

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN NANOTECNOLOGÍA

Título de tesis:

**Síntesis y caracterización de nanopartículas híbridas
termosensibles de PNIPAM-Quitosano-FL y su aplicación
potencial en liberación controlada de fármacos**

**Que para obtener el título de:
Maestro en Nanotecnología**

PRESENTA:

Hernandez Abril Pedro Amado

HERMOSILLO, SONORA.

JULIO 2016

Universidad de Sonora

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

Agradecimientos

Agradezco a CONACYT por el apoyo brindado durante mi maestría, creo que México es un mejor lugar gracias a su trabajo al impulsar nuevos a maestros y doctores.

Agradezco a mis amigos que creyeron en mí, que me apoyaron en este pequeño capítulo de mi vida:

Ernesto y Sergio, porque ser buenos amigos y ser mis compañeros en este pequeño pasillo lleno de obstáculos.

Francisco, tu hambre y ganas de salir adelante permearon en mí y fueron un gran impulso para avanzar en la dirección correcta.

Gaspar, fuiste un gran apoyo cuando más necesite de uno, sin duda un pilar en mi vida.

Mario, tu lealtad me enseñó que se puede avanzar sin hacer el mal a quien se quiere, eres un gran amigo.

Martha y Darlae, quienes son mis mejores amigas, su apoyo y sus jalones de oreja fueron siempre tan valiosos como necesarios.

Reynaldo, fuiste un buen guía en este trayecto, más importante aún, llegara el día en que no sea más mi director, pero siempre seremos amigos, gracias por tus consejos xD.

A todos los que compartieron parte de este camino haciéndolo más ameno: Melissa, Gloria, Hugo, Panchups, Yesenia, Amed, Pamela, Tony, Félix, Lucia, gracias.

Diana, por escucharme cuando más lo ocupaba y menos se notaba, gracias por ser como eres.

Denisse, por ser una secretaria paciente y siempre dar más de lo que tenía que dar.

A mis amigos, que siempre creyeron en mí: Chapo, Julio, Gaby, Carlos, Danahi, Guz, Ballesteros.

Agradezco a la Universidad de Sonora, pues siempre tendrá un lugar especial, es y será mi gran casa de estudio.

Dedicatoria

Dedico esta tesis, que simboliza la culminación de un capítulo importante de mi vida, a toda mi amada familia, en especial a;

A Pedro y Juana, mis padres amados, quienes me impulsaron a seguir creciendo, me enseñaron lo que es el trabajo duro, me amaron y a quienes debo grandemente ser quien soy.

A mis hermanos: Sergio, Claudia, Belisario, Iris, sobre todo a Mireida y Oscar, quienes me colman de su cariño sincero, sé que siempre contare con ustedes, me hacen creer que la familia es lo más sagrado.

VOTOS APROBATORIOS

DR. MARIO ENRIQUE ÁLVAREZ RAMOS

Coordinador del posgrado en Nanotecnología

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del jurado designado para revisar la Tesis de Maestría “**Síntesis y caracterización de nanopartículas híbridas termosensibles de PNIPAM-Quitosano-FL y su aplicación potencial en liberación controlada de fármacos**”, presentada por:

PEDRO AMADO HERNÁNDEZ ABRIL

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos para la obtención del Título de Maestría en Nanotecnología:

DR. REYNALDO ESQUIVEL GONZALEZ

DR. JOSUE JUAREZ ELIAS ONOFRE

DR. ANTONIO TOPETE CAMACHO

DR. PAUL ZAVALA RIVERA

DRA. MARIA GUADALUPE BURBOA ZAZUETA

Índice

Capítulo I - Introducción	1	
1.1	Estado del arte	1
1.1.1	Síntesis de nanogeles termosensible	1
1.1.1.1	Poli-(metil etil éter) [PMVE]	1
1.1.1.2	Poli-(N-vinil caprolactama) [PVC]	1
1.1.1.3	PNIPAM	2
1.1.2	Síntesis de nanogeles basados en PNIPAM	2
1.2	Motivación	3
1.3	Objetivo general del proyecto	4
1.4	Objetivos específicos	4
1.5	Hipótesis	5
Capitulo II - Marco teórico	6	
2.1	Nanociencia y nanotecnología	6
2.1.1	Método top-down	6
2.1.2	Método bottom-up	7
2.1.2.1	Interacciones entre los bloques	8
2.2	Nanomateriales	9
2.2.1	Nanomateriales inorgánicos	9
2.2.1.1	Nanopartículas metálicas	10
2.2.2	Nanomateriales biológicos	10
2.2.2.1	Complejos de ADN	11
2.2.3	Nanomateriales orgánicos/poliméricos	11
2.2.3.1	Micelas	11
2.2.3.2	Nanopartículas poliméricas	12

2.3	Nanogeles poliméricos	12
2.3.1	Nanogeles poliméricos in stimuli	13
2.3.1.1	PNIPAM	14
2.3.1.2	Termodinámica de la LCST	15
2.3.1.3	Modificación de la LCST	16
2.3.2	Quitosano: Hidrogeles sensibles al pH	17
2.3.3	PNIPAM-Quitosano	17
2.3.4	Nanogeles poliméricos como sistemas de liberación de fármacos	17
2.3.5	Aspectos generales de los nanogeles poliméricos sistemas de liberación de fármacos	18
2.3.5.1	Tamaño de partícula	18
2.3.5.2	Difusión pasiva	19
2.3.5.3	Fragmentación	19
2.3.5.4	Hinchamiento/colapso – In stimuli	20
Capítulo III - Materiales y técnicas caracterización		21
3.1	Dispersión de luz dinámica (DLS)	21
3.1.1	Movimiento browniano	21
3.1.2	Coefficiente de difusión	22
3.2	Potencial Z	22
3.2.1	pH en el potencial zeta	23
3.2.2	Movilidad electroforética	23
3.3	Microscopio de fuerza atómica (AFM)	25
3.4	Microscopio electrónico de barrido (SEM)	26
3.5	Espectroscopia ultravioleta-visible	27
3.6	Espectroscopia de fluorescencia	28

3.7	ESPECTROSCOPIA INFRAROJA	29
-----	--------------------------	----

Capítulo IV – Síntesis de nanopartículas de PNIPAM-Q-FI 31

1.4	Modificación del Quitosano	31
4.2	Síntesis de Nanopartículas por el método de precipitación polimérica por radicales libres.	31
4.2.2	Factores en la síntesis	33
4.2.2.1	Tipo de iniciador y su concentración	33
4.2.2.2	Tiempo de reacción	33
4.2.2.3	Oxígeno en el medio de reacción	33
4.3	Metodología para la síntesis de nanogeles poliméricos	33
4.2.1	PNIPAM-Quitosano	34

Capítulo V - Resultados 35

5.1	Caracterización estructural de (FC)	35
5.2	Caracterización óptica de NP PNIPAM-FC (PC ₃ F).	36
5.3	Caracterización estructural de las nanopartículas (PNIPAM-NC)	37
5.4	Estudio de la relación molar NC – NIPAM y su efecto en las propiedades fisicoquímicas de la partícula.	39
5.4.1	Diámetro hidrodinámico (obtenido por DLS)	39
5.4.2	Potencial zeta	40
5.5	Determinación LCST por medio de barrido de temperatura en DLS	41
5.6	Estudio de relación molar NC-NIPAM y su efecto sobre la morfología de las nanopartículas.	49
5.7	Estudio del efecto del pH sobre PC ₂ y PC ₃ F	51

5.8	Efecto citotóxico de PC ₃ F en las líneas celulares ARPE-19 y MDA-MB-231	52
5.9	Internalización de PC ₃ F en MDA-MB-231 de cáncer de mama y la línea celular ARPE-19.	54
Capítulo VI - Conclusiones		56
Bibliografía		58

Resumen

En los últimos años ha surgido un creciente interés en la comunidad científica, orientado al estudio de plataformas nanoestructuradas, que tienen como potencial aplicación el uso de sus propiedades en los procesos de carga eficiente de sustancias y en la liberación controlada de una gran variedad de fármacos que su naturaleza depende de la aplicación. Hoy en día se ha manifestado un importante avance en el desarrollo de nanogeles poliméricos inteligentes, debido a su sensibilidad “in stimuli” al ser expuestos a cambios externos, estas propiedades los han convertido en herramientas de gran relevancia en el campo de la biomedicina terapéutica.

El poli-(*N*-isopropilacrilamida) [PNIPAM] se considera un material termosensible, es decir su estructura química está en función de la temperatura del medio en que se encuentra, su LCST (temperatura crítica menor de solución, por sus siglas en inglés), además de tener importantes propiedades de hinchamiento que optimizan el proceso de carga de diversas sustancias. Las publicaciones de los últimos años concuerdan en que se trata de un material importante en el área biomédica, esto gracias a su biocompatibilidad y a la capacidad de copolimerizar con estructuras como el Quitosano, el cual aporta grupos aminos, cambiando así el equilibrio entre los grupos hidrófilos e hidrofóbicos. Como producto principal de esta tesis se obtuvieron novedosos nanogeles a partir de PNIPAM y Quitosano, que son sensibles a estímulos externos de acuerdo a sus segmentos estructurales para establecer un control de liberación en función de la temperatura del medio.

La nanoplataforma obtenida fue analizada por diversas técnicas para conocer sus características como: carga superficial (pZ), radio hidrodinámico (DLS), composición (FTIR), LCST (DLS) y su morfología (AFM, SEM). Se estudió también su respuesta a distintos pH, para analizar su respuesta a este estímulo. A la par se realizaron pruebas de citotoxicidad (MTT), así como pruebas de internalización celular, para comprobar la viabilidad del sistema en medios biológicos. Dichas pruebas nos hablan de la elevada biocompatibilidad de los nanogeles y su estructura porosa permite colocarlos como potenciales

candidatos como herramientas biotecnológicas en la elaboración de nano plataformas enfocadas en la liberación controlada de medicamentos por estímulos externos.

Resumen

En los últimos años ha surgido un creciente interés en la comunidad científica, orientado al estudio de plataformas nanoestructuradas, que tienen como potencial aplicación el uso de sus propiedades en los procesos de carga eficiente de sustancias y en la liberación controlada de una gran variedad de fármacos que su naturaleza depende de la aplicación. Hoy en día se ha manifestado un importante avance en el desarrollo de nanogeles poliméricos inteligentes, debido a su sensibilidad “in stimuli” al ser expuestos a cambios externos, estas propiedades los han convertido en herramientas de gran relevancia en el campo de la biomedicina terapéutica.

El poli(-N-isopropilacrilamida) [PNIPAM] se considera un material termosensible, es decir su estructura química está en función de la temperatura del medio en que se encuentra, su LCST (temperatura crítica menor de solución, por sus siglas en inglés), además de tener importantes propiedades de hinchamiento que optimizan el proceso de carga de diversas sustancias. Las publicaciones de los últimos años concuerdan en que se trata de un material importante en el área biomédica, esto gracias a su biocompatibilidad y a la capacidad de copolimerizar con estructuras como el Quitosano, el cual aporta grupos aminos, cambiando así el equilibrio entre los grupos hidrófilos e hidrofóbicos. Como producto principal de esta tesis se obtuvieron novedosos nanogeles a partir de PNIPAM y Quitosano, que son sensibles a estímulos externos de acuerdo a sus segmentos estructurales para establecer un control de liberación en función de la temperatura del medio.

La nanoplataforma obtenida fue analizada por diversas técnicas para conocer sus características como: carga superficial (pZ), radio hidrodinámico (DLS), composición (FTIR), LCST (DLS) y su morfología (AFM, SEM). Se estudió

también su respuesta a distintos pH, para analizar su respuesta a este estímulo. A la par se realizaron pruebas de citotoxicidad (MTT), así como pruebas de internalización celular, para comprobar la viabilidad del sistema en medios biológicos. Dichas pruebas nos hablan de la elevada biocompatibilidad de los nanogeles y su estructura porosa permite colocarlos como potenciales candidatos como herramientas biotecnológicas en la elaboración de nano plataformas enfocadas en la liberación controlada de medicamentos por estímulos externos.

Capítulo I - Introducción

1.1 Estado del arte

Avances en la última década

1.1.1 Síntesis de nanogeles termosensible

Se ha reportado la síntesis de nanogeles derivados de polímeros acrílicos, la morfología en su gran mayoría está enfocada a nanoesferas mesoporosas [1]. Los materiales monoméricos más usados para para la síntesis de nanogeles termosensibles con aplicaciones biomédicas son NIPAM [2,3], MVE (metil etil éter) [4,5] y NVCL (N-Vinilo-Caprolactama) [6,7]. Estos materiales, tiene distintas características que las hacen más o menos atractivos para la investigación.

1.1.1.1 Poli-(metil etil éter) [PMVE]

El PMVE tiene una LCST de 37 °C, esto ya vuelve este polímero bastante atractivo para aplicaciones biomédicas. El PMVE tiene que ser sintetizado por polimerización catiónica en condiciones inertes. Este proceso vuelve inadmisibles la presencia de grupos nucleófilos como el alcohol o aminas, esto limita su potencial uso en la biomedicina.

1.1.1.2 Poli-(N-vinil caprolactama) [PVC]

Este polímero cuenta con una LCST de 33 °C, lo cual lo vuelve llamativo para la investigación biomédica, aun así este polímero no ha sido estudiado tan ampliamente, en la actualidad sus propiedades (biocompatibilidad, solubilidad en solventes orgánicos y en agua) están causando que se vuelva más popular, aunque cuenta con limitantes como el hecho de que el polímero al degradarse aumenta el pH en la zona aledaña, así como el hecho de que su versión monomérica (NOVCL) presenta toxicidad.

1.1.1.3 PNIPAM

El PNIPAM tiene una LCST de 32-33°C, es el polímero termosensible mas estudiado, tiene una alta biocompatibilidad y su LCST es independiente del peso molecular o de la concentración [8]. Estas características lo vuelven atractivo en aplicaciones biológicas. Su LCST es modificable cambiando el balance hidrofóbico, una desventaja seria que el monómero (NIPAM) es toxico.

1.1.2 Síntesis de nanogeles basados en PNIPAM

En 2008 okuyama et al. reportaron la cinética de hinchamiento de NIPAM entrecruzado con BuMA (Butil Metacrilato), encontrando que después de una liberación abrupta del fármaco desde la parte exterior del hidrogel tiene lugar una liberación sostenida [9].

En 2006 Coughlan et al. estudiaron ampliamente la interaccion de distintos fármacos con una red polimérica de PNIPAM y el efecto que esto tiene sobre la liberación de los fármacos [10,11].

En 2008 Jones et al. sintetizaron varios co-polimeros para la entrega de agentes antimicrobianos en conjunto con dispositivos médicos[12].

En 2003 Jhon et al. estudiaron cadenas poliméricas de PNIPAM adheridas a un sustrato y se encontró que la sal baja la LCST debido al efecto Hofmeister de la sal en la estructura de las moléculas de agua [13].

En 2003 Yoshida et al. sintetizaron hidrogeles de PNIPAM entrecruzados con poli-amidicas, para producir un hidrogel termo-responsivo degradable [14].

En 2012 Gong Y. et al. lograron sintetizar microesferas en una estructura de sándwich con nanopartículas de PNIPAM embebidos en la matriz de Quitosano reticulado, por el método de micro emulsión[15].

Todas las técnicas tienen en común que se llevan a cabo a condiciones estándar. Sin embargo en algunos casos se utilizan disolventes orgánicos, tal es el caso de la síntesis por micro emulsión, en la cual se utiliza ciclohexano, lo que convierte esa ruta de síntesis en un procedimiento con limitaciones de

aplicaciones para estudios de liberación in vivo. Los nanogeles sintetizados vía radicales libres estabilizados por un surfactante no presentan esta limitante, debido a que la síntesis no requiere cambio de fase, además de tener elevada estabilidad.

1.2 Motivación

La estructura tridimensional de los nanogeles sensibles es tan compleja y al mismo tiempo interesante, que en los últimos años se han dedicado una gran cantidad de trabajos de investigación orientados hacia el estudio de las propiedades de estos materiales, para determinar las condiciones óptimas de control, además la complejidad de estos sistemas permiten realizar funciones muy específicas que permiten vislumbrar grandes áreas de aplicación que resultan ser muy prometedoras para la resolución de problemas ya existentes. Para aplicaciones científicas y a nivel industrial, es necesario evaluar las condiciones óptimas de síntesis que permitan la obtención de nanogeles que cumplan con las condiciones adecuadas de estabilidad y morfología deseables según las funciones de la nanoestructura.

En virtud de lo anterior queda establecido que la técnica de polimerización por radicales libres ha sido utilizada ampliamente para la síntesis de nanogeles poliméricos. Sin embargo de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, el avance científico de hoy en día carece de un estudio sistemático que permita esclarecer la correlación entre los parámetros óptimos de síntesis y las propiedades finales de los nanogeles, esto para la obtención de nanogeles con propiedades fisicoquímicas modulables como lo son, tamaño de partícula, carga superficial y morfología. Con base a lo anterior se propone la polimerización por radicales libres como método de síntesis debido a que ha sido ampliamente utilizada, la síntesis de nanogeles se llevara a cabo a partir de ANIPAM (isopropilacrilamida) y Quitosano nativo (NC), estos polímeros fueron seleccionados por su elevada biocompatibilidad y sus propiedades fisicoquímicas que son de gran interés.

1.3 Objetivo general del proyecto

Dilucidar los parámetros óptimos operacionales para la obtención de nanogeles poliméricos inteligentes de control dual (pH y Temperatura) a partir de la precipitación polimérica, para su uso potencial en liberación controlada de fármacos.

1.4 Objetivos específicos

- Sintetizar nanogeles mediante la técnica de precipitación polimérica partiendo del sistema NIPAM-Quitosano.
- Caracterizar la estructura de los polímeros mediante técnicas como la espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR).
- Sintetizar nanogeles con variaciones estructurales PNIPAM-Quitosano con diferentes relaciones de NIPAM-Quitosano.
- Caracterizar las propiedades físicas de las nanoplataforma para determinar el radio hidrodinámico de las partículas por la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) con la ecuación Stokes-Einstein, potencial zeta en zetasizer.
- Utilizar la DSC para establecer la LCST y determinar la relación estructura-temperatura crítica de todos los sistemas.
- Caracterizar la morfología de las nanoplataformas por medio de AFM, SEM, TEM.
- Determinar la viabilidad celular de la nanoplataforma por medio de ensayos citotóxicos (MTT).
- Establecer la capacidad de la nanoplataforma para ser internalizados en células.

1.5 Hipótesis

El uso de la precipitación polimérica como técnica síntesis de nanogeles, permite establecer los parámetros de operación óptimos para los procesos de eficiencia de carga y liberación controlada sensible a pH -temperatura del medio.

Capítulo II - Marco teórico

2.1 Nanociencia y nanotecnología

Un nanómetro es de milmillonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). A manera de ejemplo y para poder dimensionar adecuadamente el concepto de nanómetro, un cabello humano mide 80000 nm y una molécula de agua tiene un diámetro poco menor a 0.3 nm. Los nanomateriales ofrecen más que un paso en la miniaturización de los materiales, ofrecen características que no se encuentran en el material en bulto, es ahí donde nace la nanociencia, como la ciencia que estudia fenómenos presentes en materiales medibles en escala manométrica. Estos fenómenos ofrecen grandes oportunidades de desarrollo en áreas como la medicina, industria alimenticia, industria energética, informática entre otras, es aquí donde nace la nanotecnología, como el diseño y manipulación de materiales a escala manométrica, en miras a una aplicación[16].

Cuando hablamos de escala nanométrica, las propiedades pueden ser diferentes por dos razones principalmente. La primera sería que el área superficial de los nanomateriales es mayor que la misma masa de material en bulto, causando que los materiales sean químicamente más reactivos, afectar la interacción de sus fuerzas, así como sus propiedades eléctricas. La segunda razón, sería que a esta escala es posible que los efectos cuánticos dominen el comportamiento del material, dando a excepcionales comportamientos ópticos, eléctricos y magnéticos. Los materiales nanoestructurados pueden ser nanométricos en una dimensión (por ejemplo, un revestimiento superficial), en dos (por ejemplo, nanotubos y nanohilos) o en tres (por ejemplo, nanopartículas) [17]. Existen dos maneras principales de producir materiales nanoestructurados: el método top-down y el método botton-up [18].

2.1.1 Método top-down

El método top-down consiste en obtener el material nanoestructurado a partir de un material en bulto, al que se le remueve el material no deseado (figura 2.1). Podríamos perfectamente comparar este proceso con el trabajo de un

escultor, que remueve el material que no desea, para dar forma y obtener la escultura deseada. Este método es el que hoy en día tiene un desarrollo mayor, sobre todo en el área de la tecnología. La técnica top-down más utilizada es la fotolitografía, que es usada para la fabricación de dispositivos semiconductores y circuitos integrados. En el proceso un patrón es transferido de una retícula (o también llamada fotomáscara) a la superficie de una oblea, por medio de la exposición del material a luz (principalmente UV), la cual retira el material no protegido de la muestra. Lo cual puede dar como resultados estructuras micrométricas y nanométricas.

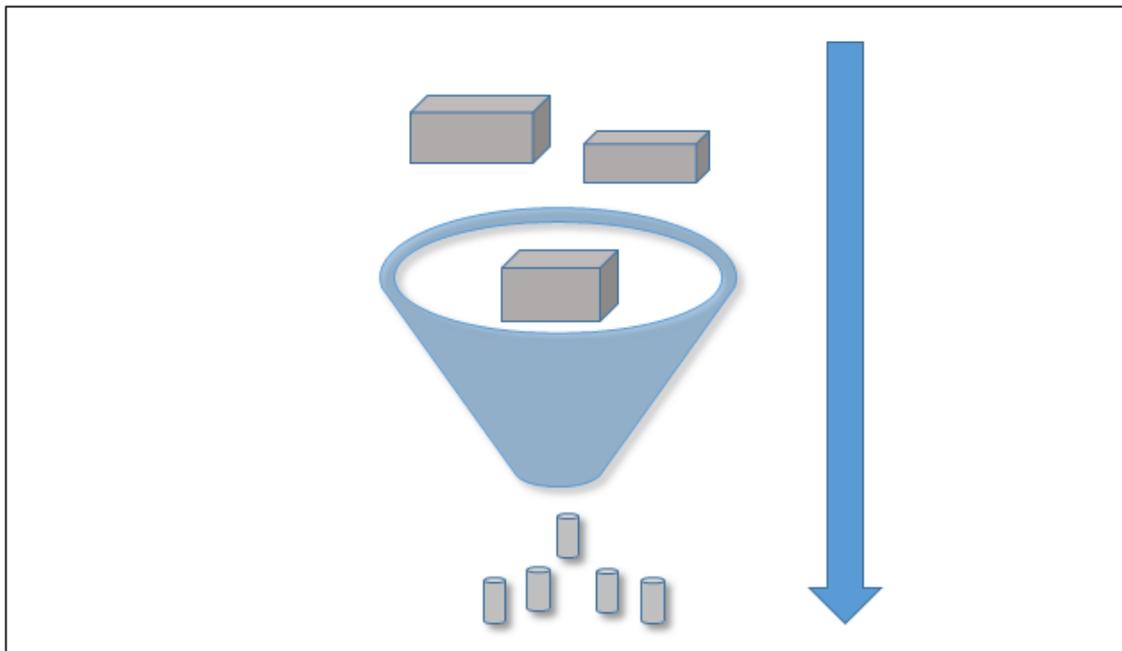


Figura 2.1: Método top-down

2.1.2 Método bottom-up

La idea general del método es crear nanoestructuras complejas a partir de componentes unitarios más simples, que son comúnmente llamados bloques (figura 2.2). La biología da grandes ejemplos de este proceso: los organismos macroscópicos nacen del caos en un conglomerado subunidades que se autoensamblan para crear un organismo vivo de gran complejidad.

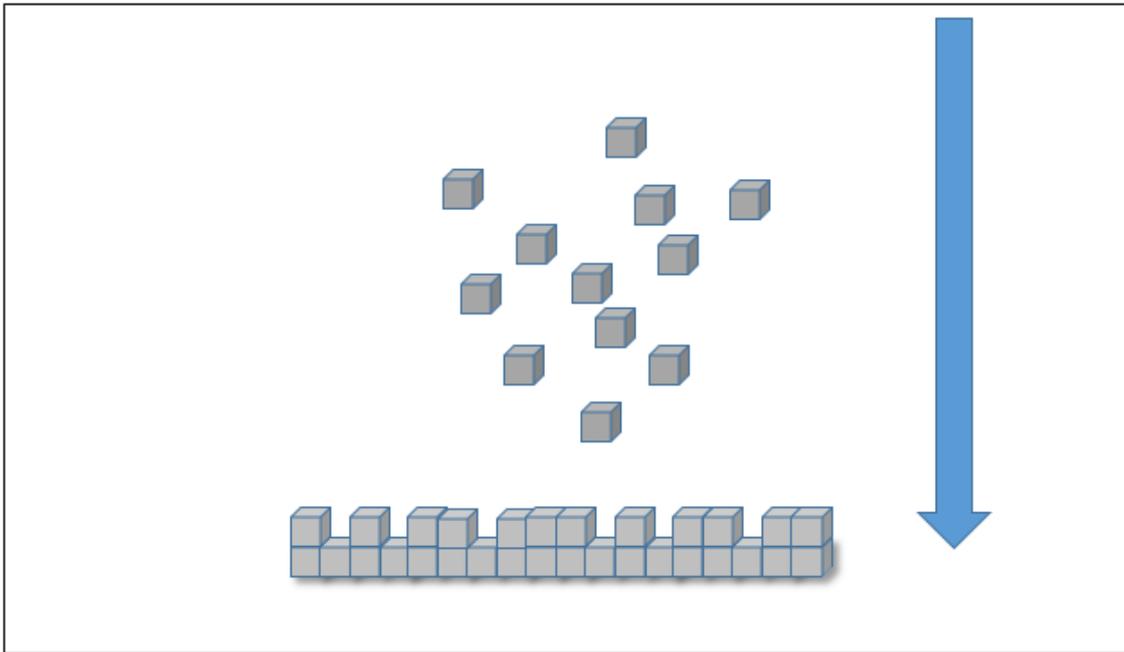


Figura 2.2: Método bottom-up

La entropía juega un rol primordial en el proceso de autoensamblaje, el sistema tiene la tendencia a buscar el estado de energía libre más bajo, algunos sistemas dependiendo de las condiciones, cambian sus arreglos estructurales para encontrar dicho estado. Las estructuras autoensambladas más complejas requieren lograr el balance entre la entropía a una temperatura y la unión entálpica de los componentes.

2.1.2.1 Interacciones entre los bloques

Las interacciones entre los bloques (átomos y moléculas) podrán ser: covalentes, metálicas, iónicas, puente de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals. El enlace covalentes se da cuándo dos átomos se unen para alcanzar la estabilidad en sus niveles, compartiendo así electrones en su último nivel. Un enlace metálico es un también un enlace covalente, pero entre metales causa una fuerte compactación en las tres dimensiones, dicha compactación causa que los núcleos interactúen con sus nubes electrónicas, los electrones pueden moverse con una relativa facilidad, razón por la cual los metales presenten una alta conductividad eléctrica y térmica. El enlace electrovalente se da cuando un ion de baja energía de ionización y uno de alta se atraen electroestáticamente,

aquí no podríamos describirlo como una unión, sería más apropiado decir que es una unión iónica (catión) y el otro recibe (anión) [19]. Un puente de hidrógeno es el resultado de una fuerza dipolo-carga entre un átomo de hidrógeno y un átomo de nitrógeno, oxígeno o flúor, es una interacción débil en comparación con las antes mencionadas [18]. Fuerza entre dos dipolos permanentes, un dipolo permanente y uno inducido, así como entre dos dipolos inducidos instantáneamente conforman las llamadas fuerzas de Van der Waals, que son relativamente débiles si se comparan con enlaces formales, pero estas son bastante importantes, ya que definen el carácter químico de muchas sustancias [19].

2.2 Nanomateriales

Es un material que se forma de manera natural, accidental o manufacturado que contiene partículas, sueltas, agregadas o aglomeradas, y en el que el 50% o más de las partículas presentan alguna o varias dimensiones en escala nanométrica [20,21]. Los nanomateriales se pueden clasificar en tres grandes grupos, según su composición: inorgánicos, biológicos y orgánicos/poliméricos [22].

2.2.1 Nanomateriales inorgánicos

Son todos aquellos que no proceden de células animales o vegetales o relacionadas con el carbón. Por lo regular se pueden disolver en el agua y en general resisten el calor mejor que las sustancias orgánicas. Metales, pnictidos, óxidos metálicos, semiconductores, aleaciones de metales, calcogenuros, entre otros, son los materiales principalmente utilizados en la síntesis de nanomateriales inorgánicos [23]. Las propiedades únicas de los materiales inorgánicos surgen del diferente comportamiento de los electrones confinados [24].

2.2.1.1 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas se sintetizan principalmente a partir de metales nobles como Au, Ag, Pt y Pd y puede tener diferentes formas, desde esferas, varillas, conchas, estrellas, etc. Su respuesta óptica depende estrechamente de su tamaño, forma, composición y medio circundante [25]. Presentan una plasmones de resonancia superficiales localizadas (LSPR) lo que los hace muy atractivo como agentes de contraste [26], biosensores [27], potenciadores de fluorescencia [28], Sustratos SERS [29] o agentes de terapia fototérmica [30], entre otros. El LSPR en la región visible e infrarrojo cercano (NIR) del espectro electromagnético puede ser sintonizado simplemente mediante la variación de su geometría, tamaño y / o la composición. Su composición química permite una fácil conjugación de moléculas, por ejemplo, polímeros hidrofílicos, que mejorar su estabilidad y / o biodistribución [31], o grupos / ligandos específicos para dirigirse específicamente a ciertas moléculas, células o tejidos [30, 32, 33]. A pesar de su gran aplicabilidad potencial en aplicaciones biomédicas gracias a sus emocionantes propiedades ópticas y excelente estabilidad e inercia, también se muestran muy prometedores como catalizadores, como bloques de construcción en el almacenamiento electrónico y dispositivos de transformación [34]

2.2.2 Nanomateriales biológicos

En más de una ocasión los sistemas biológicos han sido una inspiración en para el diseño y/o síntesis de sistemas nanoestructurados [35,36]. Un ejemplo de nanomateriales biológicos son los ácidos nucleicos o proteínas, las cuales son utilizadas para la síntesis de materiales más complejos, aprovechando su capacidad de autoensamblaje [37]. Se han utilizado cápsides virales, proteínas nanoestructuras, como vectores de suministro de genes, liberación controlada de drogas y como agente de contraste [38, 39].

2.2.2.1 Complejos de ADN

Los ácidos nucleicos son polianiones que pueden adoptar estructuras diversas, y su conformación puede responder a diferentes estímulos externos tales como el pH, la temperatura o iónica la fuerza [40]. El ADN es fácil de sintetizar (por reacción en cadena de la polimerasa, PCR), funcionalizar y manipular. Se ha utilizado para formar complejos con tensoactivos, tensoactivos catiónicos, lípidos, péptidos y polímeros catiónicos (este último conocido como "polyplexes") [41]. Estos complejos se pueden usar como vectores para introducir ácidos nucleicos, ADN plásmido, oligonucleótidos antisentido o SiARN (ARN interferente) para las células vivas con fines terapéuticos, por ejemplo, para luchar contra las enfermedades hereditarias, multigenética trastornos o cáncer [41-43].

2.2.3 Nanomateriales orgánicos/poliméricos

Dos grandes grupos dividen este tipo de materiales, los que son basados en carbón (nanotubos de carbón [44], fullerenos [45], nanodiamantes [46]) y los materiales poliméricos/surfactantes [47,48].

Los primeros cuentan con un gran auge en la investigación, en especial en industrias energéticas, textiles y medicina [25,49].

2.2.3.1 Micelas

Son agregados autoensamblados compuestos generalmente de surfactante o copolímeros anfifílicos. Son un gran ejemplo del proceso de autoensamblaje de moléculas, su conformación más simple sería una micela esférica, dependiendo de las condiciones del medio (concentración, pH, temperatura, fuerzas iónicas, etc.) pueden cambiar su arreglo estructural a formas más complejas como: víselas, cilindros, estructuras lamelares (monocapas, bicapas) [50], pero presentar una desventaja importante, que es su inherente inestabilidad en largos períodos de tiempo debido a su naturaleza dinámica. Están formados por una parte liófila rodeado por un liófilo, que estabiliza la estructura supramolecular

en el disolvente. La concentración a la que aparece las primeras micelas se conoce como la concentración crítica micelar (CMC). Por lo general, las micelas tienen geometrías esféricas, aunque dependiendo de las condiciones también pueden tener formas de varilla como y similares a gusanos [51,52]; vesículas o mesofases con estructura cúbica, hexagonal y laminar se pueden también formar dependiendo en condiciones de solución. Las micelas son capaces de solubilizar sustancias liófilas [53].

2.2.3.2 Nanopartículas poliméricas

Los materiales poliméricos han resaltado enormemente en el área de la biomedicina. Son altamente utilizados por su gran potencial como agentes de diagnóstico, así como con fines terapéuticos. El rango de tamaño va desde 10 hasta 1000 nm. Se producen a partir de materiales no degradables (poliestirenos) o polímeros biodegradables (PLA [54], PLGA [55], Quitosano [56], etc.).

Los materiales poliméricos son usadas generalmente en el área de la biomedicina como medio de transporte y liberación de fármacos [57], aunque algunos sistemas son capaces de transportar otras partículas como podrían ser (proteínas [58], péptidos [59], nanopartículas inorgánicas de un tamaño menor [60]).

2.3 Nanogeles poliméricos

Los nanogeles poliméricos se definen como estructuras nanométricas tridimensionales que interactúan internamente en sus cadenas a través de diversos mecanismos, ya sea por entrecruzamiento físico simple, por interacciones débiles como los puentes de hidrógeno ó mediante enlaces formales covalentes [61].

2.3.1 Nanogeles poliméricos in stimuli

Las propiedades fisicoquímicas de los geles poliméricos pueden sufrir cambios dramáticos en función de la naturaleza de su estructura química, es decir, que al incluir segmentos con grupos funcionales específicos se impactarán las propiedades finales del polímero, obteniéndose así materiales sensibles a estímulos como ultrasonido [62], cambios de temperatura [63], luz [64], pH del medio [65], entre otros . La capacidad de respuesta frente a los estímulos externos puede manifestarse en cambios de conformación en la estructura principal, modificaciones en la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de la superficie del material, alteraciones en las propiedades ópticas, etc. El control óptimo de la relación estructura-estímulo-respuesta hace de los materiales sensibles “in stimuli” una importante área de interés para el avance del conocimiento científico de la actualidad (figura 2.3).

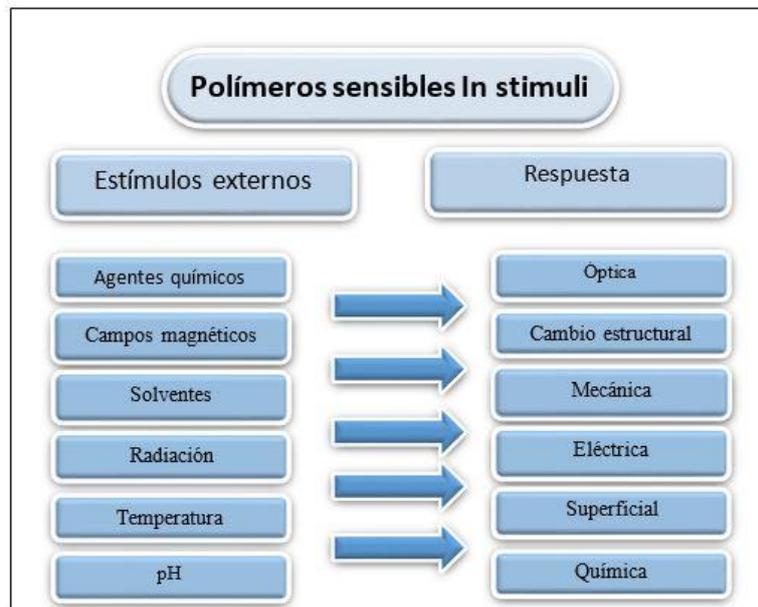


Figura 2.3. Estímulos y respuestas de los materiales inteligentes

2.3.1.1 PNIPAM

La PNIPAM se considera uno de los polímeros inteligentes de mayor uso y aplicación en un gran número de trabajos de investigación, esto a consecuencia a su sensibilidad en solución a estímulos térmicos externos [66-69]. En su estructura principal se localizan segmentos de naturaleza hidrofóbica (grupos metilos) y de carácter hidrofílico (grupo amida) responsables de los cambios conformacionales del polímero.

En los polímeros termosensibles es posible ubicar dos clasificaciones: los sistemas donde la transición conformacional ocurre por un decremento importante en la temperatura del medio, por lo cual se dice que tiene una temperatura de solución crítica superior (USCT) en contraste con los sistemas que poseen LCST por que estos sistemas alcanzan el punto de insolubilidad por incrementos en la temperatura (figura 2.4), estos fenómenos están relacionados ampliamente a parámetros termodinámicos como cambios entrópicos y de entalpía al incrementar o disminuir la temperatura del sistema.

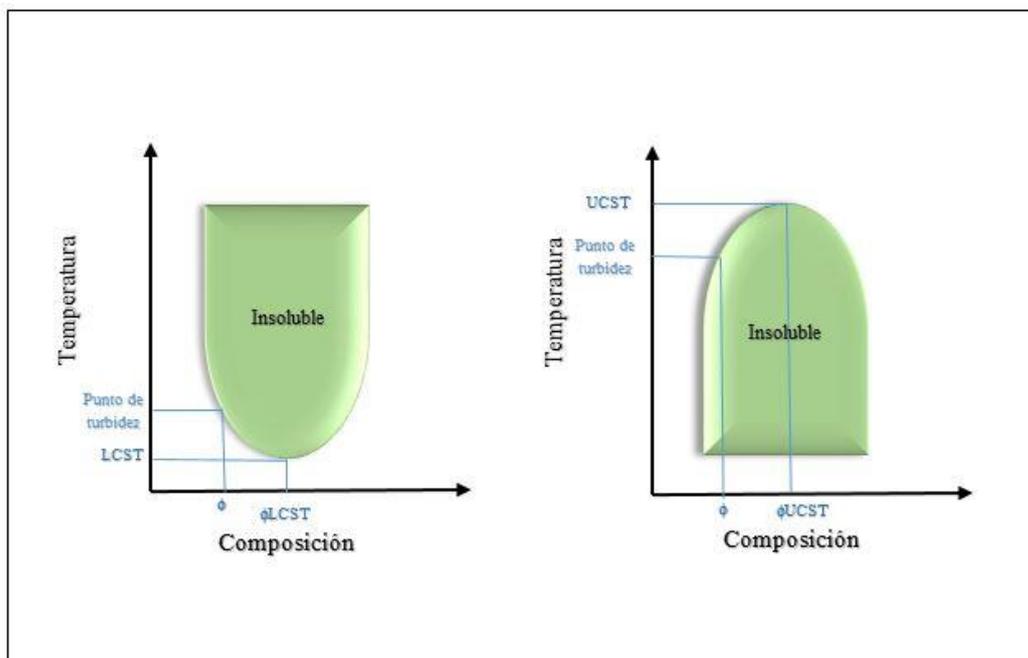


Figura 2.4. Diagramas cualitativos para sistemas LCST y UCST

La poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) expresa una LCST que corresponde a temperatura entre 30 y 35 °C inducido entrópicamente. Los

derivados de la PNIPAM presentan este comportamiento de su LCST que estructuralmente depende del equilibrio hidrofóbico-hidrofílico de sus cadenas poliméricas, en función del número de moléculas de agua unidas mediante los puentes de hidrógeno. Por esta razón el polímero muestra un hinchamiento de su red molecular como resultado de una gran absorción del disolvente. Por encima de esta temperatura aparecerá interrupción en los enlaces de hidrógeno y provoca la deshidratación de la red PNIPAM. Como resultado de esto, hay moléculas de agua expulsadas y se da una contracción de partículas causadas por la fuerte interacción de los grupos isopropilo. Al elevar la temperatura del medio en que se encuentra el hidrogel, conducirá a debilitar los puentes de hidrógeno y así incrementar interacciones de carácter hidrofóbico hasta colapsar el sistema polimérico.

2.3.1.2 Termodinámica de la LCST

Desde el punto de vista termodinámico es posible la explicación del proceso de solubilización de un polímero en un disolvente por los cambios en el balance entre entropía y entalpía cuando se presenta un aumento o disminución de la temperatura. Primero estableciendo que para que la mezcla o solubilidad se pueda llevar el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) tiene que ser negativo. Por debajo de la LCST el ΔG es negativo y positivo por encima.

Un factor físico clave que distingue a la LCST de otro comportamiento de mezcla es que la separación de fases en la LCST es impulsado por la entropía (ΔS) que desfavorable la mezcla [70]. Esto es porque que la mezcla de las dos fases es espontánea por debajo de la LCST y no por encima, es decir que el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG_{mezcla}) para la mezcla de estas dos fases es negativa ($\Delta G_{mezcla} < 0$) por debajo de la LCST y positiva por encima ($\Delta G_{mezcla} > 0$), y el cambio de entropía ($\Delta S_{mezcla} = - (d\Delta G_{mezcla} / dT)$) es negativa para este proceso de mezcla. Esto es porque el PNIPAM por debajo de la LCST tiene un cambio entrópico y entálpico negativo ($\Delta S_{mezcla} < 0$ y $\Delta H_{mezcla} < 0$). En estas condiciones y sabiendo que $\Delta G_{mezcla} = \Delta H_{mezcla} - T\Delta S_{mezcla}$, podemos decir que el componente entálpico contribuye a la solubilización y el entrópico no, pero el componente entálpico domina, dando como resultado una energía libre de Gibbs

negativa ($\Delta G_{\text{mezcla}} < 0$) y la solubilización tiene lugar. Cuando las condiciones de temperatura cambien y el sistema se encuentre por encima de la LCST, entonces el componente entrópico será significativo y tiene lugar una energía libre de Gibbs positiva ($\Delta G_{\text{mezcla}} > 0$), lo cual llevará a la no solubilidad del sistema [71].

2.3.1.3 Modificación de la LCST

El aumento de la LCST es posible mediante copolimerización con polímeros aportan grupos hidrofílicos o grupos cargados, esto se explica por la interacción que ocurre entre los grupos hidrofílicos y las moléculas de agua, el caso opuesto sucede al incluir segmentos de naturaleza hidrofóbica, de acuerdo a esto, es posible sugerir la modificación del grado de hinchamiento de hidrogeles por cambios estructurales, además de controlar la LCST en función de la cantidad de segmentos hidrofílicos en la estructura principal [72]. Una copolimerización de ANIPAM con grupos hidrofílicos aumenta la LCST, mientras que una copolimerización con grupos hidrofóbicos da como resultado una disminución en la LCST (Figura 2.5) [73].

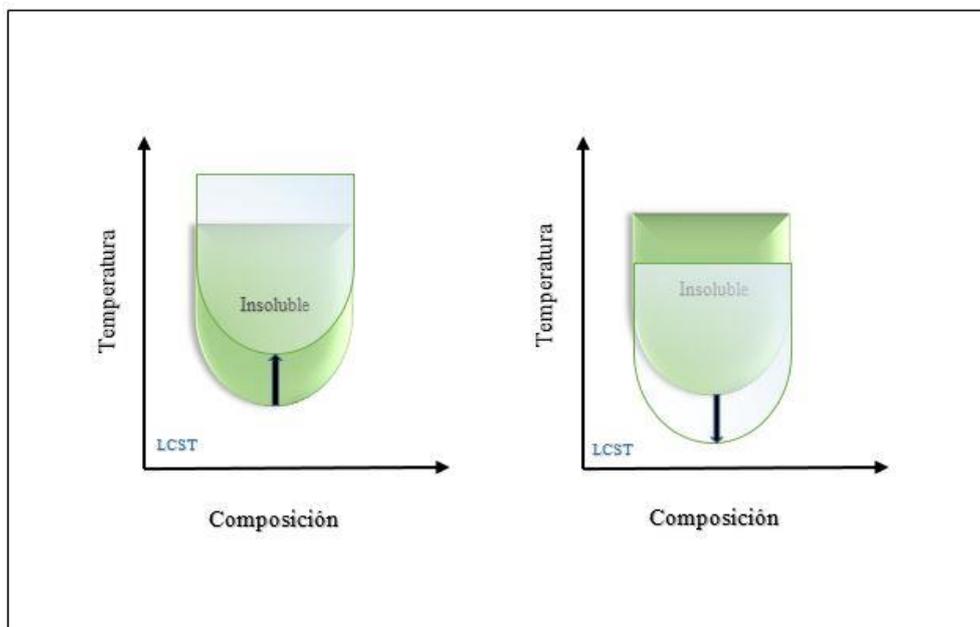


Figura 2.5. Efecto en la LCST de la PNIPAM por copolimerización con grupos hidrofóbicos e hidrofílicos.

2.3.2 Quitosano: Hidrogeles sensibles al pH

El Quitosano es un polímero natural no tóxico, biocompatible, biodegradable y sensible al pH además puede ser obtenido a partir de la quitina, la cual es el segundo polímero natural más abundante, solo por debajo de la celulosa, y que puede ser encontrado en caparazones de algunos crustáceos, como camarones[74]. Los grupo amino del Quitosano pueden reaccionar con compuestos con grupos carbonilos por medio de adición nucleofílica y debido a que es una amina primaria, dará lugar a la formación de una imina. De manera general, los hidrogeles formados con Quitosano experimentan un grado máximo de hinchamiento a valores de pH bajo determinados, debido a la repulsión por efectos de sus grupos cargados positivamente y apantallamiento por efectos de concentración [65].

2.3.3 PNIPAM-Quitosano

Para que existan respuestas a cambios de pH en hidrogeles es necesario que la estructura principal cuente con grupos hidrofílicos ionizables lo cual se manifiesta mediante el grado de hinchamiento del polímero. El Quitosano muestra dichas características, tiene una gran solubilidad y un gran grado de biocompatibilidad, cuenta con grupos hidrofílicos (aminas), esto lo perfila como una gran opción para el aumento de la LCST. La combinación termo-pH-responsivo aunado a la biocompatibilidad de los polímeros, significa un novedoso polímero multi-stimuli con una baja citotoxicidad, dichas características lo volverían atractivo para el diseño de plataformas de liberación controlada de fármacos.

2.3.4 Nanogeles poliméricos como sistemas de liberación de fármacos

En la última década se han encontrado diversas aplicaciones de los nanogeles bajo estudio a nivel industrial y a nivel científico, por ejemplo, como sistemas de liberación controlada de fármacos [1-7,58], medios de transporte

[12], encapsulación de biomoléculas [66,58] entre otras. De esta manera se estudian diversas rutas de síntesis para establecer las condiciones óptimas de estabilidad y morfología de los nanogeles, así como la eficiencia de carga y liberación de sustancias específicas. Entre las técnicas más utilizadas para la obtención de estas nanoestructuras se encuentran el entrecruzamiento físico [75,76], precipitación en emulsión [15], etc. Como una posible alternativa a estas rutas de obtención, surge como técnica de síntesis de nanogeles la precipitación polimérica [77,78]. Algunas propiedades fisicoquímicas de los nanogeles como elevada estabilidad, gran área superficial y alta porosidad permiten clasificar a estos materiales como nanoestructuras aptas para realizar procesos de carga y liberación controlada de fármacos, estos mecanismos pueden ser estrictamente regulados a través de estímulos externos muy específicos sobre la nanoplataforma [79].

2.3.5 Aspectos generales de los nanogeles poliméricos sistemas de liberación de fármacos

Existe una relación directa en el desempeño funcional de los hidrogeles poliméricos y algunas de sus propiedades de estos materiales como su estructura química [80] y propiedades fisicoquímicas [81]. Bajo este contexto es posible modular las propiedades operativas de los materiales bajo estudio a través del control de sus propiedades.

2.3.5.1 Tamaño de partícula

La síntesis de nanogeles poliméricos ofrece la posibilidad de tener control en el tamaño de partícula de estos materiales, la modulación controlada de estas nanoestructuras resulta ser de gran importancia en los mecanismos de internalización ligados a la entrega controlada de fármacos. Para aplicaciones de estudios celulares el tamaño de partícula desempeña un importante rol en el tipo de mecanismo que la nanoplataforma llevará a cabo. Por ejemplo, se ha reportado que partículas por encima de 500 nm pueden ser endocitadas

mediante mecanismos que siguen una ruta que requiere de gasto energético[82], por otro lado partículas por debajo de este valor suelen seguir mecanismos de internalización libres de gasto energético[83,84], en esta restricción de tamaño radica la importancia de la modulación de los diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas, ya que es posible optimizar el mecanismo de liberación de sustancias, esto al ocurrir en el interior de la célula, impactando de manera contundente en el uso eficiente de las cantidades y dosificaciones de fármaco.

2.3.5.2 Difusión pasiva

Puede ser considerado como el mecanismo más sencillo, se caracteriza por la difusión simple del material desde el interior de la nanoplateforma hacia los alrededores del medio en que se encuentra. La capacidad de difusión dependerá de la afinidad del medio en que se encuentra la partícula y la sustancia activa, por lo que es importante determinar la solubilidad en el medio y el coeficiente de difusión a través de la matriz polimérica [85]. Para el caso de redes tridimensionales, puede considerarse el tamaño de partícula de la especie que difunde y el tamaño de poro en la red, así como la existencia de interacciones que pudieran influenciar en la difusión, por ejemplo la formación de enlaces covalente, interacciones hidrofílicas/hidrofóbicas, puentes bisulfuro ó interacciones electrostáticas[86].

2.3.5.3 Fragmentación

La liberación del componente activo se realiza mediante la difusión favorecida por el rompimiento o fragmentación del material acarreador [87]. La principal característica de este mecanismo es que el paso de la sustancia activa sucede de manera abrupta debido al colapso del material encapsulador. El proceso de activación se ve favorecido por esfuerzos cortantes o fuerzas de compresión las inmediaciones de la matriz polimérica [88,89].

2.3.5.4 Hinchamiento/colapso – In stimuli

La liberación de sustancias mediante cores o núcleos poliméricos puede ser inducida por estímulos externos que modifican la afinidad estructural del core con el medio en el que se encuentra [60]. Por ejemplo se conoce el caso particular de la PNIPAM que por debajo de su temperatura crítica de solución mantiene un estado “hinchado”, lo cual se interpreta como una estructura que tiene una elevada afinidad por moléculas de agua [90]. Al incrementar la temperatura del medio acuoso, ocurrirá la transición conformacional de la estructura de la PNIPAM para alcanzar un balance favorecido a solo segmentos hidrofóbicos [1], por lo que las moléculas de agua tienen a difundir al exterior de los núcleos poliméricos [91-92] (figura 2.6).

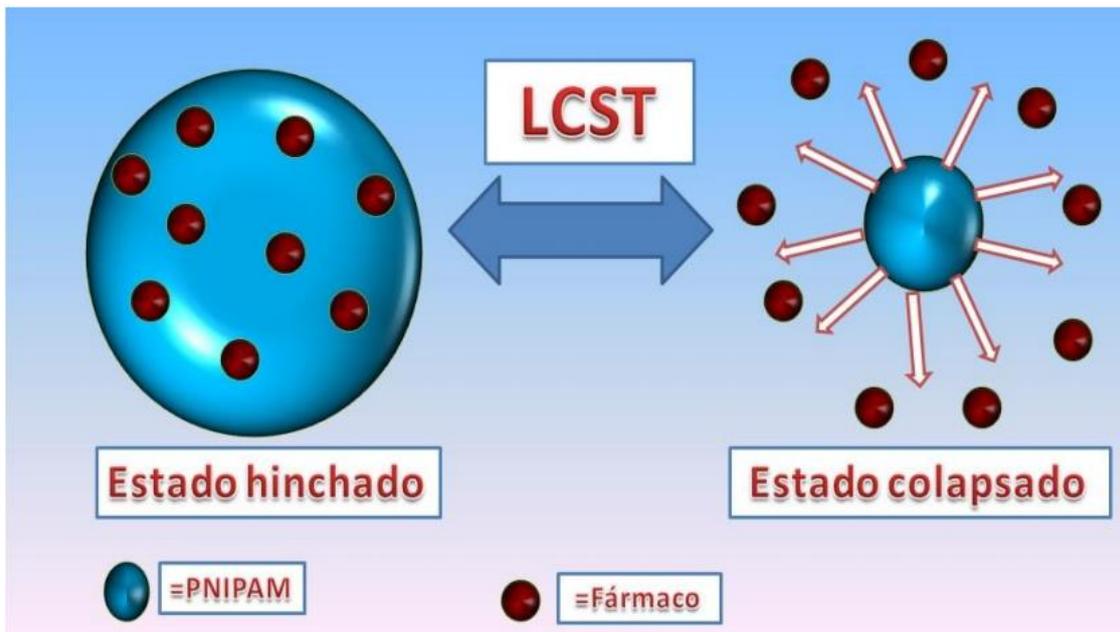


Figura 2.6 Mecanismo de hinchamiento/colapso de nanogeles poliméricos.

Capítulo III - Materiales y técnicas caracterización

3.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Es una técnica físico-química utilizada para determinar la distribución de tamaños de partículas en suspensión coloidal o macromoléculas [93]. Cuando la luz láser incide sobre partículas suspendidas, se dispersa en diversas direcciones. Si se analiza una dirección, los haces dispersados por diferentes partículas crearan una interferencia entre ellos mismo, dando como resultado una intensidad de dispersión.

3.1.1 Movimiento browniano

Las fluctuaciones en la densidad térmica en un solvente causa que las posiciones relativas de las partículas varían, esto es conocido como movimiento browniano. La teoría que sustenta lo anteriormente dicho es conocida como “teoría de fluctuación de dispersión de luz”, que fue desarrollada por Smoluchowski [94] in 1908 and Einstein [94] in 1910. El movimiento browniano también es causa de interferencia y afecta directamente la intensidad de dispersión. Un movimiento rápido, que significa una partícula pequeña, acelera el diferencial de la intensidad de dispersión. En el caso contrario, un movimiento lento, que significa una partícula grande, causa una que el diferencial de intensidad de dispersión sea más lento. En esta técnica tiene “dinámica” en su título, pero la normal general dice que la muestra permanece en reposo, el término “dinámica” hace referencia a la vibración de las partículas que componen la muestra. El punto clave de esta técnica es que el tamaño, la forma y las interacciones moleculares del material de la muestra determinan los cambios de frecuencia, la distribución angular, la polarización y la intensidad de la luz dispersada [94]. Causado por los cambios temporales en posición relativa entre las partículas y las fluctuaciones temporales en la concentración, como resultado de lo anterior, el patrón de interferencia y la intensidad de dispersión resultante, en un ángulo de dispersión dado también cambian con el tiempo, lo que refleja el movimiento browniano de las partículas de dispersión del sistema [96]. Este fenómeno proporciona la base de dispersión de luz dinámica, un procedimiento

experimental que produce una medida cuantitativa de la movilidad de la dispersión de partículas en solución, que se caracterizan por sus propios coeficientes de difusión. La mayoría de los equipos modernos para determinar tamaño de partícula en solución se basan en este principio [94-96].

3.1.2 Coeficiente de difusión

El coeficiente de difusión (D) se utiliza con frecuencia para determinar el radio hidrodinámico (R_H) de las partículas en suspensión, mediante el uso de la ecuación de Stokes-Einstein [97]:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H}$$

Donde K_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del líquido. El radio hidrodinámico obtenido por DLS representa una esfera dura ideal que se difunde con la misma velocidad que la partícula analizada. En realidad, las partículas se solvatan y el radio calculado a partir de la difusión de las partículas se corresponde con el tamaño de la partícula solvatada.

3.2 Potencial Z

Una partícula en suspensión coloidal, y esta presenta una carga superficial, afectará la manera en la que los iones se distribuyen en la región interfacial. Los iones de carga opuesta se concentrarán en las proximidades de la superficie de la partícula. Este efecto tendrá como resultado la existencia de una doble capa eléctrica alrededor de la partícula. La capa más próxima a la partícula es llamada capa Stern, los iones de esta capa cuentan con una fuerte interacción con la superficie; una segunda capa externa contará con iones más difusos, en esta capa los iones tienen una interacción menor.

La capa difusa cuenta con iones que conforman una entidad estable, así como otros, que aunque interactúan con la particular no se comportan como parte del sistema. Cuando la particular se mueve, los iones de la capa difusa que cuentan con una interacción más estable viajan junto con la particular, los iones más allá de la zona estable no se moverán con la partícula. Este límite se llama cizallamiento hidrodinámico. En este límite tiene lugar un potencial que es conocido como potencial zeta [98]. Dicho potencial es un indicador de la estabilidad del Sistema coloidal. Esto es porque si todas las partículas en suspensión coloidal cuentan con un potencial zeta elevado, negativo o positivo tendrán a repelerse entre sí y es menos probable que tenga lugar la coalescencia. Por otro lado si las partículas cuentan con un potencial zeta bajo, entonces las fuerzas de repulsión serán bajas y las partículas tenderán a coalescer. Si una partícula tiene un potencial zeta de mayor que +30 mV o menor que -30 mV, se dice por lo general que es estable [99].

3.2.1 pH en el potencial zeta

El pH es un factor importante, pues un potencial zeta sin la referencia de pH del sistema es despreciable. El potencial zeta en un pH ácido será positivo y en un pH alcalino será negativo. El pH donde el potencial zeta cambia su signo es conocido como punto isoeléctrico, este pH se conoce como el punto isoeléctrico, en este punto el sistema coloidal es menos estable [98].

3.2.2 Movilidad electroforética

Cuando a una solución electrolítica se le hace pasar un campo eléctrico, las partículas cargadas en la suspensión serán atraídas por el electrodo con carga opuesta. Las fuerzas de viscosidad se opondrán a dicho desplazamiento, cuando el equilibrio entre ambas fuerzas se encuentra, las partículas se moverán a una velocidad constante, llamada movilidad electroforética [98].

La velocidad con la que la partícula se mueva depende de varios parámetros:

- Fuerza del campo eléctrico.
- Constante dieléctrica.
- Viscosidad del medio.
- Potencial zeta de las partículas.

El potencial zeta de la partícula se puede calcular si la movilidad electroforética es conocida por medio de la ecuación de Henry [80]:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

Donde z es el potencial zeta, U_E es la movilidad electroforética, ε es el dieléctrico constante, η es la viscosidad, $f(ka)$ es la función de Henry, cuya forma extendida es [99]:

$$f(ka) = 1 + \frac{1}{16} (ka)^2 - \frac{5}{48} (ka)^3 - \frac{1}{8} (ka)^4 \\ \times \left[\frac{1}{12} (1 - ka) - \left(1 - \frac{1}{12} (ka)^2 \right) e^{ka} E_1(ka) \right]$$

Donde $E_1(ka)$ es una integral exponencial de primer orden, k es el recíproco del espesor del campo eléctrico de la doble capa, también conocido como “longitud de Debye”, y a es el radio de la partícula. Las mediciones de potencial zeta basadas en la medición de movilidad electroforética son realizadas por lo general en medio acuoso, con una concentración de electrolitos moderada. Para estas condiciones, se utiliza 1.5 como el valor de la función de Henry, esta aproximación es conocida como el modelo Smoluchowski [99].

Por lo tanto, la determinación del potencial zeta por medio de U_E es muy sencillo para sistemas que se ajustan al modelo de Smoluchowski: partículas de

más de 200 nm se dispersan en el electrolito con una concentración de ca 10^{-3} M [80]. Para partículas pequeñas en un medio con una baja constante dieléctrica, $f(ka)$ asume el valor de 1, lo que también permite un fácil cálculo del potencial zeta [99]. Esto se conoce como la aproximación Hückel. Las mediciones en medio no acuoso utilizan comúnmente la aproximación de Hückel [98].

3.3 Microscopio de fuerza atómica (AFM)

Esta técnica consiste en una punta de radio de curvatura de menos de 60nm al final de un cantiléver, dicha punta monitorea la superficie de la muestra. Las interacciones entre la punta y la muestra provocan una deflexión en el cantiléver, se cuenta con un deflector que determina esta dicha deflexión, la punta se desplazara por la superficie de la muestra. La medida de las deflexiones con respecto al tiempo da como resultado una micrografía de la superficie [100]. La principal fuerza de interacción que causa la deflexión son las fuerzas de Van der Waals. La magnitud de deflexión es una función de la distancia entre la punta y la muestra. Esta técnica cuenta con dos modos de operación: de contacto y no contacto. En el modo contacto, el cantiléver está a pocos angstroms de distancia de la superficie, las fuerzas entre el cantiléver y la muestra son repulsivas. En el modo de no contacto el cantiléver está a decenas de angstroms de la superficie de la muestra, las fuerzas en este caso son atractivas [100]. El Microscopio de Fuerza Atómica utiliza múltiples modos de operación de acuerdo a las características físicas de la muestra y de las propiedades a medir.

Contacto: Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie.

Tapping: También llamado contacto intermitente, mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie.

Imagen de Fase: Proporciona una imagen contrastada generada por las diferencias de adhesión en la superficie de la muestra.

No Contacto: Mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta.

Fuerza Magnética: Mide el gradiente de fuerza magnética sobre la superficie de la muestra.

Fuerza Eléctrica: Mide el gradiente de fuerza eléctrica sobre la superficie de la muestra.

Potencial de Superficie: Mide el gradiente de campo eléctrico sobre la superficie de muestra.

Modo Lift: Técnica que utiliza dos modos de operación usando la información topográfica para mantener la punta a una altura constante sobre la superficie.

Modulación de Fuerza: Mide la elasticidad/suavidad relativa de la superficie de las muestras.

Fuerza Lateral: Mide la fuerza de fricción entre la punta y la superficie de las muestras.

Microscopía de Tunelamiento: Mide la topografía de superficie de la muestra utilizando la corriente de tunelamiento.

Microscopía Electroquímica: Mide la estructura de la superficie y las propiedades de los materiales conductores inmersos en soluciones electrolíticas.

Litografía: Se emplea una punta especial para grabar información sobre la superficie de muestra.

3.4 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido es una técnica para el examen y análisis de las características estructurales de objetos sólidos, cuenta con una resolución de 5 nm. Permite observar materiales orgánicos e inorgánicos heterogéneos en escala mesoscópica [101]. En la práctica, un haz de electrones se centra para obtener un tamaño de punto muy fino en la superficie, un detector recoge los electrones que se emiten desde cada punto. El resultado es una imagen con un notable aspecto tridimensional constituido línea por línea. Por lo anteriormente dicho, es menester que la muestra presente conductividad

eléctrica, por lo cual en ocasiones se recubre la muestra con una película conductora y por consecuencia mejorar el contraste.

Un SEM cuenta con un cañón de electrones, creando un haz de electrones divergente. La columna tiene que estar al vacío, la columna cuenta con aberturas magnéticas que enfocan el haz de electrones, acelerando los electrones hasta la cámara de muestra. Se detecta la interacción entre el haz de electrones y la muestra, esto para finalmente construir una imagen virtual de la señal emitida desde la muestra. Esto se logra al escanear línea por línea el haz de electrones en un patrón rectangular en la superficie de la muestra. Cuando el haz se mueve, las señales que genera varían en fuerza, lo que refleja las diferencias estructurales de la muestra [101].

3.5 Espectroscopia ultravioleta-visible

La absorción de un fotón causa una transición de electrones consiste en la promoción de un electrón, partiendo de un orbital en estado basal a un orbital desocupado. En este punto se dice que la molécula se encuentra en un estado excitado. Los orbitales σ se formaran a partir de dos orbitales s , partiendo de un orbital s y un p , o de dos orbitales p si estos tienen sus ejes de simetría alineados. Los enlaces que se forman de esta manera son llamados enlaces σ . Los orbitales π se formara a partiendo de dos orbitales p que estén superpuestos lateralmente. Esta unión es llamada enlace π . Un buen ejemplo es el etileno ($\text{CH}_2 = \text{CH}_2$) que tiene sus dos átomos de carbono unidos por un enlace σ y otro enlace π . La absorción energética indicada promoverá, uno de los electrones π a un orbital anti-enlace llamado π^* , Dicha transición es llamada $\pi \rightarrow \pi^*$. Existen electrones no enlazantes situados en heteroátomos, por ejemplo oxígeno o nitrógeno. Sus correspondientes orbitales moleculares son llamados orbitales η . Cuando un electrón de un orbital no enlazado a uno anti-enlace, la transición se denota $\eta \rightarrow \pi^*$. Por lo cual, las moléculas que contienen un electrón no enlazado tal como oxígeno, nitrógeno, azufre o halógenos, a menudo exhiben absorción en la región UV [102,103].

En resumen, las transiciones electrónicas observaron en la espectroscopia UV-Vis son $\eta \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\eta \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$ y $\sigma \rightarrow \sigma^*$. El orden de energía en estas transiciones son, por lo general: $\eta \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < \eta \rightarrow \sigma^* < \pi \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$. De todas las transiciones, solo las dos con energía más baja ($\eta \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$) son obtenidas a través de energía entre 200 a 800 nm. El resto de transiciones electrónicas requieren insumos de energía más altos, por debajo de 200 nm, correspondiente a la región ultravioleta lejano del espectro electromagnético. La mayoría de las transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ en enlaces sencillos tienen lugar por debajo de los 200 nm y un compuesto que tiene solo enlaces transiciones de bonos individuales se llevan a cabo por debajo de 200 nm y una compuesto que contiene sólo enlaces σ es transparente (cerca de absorción cero) en la región UV-Vis cercano. Por ejemplo, en el metano (que tiene sólo enlaces C-H) la transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$ tiene lugar en 125 nm [104]. En la absorción y la espectroscopia de fluorescencia, dos tipos importantes de orbitales son considerados: orbital molecular ocupado de más energía (HOMO) y orbital molecular no ocupado de más baja energía (LUMO). Ambos se refieren al estado fundamental de la molécula. Por ejemplo, en el formaldehído, el HOMO es el orbital η y el LUMO es el orbital π^* .

3.6 Espectroscopia de fluorescencia

Cuando una molécula se excita por la incidencia de un fotón, se puede dar el caso en que vuelva a su estado basal, por ejemplo, esto puede suceder por la emisión de fluorescencia, la conversión interna de energía (por ejemplo, radiación de calor), puede producirse también, un cruce entre sistemas (esto puede verse secundado por la emisión de fosforescencia), transferencia de carga intramolecular y/o cambio de conformación. Los estados electrónicos singlete se indican como S0 (estado electrónico fundamental), S1, S2,..., y los estados triplete como, T1, T2,..., con diferentes niveles de vibración asociados a cada estado electrónico. Es importante tener en cuenta que la absorción de energía es muy rápido ($\approx 10^{-15}$ s) con respecto a todos los demás procesos (de modo que no hay desplazamiento simultáneo de los núcleos de acuerdo con el principio de Franck-Codon) [103, 104].

La absorción de un fotón, puede traer una molécula de uno de los niveles vibracionales de S1, S2. La emisión de fotones que acompañan a la relajación S1 → S0 se denomina fluorescencia. Debe hacerse hincapié en que, aparte de unos pocos excepciones, la emisión de fluorescencia se produce a partir de S1, por lo tanto, sus características (excepto polarización) no dependen de la longitud de onda de excitación (por supuesto sólo una especie existe en el estado fundamental). La transición entre el estado fundamental y el estado excitado antes mencionado es generalmente la misma para la absorción y fluorescencia. Sin embargo, el espectro de fluorescencia se encuentra en longitudes de onda más alta que la absorción debido a la pérdida de energía en el estado excitado debido a la relajación vibracional.

De acuerdo con la regla de Stokes la longitud de onda de emisión de fluorescencia debe ser siempre mayor que la de absorción. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el espectro de absorción se solapa en parte con el espectro de fluorescencia, es decir, una fracción de la luz se emite en longitudes de onda más cortas que la luz absorbida. Esta observación parece ser, en un principio, en contradicción con el principio de conservación de la energía. Sin embargo, tal defecto de energía se compensa por el hecho de que una pequeña fracción de moléculas se encuentra en un nivel de vibración más alta en el estado fundamental como así como en el estado excitado a temperatura ambiente [104].

3.7 ESPECTROSCOPIA INFRAROJA

Las moléculas están constituidas por átomos conectados entre sí por enlaces elásticos. Esta es la razón por la cual, los átomos cuentan con grados de libertad vibracionales. Todos los movimientos de los átomos en una molécula relacionados entre sí son una superposición de las denominadas frecuencias normales. Para las moléculas poliatómicas, el número de frecuencias características es $3N - 6$ para las moléculas no lineales y $3N - 5$ para las moléculas lineales, donde N es el número de átomos en la molécula, que definen sus espectros de vibración. Estos espectros dependerán de masa átomos, su disposición geométrica, y la fuerza de sus enlaces químicos. Agregados

moleculares, tales como cristales o se comportan como como "super-moléculas" en los que se acoplan las vibraciones de los componentes individuales. Como En una primera aproximación las vibraciones normales no se consideran acoplados, es decir, no interactúan. Sin embargo, la elasticidad de los enlaces no sigue estrictamente la ley de Hooke. Por lo tanto, pueden aparecer armónicos y combinaciones de vibraciones normales [102, 105].

Los espectros infrarrojos cubren el infrarrojo cercano (0,75-3 μm), infrarrojo medio (3-30 μm) y el infrarrojo lejano (30-300 μm). En esta región, la mayoría de las moléculas que muestran absorción o bandas de emisión resultan de la interacción de la simetría permitida con la radiación. La energía de la luz absorbida y emitida es equivalente a la diferencia de energía entre los estados vibracionales más bajos del estado fundamental electrónico de una molécula. Una molécula puede tomar hasta una cantidad de energía, $h\nu$, para llegar a un estado excitado sólo cuando la frecuencia de la radiación incidente en una molécula es la misma que su frecuencia de vibración. Este fenómeno se debe ya sea un cambio de momento dipolar de la molécula o una cambiar en su polarizabilidad. En el primer caso fenómeno tiene lugar, observaremos una banda de IR. La absorción longitud de onda de la espectroscopia de IR es 2,5 a 1.000 μm , lo que corresponde a la energía $h\nu = 4000\text{-}10\text{ cm}^{-1}$.

Capítulo IV – Síntesis de nanopartículas de PNIPAM-Q-FI

4.1 Modificación del Quitosano

La modificación del Quitosano con fluoresceína fue realizada acorde al método reportado por Hang et al [35,36], con algunas modificaciones. 3 μmol de Quitosano nativo fueron disueltos en 200 ml de ácido acético 0.1M, se mantendrá agitación magnética durante todo el proceso. Seguido de la adición de 100 ml de metanol, además de la adición de 10 ml una solución de fluoresceína 2mg/ml. Se mantendrá la agitación magnética, en condiciones oscuras y a una temperatura constante por 24 horas. El producto final se precipitara usando una solución de NaOH 1N. El producto se someterá a un proceso de diálisis por 3 días. El producto final será sometido a un proceso de liofilización. El Quitosano modificado con fluoresceína será llamado FC.

4.2 Síntesis de Nanopartículas por el método de precipitación polimérica por radicales libres.

Este método de polimerización es ampliamente utilizado para la preparación de hidrogeles, debido a que involucra la formación de radicales de una elevada cantidad de monómeros, además que se considera que las impurezas tienen un bajo impacto en el curso de la reacción lo que lleva a productos específicos y métodos de purificación muy sencillos [106].

El sistema de reacción comienza con la formación de radicales libres de persulfato de amonio (APS) en medio acuoso (Figura 4.1). Los radicales formados inician la activación radical de los segmentos de N-isopropilacrilamida desencadenando así la polimerización(Figura 4.2,4.3). Nosotros utilizaremos N,N'-Metilenebis(acrilamida) como un agente entrecruzante entre el NIPAM y el Quitosano(Figura 4.4). Es importante la presencia de agentes estabilizadoras o surfactantes para controlar el tamaño de los hidrogeles, se han reportado trabajos de investigación en los cuales utilizan dodecil sulfato de sodio

4.2.2 Factores en la síntesis

4.2.2.1 Tipo de iniciador y su concentración

Se conoce que la velocidad de la reacción depende en gran manera de la concentración del iniciador, así mismo una cantidad mayor de iniciador, tendrá como resultado cadenas poliméricas más cortas, además que su efecto también impacta las propiedades fisicoquímicas del hidrogel. El iniciador que utilizaremos es el persulfato de amonio, debido a su gran selectividad y alto rendimiento de reacción.

4.2.2.2 Tiempo de reacción

El tiempo de reacción impacta directamente en la concentración de partículas. La reacción de polimerización por radicales libres ocurre en un lapso de 25-30 minutos, pero es recomendable dar seguimiento al curso de la reacción hasta por dos horas para asegurar la estabilidad de los nanogeles obtenidos.

4.2.2.3 Oxígeno en el medio de reacción

El oxígeno que se encuentra disuelto en la solución actúa como un importante inhibidor, lo cual impacta de manera trascendente la efectividad de la reacción el método más sugerido es la desoxigenación con un gas inerte como el nitrógeno.

4.3 Metodología para la síntesis de nanogeles poliméricos

La obtención de los nanogeles se llevará a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento:

En un matraz de 3 bocas, con salidas y llave de teflón, se disuelve 195 mg del monómero NIPAM en 100 ml de agua ultra pura. Mantendremos agitación

magnética durante el proceso. Después de disolver por completo se añaden 1.95 mM de N,N`-metilenbisacrisamida (BIS) y 1.09 mM de dodecil sulfato de sodio (SDS), se mantiene la agitación constante hasta disolver completamente todos los componentes de la mezcla. A continuación se realiza purgado directo en la solución para desplazar el oxígeno disuelto, este procedimiento de purgado se mantiene mediante una hora a presión constante. Finalmente, la temperatura de reacción se incrementa hasta 70 °C, después 2.20 mM de persulfato de amonio se añaden a la mezcla de reacción, la temperatura, la agitación y la corriente de nitrógeno se mantienen constantes por periodo de 2 horas. La muestra será sometida a un proceso de centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos para separar los nanogeles.

4.2.1 PNIPAM-Quitosano

Se realizaron 3 síntesis con una relación molar NIPAM-Quitosano nativo (NIPAM-CN) de: 1-5, 1-10, 1-20. Además dos síntesis utilizando FC, con unas relaciones molares de

El proceso para la preparación de nanopartículas de PNIPAM-Quitosano tiene pocas, pero importantes diferencias;

- En lugar de agua, utilizaremos en ácido acético al 1% p/V.
- Agregaremos el NIPAM y el Quitosano en su respectiva relación molar.

El proceso continua de la misma forma a partir de aquí.

Capítulo V - Resultados

Se obtuvieron 6 sistemas:

- NP PNIPAM puro (p-NIPAM)
- NP PNIPAM - 1×10^{-7} moles Q (PC₁)
- NP PNIPAM - 2×10^{-7} moles Q (PC₂)
- NP PNIPAM - 4×10^{-7} moles Q (PC₃)
- NP PNIPAM – $0,88 \times 10^{-7}$ moles QF (PCF₁)
- NP PNIPAM – $0,99 \times 10^{-7}$ moles QF (PCF₂)

Estos sistemas se sometieron a diversas caracterizaciones y análisis, que mostraran sus propiedades fisicoquímicas, estructura química, ópticas, capacidad de internalización y viabilidad celular.

5.1 Caracterización estructural de (FC)

La Figura 5.1 muestra el análisis FT-IR del Quitosano modificado mediante el acoplamiento entre el Quitosano nativo e isotiocianato de fluoresceína. Se comparó el espectro obtenido con el Quitosano nativo, los picos típicos de anillo de piranosa se muestran a 1085 cm^{-1} , y un nuevo pico aparece en 1732 cm^{-1} . Este hecho confirma la presencia de la banda de tensión del carbonilo perteneciente a la estructura de fluoresceína. El pico característico de la tensión C-C del anillo aromático se encuentra en el pico cerca de 1468 cm^{-1} .

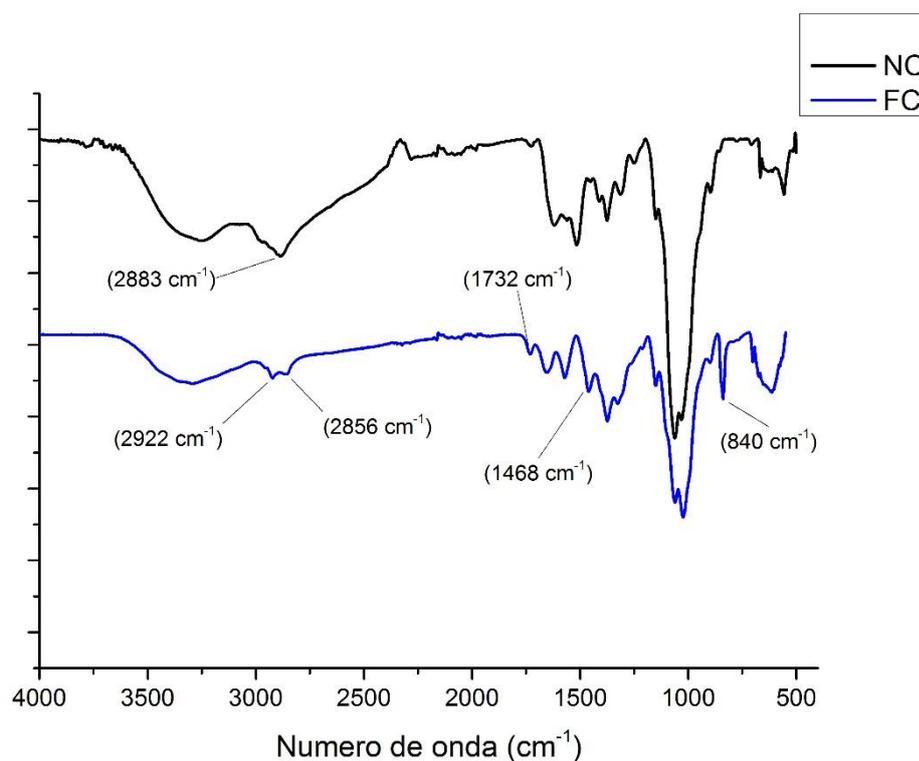


Figura 5.1. FTIR del Quitosano nativo (NC) y el Quitosano modificado (FC)

5.2 Caracterización óptica de NP PNIPAM-FC (PC₃F).

El espectro de emisión se midió con el fin de determinar λ max de las nanopartículas. La muestra se excita a $\lambda = 450$ nm; el espectro de fluorescencia se muestra en la figura 5.2. Se observa una banda ancha de emisión e intenso en un intervalo de 490 nm a 600 nm. Esta transición corresponde al color verde-amarillento en el visible, el λ máximos de emisión fue a 550 nm. Estos resultados sugieren que las nanopartículas PC₃F pueden ser útil como nanoplataforma detectable por la técnica de microscopía de fluorescencia.

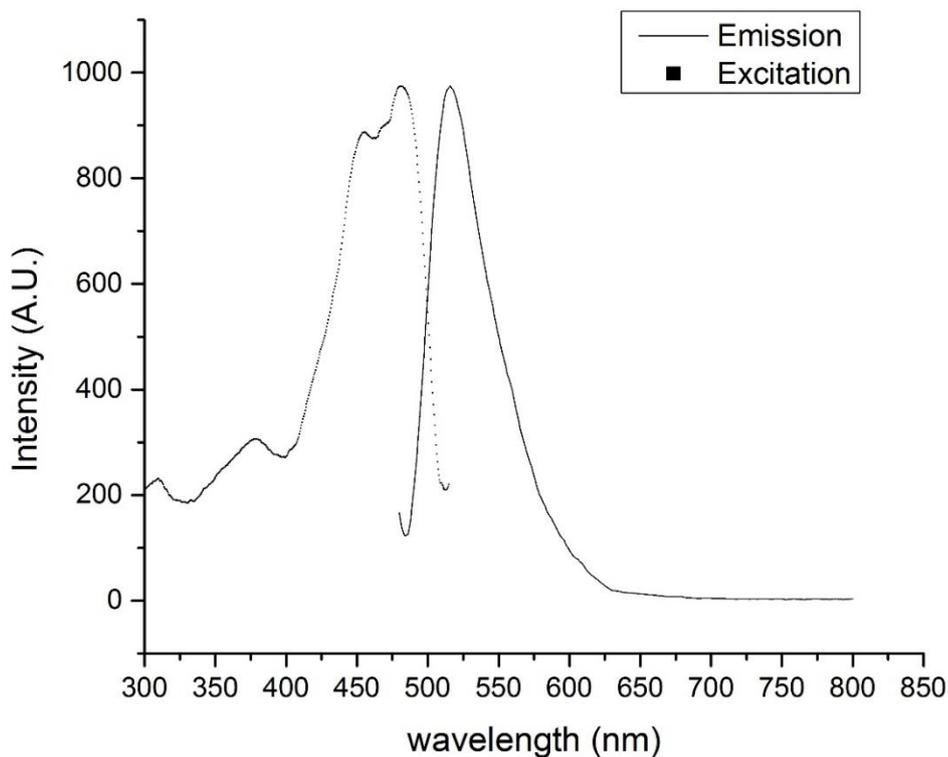


Figura 5.2. Espectro de fluorescencia de la muestra PC₃F

5.3 Caracterización estructural de las nanopartículas (PNIPAM-NC)

Los espectros FT-IR del p-NIPAM y PC₁, PC₂ y PC₃ nanopartículas se muestra en la figura 5.3. Los resultados demuestran el éxito del proceso de reticulación en la polimerización de NIPAM y solución de NC por el método de los radicales libres. Los picos anchos que aparecen cerca de 3284 cm⁻¹ y 1615 cm⁻¹ se asocian al estiramiento del grupo (-NH₂) y a la flexión tipo tijera del grupo (-NH) respectivamente. La banda de absorción a 1620 cm⁻¹ corresponde a la vibración del grupo carbonilo (C = O) de grupo amida del (PNIPAM). La presencia del doble pico intenso alrededor de 1360 cm⁻¹ y 1380 cm⁻¹ confirma la absorción debida al grupo isopropilo de la (PNIPAM) cadena (-CH (CH₃)₂).

Por otro lado, se observa una señal a 1450 cm⁻¹ relacionadas con la flexión del grupo metilo (-CH₃) de la (PNIPAM). Morfología y tamaño de partícula de las

nanopartículas de PNIPAM sintetizadas en este trabajo son similares a los resultados reportados por Guiying et al (2013), en el que se publicaron la síntesis de esferas huecas por el método de autoensamblaje de quitosano con PNIPAM para liberación controlada de 5-fluoroacil. Se caracterizan las esferas huecas por espectroscopia FT-IR. Los resultados muestran pico típico de FT-IR para la amida de flexión conjugado con grupo carbonilo (-NH) cerca de 1630 cm^{-1} . En nuestro caso, seguimos el nuevo pico a 1069 cm^{-1} en las muestras de PC₁, PC₂ y PC₃. La señal se atribuye al estiramiento del CO perteneciente al (-COC-) del anillo de piranosa del NC; la señal a 1069 cm^{-1} se intensifica en la muestra PC₃. El análisis FT-IR confirma el éxito de reacción por polimerización de radicales libres de NIPAM reticular en presencia de solución de NC.

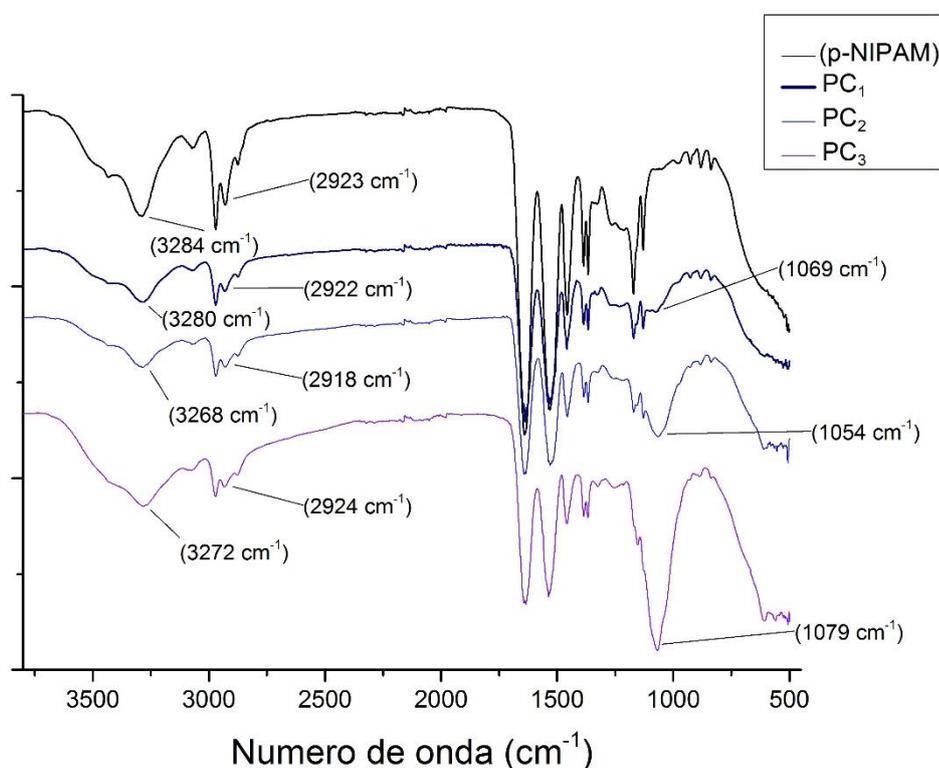


Figura 5.3. Espectro FTIR de las muestras: p-NIAPM, PC₁, PC₂ y PC₃.

5.4 Estudio de la relación molar NC – NIPAM y su efecto en las propiedades fisicoquímicas de la partícula.

5.4.1 Diámetro hidrodinámico (obtenido por DLS)

Se estudió el efecto de las nanopartículas de (PNIPAM) como una función de la relación molar de los precursores en la polimerización por radicales libres. La Figura 5.4 presenta la distribución de tamaño de las nanopartículas con tamaños entre 334 nm y 190 nm; estas mediciones corresponden a un análisis de DLS. En los datos mostrados en la Tabla 5.1, se observa un incremento significativo en el tamaño de la muestra en el PC₁. En nuestra opinión, este incremento está relacionado con la baja cantidad de quitosano. Esta condición lleva a incremento de tamaño de partícula en el estado hinchado. Por ejemplo en PC₂ y PC₃, se puede observar una importante disminución en el tamaño. Asociamos este hecho a un efecto de restricción por una mayor cantidad de cadenas de quitosano, en este sentido, se obtuvieron nanopartículas más compactas. Por otro lado, en las distintas muestras se obtuvieron mediciones de polidispersidad (PDI) bajas, todas las muestras mostraron una PDI < 0.8 (Tabla 5.1).

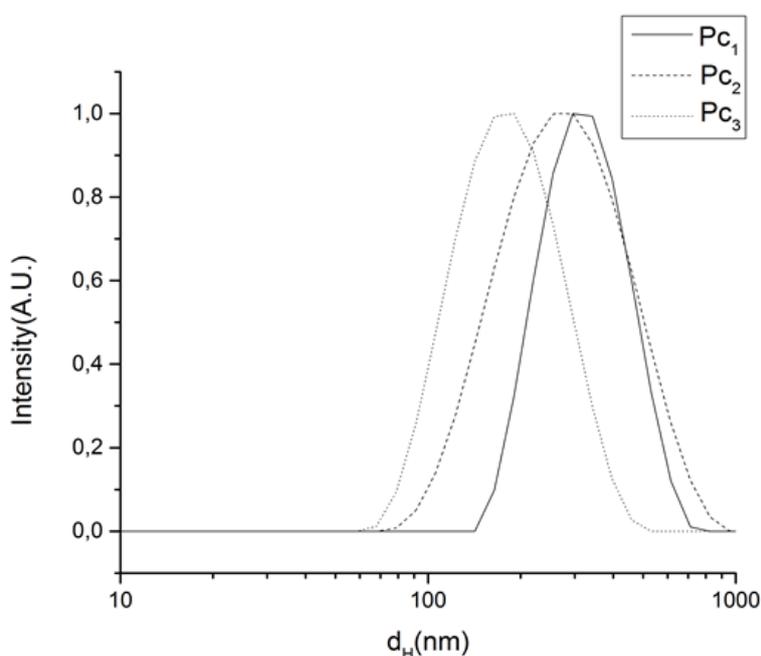


Figura 5.4. Mediciones de DLS, correspondiente a las muestras PC₁, PC₂, PC₃.

Las muestras PC₂F que fue realizada con Quitosano-Fluoresceina (FC) mostro un tamaño de 507 nm (Tabla 5.1). Este sistema muestra un tamaño no tan apto para una internalización pasiva. En cambio la muestra PC₃F tiene un tamaño de 335 nm. Las dos muestras también poseen una PDI < 0.8 (Tabla 5.1).

5.4.2 Potencial zeta

En este estudio, se observa un cambio en el potencial zeta en las diferentes relaciones molares NIPAM-NC, se puede concluir que a medida que se aumentaba la cantidad de moles de NC en la reacción, esto causaba un incremento en el potencial zeta de las partículas (Figura. 5.5). En la tabla 5.1 podemos observar que la muestra p-NIPAM tiene un potencial zeta cercano a cero (-2.5 mV) y conforme aumentamos la relación molar NIPAM-NC a favor del NC, el potencial zeta incrementa, hasta llegar a la muestra PC₃, que cuenta con un potencial zeta positivo (8.6 mV).

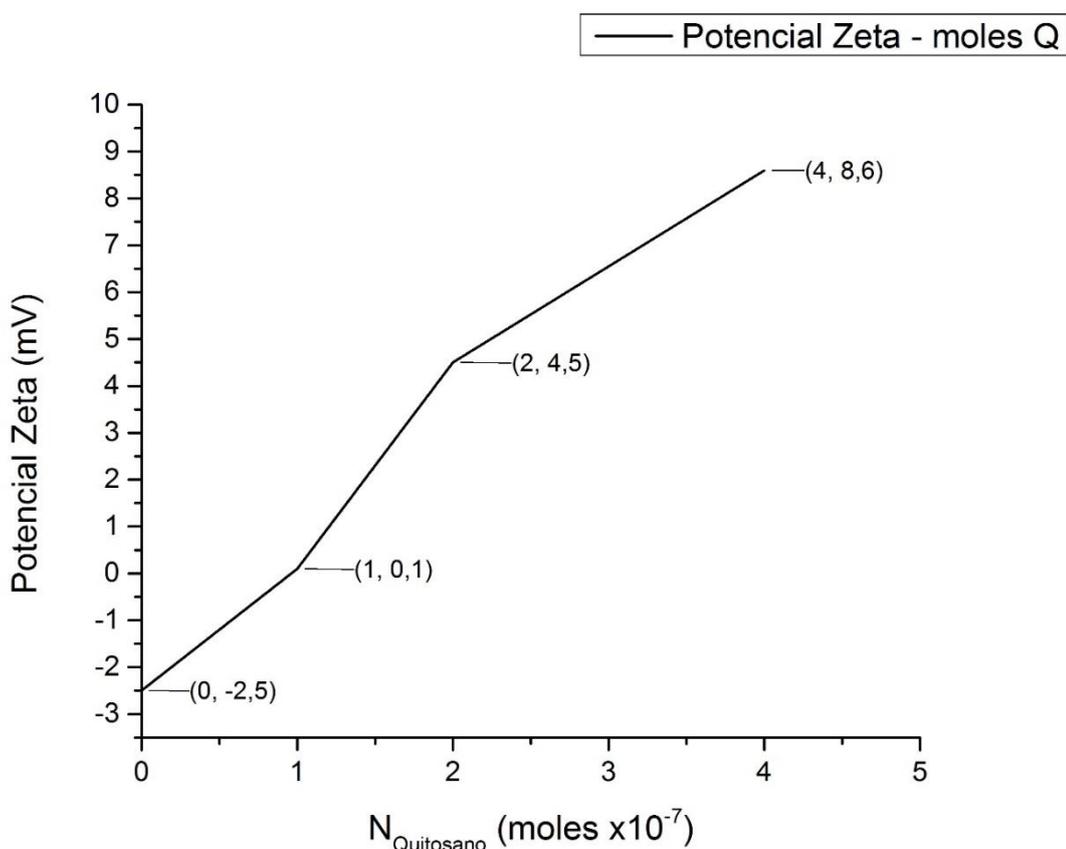


Figura 5.5. Mediciones de potencial zeta de las muestras: p-NIAPM, PC₁, PC₂ y PC₃.

La muestra PC₂F y PC₃F muestran un potencial zeta de 0.47 mV y 3.6 mV respectivamente. Este comportamiento coincide con el observado en las muestras en las que se utilizó NC, es decir, muestra un incremento en el pZ conforme se aumenta la relación molar Quitosano: NIPAM en favor del quitosano (tabla 5.1).

Muestra	(NC:NIPAM)	pH	Tamaño (nm)	PDI	pZ (mV)
(p-NIPAM)	-----	5	252	0.06	-2.5
PC ₁	1:5	5	334	0.07	0.1
PC ₂	1:10	5	300	0.05	4.5
PC ₃	1:20	5	190	0.07	8.6
PC ₂ F		5	507	0.7	0.47
PC ₃ F		5	335	0.6	3.6

Tabla 5.1. Valores de DLS y pZ de las muestras: p-NIAPM, PC₁, PC₂, PC₃, PC₂F y PC₃F.

5.5 Determinacion LCST por medio de barrido de temperatura en DLS

La respuesta terminca de los sistemas se estudiaron mediante la medición de diámetro hidrodinámico bajo diferentes temperaturas. Las mediciones fueron plasmadas en graficas de temperatura contra diametro hidrodinamico (d_H), lo cual nos permite determinar el rango de temperatura en el cual, la partícula es sensible a la temperatura. Dicha grafica nos indica tambien el rango de temperatura donde se encuentra la LCST. Se analizaron todas las muestras sintetizadas (p-NIPAM, PC₁, PC₂, PC₃, PC₂F y PC₃F).

La muestra p-NIPAM muestra un tamaño máximo de 265 nm a 21°C y un tamaño mínimo de 104 nm a 41°C. Además tiene su rango de mayor reactividad a la temperatura entre los 31 y 35°C. Su LCST se encuentra alrededor los 33°C (Figura 5.6).

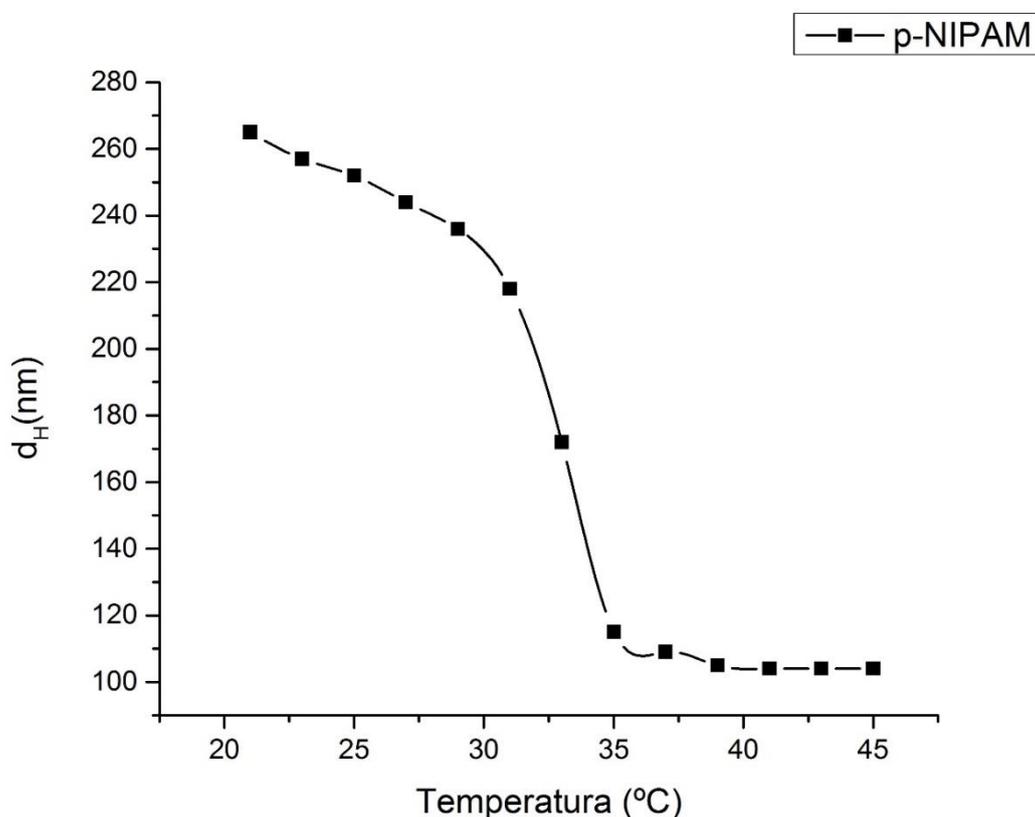


Figura 5.6. Grafica de Temperatura contra d_H de la muestra p-NIPAM.

La muestra PC₁ muestra un tamaño máximo de 339 nm a 21°C y un tamaño mínimo de 227 nm a 43°C. Además tiene su rango de mayor reactividad a la temperatura entre los 31 y 33°C. Su LCST se encuentra alrededor los 32°C (Figura 5.7).

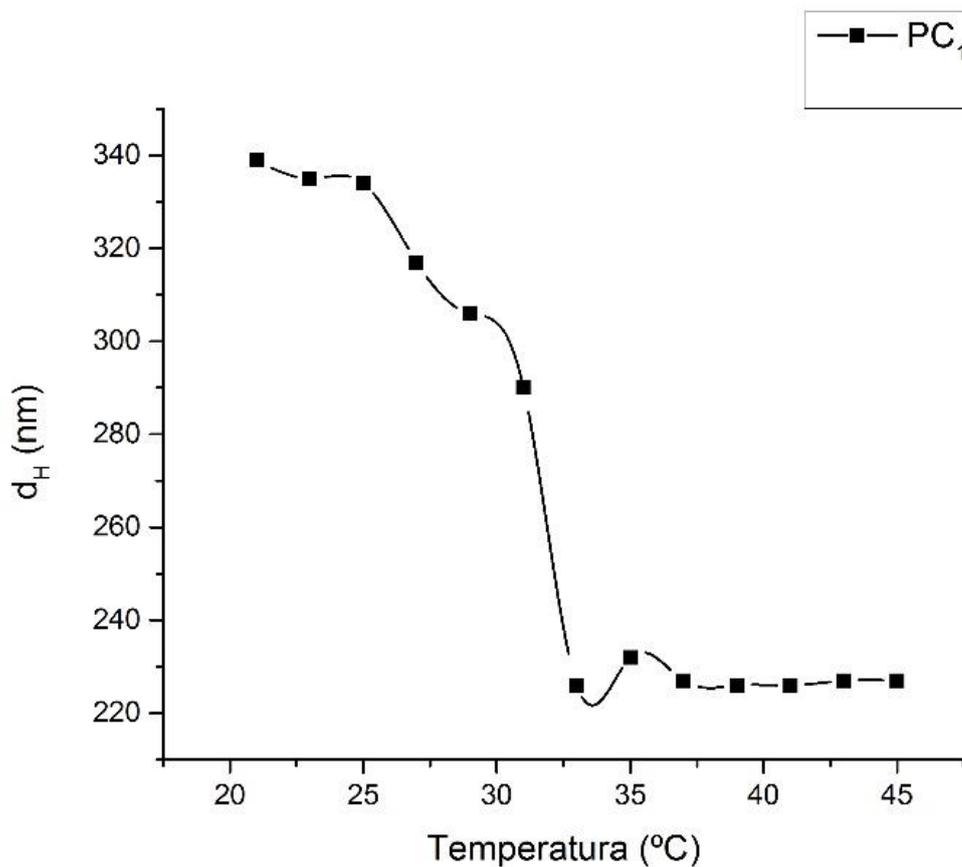


Figura 5.7. Grafica de Temperatura contra d_H de la muestra PC_1 .

La muestra PC_2 muestra un tamaño máximo de 307 nm a 21°C y un tamaño mínimo de 170 nm a 43°C. Esta muestra, expresa un comportamiento que no estaba presente en las muestras pasadas, muestra reactividad a la temperatura en un rango donde antes era casi nula (35 a 41°C), la muestra no tiene un rango de máxima reactividad bien definido, lo cual hace complicado determinar la LCST, pero por otro lado esta muestra es la primera que muestra una reactividad tan elevada por encima de los 35°C (Figura 5.8).

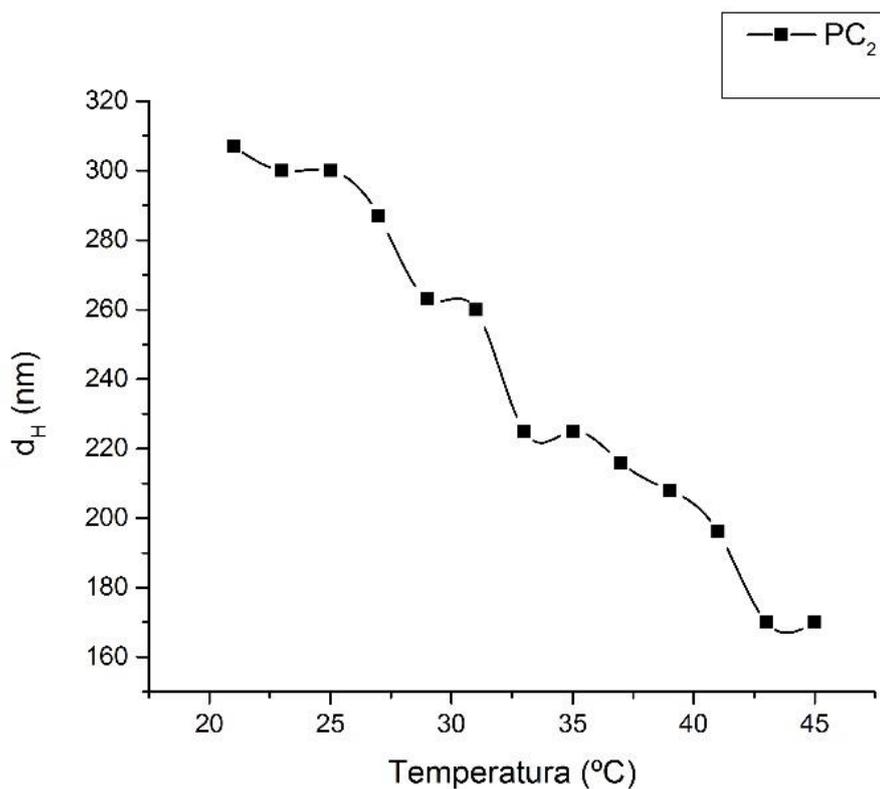


Figura 5.8. Grafica de Temperatura contra d_H de la muestra PC_2 .

La muestra PC_3 muestra un tamaño máximo de 193 nm a 21°C y un tamaño mínimo de 138 nm a 35°C. Además tiene su rango de mayor reactividad a la temperatura entre los 31 y 35°C. Su LCST se encuentra alrededor los 33°C. PC_3 expresa un comportamiento extraño, a los 35°C cambia su tendencia a disminuir su tamaño, para comenzar a aumentar, esto sucede hasta los 41°C donde comienza a estabilizarse (Figura 5.9). Esto se puede deber, a que esta muestra es la que tiene mayor cantidad de NC, el cual estará en exceso durante la reacción, es probable que el NC esté presente de manera abundante en la superficie y al calentarse por encima de cierta temperatura, las cadenas de NC se extiendan, lo cual se expresa como un aumento de tamaño.

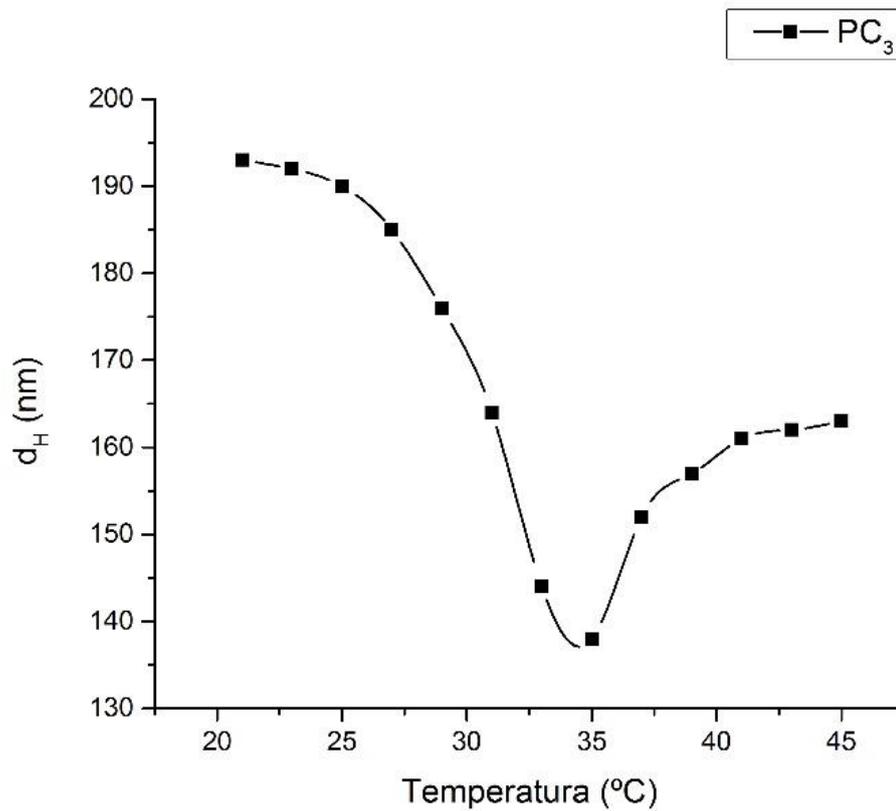


Figura 5.9. Grafica de Temperatura contra d_H de la muestra PC_3 .

La muestra PC_2F muestra un tamaño máximo de 532 nm a 21°C y un tamaño mínimo de 191 nm a 45°C. Además tiene su rango de mayor reactividad a la temperatura entre los 33 y 35°C. Su LCST se encuentra alrededor los 34°C (Figura 5.10).

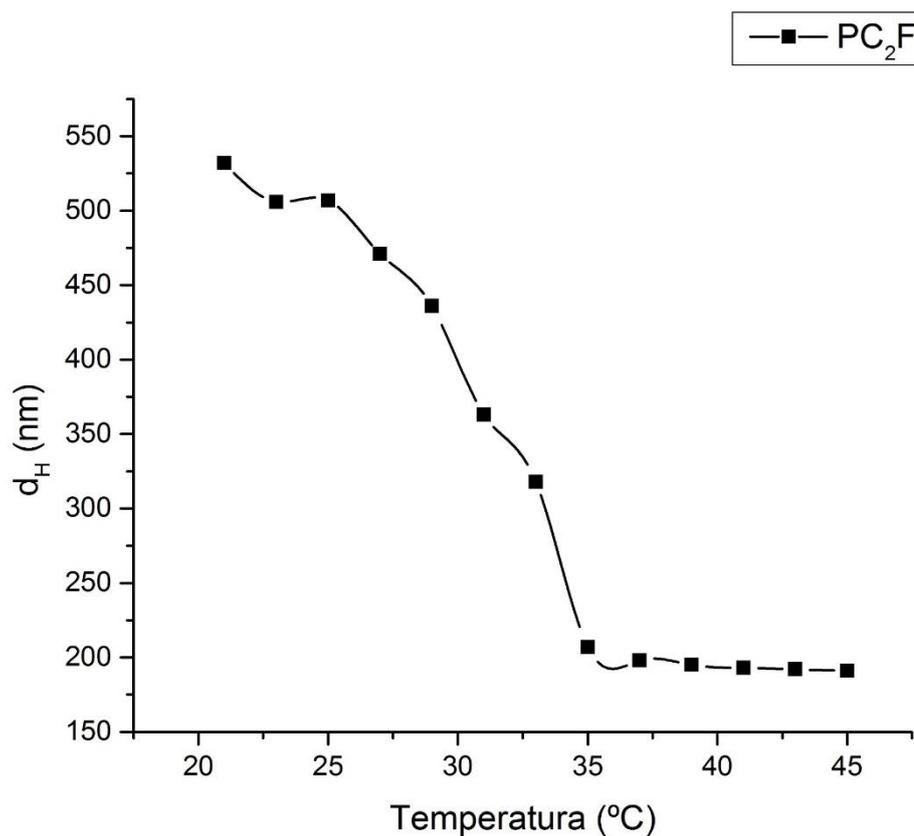


Figura 5.10. Grafica de Temperatura contra d_H de la muestra PC_2F .

La muestra PC_3F muestra un tamaño máximo de 343 nm a 21°C y un tamaño mínimo de 152 nm a 45°C. Además tiene su rango de mayor reactividad a la temperatura entre los 31 y 37°C. Su LCST se encuentra alrededor los 34°C (Figura 5.11). Esta muestra expresa una reactividad por encima de los 37°C que es significativa, los diferenciales de d_H , son lo suficientemente grandes como para decir que la muestra es sensible a la temperatura por encima de su LCST.

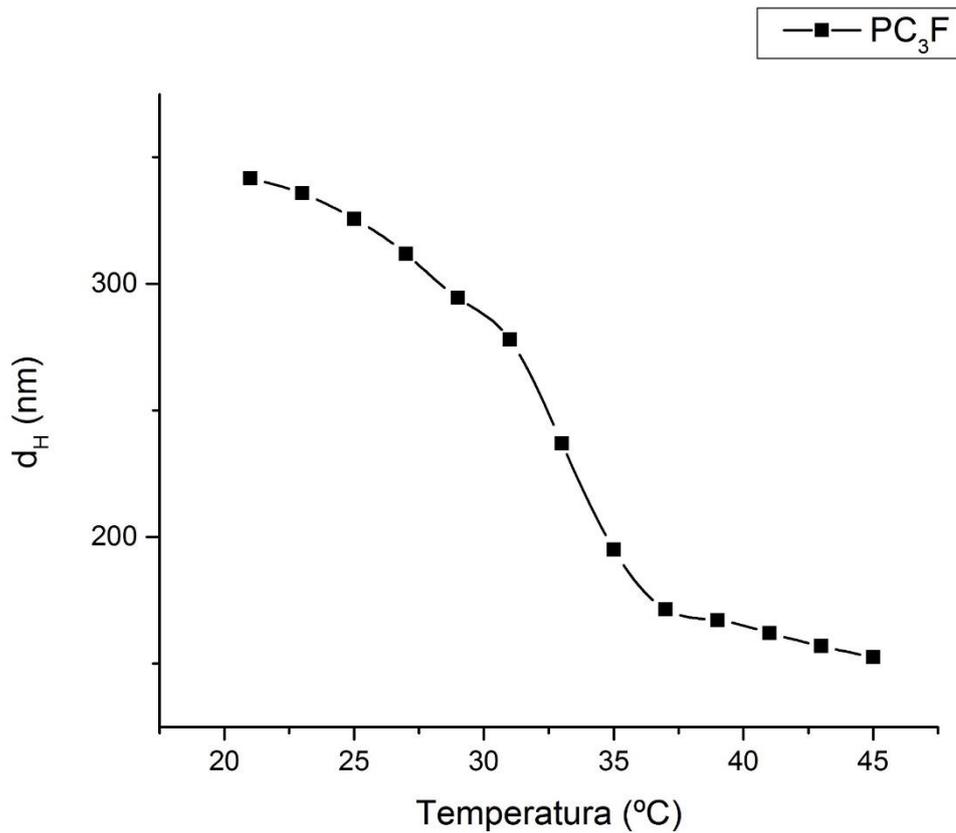


Figura 5.11. Grafica de Temperatura contra d_H de la muestra PC₃F.

Tanto la muestra PC₂ como la muestra PC₃F son las que muestran un comportamiento más atractivo, pues expresan una sensibilidad a la temperatura en un rango donde si lo comparamos con la muestra p-NIPAM (que es la muestra que no contiene Quitosano) veremos dicha diferencia (Figura 5.12, 5.13). La muestra p-NIPAM, muestra entre los 35 y los 41°C un diferencial de tamaño de solo 11 nm, por otro lado mas muestras PC₂ y PC₃F muestran un diferencial de 55 y 43 nm respectivamente.

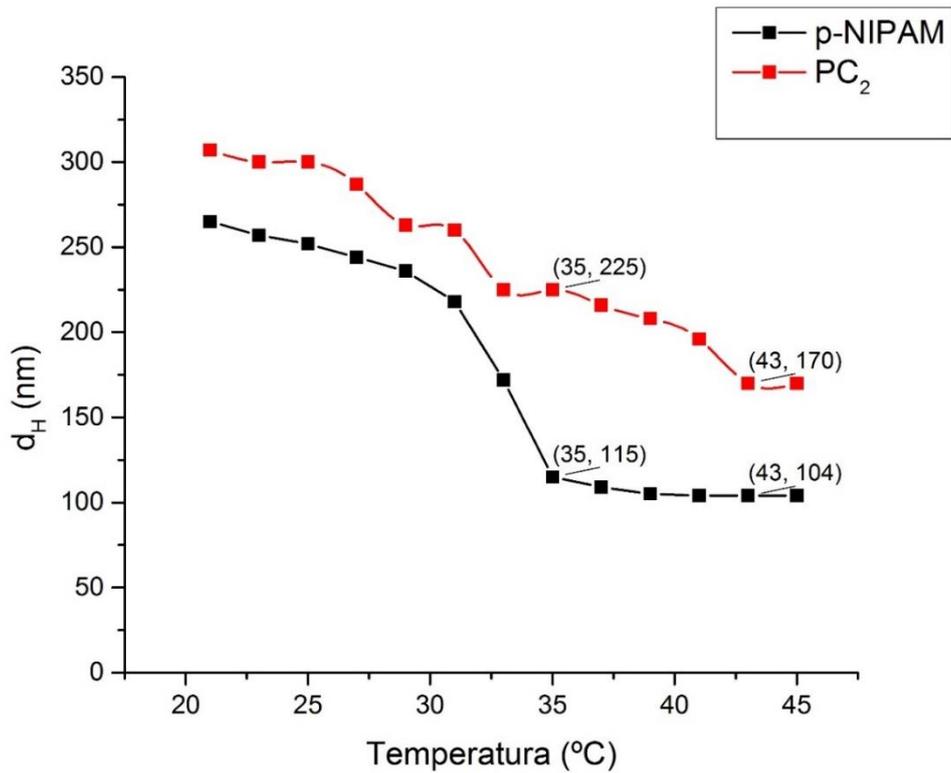


Figura 5.12. Grafica de Temperatura contra d_H de las muestras PC₁ y p-NIPAM.

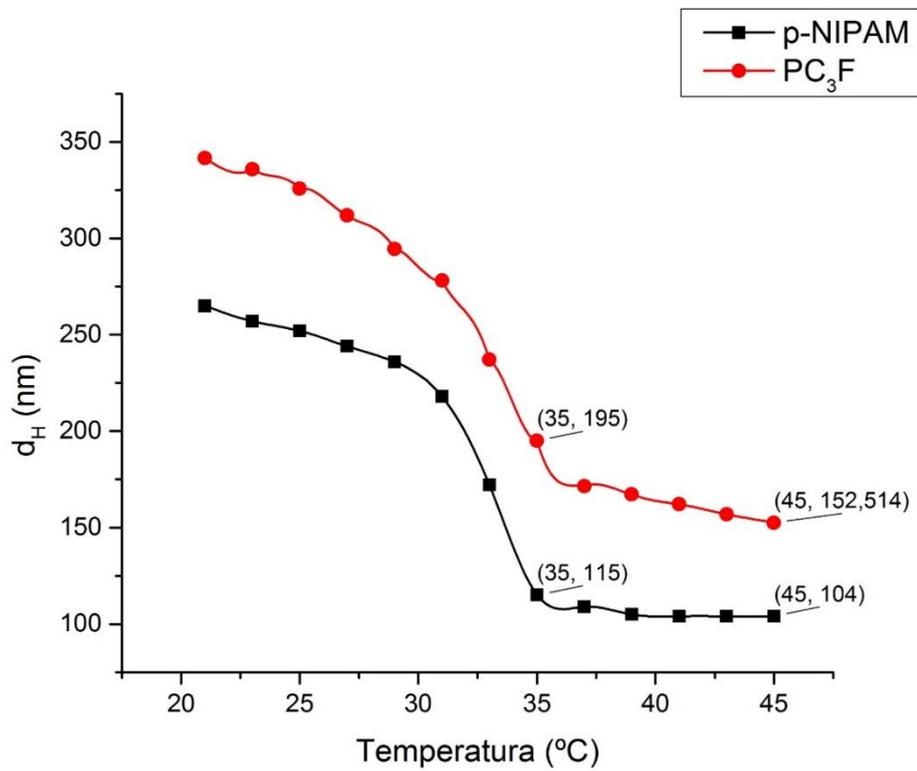


Figura 5.13. Grafica de Temperatura contra d_H de las muestras PC₃F y p-NIPAM.

Muestra	d _H min (nm)	d _H max	LCST (°C)
p-NIPAM	104	265	33
PC ₁	227	339	32
PC ₂	170	307	Indefinida
PC ₃	138	193	33
PC ₂ F	191	532	34
PC ₃ F	152	343	34

Tabla 5.2. Valores d_H máximos y mínimos, así como la LCST de las muestras; p-NIAPM, PC₁, PC₂, PC₃, PC₂F y PC₃F.

5.6 Estudio de relación molar NC-NIPAM y su efecto sobre la morfología de las nanopartículas.

Investigamos el efecto de la cantidad NC como una función de la morfología de las nanopartículas; todas las imágenes se obtuvieron por AFM (PC₁, PC₂, PC₃, PC₃F) y SEM (PC₁, PC₂, PC₃). La Figura 5.14, así como la Figura 5.15 muestran la evolución de partículas en diferentes condiciones.

PC₁ muestra (relación molar 5: 1) presenta un aumento importante en el tamaño (350 nm a 400 nm), y las mediciones DLS coincide con los perfiles de AFM y SEM medidos. Las partículas PC₁ exhiben una morfología alargada esférica (Figura 5.14, 5.15). En nuestra opinión, aumento del tamaño de partícula se atribuye a la interacción de las cadenas de y PNIPAM en el estado hinchado. Nos dimos cuenta de que una baja concentración de quitosano desencadena una estructura más amplia de las cadenas de quitosano y, por tanto, aumenta la posibilidad de crear un enlace de hidrógeno con moléculas de agua libre.

La muestra PC₂ (relación molar 10:1) tiene una morfología de tipo núcleo (Figura 5.14, 5.15). El incremento de recubrimiento NC en la superficie del núcleo (PNIPAM) es evidente para nosotros (Figura 5.14). Este resultado puede ser entendido considerando una mayor concentración de NC en el medio de reacción, ya que aumenta la concentración de quitosano, el proceso de

recubrimiento se mejora y el crecimiento de la partícula está restringido, el tamaño de la muestra concuerda con los obtenidos por DLS. La muestra PC₃ (relación molar 20:1) muestra una morfología esférica con tamaño de partícula alrededor de 180 nm, esta forma es más definida y es evidente que hay un promedio menor en tamaño; esto concuerda con los datos de DLS. La muestra PC₃F pertenece muestra una morfología alargada y un tamaño de partícula alrededor de 335 nm, los resultados obtenidos por AFM son los esperados, si nos basamos en los botenidos por DLS.

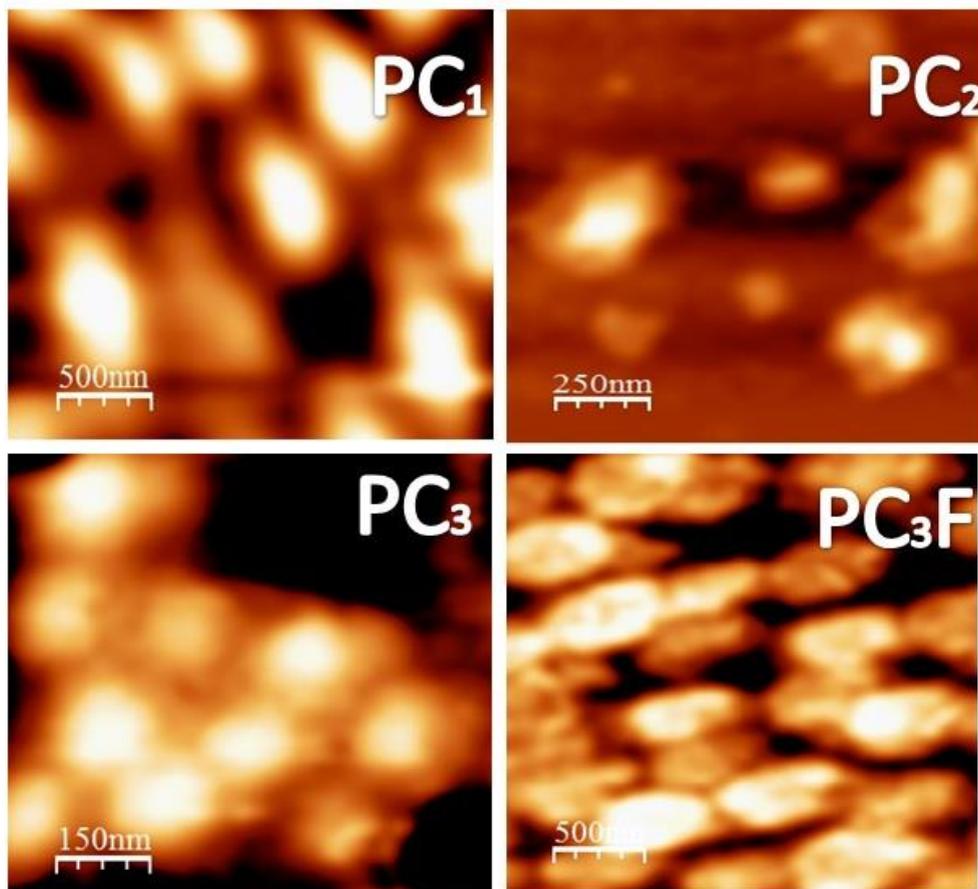


Figura 5.14. Imágenes de AFM de las muestras: PC₁, PC₂, PC₃ y PC₃F

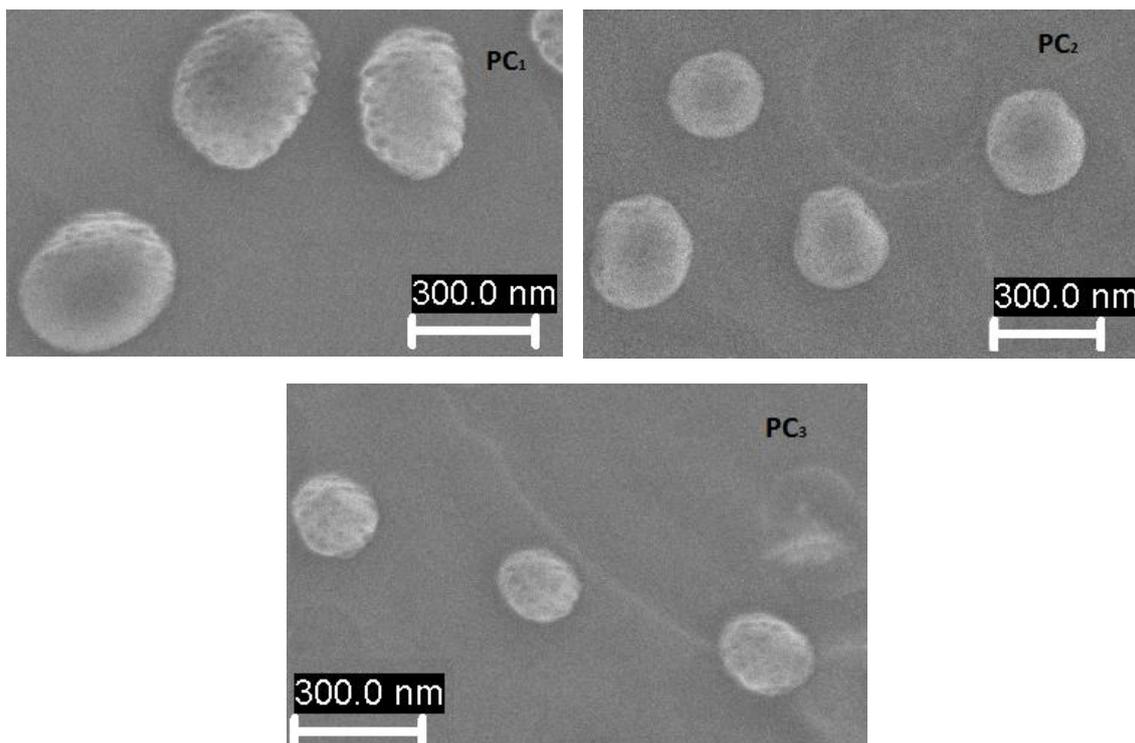


Figura 5.15. Imágenes de SEM de las muestras: PC₁, PC₂ y PC₃.

5.7 Estudio del efecto del pH sobre PC₂ y PC₃F

En este estudio, la evolución de diámetro hidrodinámico a pH diferente (3-7) se midió por DLS. PC₃F muestra, una disminución importante de diámetro hidrodinámico medida que el pH aumenta. El grado de protonación de los grupos amino libres juega un papel importante en el estado hinchado, la amina positiva a valores bajos de pH prom3ve repulsiones entre los grupos positivos desencadenantes incremento de tamaño del estado hinchado.

En la Figura 5.16, se observa un valor máximo de tamaño en el pH más bajo, 338 nm y 334 nm para PC₂ y PC₃F, respectivamente, mientras que el tamaño mínimo se observó a pH 7. La agregación de las nanopartículas se ve favorecida por este valor pH, este fenómeno es asociado al punto isoeléctrico de Quitosano. Como sabemos, la ausencia de carga podría conducir a la precipitación de nanopartículas.

Según los resultados obtenidos, es evidente la respuesta al pH de ambos sistemas (PC₂ y PC₃F). El tamaño depende en gran medida de la concentración de iones de hidrógeno; por lo tanto, promover condiciones ácidas incremento en

tamaño, mientras que las condiciones básicas determina la disminución en el tamaño y la estabilidad de las partículas.

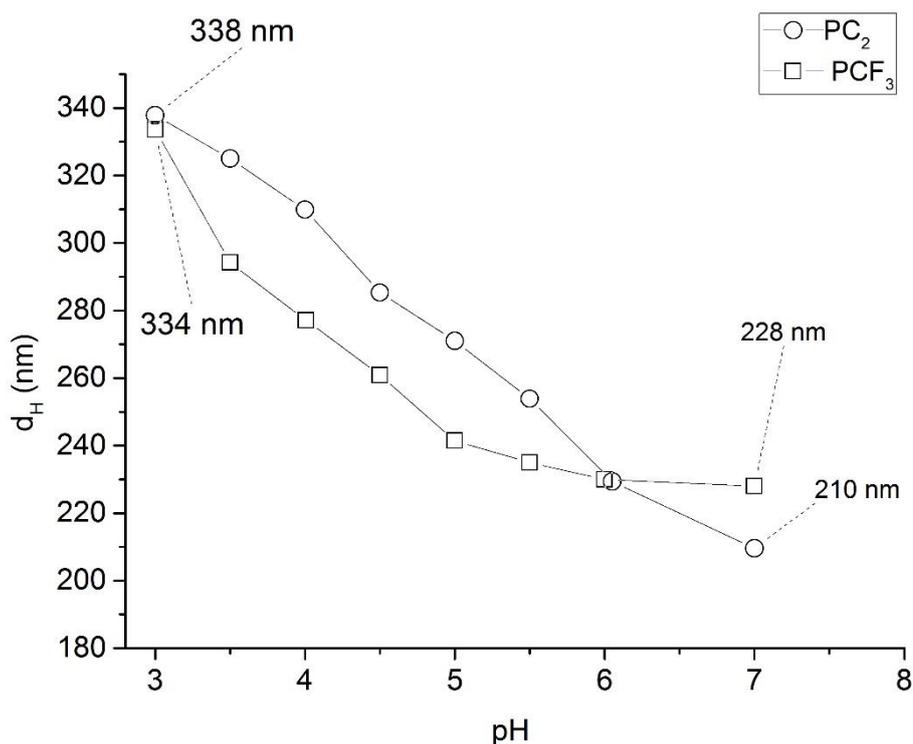


Figura 5.16. Grafica de d_H contra pH de las muestras PC₂ y PC₃F

5.8 Efecto citotóxico de PC₃F en las líneas celulares ARPE-19 y MDA-MB-231

El efecto de citotoxicidad de PC₃F se evaluó en el modelo in vitro con las líneas celulares humanas ARPE-19 (línea celular epitelial de pigmento de la retina humana) y MDA-MB-231 (línea celular de cáncer de mama) a temperatura fisiológica normal. Células de cáncer de mama y las células sanas se sembraron y se incubaron durante 48 horas en placas de 96 pocillos con las nanopartículas

y de referencia sin nanopartículas. La enzima NAD-(H) reduce el colorante de tetrazolio MTT en cristales de formazano. La sal se disolvió en alcohol isopropílico para las mediciones de UV-Vis a 570 nm. En la Figura 5.17, se observa un efecto citotóxico bajo en condiciones diluidas en las líneas celulares ARPE-19 y MDA-MB-231 ($1,25 \times 10^9$ NPs / ml); Sin embargo, como se aumenta la concentración de NP (8×10^9 NPs / ml), nos dimos cuenta de un ligero incremento de los efectos tóxicos de PC₃F en la línea MDA-MB-231.

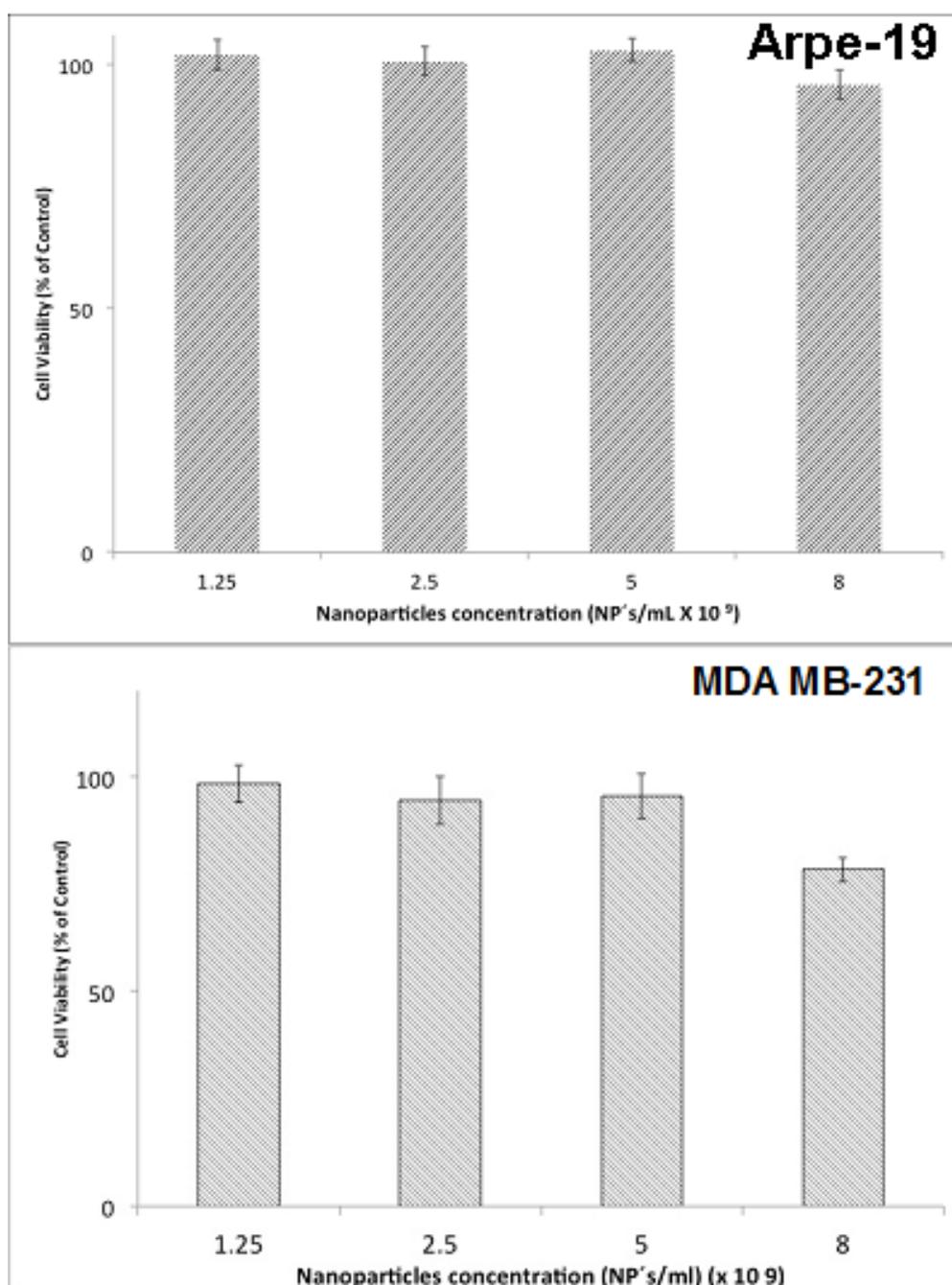


Figura 5.17. Viabilidad celular de PC₃F en las líneas celulares: Arpe-19 y MDA-MB-231.

5.9 Internalización de PC₃F en MDA-MB-231 de cáncer de mama y la línea celular ARPE-19

En vista de las propiedades mostradas por las partículas PC₃F, (tamaño, la morfología y fluorescencia), se analizó su rendimiento de internalización en las líneas celulares ARPE-19 y MDA-MB-231. En este estudio, hemos tratado de establecer la ruta de internalización por extinción de la fluorescencia externa, usando azul tripano como colorante para el núcleo celular.

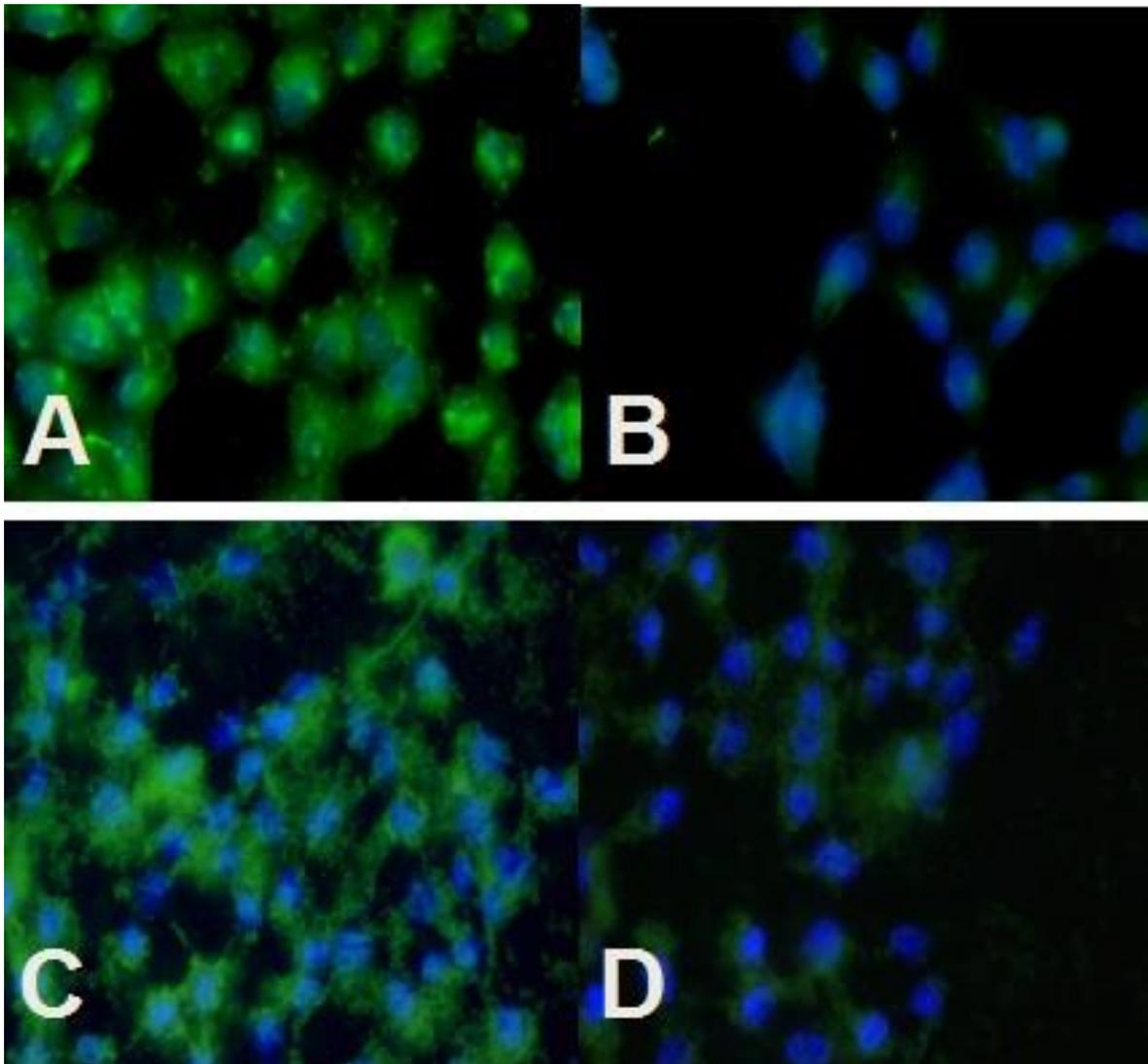


Figure 5.18. Imágenes de microscopio de fluorescencia of PC₃F en Arpe-19 A) PC₃F/ sin azul de tripano, B) PC₃F/con azul de tripano y MDA-MB-231 C) PC₃F/sin azul de tripano D) PC₃F/con azul de tripano.

Este método es capaz de diferenciar entre las partículas fluorescentes externas (adherido en la superficie de la membrana celular) de las partículas internalizadas. Como se puede observar a partir de la imagen de microscopía de fluorescencia correspondiente a nanopartículas PC₃F en Arpe 19 (Figura 5.18, A y B) y MDA-MB-231 (Figura 5.18 C y D), la imagen FL revela una señal fluorescente verde significativa. Este hecho sugiere que una alta concentración de nanopartículas PC₃F que han sido internalizadas en el citoplasma de las células cancerosas.

Capítulo VI - Conclusiones

En este trabajo, hemos preparado novedosas nanopartículas termo-pH sensibles y luminiscentes (PC₁, PC₂, PC₃ y PC₃F) el método de precipitación polimérica de radicales libres. Este método permite la preparación de nanopartículas estables y con morfología bien definida. Se estudió el efecto de la concentración de Quitosano en la morfología de las nanopartículas. Esta fue evaluada por AFM y SEM, se observó una morfología alargada para PC₁ a baja concentración de Quitosano y formas esféricas para la muestra con alta concentración de quitosano (PC₃).

En el estudio de capacidad de respuesta a cambios de temperatura se dio seguimiento a la evolución del diámetro hidrodinámico como una función de la temperatura, y se encontró que para las nanopartículas p-NIPAM las transiciones se producen desde 21 a 35°C. En la muestra PC₃F y PC₂F se observa una LCST de 34°C. Las muestras PC₃F y PC₃ expresan un cambio significativo en el rango de temperatura en el que los sistemas mostraban sensibilidad a la temperatura.

Por otra parte, hemos observado una fuerte dependencia de diámetro hidrodinámico con respecto al pH. Se ha observado una variación de estado hinchado a una concentración diferente de los iones de hidrógeno por la activación de grupos amino de quitosano.

De acuerdo con la caracterización de la forma y tamaño, se sugiere que la morfología bien definida de partículas PC₃F conduce a una mejor interacción con la membrana celular. La evaluación de internalización del modelo in vitro en células MDA-MB-231 demuestra que las NPs fluorescentes PC₃F son capaces de seguir un mecanismo de internalización en las líneas celulares de cáncer de mama. Aunque fue endocitada una concentración significativa de nanopartículas fluorescentes (PC₃F), la morfología de las células MDA-MB-231 se conservó sin cambios importantes.

Ensayos citotóxicos evidencia de que las nanopartículas PC₃F tienen una alta biocompatibilidad a concentración moderada.

La capacidad reversible de hinchamiento y colapso estos sistemas es potencialmente útil para el diseño de nuevas plataformas para los medicamentos de liberación controlada. Se sabe que las condiciones de pH y temperatura en algunos tipos de cáncer cambia de acuerdo a los mecanismos de proliferación específicos, por ejemplo, cáncer de colon (pH = 5, T = 36-37 °C) y cáncer de pulmón (pH = 6, T = 37 °C) . En este contexto, el control de la LCST de partículas de NC-PNIPAM amplían el alcance en la ingeniería de entrega de drogas en tipos específicos de cáncer.

En el análisis final, esta investigación proporciona nuevas nanopartículas derivadas de NIPAM con sensibilidad al pH y la temperatura. Estas nanopartículas son potencialmente útiles como sistema de administración de fármacos para los problemas quimioterapéuticos.

Bibliografía

1. Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications Arijit Gandhi, Abhijit Paul* , Suma Oommen Sen, Kalyan Kumar Sen. *asian journal of pharmaceutical sciences* 10 (2015) 99 e107
2. Schild HG. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog Polym Sci* 1992;17:163e249.
3. Shibayama M, Norisuye T, Nomura S. Cross-link density dependence of spatial inhomogeneities and dynamic fluctuations of poly(N-isopropylacrylamide) gels. *Macromolecules* 1996;29:8746e8750.
4. Horne R, Almeida JP, Day AF, et al. Macromolecular hydration and the effect of solutes on the cloud point of aqueous solutions of PVME. *Colloid Interface Sci* 1971;35:77e84.
5. Mikheeva LM, Grinberg NV, Mashkevich AY, et al. Microcalorimetric study of thermal cooperative transitions in poly(N-vinylcaprolactam) hydrogels. *Macromolecules* 1997;30:2693e2699.
6. Van Durme K, Verbrugghe S, Du Prez FE, et al. Influence of poly(ethylene oxide) grafts on kinetics of LCST behavior in aqueous poly(N-vinylcaprolactam) solutions and networks studied by modulated temperature DSC. *Macromolecules* 2004;37:1054e1061.
7. Makhaeva EE, Tenhu H, Khokhlov AR. Conformational changes of poly(vinylcaprolactam) macromolecules and their complexes with ionic surfactants in aqueous solution. *Macromolecules* 1998;31:6112e6118.
8. Fujishige S, Kubota K, Ando I. Phase transition of aqueous Solutions of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(Nisopropylmethacrylamide). *J Phys Chem* 1989;93:3311e3313.
9. Coughlan DC, Corrigan OI. Release kinetics of benzoic acid and its sodium salt from a series of poly(Nisopropylacrylamide) matrices with various percentage crosslinking. *J Pharm Sci* 2008;97:318e330.
10. Coughlan DC, Corrigan OI. Drug-polymer interactions and their effect on thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide) drug delivery systems. *Int J Pharm* 2006;313:163e174.

11. Jhon YK, Bhat RR, Jeong C, et al. Salt-induced depression of lower critical solution temperature in a surface-grafted neutral thermoresponsive polymer. *Macromol Rapid Commun* 2006;27:697e701.
12. Jones DS, Lorimer CP, McCoy CP, et al. Characterization of the physicochemical, antimicrobial, and drug release properties of thermoresponsive hydrogel copolymers designed for medical device applications. *J Biomed Mater Res Part B* 2008;85B:417e426.
13. Martellini F, Mei LHI, Balino JL, et al. Water and drug transport in radiation-crosslinked poly(2-methoxyethylacrylate-co-dimethyl acrylamide) and poly(2-methoxyethylacrylate-co-acrylamide) hydrogels. *Radiat Phys Chem* 2003;66:155e159.
14. Yoshida T, Aoyagi T, Kokufuta E, et al. Newly designed hydrogel with both sensitive thermoresponse and biodegradability. *J Polym Sci Part A* 2003;41:779e787
15. *Carbohydr Polym.* 2012. One-pot synthesis of poly(N-isopropylacrylamide)/chitosan composite microspheres via microemulsion. Gong Y1, Liu QL, Zhu AM, Zhang QG.
16. NANOMATERIALS HANDBOOK Published in 2006 by CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742 © 2006 by Taylor & Francis Group, LLC CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group Nanomaterials handbook / [edited by] Yuri Gogotsi.
17. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. | July 2004 | Nanoscience and nanotechnologies The Royal Society & The Royal Academy of Engineering
18. Lee SY. *Self-assembly and Nanotechnology: A Force Balance Approach.* Hoboken, New Jersey: Jon Wiley and Sons; 2008.
19. Lindsay SM. *Introduction to Nanoscience.* New York: Oxford University Press; 2010.
20. Cristina Buzea, Ivan Pacheco, and Kevin Robbie "Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity" *Biointerphases* 2 (1007)
21. <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/>.
22. Guozhong C. *Nanostructures and Nanomaterials.* London: Imperial College Press; 2007.

23. Rao CNR, Ramakrishna Matte HSS, Voggu R, Govindaraj A. Recent progress in the synthesis of inorganic nanoparticles. *Dalton Transactions*. 2012;41:5089-120.
24. Rao CNR, Cheetham AK. *Materials Science at the Nanoscale*. In: Gogotsi Y, editor. *Nanomaterials Handbook*. Boca Raton: Taylor and Francis Group; 2006.
25. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Accounts of Chemical Research*. 2008;41:1578-86.
26. Loo C, Hirsch L, Lee M-H, Chang E, West J, Halas N, et al. Gold nanoshell bioconjugates for molecular imaging in living cells. *Opt Lett*. 2005;30:1012-4.
27. Reynolds RA, Mirkin CA, Letsinger RL. Homogeneous, Nanoparticle-Based Quantitative Colorimetric Detection of Oligonucleotides. *Journal of the American Chemical Society*. 2000;122:3795-6.
28. Bardhan R, Grady NK, Cole JR, Joshi A, Halas NJ. Fluorescence Enhancement by Au Nanostructures: Nanoshells and Nanorods. *ACS Nano*. 2009; 3:744-52.
29. Jackson JB, Halas NJ. Surface-enhanced Raman scattering on tunable plasmonic nanoparticle substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101:17930-5.
30. El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer letters*. 2006;239:129-35.
31. Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y, Akiyama Y, Takahashi H, Kawano T, et al. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *Journal of Controlled Release*. 2006;114:343-7.
32. El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. *Nano Letters*. 2005;5:829-34.
33. Bardhan R, Chen W, Perez-Torres C, Bartels M, Huschka RM, Zhao LL, et al. Nanoshells with Targeted Simultaneous Enhancement of Magnetic and Optical Imaging and Photothermal Therapeutic Response. *Advanced Functional Materials*. 2009;19:3901-9.
34. Schmid G. *Nanoparticles: From Theory to Application*. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
35. Mahdavi A, Ferreira L, Sundback C, Nichol JW, Chan EP, Carter DJD, et al. Abiodegradable and biocompatible gecko-inspired tissue adhesive. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105:2307-12.

36. Bakr OM, Wunsch BH, Stellacci F. High-Yield Synthesis of Multi-Branched Urchin-Like Gold Nanoparticles. *Chemistry of Materials*. 2006;18:3297-301.
37. Doshi N, Mitragotri S. Designer Biomaterials for Nanomedicine. *Advanced Functional Materials*. 2009;19:3843-54.
38. Wu W, Hsiao SC, Carrico ZM, Francis MB. Genome-Free Viral Capsids as Multivalent Carriers for Taxol Delivery. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48:9493-7.
39. Dixit SK, Goicochea NL, Daniel M-C, Murali A, Bronstein L, De M, et al. Quantum Dot Encapsulation in Viral Capsids. *Nano Letters*. 2006;6:1993-9.
40. Nelson LD, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2008.
41. Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62:12-27.
42. Dachs GU, Dougherty GJ, Stratford IJ, Chaplin DJ. Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncology research*. 1997;9:313-25.
43. Friedmann T. Progress toward human gene therapy. *Science*. 1989;244:1275-81.
44. Fisher JE. Carbon Nanotubes: Structure and Properties. In: Gogotsi Y, editor. *Nanomaterials Handbook*. Boca Raton: Taylor & Francis; 2006.
45. Lacerda L, Bianco A, Prato M, Kostarelos K. Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58:1460-70.
46. Krueger A. New Carbon Materials: Biological Applications of Functionalized Nanodiamond Materials. *Chemistry – A European Journal*. 2008;14:1382-90.
47. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. 2001;70:1-20.
48. Bromberg L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. *Journal of Controlled Release*. 2008;128:99-112.
49. Klimov VI. *Nanocrystal Quantum Dots*. Los Alamos: Taylor and Francis Group;
50. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications

- in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Accounts of Chemical Research*. 2008;41:1578-86.
51. Dalhaimer P, Engler AJ, Parthasarathy R, Discher DE. Targeted Worm Micelles. *Biomacromolecules*. 2004;5:1714-9.
 52. Alexandridis P, Lindman B. Amphiphilic Block Copolymers: Self - assembly and Applications
 53. Zhang W, Shi Y, Chen Y, Hao J, Sha X, Fang X. The potential of Pluronic polymeric micelles encapsulated with paclitaxel for the treatment of melanoma using subcutaneous and pulmonary metastatic mice models. *Biomaterials*. 2011;32:5934-44.
 54. Verónica Lassalle, Mari´a Luja´n Ferreira. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. *Macromol. Biosci*. 2007, 7, 767–783
 55. Hirenkumar K. Makadia, Steven J. Siegel. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011, 3, 1377-1397
 56. Narayan Bhattarai, Jonathan Gunn, Miqin Zhang. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62 (2010) 83–99
 57. Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, Rouhani H, Atyabi F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:877-95.
 58. Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, Ma W, Chakravarthi SS, Amidon GL, et al. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(d,l-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Journal of Controlled Release*. 2003;92:173-87.
 59. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. 2001;70:1-20.
 60. Jia Y, Yuan M, Yuan H, Huang X, Sui X, Cui X, et al. Co-encapsulation of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:1697-708.
 61. Gómez, M. A.; Rivera, J. L.; Mendoza, A. M.; Robledo, J. G.; Díaz, N. P.; Terres, E. Degradación térmica y enzimática de redes poliméricas

- interpenetradas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2007, 8(5), 363-373.
62. Ahmed, S. E.; Martins, A. M.; Hussein, G. A. The use of ultrasound to release chemotherapeutic drugs from micelles and liposomes. *J. Drug Target*. 2015, 23, 16–42.
- 63.) Liu, J.; Debuigne, A.; Detrembleur, C.; Jérôme, C. Poly(Nvinylcaprolactam): A Thermoresponsive Macromolecule with Promising Future in Biomedical Field. *Adv. Healthcare Mater*. 2014, 3, 1941– 1968.
64. Chen, C.-J.; Jin, Q.; Liu, G.-Y.; Li, D.-D.; Wang, J.-L.; Ji, J. Reversibly light-responsive micelles constructed via a simple modification of hyperbranched polymers with chromophores. *Polymer* 2012, 53, 3695–3703.
65. Low Molecular-Weight Chitosan as a pH-Sensitive Stealth Coating for Tumor-Specific Drug Delivery. Zohreh Amoozgar, Joonyoung Park. 2012. American Chemical Society
66. Roy D., William L. A. Brooks and Brent S. Sumerlin, “New directions in thermoresponsive polymers” *Chem. Soc. Rev*, (2013), 42, 7214.
67. Kokardekar R., Shah K.V., Mody H.R., “PNIPAM Poly (N-isopropylacrylamide): A Thermoresponsive “Smart” Polymer in Novel Drug Delivery Systems” *International Journal of Medical Update*, (2012), 7, 59-62.
68. Deka S, Quarta A., Di Corato R, Riedinger A., “Magnetic nanobeads decorated by thermo-responsive PNIPAM shell as medical platforms for the efficient delivery of doxorubicin to tumour cell’s” *Nanoscale* (2011), 3, 219-229.
69. Gregory J, Cannell J, Kofron M, Yeghiazarian L, Nistor, “Functionalization of Hybrid Poly(n-isopropylacrylamide) Hydrogels for Escherichia coli Cell Capture via Adsorbed Intermediate Dye Molecule” *J. Appl Poly Sci*, (2015), 10, p 41557.
70. Sanchez, IC and Stone, MT, "Statistical Thermodynamics of Polymer Solutions and Blends" in *Polymer Blends Volume 1: Formulation*. Edited by D.R. Paul and C. B. Bucknall, 2000 John Wiley & Sons, Inc.

71. Jan Heyda, Sebastian Soll, Jiayin Yuan, and Joachim Dzubiella. Thermodynamic Description of the LCST of Charged Thermo-responsive Copolymers. *Macromolecules* 2014, 47, 2096–2102
72. Schild, H.G., Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, *Progress in Polymer Science*. 1992, 17, 163–249.
73. Afroze, F.; Nies, E.; Berghmans, H. Phase transitions in the system poly(N-isopropylacrylamide)/water and swelling behavior of the corresponding networks. *Journal of Molecular Structure*. 2000. 554. 55-68
29
74. Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, 61, 1, 83-99.
75. Kunzler F. "Hydrogels". En: *Encyclopedia of Polym. Sci. and Technol.* 2, John Wiley & Sons, Inc., 2002, p. 691-722.
76. Díez Peña E. Desarrollo y Caracterización de Hidrogeles Poliméricos con Aplicación en la Liberación Controlada de Fármacos, Tesis Doctoral. Madrid (España): Universidad Complutense de Madrid, 2002
77. Weia J, Caia J, Li Y, "Investigation of cell behaviors on thermo-responsive PNIPAM microgel films", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2015) 132, 202–207.
78. Khan A, Bisyrul M, Othman H, "Preparation, physicochemical and stability studies of chitosan-PNIPAM based responsive microgels under various pH and temperature conditions", *Iranian Polymer Journal*, April (2015) 24, 317-328.
79. Nazila Kamaly, Basit Yameen, Jun Wu, and Omid C. Farokhzad. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical reviews*, 2015
80. Uptake and Transfection with Polymeric Nanoparticles Are Dependent on Polymer End-Group Structure, but Largely Independent of Nanoparticle Physical and Chemical Properties. Joel C. Sunshine, Daniel Y. Peng, and Jordan J. Green. *Mol. Pharmaceutics*, 2012, 9 (11), pp 3375–3383
81. Honary S, Zahir F, "Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems" *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, (2013), 2, 255-264.

82. Active Intracellular Transport of Nanoparticles: Opportunity or Threat?. Henry Hess, and Yiider Tseng. ACSnano VOL. 1 ▪ NO. 5 ▪ 390–392 ▪ 2007
83. Wina K, Feng S, “Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of Polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs” *Biomaterials* ,(2005), 26, 2713 – 2722.
84. Kettler K, Veltman K, “Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type” *Environmental Toxicology and Chemistry*, (2014), 33, 481–492.
85. *The Cell*, 2nd edition A Molecular Approach. Geoffrey M Cooper. Boston University Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6
86. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. New York: Garland Science; 2002.
87. Mechanisms of polymer degradation and erosion. Achim Gijpferich. *Biomaterials* 17 (1996) 103-114
88. Effects of polymer degradation on drug release a mechanistic study of morphology and transport properties in 50:50 poly(d/-lactide-co-glycolide). L.K. Chiu, W.J. Chiu, Y.-L. Cheng. *International Journal of Pharmaceutics* 126 (1995) 169-178
89. Review Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. Frank Alexis. *Polym Int* 54:36–46 (2005)
90. Yamauchi H, Maeda Y, “LCST and UCST Behavior of Poly(N-isopropylacrylamide) in DMSO/Water Mixed Solvents Studied by IR and Micro-Raman Spectroscopy”, *J. Phys. Chem. B*, (2007), 111, 12964-12968.
91. D. Kuckling, H.J.P. Adler, K.F. Arndt, L. Ling, W.D. Habicher, *Macromol. Chem. Phys.* 201 (2000) 273.
92. T. Principi, C.C.E. Goh, R.C.W. Liu, F.M. Winnik, *Macromolecules* 33 (2000) 2958.
93. Estelrich, J. & Pons, M., La espectroscopía de correlación fotónica y sus aplicaciones, *Industria farmacéutica: Equipos, procesos y tecnología* 4, 81-86 (1991). ISSN 0213-5574.

94. Berne JB, Pecora R. Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics. Toronto: Dover Publications; 2000.
95. Schärfl W. Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticles Dispersions. Berlin: Springer; 2007.
96. Xu R. Particle characterization: light scattering methods. New York: Kluwer Academic Publisher; 2002.
97. Sperling LH. Introduction to Physical Polymer Science. New Jersey: Jon Wiley & Sons; 2006.
98. Malvern. Zetasizer Users Manual 2004
99. Swan JW, Furst EM. A simpler expression for Henry's function describing the electrophoretic mobility of spherical colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012;388:92-4.
100. Microscopio de Fuerza Atómica. Mary Cruz Reséndiz González y Jesús Castellón-Urbe. Encuentro de Investigación en Ingeniería Eléctrica Zacatecas, Zac, Marzo 17 —18, 2005.
101. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Lyman CE, Lifshin E, et al. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003.
102. van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. Principles of Physical Biochemistry. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall; 2006.
103. He BB. Two-dimensional X-Ray diffraction. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009.
104. Valeur B. Molecular fluorescence principles and application. Weinheim: WileyVCH; 2002.
105. Vedantham G, Sparks HG, Sane SU, Tzannis S, Przybycien TM. A Holistic Approach for Protein Secondary Structure Estimation from Infrared Spectra in H₂O Solutions. *Analytical Biochemistry*. 2000;285:33-49
106. Xiaobo H., Zhen T. Control of Poly(N-isopropylacrylamide) Microgel Network Structure by Precipitation Polymerization near the Lower Critical Solution Temperature, *Langmuir* 2011, 27, 4142-4148