración conocida siguiendo un método propuesto por Basotra y colaboradores (2013). Una vez terminado este paso, se llevaron a espectroscopía Uv-Vis y se leyeron a una longitud de onda de 706 nm.

2.2.7 Síntesis de quitosano tiolado

La síntesis de la modificación por grupos tiol sobre quitosano se realizó adaptada de la metodología propuesta por Esquivel, R. y col., 2015. La reacción se realizó en dos etapas. Primeramente, se vertió sobre un matraz de tres bocas 2.08×10^{-4} mol de ácido mercaptoundecanóico (11-MUA) y 1.04×10^{-4} mol de clorhidrato de carbodiimida (EDAC), el matraz previamente contenía 1 mL de dimetilformamida, esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y durante agitación magnética por tres horas. después se adicionó 1.04×10^{-4} mol de N-hidroxisuccinimida (NHS) y siguió la agitación durante 30 minutos. Posteriormente se agregó a la mezcla 20 mL de solución de quitosano al 5% (v / p) en agua ultrapura y se ajustó el pH a 5,5 usando NaOH 1 M y se dejó en agitación magnética durante 12 horas. El producto final de la reacción se precipitó mediante la adición con gotero de Hidróxido de Sodio 2 M, y fue separado por centrifugación a 5000 rpm por 30 minutos. La figura 22 ilustra la esquematización de la metodología para llevar a cabo la reacción. El estudio del grado de modificación estructural se llevó a cabo mediante un método comparativo entre los espectros de infrarrojo por transformada

de Fourier y resonancia magnética nuclear de protón ^1H -RMN de las muestras de quitosano nativo y quitosano tiolado.

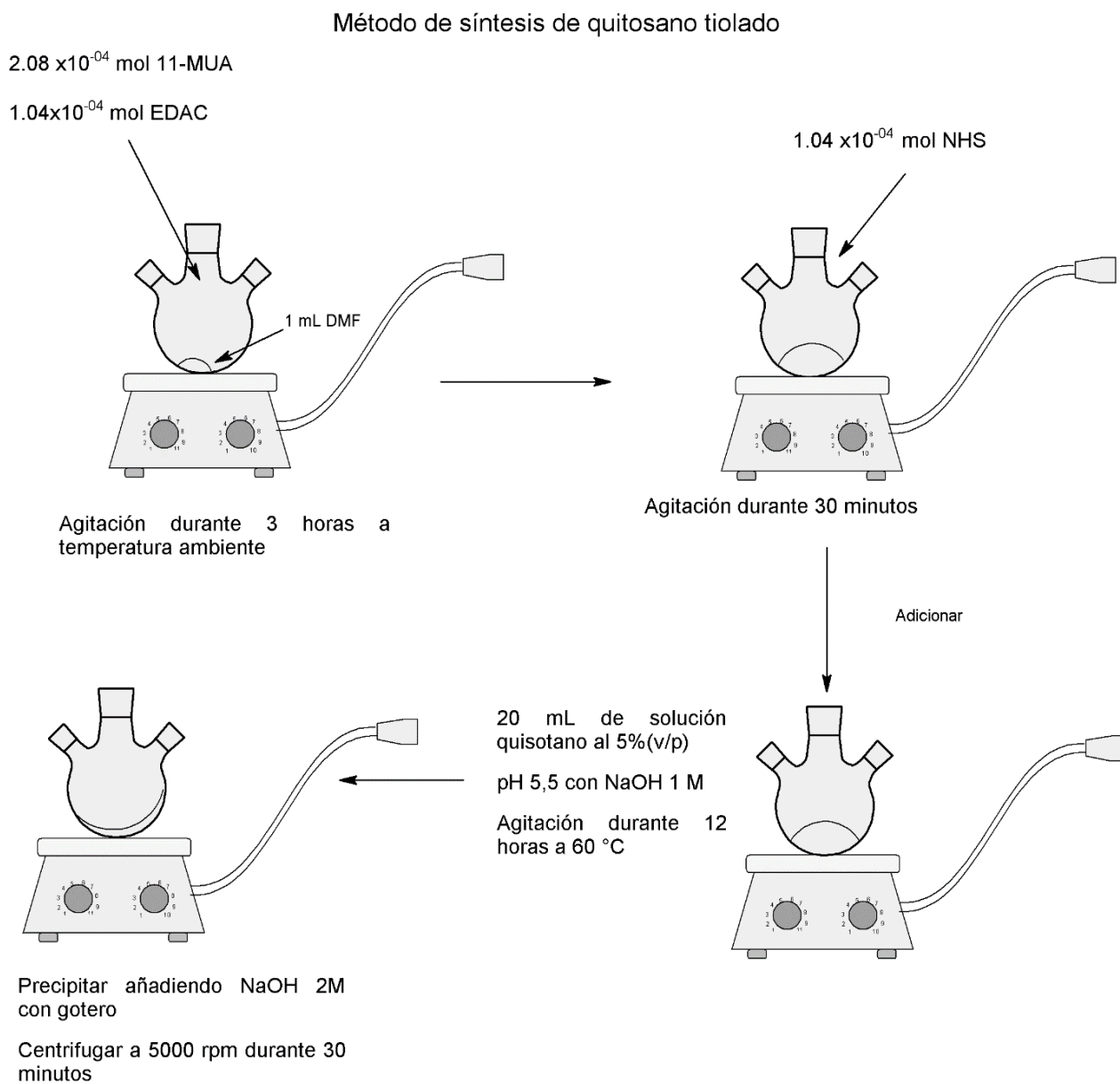


Figura 21. Metodología de reacción para la síntesis de modificación de quitosano por grupos tiol.

2.2.8 Síntesis de nanopartículas quitosano-cisplatino

Las nanoplateformas polímero-fármaco de Q/Cis se prepararon mediante enlace iónico, o gelificación iónica lo que se esquematiza en la figura 23, primeramente, se disolvió Quitosano en una solución acuosa de ácido acético al 2 % la cual contenía la concentración de 100 µg/mL de fármaco antineoplásico cisplatino. La concentración de quitosano fue de 0.5 mg/mL. Se hizo reaccionar este conjugado por un periodo de tiempo de 3 horas en una placa de agitación magnética. Pasado el tiempo de reacción se llevó a cabo el ajuste de pH de 3.9 a 4.7 con hidróxido de sodio 2 M. Posteriormente la solución de síntesis se colocó durante 10 minutos en un baño de agua a 60°C.

Antes de esto se preparó una solución de tripolifosfato de sodio (TPF) de concentración 0.5 mg/mL en agua ultrapura la cual se mantuvo en refrigeración de 2°-5° C durante 2 horas. A continuación, cierto volumen de la solución de TPF se añadió gota a gota en un baño de hielo en agitación magnética, las concentraciones en relación Q/TPF fueron las siguientes: 1:5.4 (QT₁); 1:5.1 (QT₂); 1:4.8 (QT₃); 1:4.5 (QT₄); y 1:4.2 (QT₅).

Se mantuvo la agitación durante 20 minutos, y al final se procedió a centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos. De forma similar en ausencia de fármaco antineoplásico cisplatino se prepararon nanopartículas para ensayos de control.

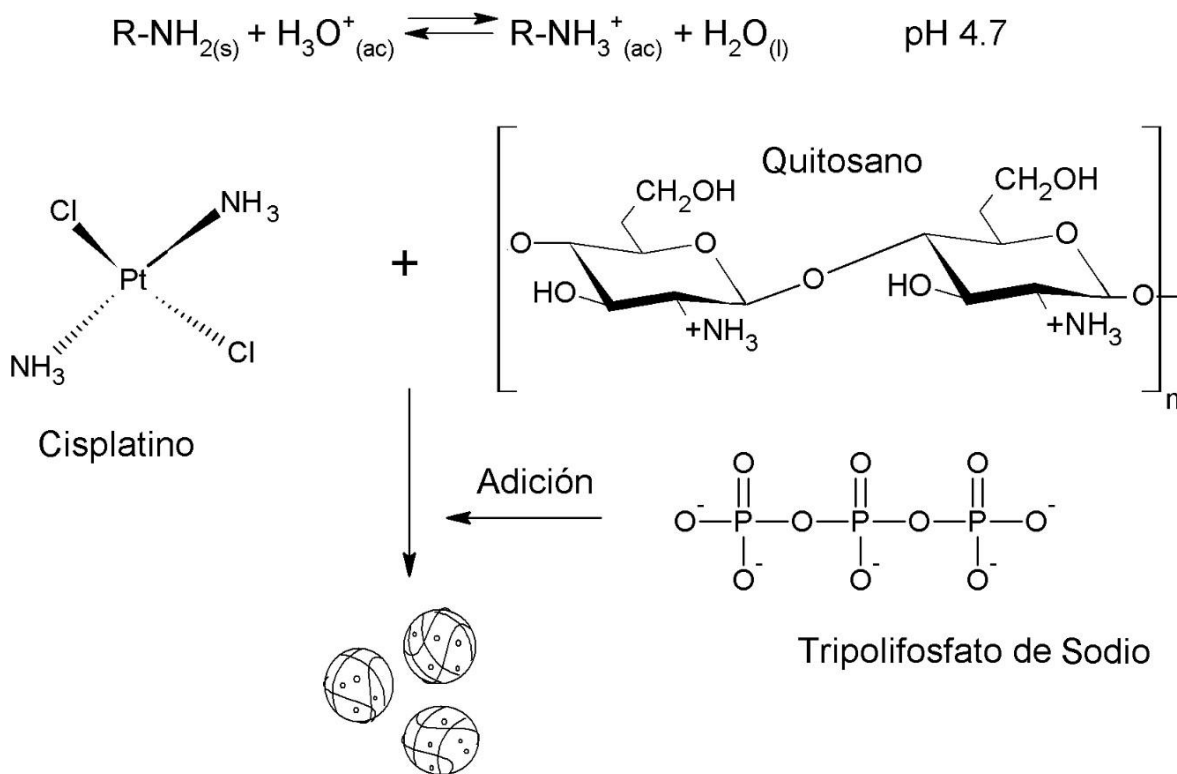


Figura 22. Ilustración esquemática para la preparación de nanopartículas de quitosano/Cisplatino.

2.2.9 Síntesis de nanopartículas quitosano tiolado-cisplatino

De manera similar a la síntesis anterior se prepararon nanoplateformas polímero-fármaco de QSH/Cis, mediante enlace iónico, o gelificación iónica. Las concentraciones en relación QSH/TPF fueron las mismas que para síntesis antes descrita esto es: 1:5.4 (QSHT₁); 1:5.1 (QSHT₂); 1:4.8 (QSHT₃); 1:4.5 (QSHT₄); y 1:4.2 (QSHT₅).

De forma similar en ausencia de fármaco antineoplásico cisplatino se prepararon nanopartículas QSH-TPF para ensayos de control.

2.2 Caracterización fisicoquímica

La determinación del tamaño de nanoplateforma para todas las relaciones de Q/TPF y QSH/TPF (1:5.4,1:5.1,1:4.8,1:4.5,1:4.2) se realizó usando el equipo Zetasizer instrumento de la serie nano de Malvern. El pellet recuperado de las secciones 2.2.7 y 2.2.8 fue suspendido nuevamente en 5.0 mL de agua destilada y se llevó a sonicación durante 30 segundos antes de la determinación del tamaño de nanoplateforma a temperatura ambiente dentro una celda de plástico de 1 cm de longitud.

El potencial zeta de las nanopartículas de Q/cisplatino y QSH/cisplatino fue estimado midiendo la movilidad electroforética en el equipo Zetasizer nano z. El cálculo se realizó utilizando la ecuación de Henry. Se tomó un mililitro de cada una de las suspensiones en una celda capilar para su medición.

Para llevar a cabo la caracterización estructural de las muestras se realizó espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en el intervalo de números de onda entre 400 y 4000 cm^{-1} .

El análisis de datos se hizo con el apoyo del programa OriginPro 2016, se graficaron las concentraciones de TPF, y se compararon con cada una de sus propiedades fisicoquímicas.

2.3 Diagrama resumen de metodología

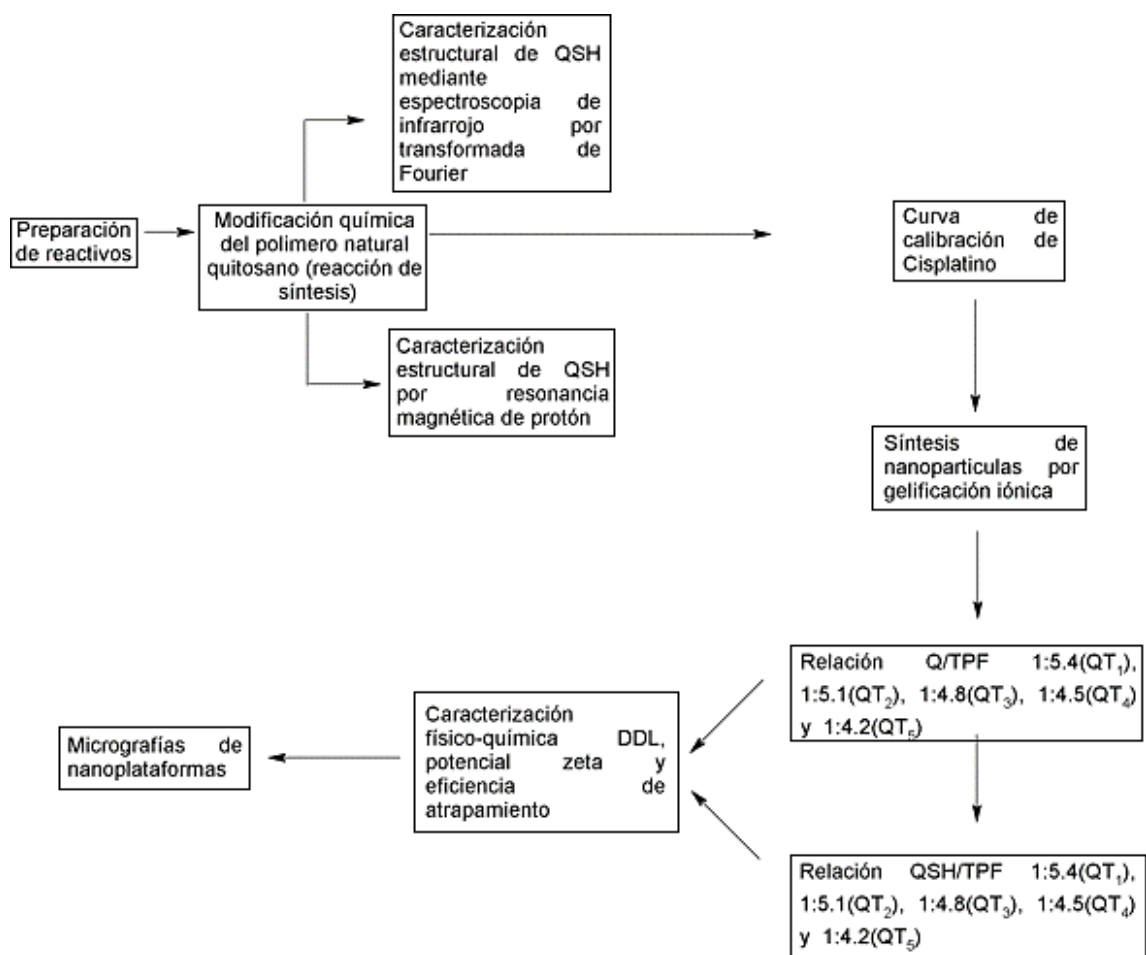


Figura 23. Diagrama representativo de la metodología seguida.

Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Modificación química del polímero natural quitosano de bajo peso molecular (QBPM)

De acuerdo a la consulta bibliográfica realizada, se justificó la modificación estructural del quitosano nativo de bajo peso molecular, el objetivo principal es incluir segmentos de tipo cadena lateral con terminación mercaptano con la finalidad de mejorar sus propiedades fisicoquímicas. La síntesis realizada da como resultado la obtención de un material poroso de coloración amarillo pálido y soluble en condiciones ácido débil diluido. En el apartado siguiente se presentarán los resultados de la caracterización estructural del nuevo compuesto derivado de quitosano.

3.2 Caracterización estructural de QSH mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

El estudio del grado de modificación estructural se llevó a cabo mediante un método comparativo entre los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) de las muestras de quitosano nativo y quitosano tiolado (figura 24). Los resultados que se presentan en esta sección sugieren que la reacción química de sustitución selectiva sobre los grupos amina del quitosano se llevó a cabo de manera exitosa, resultando en la formación de un nuevo grupo funcional correspondiente a las amidas.

La señal que aparece alrededor de 1676 cm^{-1} se debe al estiramiento carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) proveniente de grupo amida, de manera complementaria en el espectro se aprecia la deformación de la señal a 3380 cm^{-1} que es característica del estiramiento de la nueva amida (N-H), de acuerdo a los resultados publicados por Hernandez Cocoltzi y col en el año 2009, así mismo Bravo y col reportaron que la formación del nuevo enlace amida se evidencia mediante la deformación de la señal de las aminas libres (NH_2) y la aparición del grupo carbonilo. Por otra parte, la inclusión de cadenas laterales provenientes de la molécula del ácido 3-Mercaptopropanoico se encuentran en la región del estiramiento metilo ($-\text{CH}_3$) cerca de 2914 cm^{-1} respecto a lo informado en la literatura, esta señal sugiere de manera cualitativa que las cadenas alquílicas forman parte de la estructura principal de la molécula de quitosano. La aparición de la nueva banda a 1250 cm^{-1} demuestra

que en la estructura del quitosano modificado existe la presencia de movimientos tipo estiramiento (C-SH) los cuales, resultan ser típicos en moléculas mercaptocarbonadas.

De manera complementaria y de acuerdo a un trabajo realizado por Zhu y col, en el año 2012 es posible que suceda la formación de puentes bisulfuro (S-S) como parte de un rearrreglo estructural, esta señal es posible apreciarla en el espectro b, del quitosano modificado y se sitúa en 810 cm^{-1} . De acuerdo a Vieira, 2012 reportó como una de las señales más significativas en la caracterización estructural de derivados de mercaptanos, el estiramiento del grupo (S-H), aparece en el espectro de infrarrojo del quitosano modificado y se encuentra a 2540 cm^{-1} . En relación al análisis y a la comparación de los espectros es posible sugerir que se sintetizó un compuesto derivado del quitosano con dos nuevos grupos funcionales: el segmento de las amidas sobre el Carbono 9 del quitosano y un grupo terminal tiómero. De manera complementaria se realizó el análisis de resonancia magnética de protón $^1\text{H-RMN}$ para corroborar la estructura química hidrocarbonada del nuevo compuesto sintetizado.

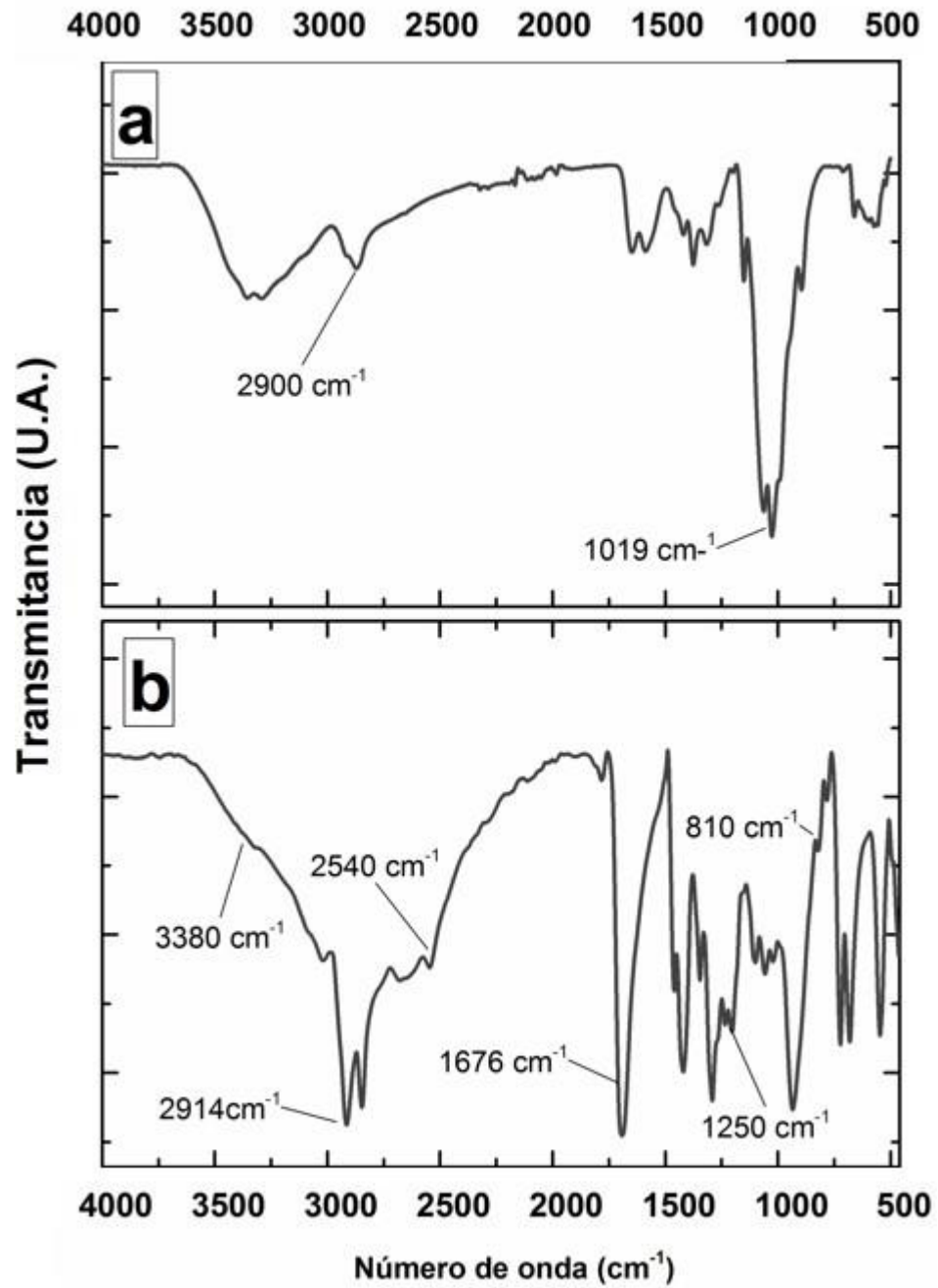


Figura 24. Espectro infrarrojo por transformada de Fourier en donde se muestran las señales representativas de quitosano nativo (a) y quitosano modificado con grupos tiol (b).

3.3 Caracterización estructural de QSH por resonancia magnética de protón ^1H -RMN ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$)

En esta sección se presentan los resultados relacionados con la caracterización estructural complementaria de la molécula de quitosano nativo (QN) y su comparación con quitosano modificado con grupos tiol ó mercaptano (QSH). En la figura (25-a) aparece el espectro de resonancia magnética de protón (^1H RMN DCI/ D_2O) a una concentración de 5 mg/mL de muestra de quitosano nativo (QN). El estudio comparativo de los espectros correspondientes evidencia la presencia de nuevas señales a campo alto que pertenecen a segmento alquílicos, lo anterior nos lleva a pensar que la cadena proveniente del ácido 3-mercaptopropiónico fue unida mediante un enlace covalente y de manera exitosa. En el espectro de ^1H RMN ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$) de Quitosano Nativo (a) es posible apreciar las señales características ya reportadas en la literatura del oligosacárido, La presencia del segmento de acetilación (NHCOCH_3) se sitúa a campo alto cerca de $\delta=2.08$ ppm (1H), el valor de la integral analizada corresponde al grado de desacetilación del polímero. Por otra parte, los protones que pertenecen al anillo de piranosa fueron localizados en dos señales distintas, el protón vecino al grupo amina (CHNH_2) contribuye con una señal (H_a) alrededor de $\delta=3.20$ ppm (d, 1H), de igual manera es posible notar que existen señales múltiples que pueden ser asociadas con el resto de los protones del anillo piranósico ($\text{H}_b+\text{H}_c+\text{H}_d+\text{H}_e$), estos desdoblamientos se localizan en un rango en desplazamiento químico que va desde $\delta=3.19$ ppm hasta $\delta=4.15$ ppm (m, 5H) estos resultados son similares a los reportados por Balanta D y col., en el año 2010 los cuales reportaron la aparición de un singlete a $\delta=2.1$ ppm, correspondiente a los protones del grupo acetamido, la señal para la fracción de D-Glucosamina aparece en $\delta=3.5$ ppm y, entre $\delta=3.7$ -4.0 ppm describieron un multiplete.

La comparación entre los espectros de ^1H RMN de los polímeros QN y QSH evidencia que existe una disminución notable sobre la señal (H_G) que se presenta a $\delta=4.42$ ppm (s, 1H), este desdoblamiento es característico del grupo amina (NH_2) del quitosano, el decremento asociado a esta señal sugiere la sustitución de protones directamente sobre este grupo funcional, dando lugar a la formación de un nuevo enlace amida (NH-COO) como resultado de la reacción del grupo amina con el compuesto 3-mercaptopropiónico. El espectro de ^1H RMN que corresponde al quitosano modificado químicamente (Figura 25-b), demuestra la presencia de nuevas señales que pudieran ser asociadas con cadenas laterales unidas a la molécula de quitosano en concordancia a los resultados mostrados por Han, B y col., en el año 2012, la señal

que se muestra a $\delta=1.12$ (m, 3H) pertenece a los protones equivalentes de la cadena alquílica proveniente del ácido 3-mercaptopropiónico (H_2+H_3), estos protones se encuentran a campo alto por el efecto protector de los grupos alquílos vecinos en la cadena lateral. En esta misma región de campo alto se aprecia la aparición de la señal $\delta=0.58$ ppm (s,1H), está señal se encuentra desprotegida a campo bajo y además es característica del protón que se encuentra en un grupo mercaptano.

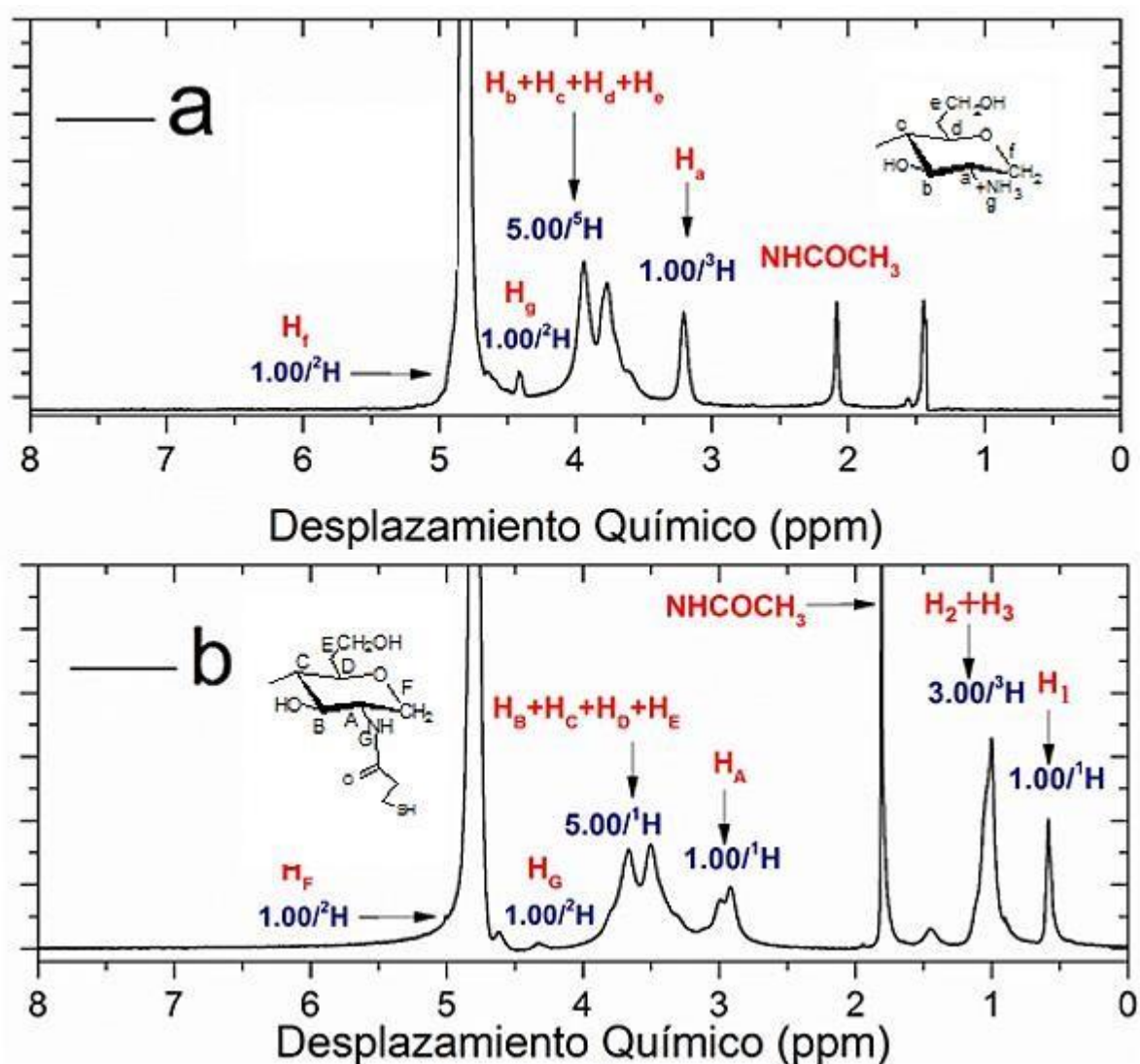


Figura 25: Espectro de resonancia magnética de protón 1H -RMN en donde se muestran las señales representativas de quitosano nativo (a) y quitosano modificado con grupos tiol (b).

La caracterización estructural de los polímeros QN y QSH mediante las técnicas de FT-IR y $^1\text{HRMN}$, sugieren que fue posible llegar a la formación de un nuevo compuesto derivado del oligosacárido Quitosano, y que fueron unidos químicamente cadenas laterales con terminación mercaptano. En la siguiente sección se muestran los resultados del estudio de la síntesis de nanopartículas a partir del nuevo quitosano tiolado (QSH) y la influencia de algunos factores en las propiedades fisicoquímicas de los nuevos sistemas coloidales

3.4 Efecto de la relación molar QN/TPF sobre el tamaño de nanoplateforma

El presente estudio se basó en controlar las condiciones específicas de concentración de entrecruzante y monitorear el tamaño de partícula y la polidispersidad mediante la técnica de dispersión de luz dinámica. La síntesis de nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular por gelación iónica con el entrecruzante tripolifosfato sódico (TPF) dio como resultado la obtención de sistemas coloidales relativamente estables, sin embargo, existen factores que pueden influenciar en el rendimiento de la reacción y en la capacidad de carga del nanomaterial, en este punto se discutirá el efecto de la concentración de TPF sobre el tamaño de partícula y la polidispersidad.

En la figura 25 se muestran los resultados del estudio del efecto del radio molar de QN/TPF sobre el tamaño de partícula determinado por DDL, los datos muestran la tendencia a incrementar el radio hidrodinámico de las nanopartículas al incrementar la concentración de entrecruzante TPF. Las nanopartículas nombradas como QT_1 corresponden a la relación molar Q/TPF 1:5.4, esta reacción representa la menor concentración utilizada de entrecruzante, el diámetro hidrodinámico se encuentra en 405 nm, este dato corresponde con los experimentos publicados por Sifaka y col., 2015, cuyos experimentos en liberación de un fármaco (timolol), los tamaños de nanopartícula varían desde 190 nm a 525 nm, reportando tamaños de partícula de similares características morfológicas y encontraron que éste dependía directamente del soporte utilizado, de las concentraciones y de su relación con el TPF.

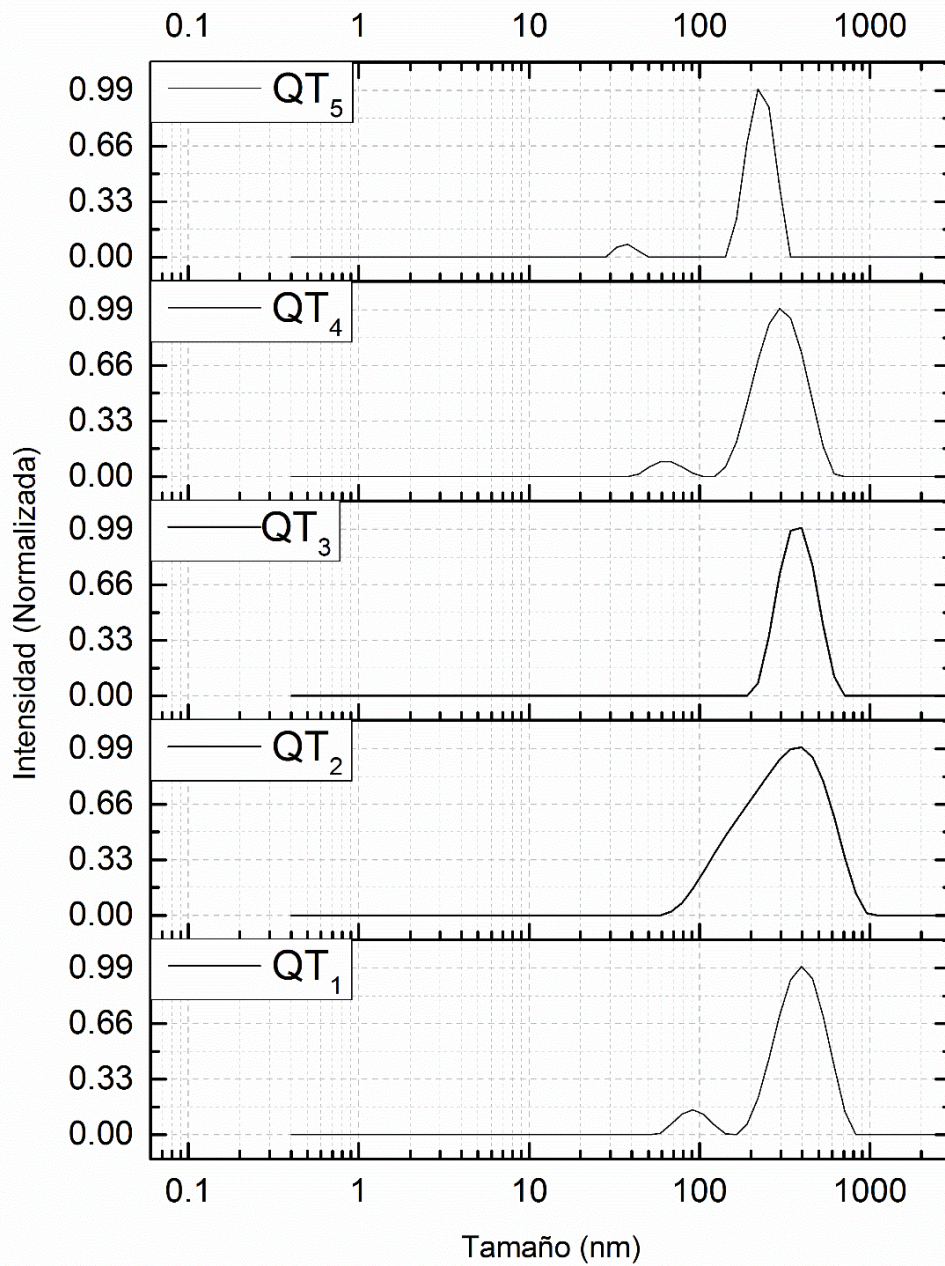


Figura 26. Gráfica de estudio del efecto del radio molar de Q/TPP sobre el tamaño de partícula determinado por DDL

Para los siguientes incrementos en la concentración de TPF se manifiesta la tendencia a disminución en el tamaño de partícula a 338 nm, para el radio molar de la muestra QT₂ (1:5.1), esto nos lleva a sugerir que la reacción de entrecruzamiento entre las cargas positivas del quitosano en forma protonada (NH₃⁺) y el TPF (·) se ve favorecida al incrementar el entrecruzamiento iónico, dando lugar a la formación de estructuras más restringidas espacialmente y por lo tanto más compactas. El siguiente incremento en la cantidad de moléculas reaccionantes de entrecruzante aniónico dio lugar a la obtención de sistemas coloidales de hasta 382 nm para la muestra QT₃, 307 nm para la relación molar (1:4.5) QT₄, es importante mencionar que según Bravo y col., quienes estudiaron el efecto de entrecruzamiento de TPF en microesferas de quitosano los incrementos de entrecruzante están asociados al pH del sistema de reacción por efecto de la concentración de los grupos fosfatos, como el biopolímero gelifica en presencia de una solución acuosa de TPF, éste se disocia y genera iones, los cuales interaccionan por despotronación o por entrecruzamiento iónico.

De acuerdo a Hashad y col., (2016) para la optimización de parámetros de formulación en nanopartículas de quitosano/TPF es conocido que la estructura del quitosano está en función del pH del medio en que se encuentra, esto debido al valor del pKa del quitosano, las cercanías a este valor favorecen la formación de agregados de quitosano y en condiciones básicas a la precipitación de las cadenas poliméricas. Las nanopartículas de menor tamaño se alcanzaron para la muestra QT₅ con la relación molar de (1:4.2), este hecho confirmó que a concentraciones altas de entrecruzante existe la tendencia a la disminución en la distribución de tamaños de hasta 229 nm, por otro lado, resulta evidente que el incremento de TPF conduce además a la formación de sistemas con menor polidispersidad, este fenómeno fue observado también por da Silva y col., en el año 2016 los cuales mediante gelificación iónica prepararon nanopartículas en una relación de masa 1:7 a un pH 5.8 mostrando un análisis de tamaño alrededor de los 200-300 nm encapsulando antioxidante ácido rosmarínico. Los resultados de esta investigación sugieren que el incremento en la cantidad de TPF homogeniza la reacción de todos los grupos amina del biopolímero, dando como resultado partículas de similar tamaño y morfología, es decir sistemas más cercanos a la monodispersidad.

3.5 Efecto de la relación molar QSH/TPF sobre el tamaño de nanoplateforma

En la figura 26 se encuentran resumidos los resultados del análisis por dispersión dinámica de luz para los sistemas coloidales poliméricos, el objetivo de esta comparación es determinar el efecto de la concentración de entrecruzante sobre el tamaño de partícula del policonjugado quitosano tiómero. En las gráficas se aprecia de manera general una disminución importante en el tamaño de partícula por debajo de 200 nm para la mayoría de las muestras sintetizadas, esta observación nos sugiere que existe un efecto predominante por parte de los grupos SH (tiol) sobre el grado de entrecruzamiento del polímero, los grupos tiol presentan conformaciones de tipo puente bisulfuro en condiciones específicas como pH.

El estudio del efecto de la concentración sobre esta propiedad fisicoquímica presenta diferencias significativas entre las nanopartículas de quitosano sin modificación química y el quitosano con cadenas de terminación tiol. La muestra QSHT₁ (1:5.4) fue analizada y se obtuvo un valor de diámetro hidrodinámico cercano a 376 nm, en comparación con la relación molar correspondiente al quitosano nativo (QT₁) que fue de 405 nm, es notable que existe una disminución para la muestra modificada.

Es posible asociar este comportamiento con la presencia de estructuras más compactas, según lo reportado por Dünnhaupt y col, 2015, los conjugados tioméricos mejoran las características físico químicas en sistemas nanoparticulados, ya que en su estudio reportan que obtuvieron tamaños de partículas menores a 300 nm, la cantidad de entrecruzante tiene gran impacto sobre el tamaño de partícula debido a que la concentración de entrecruzante aniónico (TPF) incrementa los pares iónicos o puntos de entrecruzamiento. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una tendencia similar, esto se confirma con el resultado del análisis de la muestra QSHT₂ en la concentración de entrecruzante (1:5) el valor registrado para tamaño representa una disminución importante, ya que se alcanzó un diámetro hidrodinámico de 143 nm.

Se pretende explicar la tendencia a la disminución del tamaño de partícula tomando en cuenta que el tamaño de partícula depende del grado de entrecruzamiento iónico de los polímeros. De esta manera si se toman en cuenta las interacciones de tipo puente bisulfuro entre los grupos tiol, estos enlaces pudieran contribuir a interacciones internas en la cadena y favorecer la formación de estructuras más compactas. Para los casos de las muestras QSHT₃₋₅ (178 nm)₃, (132 nm)₄ y (176 nm)₅ respectivamente, en estas nanopartículas prevaleció la disminución en el diámetro hidrodinámico. Estos resultados son parecidos a los reportados por Martien y col.

(2007), en su estudio presentaron datos similares donde los diámetros de nanopartículas de quitosano tiolado/pDNA se encontraron en el intervalo de tamaño de 100-200 nm.

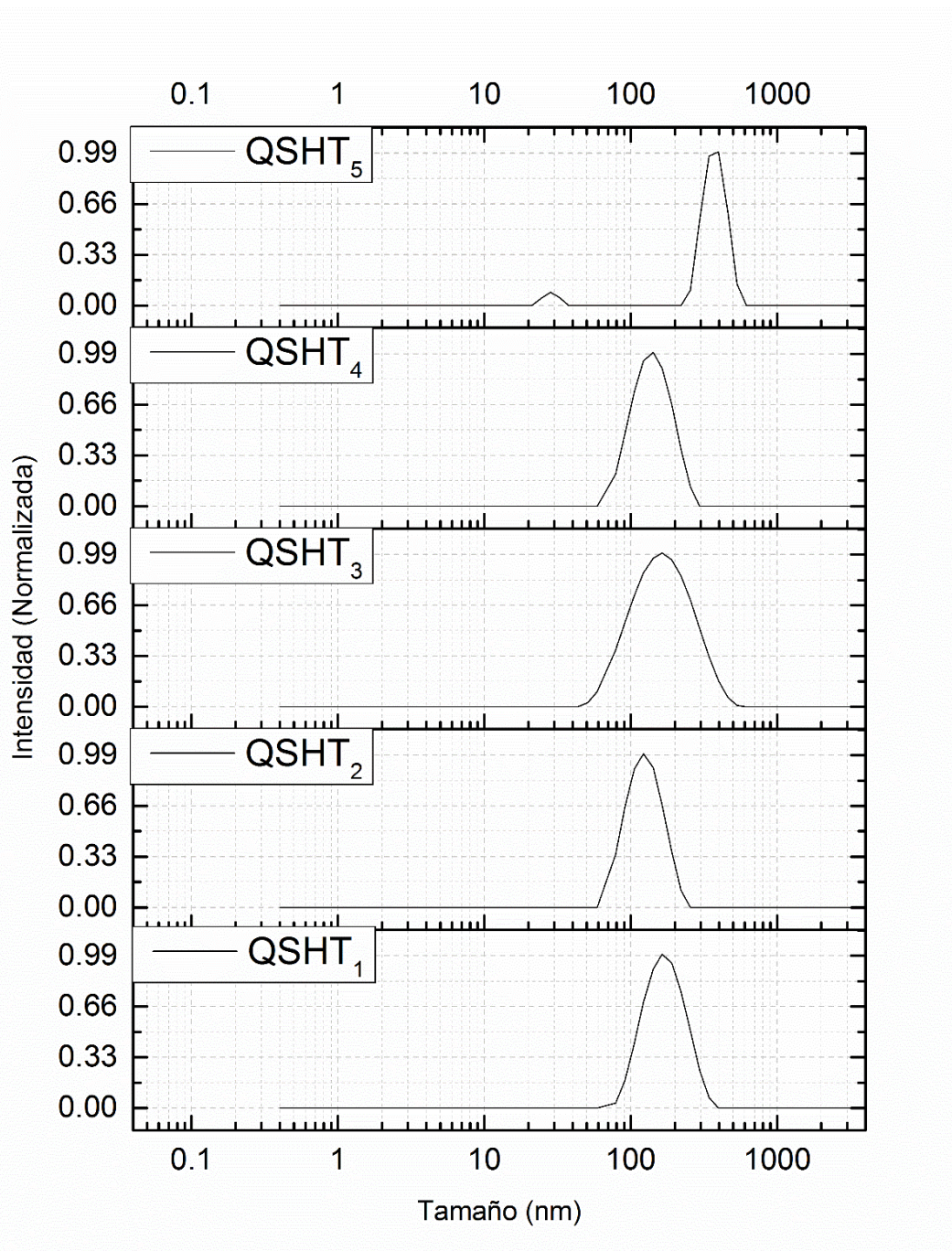


Figura 27. Gráfica de estudio del efecto del radio molar de QSH/TPP sobre el tamaño de partícula determinado por DDL

Los resultados demuestran que el tamaño de partícula de quitosano está en función de la concentración de tripolifosfato, tendiendo a disminuir, pero un exceso en la concentración de moléculas del entrecruzante conduce a la precipitación de las cadenas de quitosano. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que fue posible obtener nanopartículas por debajo de 200 nm, además el tamaño de partícula se mantuvo por debajo de este valor a pesar de incrementar la concentración de entrecruzante, las curvas de DDL demuestran que todas las muestras están libres de microagregados. Esta aportación resulta de gran impacto en la ingeniería de materiales, específicamente hablando en la preparación de nanopartículas de quitosano modificado. En las siguientes secciones se discutirá sobre el impacto en el potencial zeta, que como se sabe, este valor está relacionado ampliamente con la estabilidad coloidal.

3.6 Estudio del efecto de la relación molar Q/TPF y QSH/TPF sobre el potencial zeta de la nanoplataforma

El diseño de nanoplataformas que puedan ser utilizadas como agentes de liberación controlada de fármacos en sistemas biológicos se basa en la óptima modulación de las propiedades fisicoquímicas de los materiales involucrados. Propiedades como el tamaño de partícula, morfología y carga superficial, determinan en gran manera los mecanismos de interacción con la doble capa fosfolipídica, vías de internalización y efectos citotóxicos. Por esta razón en este apartado se pretende abordar los efectos de la concentración de entrecruzante (TPF) sobre la carga superficial de las nanopartículas de quitosano nativo y quitosano tiómero.

La figura 27 ofrece el conjunto de mediciones de potencial zeta realizada para todas las muestras derivadas del quitosano. De manera general es posible apreciar que todos los potenciales son positivos por encima de 18 mV de acuerdo a lo esperado, además de la notable disminución en los valores de potencial zeta a mayor concentración de agente entrecruzante TPF. Este comportamiento se relaciona con el mecanismo de la reacción de entrecruzamiento iónico, en el cual ocurren la formación de pares iónicos, el quitosano aporta el catión proveniente del grupo amina protonado ($^+NH_3$) y el contra ión se encuentra en la molécula de TPF^- . En base al análisis de resultados es posible observar que la muestra con menor concentración de TPF para el quitosano sin modificar, presentó el mayor valor de potencial zeta (QT_1) $\zeta=34$ mV, este valor concuerda con los potenciales reportados para esta reacción por Hashad y col en el año 2016 los cuales reportaron un aumento de 21 a 59 mV en el potencial zeta de las partículas atribuido a una menor neutralización de los grupos amino por TPF, en consecuencia este reactivo se

convirtió en limitante, por esta razón más sitios de quitosano se quedaron sin unir. El incremento de la concentración de agente entrecruzante para la muestra (QT₂) se vió reflejado con la disminución del potencial zeta $\zeta = 30$ mV, esto seguramente debido a un efecto de apantallamiento ya que existe una mayor concentración del polianión y por lo tanto la tendencia será disminuir la carga positiva en la superficie. Los siguientes incrementos en la concentración de tripolifosfato reflejan un efecto similar, es decir el potencial zeta disminuye hasta alcanzar un valor mínimo de $\zeta = 29$ mV.

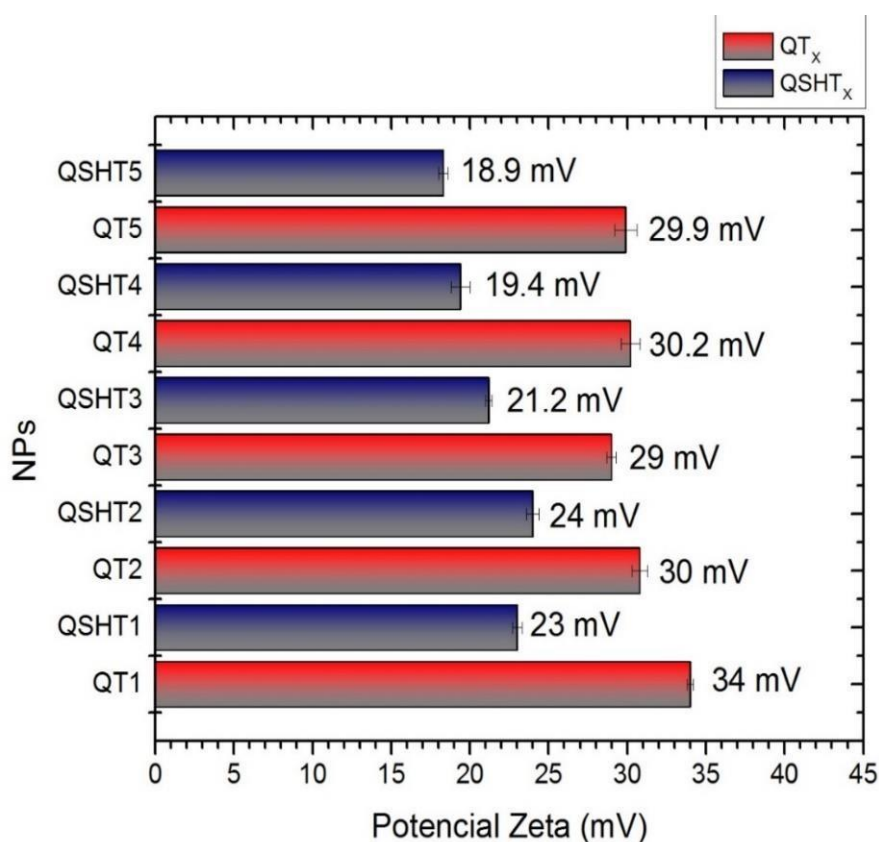


Figura 28. Gráfica de estudio del efecto del radio molar de Q/TPF (QT_x) y QSH/TPF(QSHT_x) sobre el potencial zeta (mV) de partícula determinado equipo Zetasizer

Es importante comentar que las muestras derivadas del quitosano puro fueron monitoreadas y éstas estuvieron libres de agregados o precipitados. Por otra parte, la familia de nanopartículas

preparadas a partir de QSH (tiómero) presentó valores con menor carga superficial comparada con el quitosano nativo. A pesar de experimentar disminución en la carga de la superficie, las muestras preparadas con QSH fueron estables y libres de precipitados de quitosano. De igual manera la figura 27 presenta los valores de potencial zeta para las nanopartículas preparadas con QSH, y podemos apreciar una notable disminución en la carga superficial para la muestra que utilizó menor concentración de TPF, este sistema QSHT₁ manifestó un potencial zeta de 23 mV. Resulta evidente el efecto de los grupos tiol en el potencial zeta, ya que ese mantiene un valor de carga superficial por debajo de 25 mV. Los incrementos en la concentración de polianión se reflejan en la disminución del potencial. De acuerdo a la siguiente muestra, QSHT₂ y QSHT₃ dieron como resultado las mediciones 24 mV y 21 mV respectivamente, y el mínimo valor de carga superficial registrado corresponde a la muestra QSHT₅ $\zeta = 18$ mV. Es importante mencionar que la disminución de los valores del potencial no estuvo asociado a fenómenos de agregación o precipitados, ya que se sabe que los cambios abruptos en los valores de potencial zeta desfavorecen en cierta manera las repulsiones entre partículas de la misma carga.

Los datos mostrados tienen concordancia a lo publicado por Lee y col., en el año 2006 quienes trabajaron en un sistema de administración de teofilina. El quitosano modificado con la adición de grupos tiol reduce ligeramente la carga de las nanopartículas, sus resultados muestran que quitosano nativo tiene un potencial zeta de $22,7 \pm 4$ mV, y, tras la tiolación se reduce ligeramente la carga para que las nanopartículas presenten a un potencial zeta de $15,3 \pm 2$ mV.

Este comportamiento confirma que es posible sintetizar nanopartículas a partir de QSH, aún a concentraciones elevadas de entrecruzante, estos sin afectar su estabilidad coloidal. Además, es posible modular las propiedades de potencial zeta (ζ) y de diámetro hidrodinámico en función de la concentración de entrecruzante aniónico, todo esto para dar lugar a nanopartículas biocompatibles y que presentan estabilidad coloidal en condiciones normales. La principal aplicación de estos sistemas puede ser como agente de carga y liberación de fármaco. En la siguiente sección se presenta el estudio del impacto de la concentración de entrecruzante sobre la capacidad de carga de un antineoplásico (Cisplatino).

3.7 Estudio del efecto de la relación molar Q/TPF y QSH/TPF sobre la eficiencia de atrapamiento de fármaco antineoplásico Cisplatino

En el área de materiales biocompatibles resulta de gran interés la síntesis de nanoestructuras que de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas pueden ser utilizados como agente de carga de sustancias de interés terapéutico. Las propiedades como tamaño de partícula (relación volumen/tamaño), carga superficial y porosidad, son algunas de las propiedades de mayor impacto en la interacción de las nanoplateformas con fármacos. En nuestro trabajo de investigación se sintetizaron nanopartículas de quitosano y se evaluó su capacidad de entrapamiento de un antineoplásico útil en la terapia contra el cáncer de mamá. De acuerdo a Sifaka y col.,2015, la capacidad de entrapamiento se define mediante la ecuación:

$$\text{Eficiencia de Atrapamiento} = \frac{\text{masa de fármaco en Nanopartícula (NP's)}}{\text{masa de fármaco inicial}}$$

La concentración del Cisplatino en el exterior de la cápsula (sobrenadante) fue determinado mediante el método indirecto del complejo (Cisplatino(o-fenildiamina) en dimetilformamida por el método de espectroscopia de UV-Vis. El porcentaje de entrapamiento corresponde a la cantidad de fármaco en este caso cisplatino en el interior de la cápsula y la cantidad adsorbida en la superficie.

La figura 28 presenta los valores calculados de eficiencia de atrapamiento (%EA) de cisplatino para las nanopartículas QT_x y QSHT_x. De manera general es posible observar que existe una notable tendencia al incremento en cuanto a la concentración de cisplatino en la nanocápsula al incrementar la concentración de agente entrecruzante. Este hecho puede explicarse ya que se sabe que el TPF juega un papel muy importante en el entrecruzamiento iónico de las cadenas libres y extendidas de quitosano, por lo tanto, al incrementar la concentración de puntos de unión o entrecruzamiento entre quitosano y TPF, posiblemente quedará una mayor cantidad de fármaco atrapado en el interior y superficie de la esfera biopolimérica.

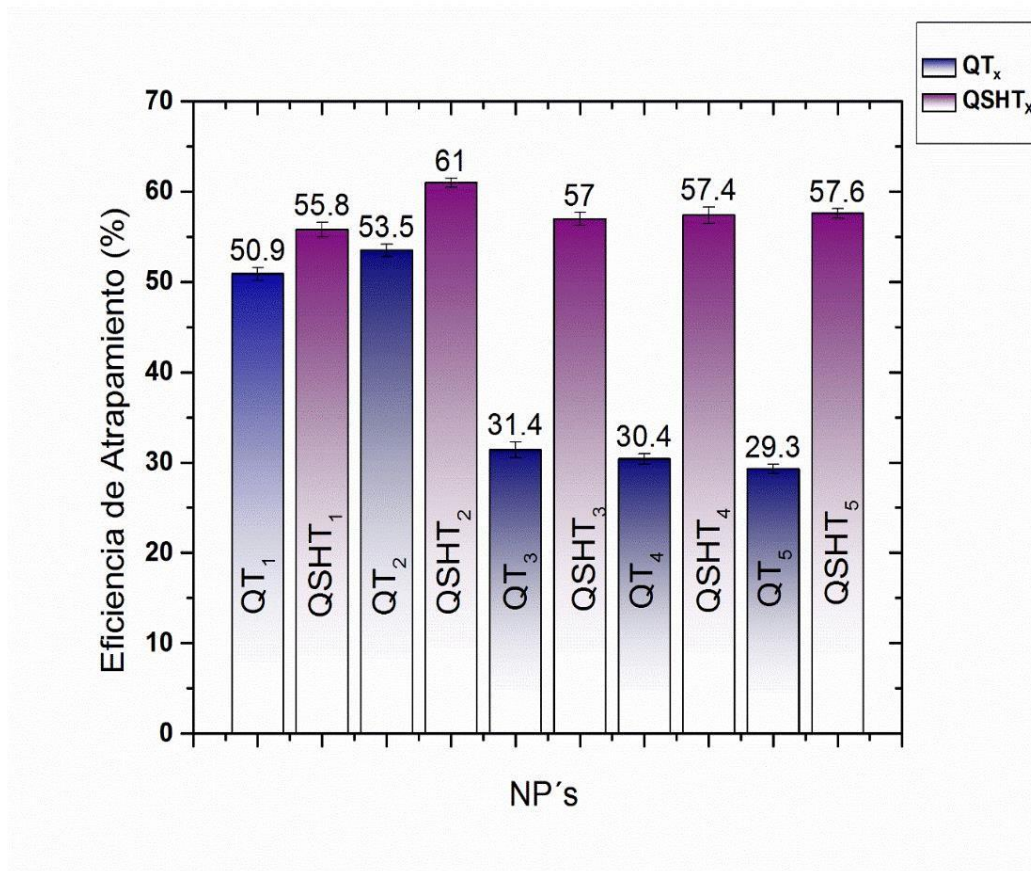


Figura 29. Gráfica de estudio del efecto del radio molar de Q/TPF (QT_x) y QSH/TPF(QSHT_x) sobre la eficiencia de atrapamiento (%) de partícula determinado por un método indirecto de espectroscopia ultravioleta-visible

Por otra parte, el análisis de los resultados de la comparación entre los sistemas de quitosano modificado (QSHT_x) y quitosano nativo (QT_x) revela que existe una mayor tendencia a encapsular el fármaco para las nanopartículas modificadas. Según los datos registrados para las partículas QT_x, las muestras con una menor concentración de entrecruzante alcanzan los valores máximos para %EA, siendo 50.9 % y 53.5 % para QT₁ y QT₂ respectivamente. Los siguientes valores de entrapamiento evidencian un decaimiento notable de hasta 29.3 % para el sistema QT₅. Estos resultados contrastan con los publicados por Lamarra y col., en el año 2016 reportaron una eficiencia de encapsulamiento de 82% en nanopartículas de quitosano/ácido Gálico. En otro estudio realizado en 2015 por Hecq y col., hay similitud en lo reportado por nuestro trabajo donde se prepararon nanopartículas de quitosano cargadas de insulina por medio de autoensamblaje de interacciones electrostáticas entre el fármaco y las cargas del polímero con un promedio de eficiencia de encapsulamiento de 52%.

Este comportamiento puede asociarse con las propiedades fisicoquímicas ya estudiadas en secciones anteriores. Es decir, los sistemas con una menor concentración del entrecruzante conducen a la obtención de sistemas coloidales de menor tamaño, mientras que las reacciones realizadas con la mayor concentración de TPF (QT₅), dan lugar a la formación de agregados coloidales con valores de índice de polidispersidad por encima de 40 %.

Para el caso de las partículas preparadas con quitosano tiolado, se observa un comportamiento inverso si lo comparamos con el polímero sin modificar. La muestra preparada con la menor concentración de TPF (QSHT₁) registró un valor de 55.9 % de cisplatino en la cápsula, los incrementos de TPF se vieron reflejados proporcionalmente al % de eficiencia de atrapamiento, por ejemplo, para las muestras QSHT₂₋₄ fueron medidos valores de 61 %, 57 % y 57.4% de manera correspondiente. Por último, la muestra QSHT₅, registró un valor de %EA de fármaco cercano a 57.6 %, la estabilidad de los sistemas sintetizados está ampliamente relacionada con la eficiencia de atrapamiento, es por eso que las muestras QSHT_x confirmaron la tendencia al incremento de este valor si lo comparamos con las muestras nativas QT_x. De acuerdo a un estudio similar llevado a cabo por Martien y col., en el año 2007 los diámetros de nanopartículas de quitosano tiolado/pDNA están en el intervalo de tamaño de 100-200 nm, En concordancia con dicho trabajo quitosano tiolado muestra una mejor prospectiva en la encapsulación de fármacos

Esta diferencia la relacionamos con la posible formación de puentes bisulfuro (S-S) que pudieran clasificarse como interacciones intramoleculares entre cadena y cadena de quitosano, lo que contribuye a la formación de estructuras más compactas y homogéneas al incrementar la cantidad de moléculas de TPF. Estos resultados reflejan similitud con los mostrados por Martien y col., en el año 2007, los cuales informaron el aumento de propiedades mucoadhesivas de 5 a 10 veces con quitosano tiolado/pDNA, en comparación con quitosano sin modificación, por lo que los autores también lo atribuyen a la formación de enlaces disulfuro. Los resultados sugieren que los sistemas de Quitosano tiolado pueden ser utilizados como agente de carga de fármaco, inclusive que es posible modular la dosificación de fármaco en el interior de la partícula en función de la relación molar QSH/TPF. Es evidente que el quitosano tiómero presenta ciertas ventajas frente a su compuesto precursor, esto al obtenerse estructuras más compactas y con un mayor % EA para el fármaco cisplatino en solución acuosa. En la siguiente sección se discutirá acerca de las propiedades morfológicas de las dos familias de nanopartículas sintetizadas en este trabajo de investigación.

3.8 Micrografías de nanoplateformas de configuración Q/TPF y QSH/TPF en microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Como un estudio complementario al trabajo en las figuras 29 y 30, se exponen micrografías representativas en TEM, las cuales confirmaron la síntesis de nanoplateformas de configuración Q/Cis y QSH/Cis, con forma esférica que se presentaron como partículas un tanto separadas. El tamaño para las nanopartículas fue generalmente con similitud al tamaño medido por DDL. Para nanoplateformas de configuración Q/Cis el tamaño osciló por debajo de 250 nm y para nanoplateformas de configuración QSH/Cis el tamaño se encuentra alrededor de 100 nm. En un estudio realizado por Lee y col., en el año 2013 reportaron nanopartículas de cisplatino en PAA-MMA las cuales tienen una morfología esférica con dimensiones inferiores a 200 nm, Así mismo, también se observa una distribución homogénea con tamaños de nanopartículas similares para los dos tipos de síntesis, esto también confirma el estudio realizado por DDL, donde se indicó muestras libres de agregados, lo cual resulta en un sistema monodisperso. Por último para los dos tipos de síntesis se pueden observar que algunas nanopartículas no tienen forma esférica clara y presentan algunas irregularidades, resultado que también observó Lamarra y col., en el año 2016 sintetizando nanopartículas de quitosano funcionalizado con ácido gálico en donde reportaron una distribución normal de forma irregular y superficie lisa. La morfología y el control de tamaño es un parámetro importante debido a que tiene un significativo impacto en la degradación de la matriz polimérica, al igual que en la carga y liberación del fármaco.

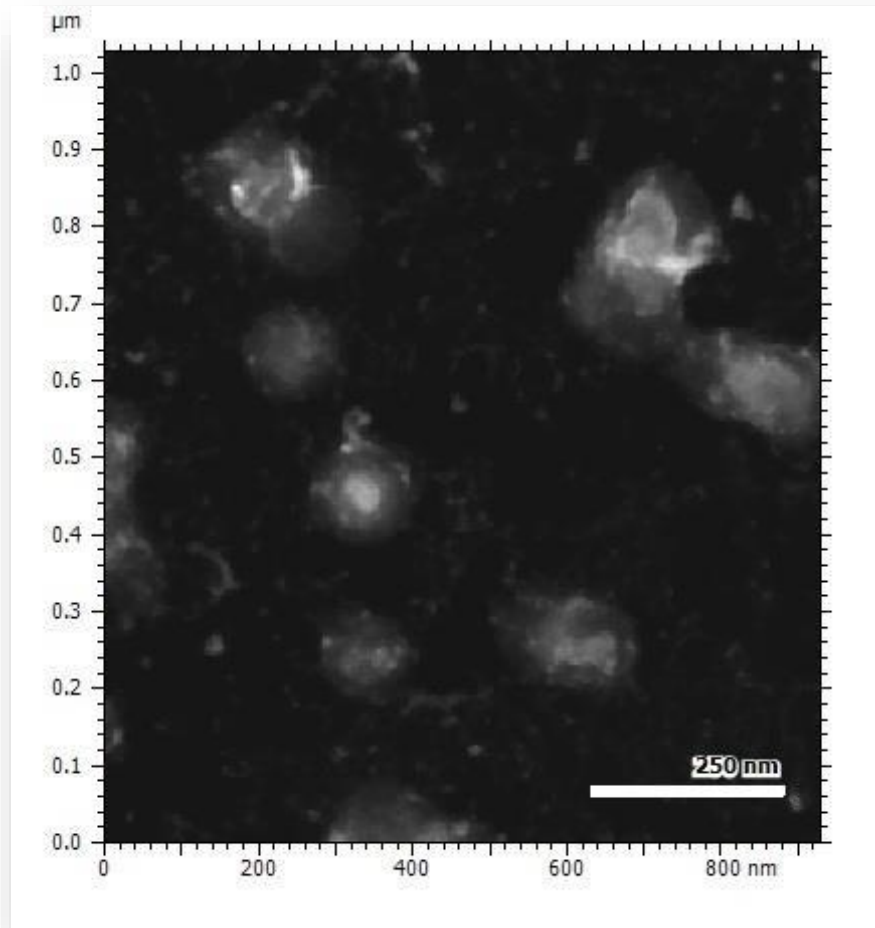


Figura 30. Morfología esférica de nanoplataforma QN/TPF en Microscopio electrónico de transmisión FEI-Titán G2

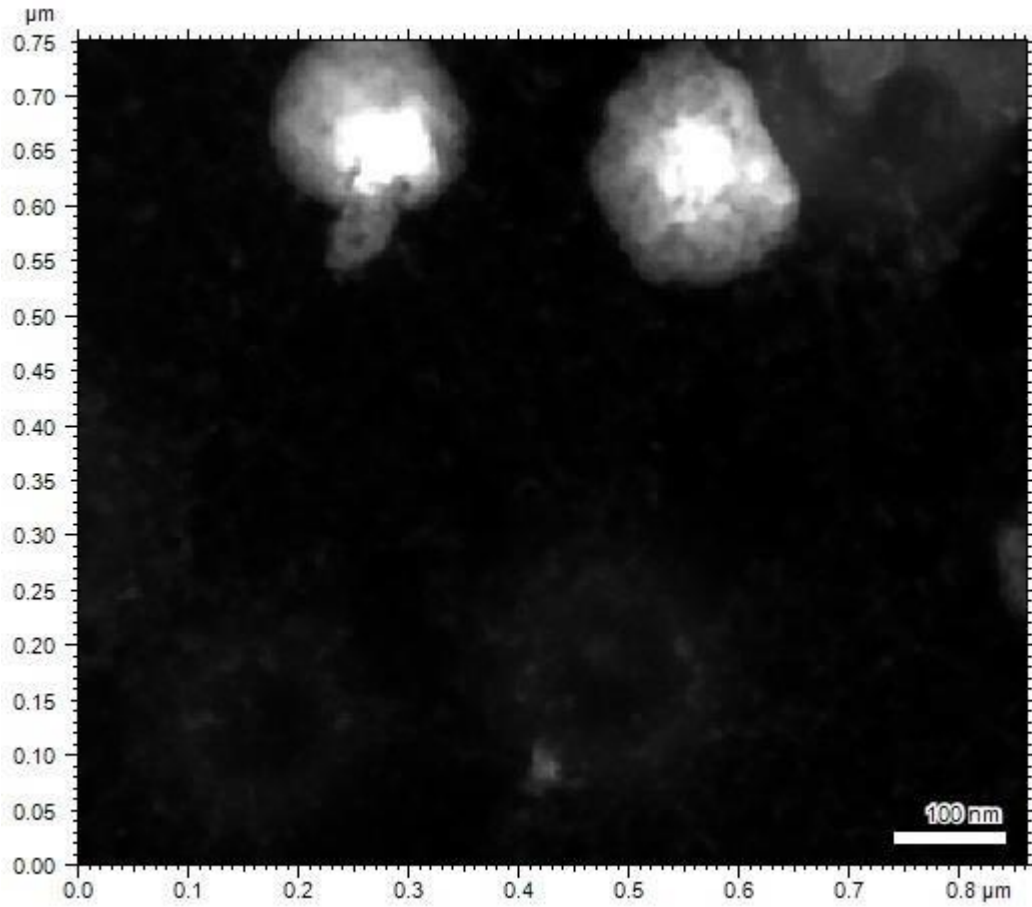


Figura 31. Morfología esférica de nanoplateforma QSH/TPF en Microscopio electrónico de transmisión FEI-Titán G2

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de configuración quitosano/cisplatino y quitosano tiolado/cisplatino mediante gelificación ionotrópica el cual es un método propiamente económico, simple y amigable con el medio ambiente. Cada una de las nanopartículas desarrolladas exhiben características adecuadas para llegar a ser consideradas candidatas a utilizar como base de desarrollo en sistemas de liberación de fármacos.

Se validó la síntesis de quitosano tiolado, con su caracterización estructural de la modificación del quitosano nativo de bajo peso molecular, mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) y resonancia magnética de protón $^1\text{H-RMN}$ ($\text{D}_2\text{O/DCI}$)

Las síntesis con mejores condiciones para llegar a ser propuestas como sistema de liberación de fármacos fueron las nanopartículas de configuración quitosano modificado con la adición de grupos tiol/cisplatino y en el conjunto de estas tras el análisis gráfico la relación molar 1:5 de QSH/TPF se propone como la que exhibió mejoras notables en sus características fisicoquímicas para llevar a cabo esta función. Esto debido que presenta uno de los menores tamaños de nanoplateforma el cual es importante en la internalización celular, la mayor capacidad de atrapamiento, lo cual es indicativo de una mayor cantidad de fármaco antineoplásico a transportar y un elevado valor de potencial zeta, este último es de importancia en la estabilidad de la nanoplateforma y en la interacción con los potenciales de membrana celulares.

Se verificó la morfología en microscopio electrónico de transmisión, lo cual confirmó la síntesis de nanoplateformas esféricas.

De acuerdo al desarrollo de este trabajo se presenta evidencia experimental que sugiere a nanoplateformas de configuración quitosano tiolado/cisplatino en relación molar 1:5.1 de QSH/TPF, como, un sistema promisorio para fines de liberación de fármacos, aunque también es válido llevar a cabo un estudio más detallado para conocer sus verdaderas capacidades en estudios "*in vivo*".

CAPÍTULO 5. RECOMENDACIONES

En esta sección se propondrán recomendaciones, las cuales pretenden orientar a futuras trabajos de investigación, dado que es factible llevarlas a cabo para la obtención de un panorama de resultados más concreto con la finalidad de ayudar al mejoramiento del mismo.

1. Determinar la capacidad de liberación de fármaco de la nanopartícula mediante sistema in vitro de membrana semipermeable.
2. Ajustar la liberación de fármaco a un modelo de liberación, con esto conocer el tipo de liberación controlada.
3. Realizar estudio de internalización celular en líneas celulares de cáncer de mama, para evaluar su efecto citotóxico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida VD, Leitão A, Reina LDCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova*, 28(1), 118-129.
2. Angulo MM, Yustos MA, León MV, de Mon Soto MÁ. 2013. Cáncer de mama. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(27), 1629-1640.
3. Akhlaghi SP, Saremi S, Ostad SN, Dinarvand R, Atyabi F. 2010. Discriminated effects of thiolated chitosan-coated pMMA paclitaxel-loaded nanoparticles on different normal and cancer cell lines. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(5), 689-697.
4. Arias AIO. 2005. Nuevas propiedades físicas de materiales nanoestructurados. *Ing. Rev. Acad*, 9(3), 39-46.
5. ATDBio Ltd. 2005-2017. Nucleic acid-drug interactions. Recuperado de <http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>
6. Avti PK, Kakkar A. 2013. Dendrimers as anti-inflammatory agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(SPE), 57-65.
7. Babu A, Amreddy N, Ramesh R. 2015. Nanoparticle-based cisplatin therapy for cancer. *Therapeutic delivery*, 6(2), 115-119.
8. Balanta D, Grande CD, Zuluaga F. 2010. Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(5), 297-316.
9. Basotra M, Singh SK, Gulati M. 2013. Development and Validation of a Simple and Sensitive Spectrometric Method for Estimation of Cisplatin Hydrochloride in Tablet Dosage Forms: Application to Dissolution Studies. *ISRN Analytical Chemistry*, 2013.
10. Bawa R, Bawa SR, Maebius SB, Flynn T, Wei C. 2005. Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(2), 150-158.
11. Bravo JJP, Creus C, Francois N. Efecto del entrecruzamiento con tripolifosfato de sodio en la estabilidad térmica de macroesferas de quitosano.
12. Calderó G, Montes R, Llinàs M, García-Celma MJ, Porras M, Solans C. 2016. Studies on the formation of polymeric nano-emulsions obtained via low-energy emulsification and their use as templates for drug delivery nanoparticle dispersions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 145, 1 September 2016, pp. 922–931.

13. Cárdenas TG. 2010. Composición de pintura anti-incrustante a base de complejo de quitosano-cobre (i) y método para obtenerla Google Patents. Recuperado de: <https://www.google.com/patents/WO2010032197A1?cl=es>
14. Castillo E, Jiménez G, Gómez-Gaete C, von Plessing C. 2014. Desarrollo de un carrier nanoparticulado como estrategia de transporte a través del sistema nervioso. *Rev Farmacol Chile*, 7(2), 17-24.
15. Cebada TT. 2002. Nanoquímica y nanotecnología: Nuevos materiales, polímeros y máquinas moleculares. *Encuentros multidisciplinares*, 4(12), 20-25.
16. Cerchiara T, Abruzzo A, di Cagno M, Bigucci F, Bauer-Brandl A, Parolin C, Luppi B. 2015. Chitosan based micro-and nanoparticles for colon-targeted delivery of vancomycin prepared by alternative processing methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 92, 112-119.
17. Chiancone A. 2012. Las nanotecnologías en Uruguay. *Espacio interdisciplinario*. Universidad de la Republica Uruguay. Capítulo de libro, pp. 45-53. Recuperado de: http://www.estudiosdeldesarrollo.mx/administracion/docentes/documentos_personales/16096NT%20URUGUAY%20reducido.pdf#page=18. Fecha de acceso 12 de octubre de 2016.
18. Cruz MDCL, Mendiola AV, Cruz IS. 2014. Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2), 98-107.
19. Cuadros-Moreno A, Pimentel RC, Martínez ESM, Fernandez JY. 2014. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 14.
20. Curtis LT, England CG, Wu M, Lowengrub J, Frieboes HB. 2016. An interdisciplinary computational/experimental approach to evaluate drug-loaded gold nanoparticle tumor cytotoxicity. *Nanomedicine*, 11(3), 197-216.
21. Dasari S, Tchounwou PB. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.
22. Devaraj M, Deivasigamani RK, Jayadevan S. 2013. Controlled growth and molecular self-assembly of Au nanoparticles to Au nanochains: application towards enhancement for the electrochemical determination of paracetamol. *Analytical Methods*, 5(14), 3503-3515.
23. Dünnhaupt S, Barthelmes J, Köllner S, Sakloetsakun D, Shahnaz G, Düregger A, Bernkop-Schnürch A. 2015. Thiolated nanocarriers for oral delivery of hydrophilic macromolecular drugs. *Carbohydrate polymers*, 117, 577-584.

24. Farfán RA, Molina JR, Ottavianelli E, Espíndola JA. 2006. Asignación de Bandas de Infrarrojo del Lapachol mediante Estudios Comparativos Teóricos y Experimentales. *Información tecnológica*, 17(5), 63-66.
25. Flores CY. 2014. Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas). Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10915/34946>. Fecha de acceso 06 de octubre de 2016.
26. Gelfert A. 2012. Nanotechnology as ideology: Towards a critical theory of 'converging technologies'. *Science Technology & Society*, 17(1), 143-164.
27. Golubnitschaja O, Debal M, Yeghiazaryan K, Kuhn W, Pešta M, Costigliola V, Grech G. 2016. Breast cancer epidemic in the early twenty-first century: evaluation of risk factors, cumulative questionnaires and recommendations for preventive measures. *Tumor Biology*, October 2016, Volume 37, [Issue 10](#), pp. 12941–12957
28. Gómez-Campos FM, Rodríguez-Bolívar S, Luque-Rodríguez A, López-Villanueva JA, Carceller JE. 2009. Sobre la aplicación de nanoestructuras periódicas de hilos cuánticos en sensores ópticos. *Óptica pura y aplicada*, 42(4), 227-232.
29. Gómez R, Murillo R. 2012. Espectroscopía infrarroja. Recuperado de: <http://sistemas.fcencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf>.
30. Gómez Villalba LS, López-Arce P, Fort González R, Álvarez de Buergo M, Zornoza-Indart A. 2011. Aplicación de nanopartículas a la consolidación del patrimonio pétreo.
31. Goycoolea F. 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Laboratorio de biopolímeros. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, México.
32. Han B, Wei Y, Jia X, Xu J, Li G. 2012. Correlation of the structure, properties, and antimicrobial activity of a soluble thiolated chitosan derivative. *Journal of Applied Polymer Science*, 125(S2).
33. Hashad RA, Ishak RA, Fahmy S, Mansour S, Geneidi AS. 2016. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: Optimization of formulation parameters for improving process yield at a novel pH using artificial neural networks. *International journal of biological macromolecules*, 86, 50-58.
34. Hashad RA, Ishak RA, Geneidi AS, Mansour S. 2016. Methotrexate Loading in Chitosan Nanoparticles at a Novel pH: Response surface modeling, optimization and

- characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 91, October 2016, pp. 630-639
35. Hecq J, Siepmann F, Siepmann J, Amighi K, Goole J. 2015. Development and evaluation of chitosan and chitosan derivative nanoparticles containing insulin for oral administration. *Drug development and industrial pharmacy*, 41(12), 2037-2044.
 36. Hernández Cocolletzi H, Águila Almanza E, Flores Agustin O, Viveros Nava EL, Ramos Cassellis E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, 22(3), 57-60.
 37. Investigación y ciencia (11/02/2013). Disponible en Richard Feynman, in memoriam Prensa Científica Muntaner 339, pral 1a. - 08021 Barcelona. Recuperado de: <http://www.investigacionyciencia.es/noticias/richard-feynman-em-in-memoriam-em-10845>. Fecha de acceso 17 de noviembre de 2016
 38. Kai MP, Keeler AW, Perry JL, Reuter KG, Luft JC, O'Neal SK, DeSimone JM. 2015. Evaluation of drug loading, pharmacokinetic behavior, and toxicity of a cisplatin-containing hydrogel nanoparticle. *Journal of Controlled Release*, 204, 70-77
 39. Konecsni K, Low NH, Nickerson MT. 2012. Chitosan–tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. *Food chemistry*, 134(4), 1775-1779
 40. Lee DW, Shirley SA, Lockey RF, Mohapatra SS. 2006. Thiolated chitosan nanoparticles enhance anti-inflammatory effects of intranasally delivered theophylline. *Respiratory research*, 7(1), 1.
 41. Lee KD, Jeong YI, Da Hye Kim GTL, Choi KC. 2013. Cisplatin-incorporated nanoparticles of poly (acrylic acid-co-methyl methacrylate) copolymer. *International Journal of nanomedicine*, 8, 2835.
 42. León K, Gago J, López A, Santiago J. 2013. Obtención de partículas de quitosano mediante radiación gamma y gelación ionotrópica. *Informe Científico Tecnológico*. Volumen 11 (2011). p. 15-19. ISSN 1684-1662
 43. Loera Serna S, Ruiz Angeles J, Flores Moreno J, Soto Portas L. 2012. Protegiendo fármacos con nanomateriales inteligentes. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 5(1).
 44. Lucio Porto R. (2010). Control de la síntesis dirigida por micelas para la obtención de nanoestructuras de óxidos de manganeso con uso potencial en capacitores electroquímicos (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
 45. Magaña-Valladares L, González-Robledo MC, Rosas-Magallanes C, Mejía-Arias MÁ, Arreola-Ornelas H, Knaul FM. (2016). Training Primary Health Professionals in Breast

- Cancer Prevention: Evidence and Experience from Mexico. *Journal of Cancer Education*, 1-7.
46. Markowska A, Kasprzak B, Jaszczyńska-Nowinka K, Lubin J, & Markowska J. 2015. Noble metals in oncology. *Contemp Oncol (Pozn)*, 19(4), 271-275.
 47. Martien R, Loretz B, Thaler M, Majzoob S, & Bernkop-Schnürch A. 2007. Chitosan–thioglycolic acid conjugate: an alternative carrier for oral nonviral gene delivery?. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82(1), 1-9.
 48. Martín Martínez FJ. Modelización molecular de nanotubos de carbono. Granada: Universidad de Granada, 2013. 338 p. [<http://hdl.handle.net/10481/24449>].
 49. Mayoral JB, Moreno AC, Martínez ESM. 2014. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 19.
 50. Melo Jr, MA, Santos LSS, Gonçalves MDC, Nogueira AF. 2012. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*. *Química Nova*. Sociedade Brasileira de Química, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012. Recuperado de <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/202533>
 51. Montanari MLC, Montanari CA, Piló-Veloso D, Beezer AE, Mitchell JC. 1998. Sistemas transportadores de drogas. *Química Nova*, 21(4), 470-475.
 52. Mourya VK, Inamdar NN. 2008. Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *Reactive and Functional polymers*, 68(6), 1013-1051.
 53. Nanomedicina y cáncer. Tessy Lopez M, Alvarez S. Capítulo del libro *Nanociencia y Nanotecnología en Mexico*. 2012. Article (PDF Available) · February 2012 with 142 Reads
 54. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=71853, Recuperado de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71853> Fecha de acceso: Sept. 30, 2016).
 55. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=441203, Recuperado de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441203> Fecha de acceso: Sept. 30, 2016.
 56. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=24455, Recuperado de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24455> Fecha de acceso: Sept. 30, 2016).

57. Nigenda G, Gonzalez-Robledo MC, Gonzalez-Robledo LM, Bejarano-Arias RM. 2016. Breast cancer policy in Latin America: account of achievements and challenges in five countries. *Globalization and Health*, 12(1), 39.
58. Organización Mundial de la Salud. 2015. Visible en Organización Mundial de la Salud, Centro de prensa, notas descriptivas WHO Media centre. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Fecha de acceso: 03 de octubre de 2016.
59. Oropesa-Nuñez R, Jáuregui-Haza UJ. 2012. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives. *Revista CENIC Ciências Biológicas*, 43(3).
60. Patel SP, Patel PB, Parekh BB. 2014. Application of nanotechnology in cancers prevention, early detection and treatment. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(3), 479.
61. Rangel-Corona R, Soto-Vázquez R, Weiss-Steider B, Alegre MEG, Corona-Ortega MT 2014. Propuesta biotecnológica para el tratamiento del cáncer de cérvix uterino, empleando liposomas. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 80, No. 1).
62. Ranjan S, Dasgupta N, Chakraborty AR, Samuel SM, Ramalingam C, Shanker R, Kumar A. 2014. Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends. *Journal of nanoparticle research*, 16(6), 1-23.
63. Risk RM. 2015. Nanobioingeniería: Historia y futuro. *Tecno Lógicas*, 18(34), 09-11.
64. Rodríguez Hamamura N, Valderrama Negrón A, Alarcón Cavero H, López Milla A. 2010. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(4), 336-354.
65. Rodríguez W, García PA, Fajardo A. 2016. Aplicaciones de Técnicas Espectroscópicas para el Análisis de Suelos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 228-251.
66. Rogers B, Adams J, Pennathur S. 2014. *Nanotechnology: understanding small systems*. Third edition. Crc Press. Pp. 9-15.
67. Sarwar A., Katas H, Samsudin SN, Zin NM. 2015. Regioselective sequential modification of Chitosan via Azide-Alkyne click reaction: synthesis, characterization, and antimicrobial activity of chitosan derivatives and nanoparticles. *PloS one*, 10(4), e0123084.
68. Sanchez-Cano C, Hannon MJ. 2009. Novel and emerging approaches for the delivery of metallo-drugs. *Dalton Transactions*, (48), 10702-10711.

69. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149.
70. Ventosa N. 2011. Materiales moleculares nanoestructurados en el desarrollo de nuevos fármacos. Dossier científico. SEBBM 168. Junio 2011. Recuperado de: <http://www.sebbm.com/pdf/168/d03168.pdf>. Fecha de acceso 23 de octubre de 2016.
71. Wang PC, Weng CC, Hou YS, Jian SF, Fang KT, Hou MF, Cheng KH. 2014. Activation of VCAM-1 and its associated molecule CD44 leads to increased malignant potential of breast cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3560-3579.
72. Wang A. Z, Langer R, Farokhzad OC. 2012. Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annual review of medicine*, 63, 185-198.
73. World Health Organization. 2014. World cancer report 2014. Published by the International Agency for Research on Cancer, 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France Recuperado de: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>. Fecha de consulta 12 de octubre de 2016.
74. Zeta P. 1997. Un curso completo en 5 minutos. Recuperado de: www.zeter-meter.com/contact.htm. Fecha de acceso: 28 de noviembre de 2016.
75. Zhu X, Su M, Tang, S, Wang L, Liang X, Meng F, Xu Z. 2012. Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery. *Molecular Vision* 2012, 18:1973-1982. Recuperado de: <http://www.molvis.org/molvis/v18/a207>