

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Posgrado en Nanotecnología

Tesis

NANOPLATAFORMAS MULTIFUNCIONALES A BASE DE POLÍMEROS BIOCOMPATIBLES Y BIODEGRADABLES COMO AGENTES TERAGNÓSTICOS POTENCIALES

Que para obtener el grado de:

Doctor en Nanotecnología

Presenta:

Jaime Manuel Ibarra Hurtado

Director:

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias

Co-director

Dr. Pablo Taboada Antelo

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

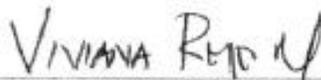
VOTOS APROBATORIOS

DR. MARIO ENRIQUE ÁLVAREZ RAMOS
Coordinador de Posgrado en Nanotecnología

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis de Doctorado: "Nanoplateformas multifuncionales a base de polímeros biocompatibles y biodegradables como agentes teragnósticos potenciales", presentada por:

Jaime Manuel Ibarra Hurtado

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 Doctorado en Nanotecnología:



DRA. VIVIANA REYES MARQUEZ



DRA. MARÍA GUADALUPE BURBOA
ZAZUETA



DR. JOSUÉ EFRAIM JUÁREZ ONOFRE



DR. MIGUEL ÁNGEL VALDÉS
COVARRUBIAS



DR. PABLO TABOADA ANTELO
(EXTERNO)

DEDICATORIA

A MI ESPOSA.

Olga Elisa Mendoza Valdez, Gracias por todo tu apoyo y tolerancia.

A MIS HIJOS.

Itzel, Ximena y Jaime son mis motores para seguir luchando.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer al Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias por todo su apoyo, consejos y su compromiso para poder culminar este proyecto. Estoy profundamente agradecido por sus atenciones tanto en lo académico como en lo personal.

De igual forma agradecer al Dr. Josué Elías Juárez Onofre por su amistad, su apoyo, consejos, disponibilidad y compromiso para realizar este trabajo.

Al Dr. Pablo Taboada Antelo, por sus atenciones y disponibilidad durante la estancia de investigación realizada en la Universidad de Santiago de Compostela.

A la Dra. Guadalupe Burboa por su apoyo y facilidades brindadas para el uso de sus laboratorios. Así mismo a la Dra. Viviana Reyes Márquez por sus contribuciones académicas en esta tesis.

A mi familia, padres, suegros y todas aquellas personas que siempre me han apoyado.

A la Universidad de Sonora, ya que nuevamente contribuyó en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto.

RESUMEN

En este trabajo se realizó la síntesis, caracterización y evaluación biológica de una nanoplataforma híbrida multifuncional que consiste en la co-encapsulación de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION) y el fármaco cisplatino en una matriz de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) modificada superficialmente con una mezcla de poli vinil alcohol (PVA)/quitosano. El trabajo se realizó en dos etapas, primeramente, las nanopartículas de magnetita fueron hidrofobizadas con ácido oleico y se encapsularon en una matriz de PLGA mediante el método de emulsión evaporación. Después de que se obtuvieron las nanopartículas de magnetita/PLGA estas fueron recubiertas utilizando diferentes concentraciones de quitosano. Los datos experimentales obtenidos a partir de dispersión dinámica de luz láser (DLS por sus siglas en inglés) y de calorimetría de titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés) mostraron que la interacción de las nanopartículas de PLGA-quitosano está regulada principalmente por fuerzas electrostáticas. A partir de los resultados obtenidos en el estudio calorimétrico y utilizando un modelo de sitios idénticos de unión, se determinó que el número de cadenas de quitosano por nanopartícula de PLGA es de aproximadamente 3.4. Este resultado se confirmó utilizando un modelo basado en la teoría de Darjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO por sus siglas en inglés) aplicado a los datos experimentales obtenidos por medidas de DLS de las nanopartículas de magnetita/ PLGA/quitosano. El número de moléculas de quitosano unidas a la superficie de cada nanopartícula de magnetita/PLGA obtenidas por este método fue de 3.6. a continuación, se evaluó el efecto de la carga superficial de las nanopartículas en un modelo de membrana de células endoteliales utilizando, para ello, una mezcla de tres fosfolípidos (1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina, fosfatidilserina y esfingomielina). La mezcla de fosfolípidos se depositó en la superficie de la subfase acuosa contenida en la balanza de Langmuir-Blodgett. Las isothermas y curvas de adsorción muestran que la superficie catiónica de las nanopartículas cargadas interactúa fuertemente con la mezcla de fosfolípidos (neutros o cargados negativamente). Estos resultados pueden ser la base de futuros estudios para comprender la interacción entre las nanopartículas y la membrana celular. En la segunda etapa del trabajo se incorporó el fármaco cisplatino en la nanoplataforma con la intención de obtener una nanoplataforma multifuncional. Las nanoplataformas mostraron carga superficial ligeramente positiva y formas esféricas, con

un diámetro promedio de 100 nm y baja polidispersidad. Este rango de tamaño sugiere que estas partículas son adecuadas para evitar el reconocimiento por parte de los macrófagos, permitiendo la explotación de la orientación pasiva del nanotransportador hacia células tumorales mediante el efecto de permeación y retención aumentada (EPR por sus siglas en inglés) y una interacción exitosa con las superficies de las membranas celulares que favorezcan su internalización. Las propiedades magnéticas y las imágenes obtenidas mediante ensayos *in vitro* de resonancia magnética de imagen (MRI por sus siglas en inglés) sugieren que la nanoplataforma puede ser utilizada como agente de contraste tipo T₂. Los perfiles de liberación *in vitro* de cisplatino mostraron una liberación inicial de aproximadamente el 16% en las primeras 6 horas de incubación, seguida de una liberación sostenida durante 10 días, lo que asegura una administración lenta del fármaco en el sitio de acción prolongando su actividad quimioterapéutica. Esto fue confirmado en los ensayos de citotoxicidad *in vitro* que indican que el efecto quimioterapéutico del cisplatino en las líneas celulares de cáncer cervical (HeLa) y cáncer de mama (MDA-MB-231) mejora en gran medida cuando el fármaco es encapsulado en la nanoplataforma en comparación con la administración del mismo en forma libre. Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que este nanosistema puede considerarse una prometedora nanoplataforma multifuncional con potenciales propiedades teragnósticas frente al cáncer.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	V
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	5
NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA.....	5
NANOMATERIALES.....	5
NANOMATERIALES MAGNÉTICOS.....	6
Propiedades magnéticas de NPs de óxidos de hierro.....	6
Síntesis de NPs superparamagnéticas de óxidos de hierro.....	10
Método de coprecipitación química.....	10
Aplicaciones de NPs superparamagnéticas.....	11
Hipertermia magnética.....	11
Administración de genes.....	12
Administración dirigida de fármacos.....	13
Agente de contraste por resonancia magnética de imagen (MRI).....	14
NANOMATERIALES POLIMÉRICOS.....	17
Polímeros sintéticos biodegradables.....	18
Polímeros naturales (biopolímeros).....	20
Síntesis de NPs de PLGA.....	22
Método de emulsión evaporación del solvente.....	22
Emulsión simple (aceite/agua).....	22
Emulsión doble (agua/aceite/agua).....	23
NPs SUPERPARAMAGNÉTICAS EN MATRICES DE PLGA.....	24

NANOPLATAFORMAS MULTIFUNCIONALES.....	25
CISPLATINO	26
Mecanismo de acción.....	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS.....	29
GENERAL.....	29
ESPECÍFICOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
MATERIALES PARA LA SÍNTESIS DE LA NANOPLATAFORMA.....	30
Síntesis de NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico.....	30
Preparación de NPs magnetita/PLGA.....	31
Determinación de número de partículas.....	31
Estabilización de NPs de magnetita/PLGA con quitosano.....	32
Determinación de la densidad de carga de quitosano.....	32
Termodinámica de formación de la nanoplateforma magnetita/PLGA/quitosano.....	32
Caracterización en las diferentes etapas de formulación de la nanoplateforma magnetita/PLGA/quitosano.....	33
Difracción de rayos X (XRD).....	33
Espectroscopia Raman.....	33
Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	33
Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	34
Microscopia de fuerza atómica (AFM)	34
Dispersión dinámica de luz (DLS)	34
Potencial ζ	35
Interacción de NPs con un modelo de membrana	35
Penetración de las NPs en monocapas.....	36
MATERIALES PARA LA CO-ENCAPSULACIÓN DE CISPLATINO Y NPs DE MAGNETITA EN LA NANOPLATAFORMA Y ENSAYOS CELULARES IN VITRO.....	36
Co-encapsulación de cisplatino y NPs de magnetita en la nanoplateforma.....	36
Determinación de cisplatino encapsulado en la nanoplateforma	37

Cinética de liberación de cisplatino a partir de cisplatino-MPNPs	38
Determinación de eficiencia de carga de NPs de magnetita.....	38
Susceptibilidad magnética (VSM) y resonancia magnética de imagen (MRI)	38
Ensayos citotóxicos in vitro en líneas celulares Arpe-19, MDA-MB-231 y HeLa	39
Modificación de nanoplataforma con isotiocianato de fluoresceína (FITC)	40
Internalización celular de FITC-MPNPs por células cancerosas	40
RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
SÍNTESIS DE LA NANOPLATAFORMA	41
Síntesis y caracterización de NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico	41
NPs de magnetita/PLGA.....	46
Estabilización de NPs de magnetita/PLGA con quitosano	49
Estudio termodinámico de la interacción NPs de PLGA-quitosano	53
Potencial ζ	56
Interacción de NPs con un modelo de membrana celular	59
Penetración de NPs en monocapas	61
CO-ENCAPSULACIÓN DE CISPLATINO Y NPs DE MAGNETITA EN LA NANOPLATAFORMA Y	
ENSAYOS CELULARES.	63
Caracterización fisicoquímica de co-encapsulamiento de NPs de magnetita y cisplatino	
en la nanoplataforma (cisplatino-MPNPs).....	63
Determinación de cisplatino en MPNPs y perfiles de liberación In-vitro.....	67
Caracterización de cisplatino-MPNPs como agente de contraste por MRI.....	70
Ensayos de internalización celular de FITC-MPNPs	71
Citotoxicidad de cisplatino-MPNPs en células MDA-MB-231 y células HeLa.	74
CONCLUSIONES	77
ANEXOS	78
REFERENCIAS.....	111

LISTA DE TABLAS

Tabla1	Resumen de las diferentes relaciones molares utilizadas en la preparación de NPs de magnetita/PLGA: Tamaño hidrodinámico, índice de polidispersidad y potencial ζ .	49
Tabla 2	Caracterización fisicoquímica de nanoplataformas MPNPs y cisplatino-MPNPs.	65
Tabla 3	Comparación de tamaño, potencial ζ y EE% de nuestras cisplatino-MPNPs con otras obtenidas por otros grupos de investigación.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática de la estructura cristalina del óxido de hierro magnetita (a) y el ordenamiento de spin de los átomos de Fe en dicha estructura, que le confiere un comportamiento ferrimagnético (b). Imagen adaptada de referencia [50].	7
Figura 2	Representación esquemática de comportamiento magnético en función del diámetro de partícula. Imagen adaptada de referencia [52].	9
Figura 3	Aplicaciones biomédicas de NPs superparamagnéticas, a) terapia por hipertermia magnética, b) administración de genes mediada por campos magnéticos (magnetofección), c) administración específica de fármacos y d) Agente de contraste por resonancia magnética de imagen. Imágenes tomadas de referencias [69][70], respectivamente.	13
Figura 4	Representación esquemática de los fundamentos de la técnica de resonancia magnética de imagen. Imagen tomada de referencia [73].	15
Figura 5	Estructura química del ácido poli (láctico-co-glicólico) y los monómeros que lo conforman. Imagen tomada de referencia [81].	18
Figura 6	Estructura química de quitina (a), monómero de quitosano (b) y estructura de quitosano parcialmente desacetilado. Imagen tomada de referencia [91].	21
Figura 7	Esquemización de los procesos de obtención de NPs mediante emulsión simple y doble emulsión. Imagen tomada de referencia [96].	24
Figura 8	Mecanismo de acción de cisplatino. Imagen tomada de referencia [107].	27
Figura 9	Patrón de difracción de NPs de magnetita.	41
Figura 10	Espectro Raman de NPs de magnetita.	42
Figura 11	Espectros FTIR de ácido oleico puro (a) y NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico (b).	44
Figura 12	Micrografías AFM y TEM de NPs magnetita recubiertas con ácido oleico.	45
Figura 13	Curvas de magnetización vs campo magnético de NPs de magnetita a 5 (a) y 300 K (b). Los recuadros muestran un aumento de la región bajo campo magnético. c) Curvas de ZFC y FC indicando la presencia de la temperatura de bloqueo TB.	46
Figura 14	Micrografías de TEM de las NPs de magnetita/PLGA sintetizadas a diferentes relaciones molares: a) NPs de puro PLGA, b) relación molar 1:1, c) relación molar 3:1 y d) relación molar 5:1.	48
Figura 15	Experimento de titulación conductimétrica para determinar la densidad de carga del quitosano.	50
Figura 16	Representación esquemática del proceso de protonación inducido por la titulación con HCl de la cadena de quitosano: a) quitosano insoluble con grupos amino desprotonados (puentes de hidrogeno); b) protonación parcial de grupos amino promovida por la adición de HCl; c) protonación total de grupos amino. Imagen tomada de referencia 52.	51
Figura 17	Comportamiento del diámetro hidrodinámico obtenidos por DLS e imágenes de AFM de NPs de magnetita/PLGA modificadas con diferentes concentraciones de quitosano. a) NPs de magnetita/PLGA sin quitosano, b) 1.66×10^{-8} M, c) 3.33×10^{-8} M, d) 2.66×10^{-7} M, e) 2.13×10^{-6} M y f) 3.33×10^{-6} M.	53
Figura 18	Calor integrado de la interacción entre nanopartículas de	55

	magnetita/PLGA y quitosano. La línea sólida representa el ajuste al modelo de un sitio de unión de los datos experimentales.	
Figura 19	Medidas de potencial ζ para NPs de magnetita/PLGA cubiertas con diferentes concentraciones de quitosano. La línea sólida representa el ajuste de la curva obtenido con un modelo teórico basado en la ecuación de Grahame.	58
Figura 20	Representación de número de cadenas por NP de magnetita/PLGA obtenidas (●) y mediante el modelo teórico utilizando la ecuación de Grahame (■)	59
Figura 21	Isotermas de presión superficial para monocapas extendidas y módulos de compresibilidad para NPs de magnetita/PLGA/quitosano con diferente carga superficial presentes en la subfase para un modelo de membrana constituido por una mezcla de fosfolípidos en la interfase aire-agua.	61
Figura 22	Isotermas de adsorción para NPs de magnetita/PLGA/quitosano con diferente carga superficial en un modelo de membrana compuesto por una mezcla de tres fosfolípidos en la interface aire-agua.	62
Figura 23	Variación del tamaño y potencial ζ de MPNPs formuladas con diferentes relaciones peso/volumen de PVA.	64
Figura 24	Caracterización de cisplatino-MPNPs a) micrografía SEM, b) micrografía TEM, c) curva de magnetización a 300 K y d) ZFC y FC.	67
Figura 25	Perfiles de liberación de cisplatino encapsulado en cisplatino-MPNPs a diferentes pH. Como control se muestra el perfil de liberación del cisplatino libre en el mismo experimento de diálisis.	69
Figura 26	Caracterización de las cisplatino-MPNPs como agente de contraste. a) Velocidad de relajación T2 en función de la concentración de Fe; b) Imágenes ponderadas en T2 de cisplatino-MPNPs en gel de agar en función de la concentración de Fe.	70
Figura 27	Imágenes de microscopía de fluorescencia demostrando la captación e internalización celular de las FITC-MPNP dentro de células MDA-MB-231. En todas las imágenes el núcleo celular fue teñido con DAPI (azul). a) Imagen de microscopía de campo brillante; b) Canal DAPI (canal azul, $\lambda= 355$ nm), c) Canal FITC (canal verde, $\lambda= 495$ nm); d) Canal BODIPY phalloidin (canal rojo, $\lambda= 633$ nm); e) imágenes superpuestas y f) reconstrucción 3D de secciones ópticas a lo largo del eje z. Barra de escala es 20 μ m.	72
Figura 28	Imágenes de microscopía de fluorescencia demostrando la captación e internalización celular de las FITC-MPNP dentro de células HeLa. En todas las imágenes el núcleo celular fue teñido con DAPI (azul). a) Imagen de microscopía de campo brillante; b) Canal DAPI (canal azul, $\lambda= 355$ nm), c) Canal FITC (canal verde, $\lambda= 495$ nm); d) Canal BODIPY phalloidin (canal rojo, $\lambda= 633$ nm); e) imágenes superpuestas y f) reconstrucción 3D de secciones ópticas a lo largo del eje z. Barra de escala es 20 μ m.	73
Figura 29	Citotoxicidad celular de MPNPs y cisplatino-MPNPs: a) MPNPs en células Arpe-19; b) cisplatino-MPNPs en células Hela; c) cisplatino-MPNPs en células MDA-MB-231 y d) citotoxicidad celular empleando cisplatino-MPNPs y concentraciones teóricas de cisplatino liberado a 48 h, en células Hela y MDA-MB-231.	76

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad la humanidad ha aprovechado los materiales de su entorno de acuerdo con sus necesidades [1]. En las últimas décadas, aparentemente a partir de la charla ofrecida por Richard P. Feynman en diciembre de 1959 en el encuentro de la *American Physical Society*, la ciencia ha dirigido su atención hacia materiales con dimensiones nanoscópicas, dando lugar al surgimiento de una gran variedad de materiales orgánicos e inorgánicos con dimensiones del orden de unos cientos de nanómetros con potenciales aplicaciones en diferentes áreas de la ciencia, muchos de ellos considerados materiales funcionales, es decir, con una función específica o bien materiales multifuncionales, capaces de realizar diversas funciones a la vez [2].

En la actualidad, la nanociencia es el área más dinámica en la búsqueda de nuevos materiales funcionales con aplicaciones en áreas como la alimentaria, textil, medicina, química, tecnologías de la información, electrónica y energía; debido a las novedosas propiedades que los materiales poseen cuando se encuentran en la escala nanoscópica (magnéticas, ópticas, mecánicas, térmicas, reológicas, catalíticas, etc.) [3–7]. Estas propiedades son producto de factores como el tamaño, forma y composición del material, por lo que las condiciones para la obtención de nuevos nanomateriales pueden ser manipuladas con el fin de diseñarlos de tal manera que ayuden a solucionar diversos problemas actuales de la humanidad.

Los nanomateriales funcionales para aplicaciones biomédicas y energéticas, sin lugar a duda, son la principal prioridad de la comunidad científica hoy en día. Específicamente para aplicaciones biomédicas se ha presentado un aumento significativo en el diseño y desarrollo de nanomateriales funcionales y multifuncionales como prometedoras herramientas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades [8–12]. La característica principal de estos materiales es su capacidad de exhibir cierta propiedad cuando se encuentran bajo la influencia de un determinado estímulo (pH, radiación, temperatura, etc.), realizando así acciones inteligentes y controladas [13,14].

Recientemente se ha intensificado el uso de materiales multifuncionales para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades como el cáncer, Alzheimer, artritis reumatoide, entre otras [15–18]. Dentro de estos materiales destacan aquellos que están constituidos por polímeros

biocompatibles y biodegradables, combinados con alguna sustancia activa (fármaco), material magnético o material luminiscente. Por ejemplo, nanopartículas (NPs) poliméricas obtenidas a partir de ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA), poli-caprolactona (PCL), ácido poli-láctico son investigadas ampliamente por la comunidad científica debido a su potencial uso en medicina como vectores de transporte y liberación controlada de fármacos [19,20].

Los sistemas de NPs basados en PLGA son de los más exitosos e interesantes sistemas coloidales. Sus principales ventajas son su capacidad para encapsular agentes terapéuticos, protegerlos, incrementar su estabilidad y liberarlos en el sitio específico conforme la matriz polimérica es degradada [21]. Sin embargo, la efectividad de estos sistemas puede ser mejorada por la encapsulación de otro material en su interior que ofrezca una funcionalidad adicional. En este sentido, las NPs magnéticas (magnetita) son de gran interés debido a sus propiedades superparamagnéticas, permitiendo su uso en aplicaciones biomédicas como hipertermia magnética y agente de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI) [19,22].

El cisplatino es un fármaco antineoplásico ampliamente utilizado, que exhibe actividad terapéutica contra varios tipos de cáncer, tales como: ovario, testicular, osteosarcoma, cuello, y pulmón [23,24]. Recientemente, se ha demostrado una alta eficiencia en el tratamiento de cáncer de mama [23–25], sin embargo, su alta actividad antitumoral es frecuentemente obstaculizada por indeseables efectos secundarios como nefrotoxicidad, neurotoxicidad y ototoxicidad [26,27]. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos sistemas de administración de fármacos capaces de distribuir el fármaco activo solo en el sitio de acción, sin afectar a las células y tejidos sanos localizados alrededor del sitio diana. En décadas recientes, se han reportado un gran número de trabajos respecto a la encapsulación de fármacos dentro de matrices de PLGA con la intención de obtener nanoplataformas multifuncionales para el tratamiento del cáncer.

Particularmente, la encapsulación individual de NPs magnéticas [22,28] o cisplatino [29–31] en NPs de PLGA mediante el método de emulsión evaporación ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, hay pocos trabajos que reporten la co-encapsulación de estos. Nejati *et al.* reportaron la síntesis de NPs de cisplatino-magnetita-PLGA-Polietilenglicol (PEG) observando que este sistema podría ser un buen vector de transporte y liberación

controlada de fármacos. Además, mediante ensayos *in-vitro* demostraron que el IC50 del cisplatino encapsulado en la nanoplateforma fue menor que el de cisplatino libre frente a células A549 de cáncer de pulmón.

Aunque las NPs de PLGA son ampliamente utilizadas para encapsular fármacos y otros tipos de nanomateriales, su carga superficial es un factor limitante, ya que los grupos carboxilo presentes en la superficie de las NPs proporcionan una carga superficial negativa, dificultando su interacción con las membranas de las células cancerosas (cargada negativamente) [32,33]. Por este motivo, recientemente, la tendencia está cambiando hacia el uso de polímeros naturales tales como, alginatos, celulosa, almidón o quitosano, entre otros [34–36].

En este trabajo primeramente se sintetizó una nanoplateforma híbrida constituida por NPs de magnetita incorporadas en una matriz de PLGA estabilizada con diferentes concentraciones de quitosano. El quitosano como polímero modificador de superficie se escogió para contrarrestar la limitación de la carga superficial presente en las NPs de PLGA, adquiriendo una carga superficial positiva una vez que fueron cubiertas con el quitosano. La nanoplateforma fue caracterizada en cuanto a su tamaño y forma mediante dispersión dinámica de luz, microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica de transmisión. La interacción de las NPs de PLGA-quitosano fue analizada mediante microcalorimetría de titulación isotérmica y experimentos de potencial ζ . Se realizó un modelo teórico basado en la ecuación de Grahame para analizar el comportamiento del potencial ζ para diferentes concentraciones de quitosano, llevándose a cabo una comparación de los resultados del análisis calorimétrico y potencial ζ para comprender la interacción quitosano-PLGA. Finalmente, considerando que la importancia de las interacciones biofísicas de las NPs con la membrana celular es crítica para desarrollar sistemas efectivos para el transporte y entrega de fármacos, se realizó un estudio de adsorción de NPs en un modelo de membrana celular compuesto por tres fosfolípidos.

Como parte complementaria del trabajo y una vez realizada la caracterización fisicoquímica de la nanoplateforma, se encapsuló cisplatino junto con las NPs magnéticas en el interior de NPs de PLGA con el fin de obtener una nanoplateforma multifuncional con propiedades teragnósticas. Además, se incorporó polivinil-alcohol (PVA) para estabilizar y modificar la

carga superficial de las mismas. A continuación, se determinaron el tamaño de partícula, carga superficial, capacidad de carga (cisplatino y NPs de magnetita), propiedades magnéticas y su potencial como agente de contraste T₂. Finalmente se determinó el efecto citotóxico del cisplatino encapsulado en la nanoplataforma en comparación con el efecto de cisplatino libre frente a células de cáncer cervical (Hela) y cáncer de mama (MDA-MB-231).

ANTECEDENTES

Nanociencia y Nanotecnología

La nanociencia y nanotecnología son áreas de investigación y desarrollo que tienen como objetivo principal controlar el comportamiento y la estructura fundamental de la materia a nivel atómico y molecular [37]. La nanociencia se encarga del estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, cuyas propiedades son significativamente diferentes a la de los mismos materiales en escalas mayores. Esta área involucra la parte teórica y experimental, y se ha convertido en un campo científico con entidad propia de la cual se desprende la nanotecnología, encargada del diseño, producción, caracterización y aplicación de estructuras y sistemas novedosos con tamaños nanométricos (nanomateriales) a partir de la manipulación y control de la materia en dimensiones menores a 500 nm [37,38].

Nanomateriales

Los nanomateriales son aquellos que tienen componentes estructurados con al menos una de sus dimensiones inferior a 100 nm. Estos pueden clasificarse como nanomateriales no intencionados o intencionados. Los primeros incluyen materiales de tamaño nanométrico que pertenecen naturalmente al medio ambiente como proteínas, virus, NPs producidas durante actividad volcánica, polvo interestelar, o bien aquellos que son producto de la actividad humana como las NPs producidas a partir de la combustión de combustibles fósiles. Por otro lado, los nanomateriales intencionados son producidos deliberadamente, y a medida que nuestra comprensión y capacidad para controlar su estructura mejore, se creará una gama de materiales con nuevas características, funciones y aplicaciones.

Los nanomateriales son de interés porque sus propiedades eléctricas, electrónicas, ópticas, térmicas, mecánicas o magnéticas, han abierto grandes esperanzas para diversas aplicaciones importantes y han redefinido y mejorado las eficiencias de los dispositivos generados a partir de ellas [39]. Estas propiedades emergentes tienen gran impacto, por ejemplo, en electrónica, optoelectrónica, procesamiento de información, catálisis, ciencia biomédica, ciencia ambiental, conversión y almacenamiento de energía, tecnologías avanzadas de defensa y muchos otros campos [40].

En los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de nanomateriales para aplicaciones biomédicas. En esta área, por ejemplo, destacan las NPs de óxidos de hierro debido a su excelente estabilidad química, nula toxicidad, biocompatibilidad, alta magnetización de saturación y alta susceptibilidad magnética, que les permite tener aplicaciones como transportadores de fármacos, en terapia por hipertermia magnética, bioimagen, etiquetado celular y entrega de genes [41]. Por otro lado, los nanomateriales basados en polímeros biocompatibles y biodegradables representan la clase de biomateriales más grande y versátil, con una creciente aplicación en áreas biomédicas que incluyen la liberación controlada de fármacos, imagen médica, medicina regenerativa e ingeniería de tejidos [42–44]. Debido a que este tipo de materiales son importantes para este trabajo, en las siguientes secciones hablaremos más sobre ellos, con un especial enfoque en sus aplicaciones biomédicas.

Nanomateriales magnéticos

Los nanomateriales magnéticos han llamado considerablemente la atención debido a sus potenciales aplicaciones en diferentes áreas tecnológicas. En particular, su posible aplicación en el área biomédica como agentes terapéuticos (por ejemplo, como agentes de hipertermia magnética) y de contraste por MRI ha provocado que la comunidad científica las vea como una alternativa para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer, Alzheimer y artritis reumatoide [45–47]. Para que las NPs magnéticas puedan ser útiles en aplicaciones biomédicas estas deben presentar un tamaño de partícula entre 1 y 100 nm (tamaño inferior a células, virus, genes y proteínas). Las NPs de óxidos de hierro son las más utilizadas debido a que son biocompatibles, de bajo coste y presentan propiedades superparamagnéticas en diferentes intensidades, dependiendo del óxido de hierro que se trate, ya sea, magnetita, α -hematita o γ -maghemita. Por otro lado, nanomateriales altamente magnéticos a base de cobalto y nickel son tóxicos, por lo tanto, son de poco interés en aplicaciones biomédicas [48]. En esta sección abordaremos el tema enfocándonos particularmente en NPs de óxido de hierro.

Propiedades magnéticas de NPs de óxidos de hierro

La magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) son los óxidos de hierro más utilizados en aplicaciones biomédicas [49]. La magnetita es un mineral magnético de color negro que se

encuentra disperso en rocas naturales, mientras que la maghemita es un mineral magnético café-rojizo, isoestructural a la magnetita, pero con vacantes catiónicas. Como la maghemita resulta de la oxidación de magnetita sus propiedades son muy similares y por lo tanto es muy difícil distinguirlas.

La magnetita contiene iones Fe^{2+} y Fe^{3+} dentro de una estructura de espinela inversa. La celda unitaria es cúbica centrada en las caras y cuenta con 32 aniones oxígeno, con un parámetro de red de 0.839 nm. Los iones Fe están localizados en 8 sitios tetraédricos (rodeados por 4 iones de oxígeno) y 16 sitios octaédricos (rodeados por 8 iones de oxígeno). En la figura 1 se observa como iones Fe^{3+} ocupan exclusivamente los sitios tetraédricos y los iones Fe^{3+} y Fe^{2+} ocupan alternadamente los sitios octaédricos [50]. Debido a esta organización la magnetita presenta un comportamiento ferrimagnético, donde todos los momentos magnéticos de los iones de Fe tetraédricos están alineados en una dirección específica, mientras que todos los momentos magnéticos de Fe octaédricos están alineados en la dirección opuesta. Debido a que existe el mismo número de iones Fe^{3+} octaédricos y tetraédricos, se compensan entre sí, por lo que el momento resultante de un cristal de magnetita surge sólo de los iones Fe^{2+} octaédricos descompensados.

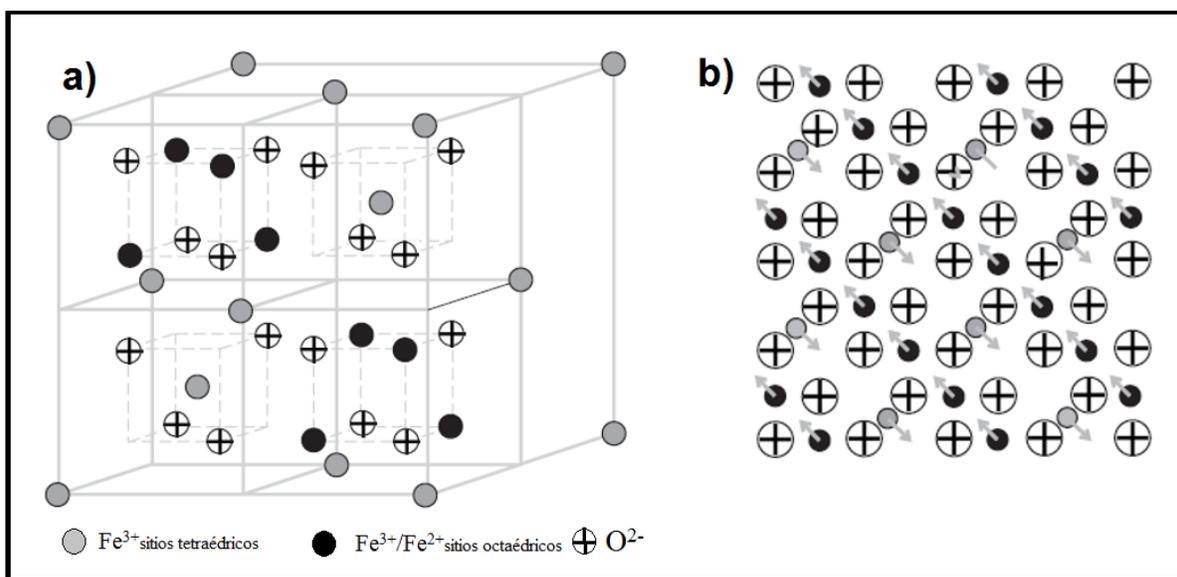


Figura 1. Representación esquemática de la estructura cristalina del óxido de hierro magnetita (a) y el ordenamiento de spin de los átomos de Fe en dicha estructura, que le confiere un comportamiento ferrimagnético (b). Imagen adaptado de referencia [50].

El momento magnético resultante de un cristal de magnetita (o maghemita) no se dirige arbitrariamente; está alineado preferentemente a lo largo de direcciones específicas, denominadas ejes de anisotropía. Estos ejes están determinados, principalmente, por el campo de anisotropía magneto-cristalina, que depende de la composición y la estructura cristalográfica del compuesto magnético. La energía de acoplamiento entre este campo y el momento magnético cristalino es mínima cuando el momento magnético se dirige a lo largo de algunas direcciones particulares. Por ejemplo, en el caso de la anisotropía uniaxial, sólo existen dos direcciones de anisotropía opuestas y la energía de acoplamiento simplemente depende del ángulo entre el momento magnético y este único eje de anisotropía [49–52].

Como se mencionó anteriormente, el comportamiento ferrimagnético aparece cuando el sistema no está compensado magnéticamente y, como resultado, presenta una magnetización de saturación, que en el caso de la magnetita de tamaño macroscópico posee un valor de 98 emu/g a 273 K [53]. Otro punto importante en el comportamiento magnético es la denominada temperatura de Curie, cuyo valor para la magnetita es de 850 K; sólo por debajo de esta temperatura se observa el comportamiento ferrimagnético; por encima de este valor se observa un comportamiento paramagnético [54].

Cuando se sintetizan materiales magnéticos que se encuentran en un rango inferior a 100 nm, estos presentan propiedades diferentes al mismo material en escala macroscópica. Para que esto ocurra, hay que tener en cuenta que en un sistema con respuesta magnética existe la denominada energía de anisotropía, la cual se define como la barrera que hay que superar para invertir los dipolos magnéticos del material [55,56]. La energía anisótropa del sistema está dada por el producto entre la constante de anisotropía, (K), y el volumen, (V), de la partícula. A medida que el volumen disminuye el producto KV será comparable con la energía térmica $K_B T$. Por lo tanto, como resultado de la disminución de tamaño, la energía puede sobrellevar la fuerza anisótropa y espontáneamente revertir la magnetización de una partícula desde una dirección preferencial a otra, incluso en la ausencia de un campo aplicado [50,52,57,58]. Si la anisotropía es cero, entonces el momento magnético de cada partícula puede apuntar en cualquier dirección y, de acuerdo a la teoría clásica la magnetización, puede ser descrita por la función de Langevin (ecuación 1) [57]:

$$M = Nm \left[\cot\left(\frac{mH}{K_B T}\right) - \frac{K_B T}{mH} \right] \quad (1)$$

$$M = Nm L(\alpha)$$

donde $\alpha = mH/K_B T$, $L(\alpha) = \cot(\alpha) - 1/\alpha$ (función de Legevin), $M \cong$ magnetización, $K_B \cong$ constante de Boltzmann, $T \cong$ temperatura y $H \cong$ campo magnético.

En términos generales, los cambios en las propiedades magnéticas se observan a medida que disminuye el diámetro de la partícula presentándose un cambio en la configuración de los espines magnéticos. Hay dos tamaños críticos considerados importantes en el comportamiento magnético de los nanomateriales, uno de ellos es el denominado tamaño de transición monodominio-multidominio (D_1) y el otro está relacionado con la transición del comportamiento ferrimagnético al superparamagnético (D_2) (ver figura 2). En el caso de partículas con tamaños por debajo de D_1 la energía necesaria para invertir el momento magnético es proporcional al volumen de la partícula, mientras que para partículas por debajo de D_2 , por encima de una temperatura determinada y en ausencia de un campo magnético externo, la energía térmica es superior a la energía de anisotropía, por lo que el momento magnético de las partículas se deslocaliza y el sistema entra en un estado superparamagnético.

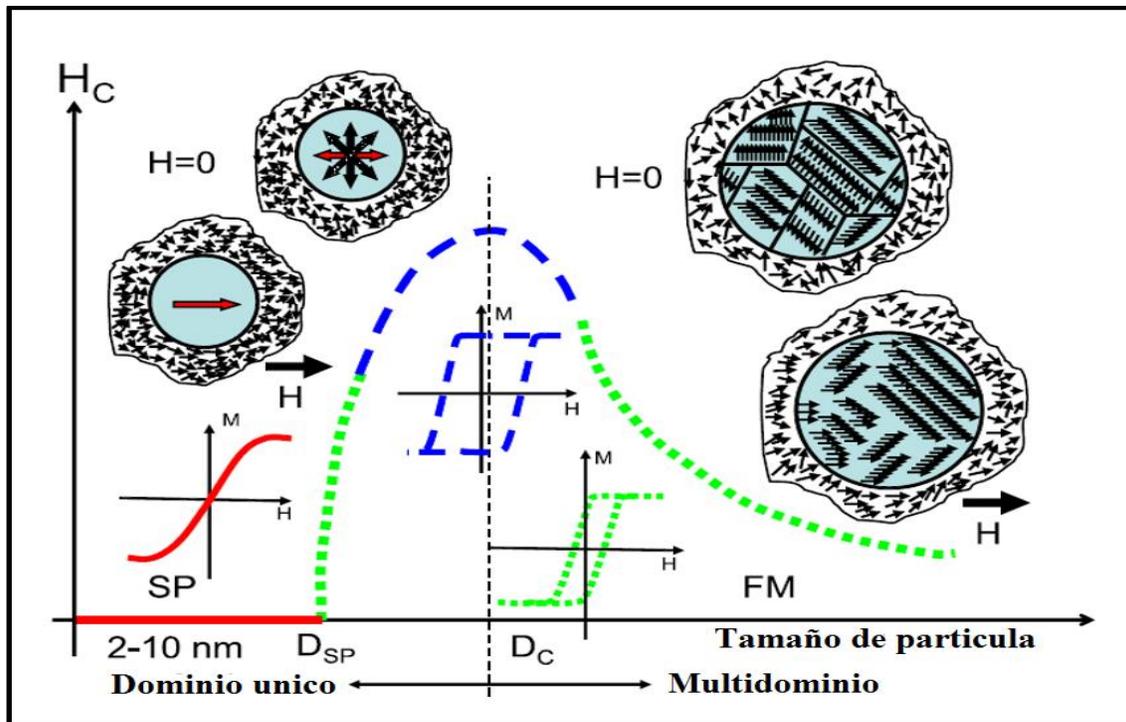


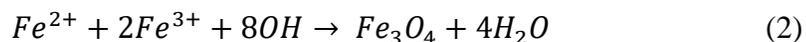
Figura 2. Representación esquemática de comportamiento magnético en función del diámetro de partícula. Imagen adaptada de referencia [52].

Síntesis de NPs superparamagnéticas de óxidos de hierro

Numerosos métodos químicos pueden usarse para sintetizar NPs magnéticas para aplicaciones biomédicas: síntesis en microemulsiones, sol-gel, reacciones sonoquímicas, reacciones hidrotermales, electro-pulverización y coprecipitación química. La síntesis de NPs superparamagnéticas es un proceso complejo debido a su naturaleza coloidal. El primer desafío químico consiste en definir las condiciones experimentales que lleven a una población monodispersa de granos magnéticos de tamaño adecuado. Estos métodos se han utilizado para preparar partículas con una composición homogénea y una distribución de tamaño estrecha. Sin embargo, el método más común para la producción de NPs de magnetita es la técnica de coprecipitación química de sales de hierro [59–61].

Método de coprecipitación química

Este método es probablemente la más simple y eficiente vía química para obtener NPs magnéticas. El método consiste en la mezcla de sales férricas y ferrosas con una relación molar 1:2 en una solución básica con pH entre 9 y 14. La reacción química en la formación de NPs de magnetita (Fe_3O_4) está dada en la ecuación 2:



Sin embargo, la magnetita (Fe_3O_4) no es muy estable y es sensible a la oxidación, transformándose en maghemita (γFe_2O_3). La reacción está representada en la ecuación 3:



Para evitar que las NPs de hierro se oxiden y se aglomeren, las NPs de magnetita usualmente son recubiertas con moléculas orgánicas o inorgánicas. Sin embargo, es un requisito importante realizar la síntesis de NPs bajo un ambiente libre de oxígeno, preferiblemente en presencia de N_2 . El burbujeo de gas nitrógeno no solo protege de la oxidación del aire sino que también reduce el tamaño [61]. El tamaño y la forma de las NP de óxido de hierro dependen del tipo de sal utilizada (como cloruros, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), la relación de iones férricos y ferrosos, la temperatura de reacción, el pH, fuerza iónica de los medios, así como otros parámetros de reacción (por ejemplo, velocidad de agitación, velocidad de caída de la solución básica, etc.) [62].

Este método de síntesis afecta significativamente las propiedades físicas y químicas de las partículas de óxido de hierro. En general, los valores de magnetización de saturación (M_s) encontrados en los materiales nanoestructurados suelen ser más pequeños que la fase volumétrica correspondiente, siempre y cuando no se produzca ningún cambio en las configuraciones iónicas. De acuerdo con esto, se ha obtenido que el valor experimental de M_s para las NPs de óxido de hierro está en el rango de 30-80 emu g⁻¹, menor que el valor de la magnetita en escala macroscópica [59,61,62].

Aplicaciones de NPs superparamagnéticas

Las NPs superparamagnéticas de óxidos de hierro, se han convertido en una herramienta popular para el tratamiento de cáncer e imagen molecular, debido a sus versátiles propiedades físicas y elevada biocompatibilidad [63]. El empleo de NPs superparamagnéticas como agentes terapéuticos se centra en su uso como agentes hipertérmicos bajo la acción de campos magnéticos alternos aplicados y como vehículos para la administración de genes y fármacos. A continuación, daremos una breve explicación de estas aplicaciones abordando más detalladamente el uso de NPs superparamagnéticas como agentes de contraste.

Hipertermia magnética.

La temperatura óptima de supervivencia de las células es de 37 °C, temperaturas más altas conducen a la pérdida de la función celular e incluso la muerte celular. La hipertermia magnética es una modalidad terapéutica local para el tratamiento del cáncer que se basa en el hecho de que las NPs magnéticas producen calor cuando se exponen a un campo magnético alterno (AMF por sus siglas en inglés). La terapia comprende la administración de NPs magnéticas en el tumor, seguida de una exposición al campo magnético alterno como se muestra en la figura 3a. Las células cancerosas cargadas con NPs magnéticas estarán sujetas a daños irreversibles a consecuencia de alcanzar temperaturas superiores a 42-43 °C. En 2005 se llevó a cabo el primer ensayo clínico en un paciente con un tumor prostático recurrente en el que se concluyó que la hipertermia magnética es una modalidad de tratamiento factible y bien tolerada [64]. Posteriormente, Ronny *et al.* realizaron un estudio utilizando una combinación de hipertermia magnética con radioterapia en 14 pacientes con cáncer cerebral (glioblastoma multiforme). La termoterapia con NPs

magnéticas fue bien tolerada por todos los pacientes con efectos secundarios menores o nulos. Se midieron temperaturas promedio intra-tumorales de 44.6 ° C (42.4-49.5 ° C), observándose signos de control local del tumor. Se concluyó que la terapia mediante hipertermia craneal profunda utilizando NPs magnéticas podía aplicarse con seguridad en pacientes con glioblastoma multiforme [65].

Administración de genes.

La terapia génica es una gran promesa para el tratamiento del cáncer pero sus aplicaciones clínicas se ven obstaculizadas debido a la entrega y expresión incontrolada de genes [66,67]. Los vectores virales se usan comúnmente en la terapia génica debido a su alta eficacia de administración, pero a menudo exhiben efectos secundarios no deseados, tales como la integración aleatoria e inmunogenicidad. Recientemente, el uso de NPs funcionales como portadores de un gen terapéutico ha recibido una atención creciente por su potencial para superar los problemas de toxicidad de la administración viral. Sherer *et al.* asociaron vectores de genes con NPs superparamagnéticas para la entrega de genes dirigidos mediante la aplicación de un campo magnético. Esto potenció la eficacia de cualquier vector hasta varios cientos de veces, permitiendo la reducción de la duración del suministro del gen a minutos. Más importante aún, la alta eficacia de transducción observada *in vitro* fue corroborada también *in vivo*, con transfección local guiada por campos magnéticos en el tracto gastrointestinal y en los vasos sanguíneos. Se concluyó que la magnetofección (transferencia génica asistida por campos magnéticos externos (figura 3b)) proporciona una herramienta novedosa de alto rendimiento para la detección de genes *in vitro* y puede ayudar a superar las limitaciones fundamentales de la terapia génica *in vivo* [67]. Por otro lado, Pardo *et al.* estudiaron la eficiencia de la transferencia génica en células gliales B92 utilizando NPs magnéticas complejadas con vectores génicos en presencia de un campo magnético externo. Las NPs magnéticas asociadas a adenovectores Rad-GFP (que expresa la proteína fluorescente verde GFP) o Rad-DsRed (que expresa la proteína fluorescente roja DsRed2) mostraron mejor eficiencia en la terapia génica en células cerebrales [68].

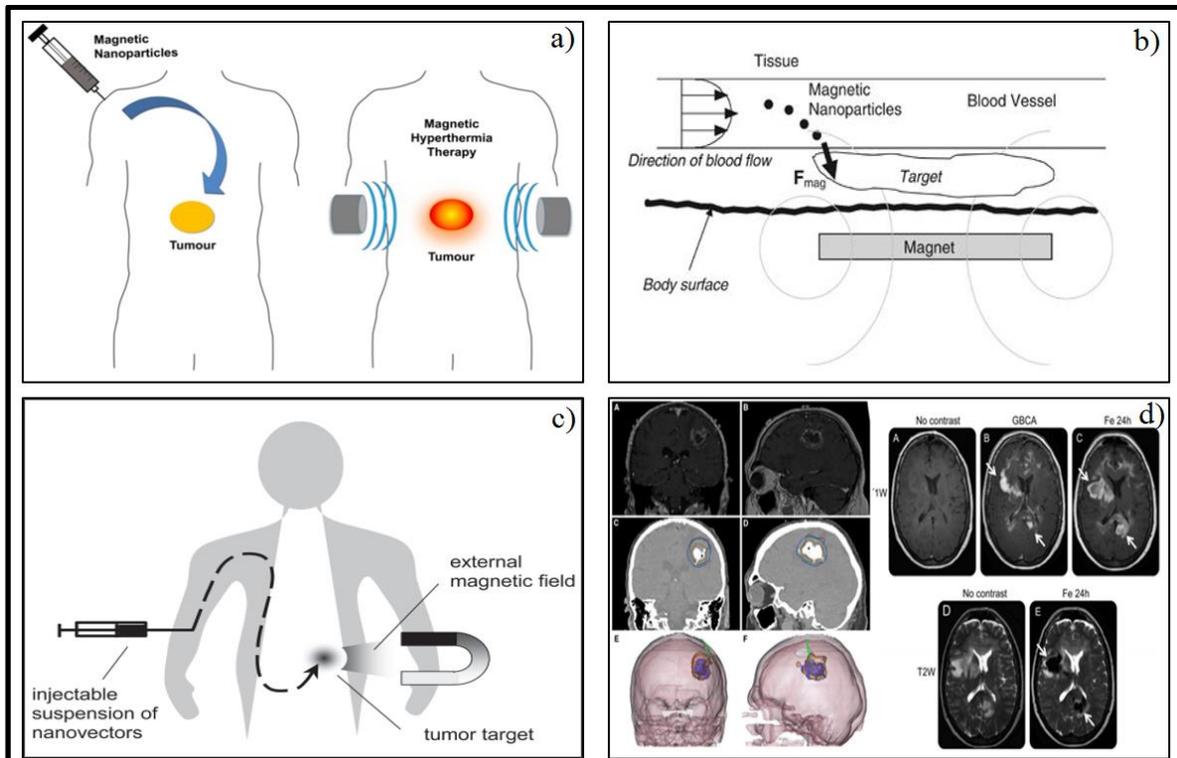


Figura 3. Aplicaciones biomédicas de NPs superparamagnéticas, a) terapia por hipertermia magnética, b) administración de genes mediada por campos magnéticos (magnetofección), c) administración específica de fármacos y d) Agente de contraste por resonancia magnética de imagen. Imágenes tomadas de referencias [69][70], respectivamente.

Administración dirigida de fármacos.

La quimioterapia tradicional se ha usado durante mucho tiempo para mejorar el pronóstico de los pacientes con cáncer, especialmente aquellos con metástasis. A pesar de sus muchos beneficios para los pacientes, algunas desventajas todavía están asociadas con el método tradicional, como la inespecificidad para las células malignas [63]. En estas circunstancias, el uso de NPs magnéticas como sistema de suministro de fármacos bajo la influencia de un campo magnético externo ha recibido mucha atención como consecuencia de su simplicidad, facilidad de preparación y capacidad de adaptar sus propiedades para aplicaciones biológicas específicas [71]. El principio del direccionamiento anticancerígeno magnético se muestra en la Figura 3c. por ejemplo es bien conocida la complejidad de direccionar sistemas de NPs a través de la barrera hematoencefálica y alcanzar tumores cerebrales; en este sentido las NPs magnéticas como sistemas administradores de fármacos pueden ser de gran ayuda. Liu *et al.* desarrollaron NPs de óxido de hierro (Fe_3O_4) encapsuladas dentro poli [anilina-co-sodio-N-(1-uno-acido butírico) anilina], con el agente

antineoplásico epirrubicina inmovilizado en su superficie. Este novedoso sistema de administración de fármacos magnéticos se dirigió al cerebro utilizando ultrasonidos focalizados y orientación magnética como un sistema de administración sinérgico. Tanto el ultrasonido como el campo magnético aplicado aumentaron activamente la concentración local de NPs. Sus resultados mostraron que los animales control no presentaban acumulación de NPs en la región tumoral incluso 6 h después de la administración. Sin embargo, al aplicar un campo magnético externo, las células tumorales absorbieron aproximadamente 15 veces más del rango terapéutico de epirrubicina por gramo de tejido [72].

Agente de contraste por resonancia magnética de imagen (MRI)

La resonancia magnética de imagen (MRI) se basa principalmente en la resonancia magnética nuclear de protones de hidrógeno extremadamente abundante en organismos vivos, especialmente en forma de agua. La figura 4 muestra el fundamento de esta técnica en la cual un fuerte campo magnético estático (en diagnóstico clínico normalmente se utiliza un campo magnético entre 1.5 y 3 T) se utiliza para alinear los momentos magnéticos nucleares de los protones, que luego se desvían selectivamente en el plano transversal por la aplicación de un pulso de radiofrecuencia (5-100 MHz). El tiempo necesario para que los momentos magnéticos vuelvan a la dirección longitudinal original del campo magnético estático se define como el tiempo de relajación. Se pueden considerar dos tiempos de relajación diferentes: T_1 , que corresponde a la recuperación longitudinal, y T_2 , que es la desintegración transversal. Ambos tiempos de relajación son la fuente de contraste en la RM y se caracterizan por las relajaciones r_1 ($1 / T_1$) y r_2 ($1 / T_2$) [50,73,74].

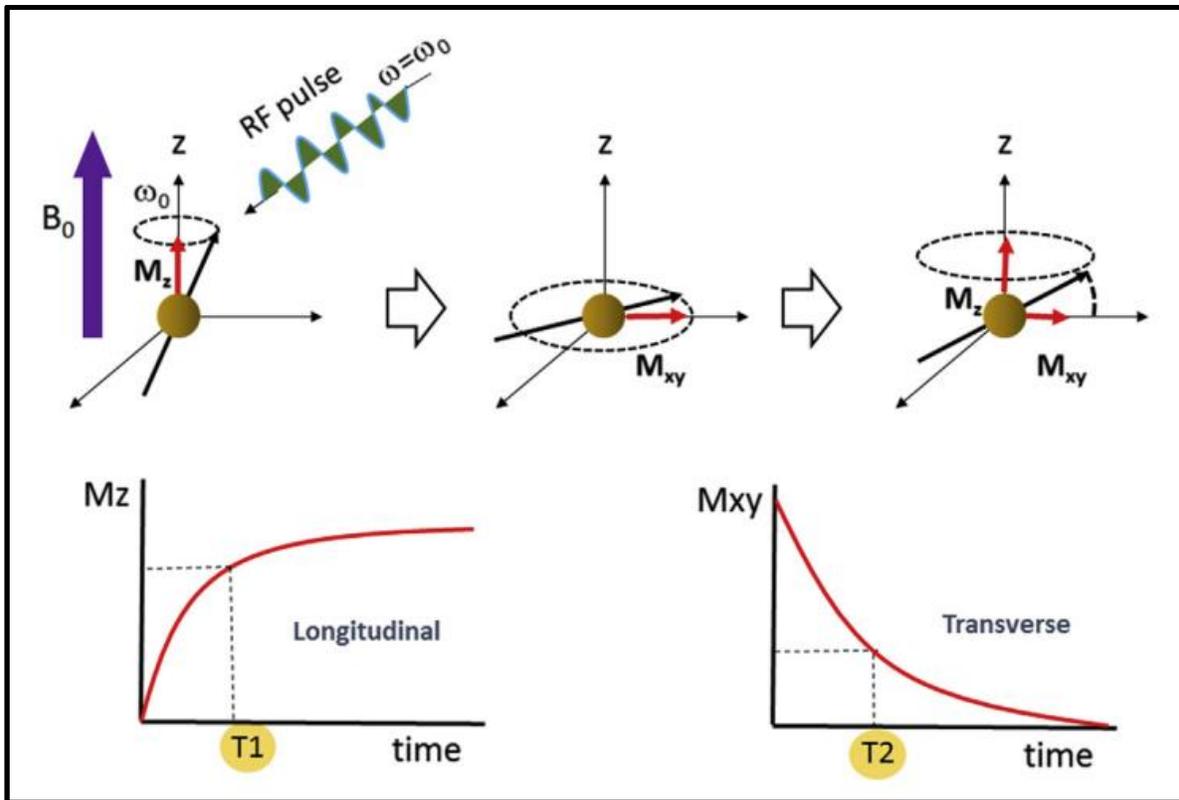


Figura 4. Representación esquemática de los fundamentos de la técnica de resonancia magnética de imagen. Imagen tomada de referencia [73].

La MRI se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas y poderosas para el diagnóstico clínico no invasivo debido a su alto grado de contraste en tejidos blandos, resolución espacial, y profundidad de penetración. Como ya se mencionó, la intensidad de la señal de MRI está relacionada con los tiempos de relajación (T_1 , relajación de espín-red y T_2 , relajación espín-espín) de los protones de agua *in vivo*. Para aumentar el contraste se administran compuestos magnéticos (agentes de contraste) antes del escaneo con el objetivo de acelerar la relajación del protón (ver figura 3d). El acortamiento de T_1 y T_2 aumenta las tasas de relajación correspondientes, r_1 y r_2 , produciendo señales hiperintensas e hipointensas en tiempos más cortos. Además, la relación señal/ruido se puede mejorar con la adquisición de un gran número de mediciones. Los agentes de contraste utilizados generalmente se basan en NPs de óxido de hierro o ferritas, proporcionando un contraste negativo en las imágenes ponderadas en T_2 , o complejos de metales lantánidos (que en su mayoría contienen iones de gadolinio (Gd)), que proporcionan un contraste positivo en las imágenes potenciadas en T_1 [73–75]. Sin embargo, agentes de contraste basados en Gd son

tóxicos, y su toxicidad básicamente depende de la estabilidad termodinámica y la cinética de disociación de los complejos formados. Además, permanecen en el organismo durante un período de tiempo más corto, lo que compromete la disponibilidad del paciente para el análisis y limita la duración del examen. Por estas razones, las NP de óxidos de hierro emergen como una alternativa a los quelatos convencionales de Gd [73].

Las NPs de óxidos de hierro se han utilizado como agentes de contraste T_2 durante más de 25 años. Dado que tanto la magnetita como la maghemita exhiben un comportamiento superparamagnético, la pérdida de su magnetización neta en ausencia de un campo magnético externo limita su tendencia a la auto-agregación, y esto ayuda a obtener una buena respuesta biológica [76]. Desafortunadamente, las omnipresentes fuerzas de Van der Waals inducen la agregación natural de las partículas y, para eludir este problema, existe una gran variedad de alternativas para estabilizar las partículas. Estas alternativas incluyen a los polímeros, que son los materiales estabilizantes más ampliamente utilizados, ya que se pueden adsorber o anclar en la superficie del óxido de hierro mediante enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas o unión pseudo covalente. Entre los materiales utilizados se incluyen PEG, dextrano y sus derivados, alginato, quitosano, almidón, PVA, albúmina, poli(etilenimina), siloxano orgánico, estireno-di-vinil-benceno sulfonato y PLGA. Este último lo abordaremos más adelante.

Recientemente, se han reportado una gran cantidad de trabajos utilizando NPs superparamagnéticas de óxido de hierro en aplicaciones *in vivo* como agente de contraste por MRI. Por ejemplo, Patel *et al.* sintetizaron NPs de magnetita@PLGA como agente de contraste por MRI. En sus ensayos *in vivo* aplicaron las NPs en hígados de conejo y sus resultados mostraron una mejora en el contraste después de la aplicación de las NPs, sugiriendo que las NPs localizadas en el hígado interactúan con los núcleos de hidrógeno a su alrededor y provocan el cambio en el tiempo de relajación [77]. Ding *et al.* prepararon NPs de óxido de hierro conjugadas con el anticuerpo anti-HER2 de cadena simple (scFv), como nuevos agentes de contraste por MRI dirigida al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2). Los ensayos los llevaron a cabo utilizando modelos murinos y los resultados revelaron la unión específica de las NPs al receptor HER2 expresado en las células tumorales, así como la capacidad de obtener imágenes de RM del

tumor *in vivo*. Así, las NPs conjugadas con el anti-HER2 pueden ser utilizadas como agente de contraste para el diagnóstico preoperatorio de tumores malignos [78]. Por otro lado, Chen *et al.* conjugaron NPs de óxido de hierro con el anticuerpo anti-CD3 (IOPC-CD3) con el propósito de construir un agente de contraste (MRI) dirigido a células T. La utilidad de IOPC-CD3 como agente de contraste fue evaluada *in vivo* en un modelo murino de artritis reumatoide inducida por colágeno tipo II. Sus resultados mostraron que IOPC-CD3 presentaban una alta relajación transversal, baja toxicidad celular y una alta eficiencia como marcador para células T. Las células T marcadas con IOPC-CD3 fueron detectadas en el modelo animal utilizando MRI, por lo tanto, se concluyó que las IOPC-CD3 pueden ser utilizadas como una sonda molecular para su uso en aplicaciones clínicas.

Como se mencionó anteriormente, las NPs de óxido de hierro tienen variedad de aplicaciones en biomedicina, sin embargo, muchas de las características que les confieren esa utilidad se ven afectadas cuando las NPs son cubiertas o encapsuladas en otros materiales. Debido a que este trabajo va dirigido al desarrollo de una nanoplataforma multifuncional y, por lo tanto, implica encapsular NPs de magnetita en una matriz polimérica, este tema es importante y se abordará más adelante.

Nanomateriales poliméricos

En la actualidad los nanomateriales a base de polímeros han sido ampliamente utilizados como sistemas liberadores de fármacos, en regeneración de tejidos y en herramientas de diagnóstico. El interés en este tipo de nanomateriales radica principalmente en dar solución a los problemas relacionados con la entrega controlada de fármacos [79]. Dependiendo de la ruta de administración (oral o parenteral) y la aplicación (transporte de fármacos o sistema de diagnóstico) los materiales utilizados para la formulación de las NPs deben cumplir ciertos requerimientos fisiológicos.

Los principales polímeros utilizados en la preparación de NPs con aplicación biológica se dividen en tres grupos: i) polímeros naturales (biopolímeros), polímeros sintéticos biodegradables (degradables por procesos químicos o biológicos en el organismo), y polímeros sintéticos no degradables [79].

Polímeros sintéticos biodegradables

En contraste con los polímeros naturales cuyo peso molecular y distribución dependen del procedimiento de extracción, los polímeros sintéticos pueden ser hechos a conveniencia. Sus propiedades fisicoquímicas pueden variar en un amplio intervalo, particularmente mediante copolimerización con monómeros funcionales apropiados. Además, utilizando técnicas de polimerización controlada, las características macromoleculares se pueden ajustar y se puede alcanzar una distribución de peso molecular estrecha (PDI). Entre los polímeros sintéticos para aplicaciones biológicas destacan los poliésteres alifáticos como el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), el copolímero ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), y la policaprolactona (PCL). Sin embargo, el PLGA tiene mayor preferencia por encima de sus monómeros PLA y PGA [80].

El PLGA es un copolímero lineal que puede ser preparado a diferentes relaciones entre los monómeros que lo componen, ácido láctico y glicólico (figura 5). Este es el polímero más comúnmente utilizado en la preparación de NPs con aplicaciones biomédicas debido a: i) su biocompatibilidad y biodegradabilidad; ii) su velocidad de biodegradación adaptada (según el peso molecular y la proporción de copolímeros); iii) está aprobado para su uso clínico en humanos por la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA por sus siglas en inglés); y iv) su potencial para modificar las propiedades de superficie para mejorar su interacción en aplicaciones biológicas [81].

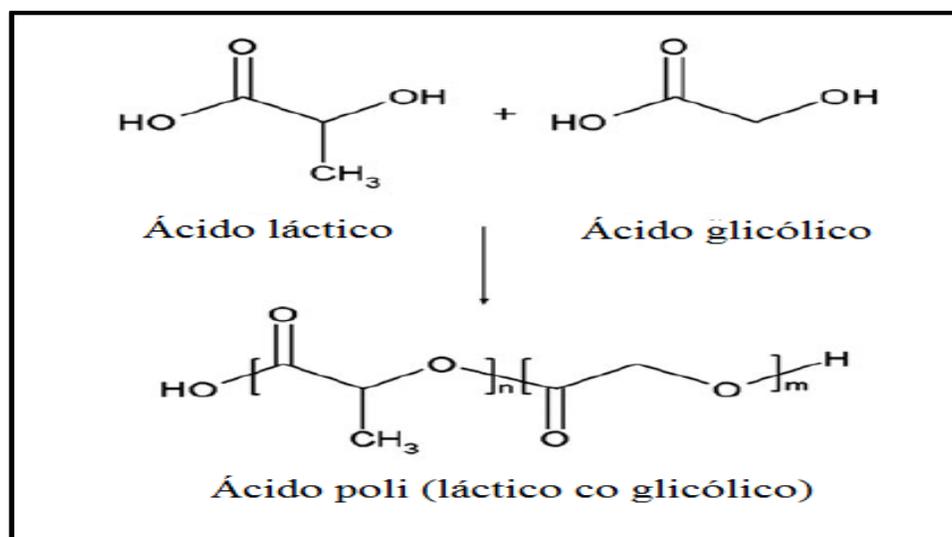


Figura 5. Estructura química del ácido poli (láctico-co-glicólico) y los monómeros que lo conforman. Imagen tomada de referencia [81].

El PLGA se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster en ambientes acuosos. En detalle, se pueden describir cuatro pasos durante su degradación: (i) hidratación: el agua penetra en la región amorfa e interrumpe las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno, causando una disminución en la temperatura de transición vítrea (la T_g está por encima de $37\text{ }^\circ\text{C}$); (ii) degradación inicial: escisión de enlaces covalentes, con una disminución en el peso molecular; (iii) degradación constante: los grupos terminales carboxílicos autocatalizan el proceso de degradación, y la pérdida de masa comienza por la escisión masiva de los enlaces covalentes de la cadena principal, dando como resultado la pérdida de integridad; (iv) solubilización: los fragmentos se dividen adicionalmente en moléculas que son solubles en el medio acuoso. Después de la degradación del PLGA, el ácido láctico y glicólico se forman como productos finales. Ambos ácidos son inocuos ya que se incorporan al ciclo de Krebs y se excretan en forma de dióxido de carbono y agua [80,81].

Las tasas de degradación pueden verse influenciadas por diferentes parámetros del polímero: (i) el peso molecular: aumentando el peso molecular de 10-20 a 100 kDa, las tasas de degradación varían de semanas a meses; (ii) la relación de ácido glicólico a láctico, con un mayor contenido de ácido láctico son menos hidrófilos, absorben menos agua y, por lo tanto, se degradan más lentamente, como consecuencia de la presencia de grupos laterales metilo en el ácido poliláctico que lo hace más hidrófobo que el ácido poliglicólico (una excepción a esta regla es el copolímero 50:50 que exhibe una degradación más rápida); (iii) estereoquímica: las mezclas de monómeros de ácido láctico D y L se usan con mayor frecuencia para la fabricación de PLGA, ya que la tasa de penetración de agua es mayor en las regiones D, L amorfas, lo que conduce a la degradación acelerada del PLGA; y (iv) funcionalización del grupo terminal: los polímeros que tienen un extremo limitado con ésteres (a diferencia del ácido carboxílico libre) presentan una degradación más prolongada [81].

Recientes investigaciones han utilizado los grupos terminales carboxilo libres en la superficie de NPs de PLGA para realizar modificaciones físicas y químicas para modular su velocidad de degradación o sus velocidades de liberación para la administración de fármacos. Entre una amplia gama de modificaciones de PLGA, se ha investigado la interacción electrostática entre el grupo terminal carboxilo del PLGA con grupos amina

presentes en el biopolímero quitosano con la intención de solucionar la principal limitación para una interacción efectiva de las NPs de PLGA con la membrana celular y, con ello, obtener nanoplataformas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer [82–87].

Polímeros naturales (biopolímeros)

Los polisacáridos representan el grupo más importante de polímeros naturales [88,89]. Polímeros biocompatibles como el quitosano, dextrano y el ácido hialurónico se han utilizado en la modificación de superficies de NPs con el fin de mejorar sus funciones en la actividad biológica [27,82,90].

El quitosano es un biopolímero formado por glucosaminas y N-acetil glucosamina. Se obtiene a partir de la desacetilación parcial de la quitina, un polisacárido natural encontrado principalmente en los crustáceos (ver figura 6) [91]. Debido a la naturaleza policationica del quitosano, este se ha utilizado en gran medida ya sea para la formulación de NPs o como recubrimiento de estas, facilitando su administración al tracto gastrointestinal, o por vía nasal, ocular, bucal y vaginal. La fuerte mucoadhesión del quitosano puede explicarse por las interacciones iónicas entre esta molécula policationica y las subestructuras aniónicas, tales como restos de ácido siálico en la mucosa. Además de sus propiedades mucoadhesivas, el quitosano muestra baja toxicidad, degradabilidad por enzimas como la quitinasa y la lisozima, propiedades anticoagulantes, y actividad antibacteriana y antifúngica. También se ha demostrado que es un promotor de la curación de heridas en el campo de la cirugía [82,88,89,92].

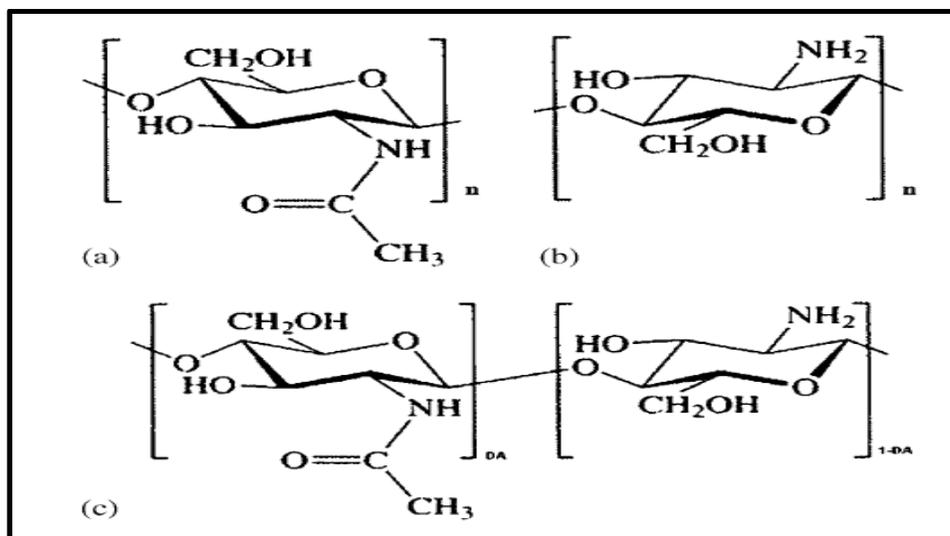


Figura 6. Estructura química de quitina (a), monómero de quitosano (b) y estructura de quitosano parcialmente desacetilado. Imagen tomada de referencia [91].

Como se mencionó anteriormente, el quitosano se ha utilizado ampliamente en la modificación superficial de NPs con la finalidad de resolver principalmente problemas de biocompatibilidad. Chronopoulou *et al.* sintetizaron NPs de PLGA cargadas con dexametasona modificadas superficialmente con quitosano, observando un cambio en la carga superficial de las NPs de PLGA, de negativa a positiva, asociado a la adsorción de quitosano en la superficie de las NPs sin cambio aparente del tamaño de partícula. También investigaron el efecto de la presencia de quitosano en los perfiles de liberación *in vitro* del fármaco, donde encontraron que la presencia de quitosano prolonga la liberación del fármaco hasta 7 días a diferencia de las NPs de PLGA sin recubrimiento que lo liberan en 2 horas [87]. Por otro lado, Guo *et al.* encapsularon el fármaco 7-etil-10-hidroxicamptotecina en NPs de PLGA modificadas superficialmente con quitosano. Sus resultados de estudios *in situ* de perfusión intestinal de un solo paso (SPIP) indicaron una mejora en la absorción del fármaco como resultado del efecto sinérgico entre el quitosano y el PLGA sobre la inhibición de la P-glicoproteína (Pgp). Las NPs mostraron una captación celular alta y un eflujo bajo para los fármacos en células de adenocarcinoma colorrectal (Caco-2). Los estudios de citotoxicidad revelaron que las NP de PLGA cubiertas con quitosano tenían un efecto transitorio sobre la integridad de la membrana, pero que no tenían influencia sobre la viabilidad celular. Por lo tanto, concluyeron que las NPs de PLGA cubiertas con quitosano

serían una opción viable como portadores inteligentes para la administración oral de agentes antineoplásicos [83].

Síntesis de NPs de PLGA

Como se mencionó anteriormente, el PLGA en forma de NPs ha llamado la atención para aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, capacidad para proteger fármacos contra la degradación, viabilidad para conseguir una liberación sostenida, posibilidad de modificaciones superficiales para conseguir interacciones biológicas efectivas, enfoques de síntesis de acuerdo con varios tipos de fármacos (por ejemplo moléculas pequeñas o macromoléculas hidrofílicas o hidrófobas) y la posibilidad de dirigirse a órganos o células específicos [93].

Los métodos para la obtención de NPs de PLGA se pueden dividir en 2 clases: técnicas *bottom-up* (de abajo hacia arriba) y *top-down* (de arriba hacia abajo). Las técnicas *bottom-up*, incluyen el proceso de polimerización a partir de un monómero como punto de partida, mientras que las técnicas de emulsión evaporación, emulsión difusión, nanoprecipitación y salting-out son técnicas *top-down*, donde las NPs se forman a partir de polímeros ya fabricados [94].

Método de emulsión evaporación del solvente

El método de emulsión evaporación es el más utilizado para la formulación de NPs de PLGA y se divide en las metodologías de emulsión simple y doble (figura 7).

Emulsión simple (aceite/agua)

Este método es utilizado comúnmente para encapsular compuestos hidrofóbicos. Se basa en la emulsificación de una disolución orgánica que contiene el polímero y el componente activo en una fase acuosa, seguido por la evaporación del disolvente. Se pueden utilizar surfactantes como el PVA, SDS o Pluronic en la fase acuosa para ayudar a la estabilización de las NPs formadas. La reducción de tamaño de las gotas emulsionadas se realiza por medio de agitación, sonicación o microfluidización [94]. El proceso de evaporación se requiere para eliminar el disolvente orgánico presente en la fase orgánica, conduciendo a la precipitación del polímero en forma de NPs con un diámetro en el rango de unos cientos de nanómetros.

Los parámetros a considerar al utilizar este método de síntesis son: el peso molecular y concentración del polímero, la relación de copolímeros y grupos terminales, la naturaleza del surfactante, la relación volumétrica de las fases, la naturaleza del solvente, la velocidad de evaporación, la capacidad de atrapamiento del fármaco, el estrés cortante y la esterilización [94].

Emulsión doble (agua/aceite/agua)

La técnica de doble emulsión es ampliamente utilizada para encapsular fármacos hidrofílicos, péptidos y proteínas. El primer paso del método de doble emulsión es la formación de una emulsión agua/aceite, donde la disolución acuosa contiene el componente activo y es añadida a una fase orgánica que contiene el PLGA. La emulsión es llevada a cabo bajo fuerte estrés cortante por medio de sonicación, microfluidización o altas velocidades de homogenización. Posteriormente, la emulsión agua/aceite es añadida a una fase acuosa que contiene PVA como emulsificante, formándose la doble emulsión agua/aceite/agua. Finalmente, la emulsión es sometida al proceso de evaporación del disolvente [95].

El principal inconveniente del método de doble emulsión es el gran tamaño de las NPs formadas y la fuga del componente activo hidrófilo, responsable de las bajas eficiencias de atrapamiento. La coalescencia y la maduración de Oswald son los dos mecanismos importantes que desestabilizan las gotas de la emulsión doble, mientras que, la difusión a través de la fase orgánica del componente activo hidrófilo, es el principal responsable de los bajos niveles de componente activo atrapado [94,95].

Los parámetros importantes a considerar en este proceso sintético son: la relación polímero/agente surfactante, la concentración de polímero, la naturaleza del agente surfactante, la viscosidad, la naturaleza del disolvente, el esfuerzo cortante, la evaporación, los aditivos y las relaciones de primera fase/segunda fase [94].

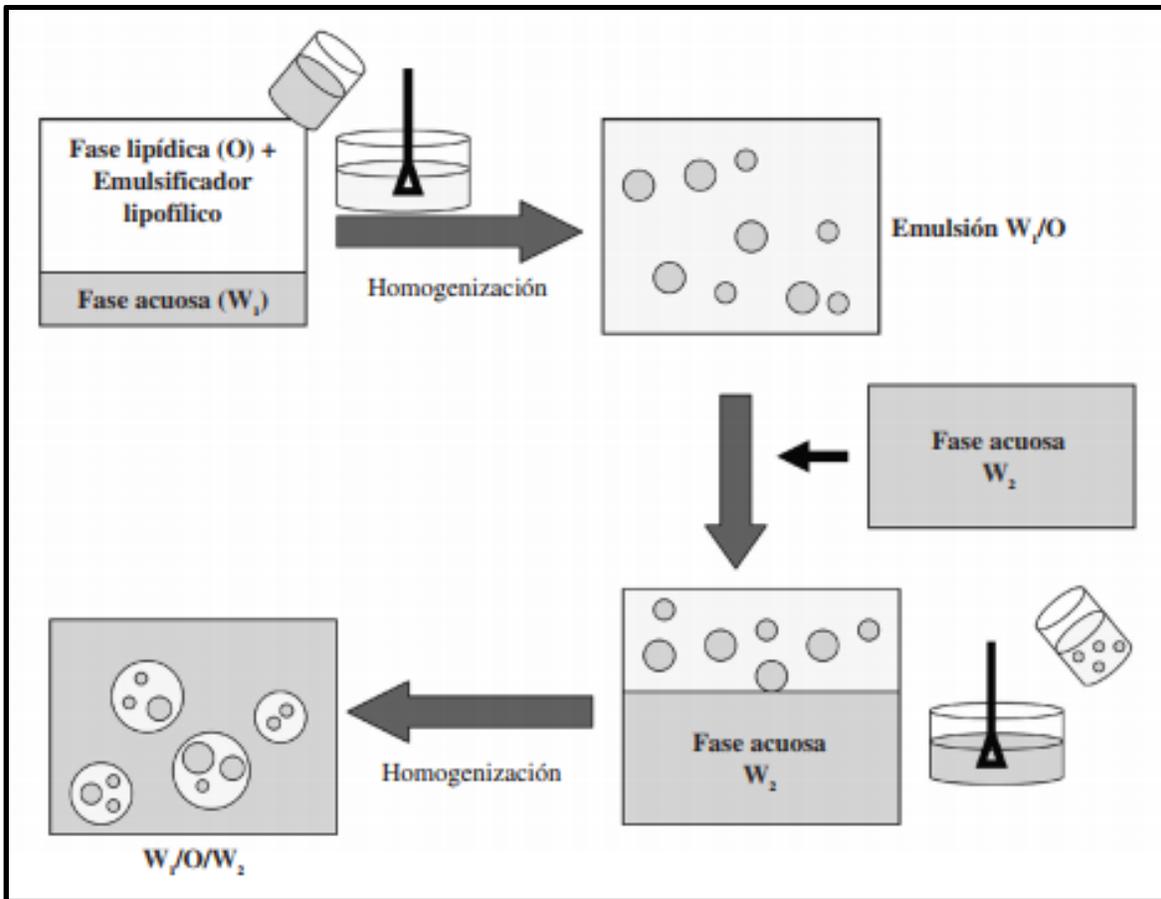


Figura 7. Esquematación de los procesos de obtención de NPs mediante emulsión simple y doble emulsión. Imagen tomada de referencia [96].

NPs superparamagnéticas en matrices de PLGA

Como se mencionó anteriormente, las NPs superparamagnéticas de óxido de hierro y PLGA son ampliamente utilizadas en aplicaciones biomédicas como agentes de contraste y sistemas de liberación controlada de fármacos. Una gran cantidad de trabajos sobre la encapsulación de NPs superparamagnéticas dentro de NPs de PLGA han sido previamente reportados [20,22,28,97–99]. Algunos dirigidos hacia el diagnóstico y otros hacia la terapia de enfermedades tales como el cáncer.

Como el PLGA tiene la capacidad de encapsular compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos mediante los métodos de emulsión simple o doble, por lo tanto, es relativamente fácil encapsular NPs superparamagnéticas hidrofóbicas en su interior ya que estas presentan tamaños de partícula de menos de un par de decenas de nanómetros. Por ejemplo, Lee *et al.* prepararon NPs superparamagnéticas de óxidos de hierro encapsuladas dentro de NPs de

PLGA. En este trabajo, estos investigadores reportaron la formulación de tres tamaños diferentes de NPs de PLGA, y encontraron que la susceptibilidad magnética de estas incrementaba conforme disminuía el tamaño de las NPs, asociando este comportamiento al aumento de la fracción volumen de NPs superparamagnéticas conforme se reduce el tamaño de las NPs de PLGA [100]. Por otro lado, Wassel *et al.* sintetizaron NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico y las encapsularon dentro de NPs de PLGA utilizando la técnica de emulsión doble. Las NPs híbridas obtenidas mostraron una disminución en la saturación magnética con respecto a las NPs magnéticas puras; sin embargo, el valor obtenido estuvo por encima de los reportados previamente por otros autores, lo que permitiría su uso como agente de contraste [101].

Nanoplataformas multifuncionales

Recientemente, se han desarrollado sistemas de NPs poliméricas combinadas con otros tipos de materiales, tales como, NPs magnéticas, marcadores fluorescentes, fármacos y moléculas específicas con la intención de expandir sus capacidades y producir lo que hoy en día se conocen como nanoplataformas multifuncionales. La co-encapsulación de NPs superparamagnéticas y fármacos dentro de NPs de PLGA modificadas con biopolímeros o marcadores específicos ha despertado el interés de la comunidad científica, ya que este tipo de nanoplataformas podrían presentar propiedades teragnósticas, es decir, ser capaces de proporcionar un diagnóstico y terapia a la vez.

Schleich *et al.* desarrollaron NPs con propiedades teragnósticas a partir de la co-encapsulación de NPs magnéticas y el fármaco paclitaxel dentro de NPs de PLGA. En cuanto a la actividad como agente de contraste, los resultados *in vitro* de relajación e imágenes MRI ponderadas en T_2 mostraron que las NPs pueden ser utilizados como agentes de contraste. Estos investigadores también evaluaron la actividad de las NPs como agente terapéutico *in vivo*, encontrando que las NPs cargadas con paclitaxel retrasaban el crecimiento del tumor CT26, asociado al cáncer de colon. En conjunto, sus resultados sugieren que estas NPs se pueden considerar una nanoplataforma multifuncional para la obtención de imágenes de orientación y monitorización en tiempo real de la respuesta terapéutica [102]. Por otro lado, Singh *et al.* prepararon y caracterizaron NPs magnéticas embebidas en matrices de PLGA junto con fármacos hidrofóbicos (paclitaxel y

rampamicina) e hidrofílicos (carboplatino). El objetivo de su trabajo fue obtener un sistema capaz de entregar dos fármacos a la vez en el sitio diana y que, además, pudiera servir como agente de contraste. Sus resultados muestran la encapsulación de uno y los dos fármacos a la vez, y sus ensayos celulares *in vitro* evidenciaron la capacidad de las NPs para liberarlos. En cuanto a su función como agente de diagnóstico, los resultados obtenidos mostraron un mejor efecto de contraste que los productos comerciales debido a una mayor relajación T_2 y una vida media de circulación sanguínea de ~47 minutos en un modelo murino [103].

Como mencionamos previamente, la co-encapsulación de fármacos y NPs magnéticas en matrices poliméricas para la formulación de nanoplataformas multifuncionales recientemente ha cobrado gran interés. En la literatura podemos encontrar trabajos donde se co-encapsulan fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos; sin embargo, hay pocas evidencias sobre trabajos relacionados con la co-encapsulación de NPs magnéticas y cisplatino en NPs de PLGA, siendo esta la principal motivación para la realización de este trabajo.

Cisplatino

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II o CDDP) es un compuesto metálico con geometría plana. Es considerado uno de los más potentes agentes quimioterapéuticos en la actualidad, y es utilizado ampliamente para diferentes tipos de cáncer tales como cáncer de pulmón de células pequeñas, tumores de células germinales, linfoma y cáncer de ovario[104]. Si bien a menudo se lo considera un agente alquilante, no contiene grupos alquilo ni instiga reacciones de alquilación, por lo que se lo designa inadecuadamente como un fármaco de tipo alquilante [104].

El cisplatino fue creado a mediados del siglo XIX, conociéndosele también como cloruro de Peyrone. Sin embargo, fue hasta la década de 1960 cuando los científicos empezaron a interesarse por sus efectos biológicos, entrando en ensayos clínicos para la terapia del cáncer en 1971. A fines de la década de 1970 ya se usaba ampliamente, y hoy en día es considerado como “la penicilina del cáncer” a pesar de los nuevos medicamentos de quimioterapia desarrollados en las últimas décadas [104].

Mecanismo de acción

La figura 8 muestra el mecanismo de acción de cisplatino, el cual está relacionado con su capacidad de entrecruzarse con el ADN provocando daños que pueden terminar ya sea en reparación del daño celular o bien en muerte celular por apoptosis. Para que ocurra la interacción del cisplatino con el ADN, este debe ser activado a través de una serie de reacciones espontáneas, que implican el reemplazo secuencial de los ligandos cis-cloro del cisplatino con moléculas de agua (ver figura 8). El cisplatino se activa cuando ingresa a la célula, ya en el citoplasma los átomos de cloro son desplazados por moléculas de agua. Este producto hidrolizado es un electrófilo potente que puede reaccionar con cualquier nucleófilo, incluidos los grupos sulfhidrilo presentes en las proteínas y los átomos de nitrógeno en los ácidos nucleicos. La citotoxicidad del cisplatino se atribuye principalmente a su interacción con los sitios nucleófilos N7 de las bases púricas (guanina) en el ADN para formar entrecruzamientos ADN-proteína y entrecruzamientos intra-cadena ADN-ADN. Sin embargo, la evidencia favorece fuertemente a los aductos intra-cadena como responsables de la acción citotóxica. [105,106].

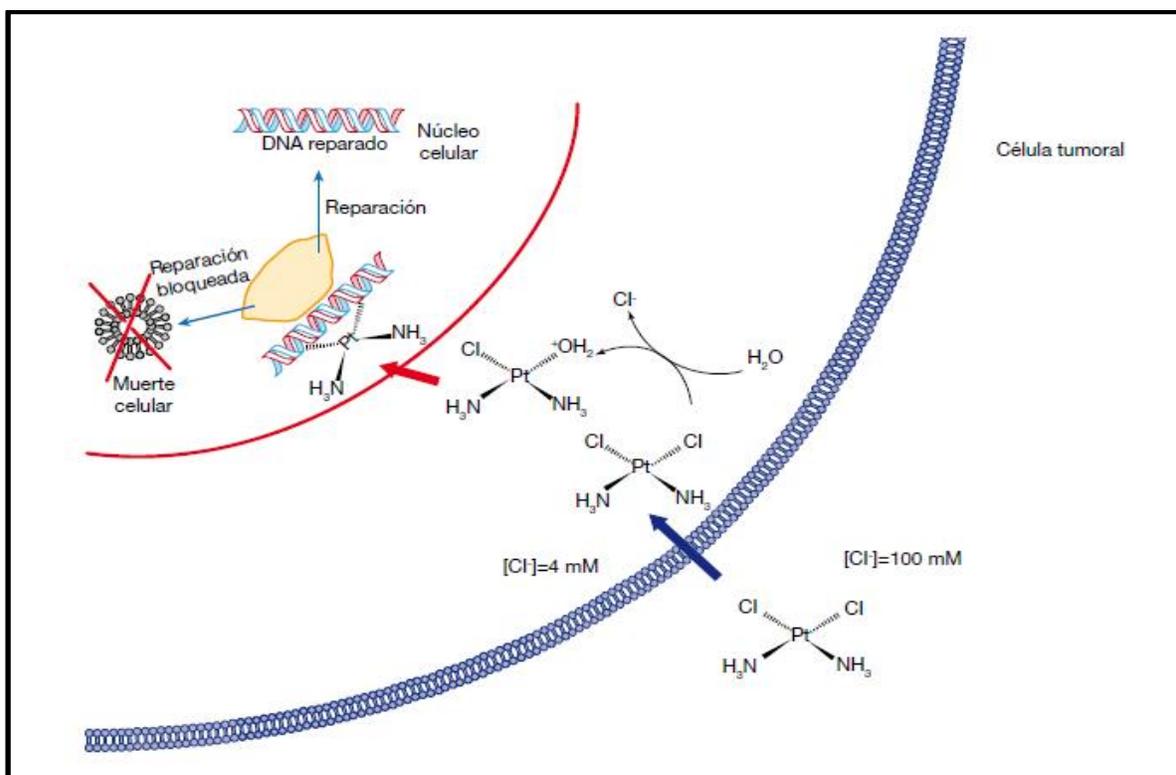


Figura 8. Mecanismo de acción de cisplatino. Imagen tomada de referencia [107].

HIPÓTESIS

La co-encapsulación de NPs de magnetita y cisplatino dentro de una matriz polimérica biocompatible y biodegradable permitirá obtener una nanoplataforma con el potencial de brindar un diagnóstico y terapia simultáneas frente al cáncer.

OBJETIVOS

General

Obtener una nanoplataforma multifuncional compuesta de cisplatino y NPs de magnetita encapsuladas en una matriz de PLGA estabilizada con quitosano con el fin de obtener un sistema con propiedades teragnósticas.

Específicos

- Sintetizar y caracterizar NPs de óxido de hierro (magnetita) y evaluar sus propiedades magnéticas *in-vitro*.
- Sintetizar y caracterizar nanoplataformas que servirán de vector de transporte para sustancias activas (cisplatino) y NPs magnéticas.
- Evaluar el efecto del quitosano sobre la carga superficial de las nanoplataformas.
- Evaluar el efecto de las NPs con diferente carga superficial sobre un modelo de membrana.
- Caracterizar las nanoplataformas en cuanto a su tamaño, morfología, propiedades magnéticas, perfiles de liberación y actividad citotóxica para determinar su posible aplicación como agente teragnóstico.
- Evaluar la captación celular de las nanoplataformas por células HeLa y MDA-MB-231.
- Evaluar la citotoxicidad de las nanoplataformas obtenidas en células Arpe-19, HeLa y MDA-MB-231.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales para la síntesis de la nanoplataforma

Para la síntesis de la nanoplataforma magnetita/PLGA/quitosano se utilizó ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) 50:50 con peso molecular de 30.000-60.000 Da, cloruro ferroso ($\text{FeCl}_2 \geq 98\%$), cloruro de férrico ($\text{FeCl}_3 \geq 97\%$), ácido oleico ($\geq 99\%$), ácido acético ($\geq 99\%$), hidróxido de amonio (28-30 % wt.) y acetona ($\geq 99\%$), todos adquiridos de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Quitosano de baja viscosidad con grado de acetilación de 79% y peso molecular promedio de 150.000 Da fue adquirido de Fluka y usado como se recibió.

Para los ensayos con el modelo de membrana se utilizó cloroformo ($\geq 99\%$) y 1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina (semisintético, $\geq 99\%$), adquiridos de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Fosfatidilserina ($\geq 99\%$) y esfingomielina de cerebro porcino ($\geq 99\%$) fueron adquiridos de Avanti Polar (Alabaster AL.).

El agua utilizada para todas las disoluciones fue agua ultra pura con una resistividad de $18.3 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$.

Síntesis de NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico

Las NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico se sintetizaron utilizando el método de co-precipitación química propuesto por Racuciu *et al.* con algunas modificaciones [108]. En una típica reacción de co-precipitación química, una mezcla de cloruros de hierro (FeCl_2 y FeCl_3) fue colocada en 100 ml de agua desgasificada y luego se llevó a una temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ y se mantuvo durante 10 minutos con agitación mecánica moderada. Posteriormente, se añadieron 10 ml de hidróxido de amonio (28%) y la reacción se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos. Después se añadió ácido oleico a una relación molar de 1:1,25 con respecto al Fe^{3+} con el objetivo de asegurar una completa unión del ácido oleico a la superficie de las NPs de magnetita y, con esto, garantizar su hidrofobización. Las NPs de magnetita fueron separadas utilizando un imán y, posteriormente, lavadas con etanol puro y, a continuación, dos veces con una mezcla etanol/agua al 50 % (v/v) para finalmente obtener como producto final un precipitado color negro brillante.

Preparación de NPs magnetita/PLGA

Una vez que las NPs de magnetita fueron recubiertas con ácido oleico, estas fueron incorporadas dentro de una matriz de PLGA mediante el método de emulsión simple propuesto por Hoa *et al.* con algunas modificaciones [109]. Las NPs de magnetita fueron suspendidas en acetona y mezcladas con 600 μ l de una disolución de PLGA 0.22 mM a diferentes relaciones molares magnetita:PLGA (1:1, 3:1 y 5:1). Las tres diferentes relaciones molares fueron depositadas gota a gota en 10 ml de agua desionizada bajo agitación moderada durante 5 minutos. Después, la emulsión fue colocada en una campana de extracción durante 24 horas a 25 °C para la evaporación del disolvente. Luego de evaporar completamente el solvente las NPs fueron recuperadas por centrifugación a 12000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y, posteriormente, liofilizadas.

Determinación de número de partículas

La concentración de NPs fue determinada utilizando un viscosímetro de tubo capilar Ubbelohde y la ecuación de Einstein-Stokes (4) como ha sido reportado por otros autores [110].

$$\eta_r = 1 + 2.5\phi \quad (4)$$

donde η_r es la viscosidad relativa y ϕ corresponde a:

$$\phi = \frac{nV_i}{V} \quad (5)$$

donde n es el número de NPs en disolución, V_i es el volumen la nanopartícula, considerando que esta se comporta como una esfera rígida. El volumen de una esfera se determina mediante la expresión:

$$V_i = \frac{4\pi r^3}{3} \quad (6)$$

donde r es el radio hidrodinámico de la NPs determinado por DLS.

Por lo tanto, sustituyendo en la ecuación (4) los tiempos obtenidos de nuestro disolvente puro contra nuestras NPs en el solvente obtenemos el valor de ϕ , considerando que el valor de r en la ecuación (6) se determinó mediante DLS y el volumen total de la solución es conocido, despejando n en la ecuación (5) permite determinar la concentración de NPs.

Estabilización de NPs de magnetita/PLGA con quitosano

Las NPs de magnetita/PLGA fueron modificadas superficialmente utilizando diferentes concentraciones de quitosano. Primero, se preparó una disolución stock de quitosano disolviendo 40 mg de quitosano en 20 ml de ácido acético 10 mM. A continuación, se prepararon diferentes formulaciones de NPs de magnetita/PLGA utilizando diferentes concentraciones de quitosano. Las NPs de magnetita/PLGA/quitosano fueron obtenidas mediante la adición gota a gota de la suspensión de NPs de magnetita/PLGA en las disoluciones con diferentes concentraciones de quitosano. Después de añadir las NPs en la disolución de quitosano, la mezcla fue homogenizada mediante agitación mecánica a temperatura ambiente durante 60 min. Finalmente, las NPs de magnetita/PLGA/quitosano fueron recuperadas por centrifugación a 12000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y almacenadas a 25 °C.

Determinación de la densidad de carga de quitosano

Con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración de quitosano sobre las propiedades fisicoquímicas de las NPs de magnetita/PLGA, se determinó la densidad de carga del quitosano mediante una titulación conductimétrica para conocer el número de grupos amino libres por cadena de quitosano utilizando el protocolo reportado por Farris *et al.* [111] con algunas modificaciones. El experimento se realizó colocando 0.2 g de quitosano en 100 ml de agua desionizada bajo vigorosa agitación magnética. Posteriormente, se añadieron 0.25 ml de ácido clorhídrico 0.1 N cada dos minutos hasta alcanzar un volumen añadido de 16 ml. Durante todo el experimento se midió el pH de la disolución polimérica y su conductividad utilizando un pH-metro (Jenway modelo 3540).

Termodinámica de formación de la nanoplataforma magnetita/PLGA/quitosano

El estudio termodinámico de la interacción entre NPs de magnetita/PLGA y quitosano se llevó a cabo utilizando la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés). Los experimentos de ITC fueron realizados con un microcalorímetro VP-ITC de MicroCal Inc (Northampton, USA). El experimento se realizó colocando la suspensión de NPs de magnetita/PLGA en la celda de muestra y la celda de referencia fue rellena con agua desionizada. Posteriormente, se inyectaron alícuotas de la disolución de quitosano (0.2 mg/ml), iniciándose el proceso con una inyección de 2 µl seguida por 26

inyecciones de 10 µl con intervalos de 300 segundos entre cada una. El experimento para el blanco de referencia fue realizado siguiendo el mismo protocolo, sólo que la titulación fue hecha utilizando una disolución ácida ($\text{pH } 5.1 \pm 0.1$) libre de quitosano. Para evitar la presencia de burbujas, todas las muestras fueron desgasificadas durante 10 minutos antes de iniciar los experimentos. La velocidad de agitación durante el experimento fue de 357 rpm a una temperatura de 25 °C.

Caracterización en las diferentes etapas de formulación de la nanoplataforma magnetita/PLGA/quitosano

Difracción de rayos X (XRD)

Los experimentos de XRD para determinar la fase cristalina de las NPs magnéticas se realizaron en un difractómetro de rayos X (Philips PW1710) con radiación Cu- $K_{\alpha 1}$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Las muestras se midieron, operando a 40 kV y 30 mA. El patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) se recolectó con una variación angular 2θ de 10 a 70° en pasos de 0.02° cada 2 s.

Espectroscopia Raman

Los espectros Raman fueron obtenidos utilizando un espectrómetro LabRAM HR equipado con un microscopio, detector CCD enfriado por peltier y una línea láser He-Ne de 633 nm para excitación lumínica. Alrededor de 5 ml de NPs de magnetita fueron colocadas en un contenedor de alúmina inmediatamente después de ser sintetizadas. El láser fue enfocado sobre la superficie del fluido utilizando el objetivo de 50X y el tiempo de adquisición fue de 20 segundos. Las mediciones se realizaron a 25°C y presión atmosférica. Los resultados se analizaron utilizando el software LabSpec 5.

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR fueron obtenidos utilizando un espectrómetro Spectrum two de Perkin-Elmer equipado con un accesorio universal de reflectancia totalmente atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Los espectros fueron adquiridos antes y después del proceso de recubrimiento de las NPs de magnetita con ácido oleico en el rango de 5000 a 440 cm^{-1} . Las adquisiciones fueron realizadas por triplicado con una resolución espectral de 4 cm^{-1} y analizadas con el software Spectrum.

Magnetometría de muestra vibrante (VSM)

Las propiedades magnéticas de las NPs de magnetita fueron determinadas utilizando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM por sus siglas en inglés) en el sistema de medidas de propiedades físicas (PPMS por sus siglas en inglés) de Quantum Design. Los ciclos de histéresis fueron medidos bajo un campo aplicado de ± 45 kOe a 5 y 300 K con el objetivo de evaluar el campo coercitivo y saturación magnética. Las curvas de Zero-field-cooling (ZFC) y field-cooling (FC) fueron obtenidas a 500 Oe en un rango de temperatura de 5 a 300 K.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El tamaño y la forma de las NPs de magnetita, PLGA, magnetita/PLGA y magnetita/PLGA/quitosano fueron determinados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) utilizando un microscopio Phillips CM-12 operando a 120 keV. Para ello, 15 μ l de la suspensión de NPs fueron depositados sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono para luego dejarla secar, y posteriormente, obtener las imágenes. Las NPs de PLGA fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 2%, secadas y luego examinadas.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La morfología de las NPs fue observada a través de un microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) modelo JSPM-4210 (JEOL, Japan). Una gota de la suspensión de NPs fue depositada sobre mica recién cortada y secada durante 1 hora. Las imágenes fueron obtenidas en el modo no contacto utilizando un cantiléver NSC15. Las imágenes fueron analizadas con el software WSxM.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

La distribución de tamaños e índices de polidispersidad de las NPs de PLGA, magnetita/PLGA y magnetita/PLGA/quitosano fueron determinados utilizando un zetasizer-NanoZS de Malvern instruments (UK), equipado con un láser rojo de $\lambda = 633$ nm (He-Ne, 4 mW). Las muestras fueron diluidas y, a continuación, colocadas en la celda de medida. Las mediciones se realizaron por triplicado después de conseguir un equilibrio térmico de 25 °C. El número de rondas en cada medición fue determinado automáticamente por el software.

Potencial ζ

Las mediciones de potencial ζ de las NPs de PLGA, magnetita/PLGA, magnetita/PLGA/quitosano se llevaron a cabo utilizando un zetasizer-NanoZS de Malvern instruments (UK). Las NPs en suspensión fueron cargadas y medidas en una celda para potencial ζ . Los valores obtenidos se muestran como una media \pm desviación estándar de tres medidas independientes.

Interacción de NPs con un modelo de membrana

Las isothermas de π -A de las mezclas de tres fosfolípidos (1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina, fosfatidilserina y esfingomielina), fueron obtenidas utilizando una balanza de Langmuir (Model type 611, Nima Technologies Ltd, Coventry, EK), con precisión de 0.1 mN m^{-1} . Los fosfolípidos fueron disueltos en cloroformo a una concentración final de 1 mg ml^{-1} en una proporción 57:17:27 % peso, respectivamente, y fueron dispersados sobre la superficie de la balanza de Langmuir. La presión superficial $\pi = \gamma_0 - \gamma$, es decir, la diferencia entre la tensión superficial del agua pura y la tensión superficial de la superficie cubierta con los fosfolípidos fue medida utilizando el método de la placa de Wilhelmy. Para ello, $50 \mu\text{l}$ de la muestra de fosfolípidos fueron dispersados con una micro-jeringa Hamilton sobre la superficie de agua pura o sobre diferentes suspensiones acuosas de NPs con una concentración final de 9.3×10^{10} NPs/ml. Todos los experimentos fueron realizados dentro de una cabina de vidrio libre de polvo. Después de limpiar la superficie de la cuba, 480 ml de agua desionizada fueron depositados sobre esta y las disoluciones de cloroformo fueron depositadas en la subfase. Las isothermas fueron realizadas 15 minutos después que los fosfolípidos fueron depositados para permitir la evaporación del cloroformo. Cuando se utilizaron las suspensiones de NPs como subfase, las isothermas fueron realizadas después de 1 hora. Las isothermas se hicieron por triplicado con un error relativo de 2% a una velocidad de compresión de $20 \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1}$. Para evaluar la interacción de NPs con diferente carga superficial, se utilizó la misma cantidad de las NPs de magnetita/PLGA con diferentes concentraciones de quitosano en la subfase: 0, 1.66×10^{-8} , 2.66×10^{-8} M y 3.33×10^{-8} de quitosano, respectivamente. Todos los experimentos fueron realizados a 25°C .

Penetración de las NPs en monocapas

Las monocapas de las mezclas de fosfolípidos en la interfase aire-agua fueron comprimidas hasta 30 mN m^{-1} . Después de mantener estable la presión superficial a 30 mN m^{-1} durante 15 minutos, 5 ml de una suspensión acuosa de nanoplateformas magnetita/PLGA/quitosano (4.5×10^{13} NPs) fueron inyectados lentamente en la subfase y el control de la presión fue liberado; posteriormente, el incremento en la presión superficial fue medido durante 3 horas después de alcanzar el equilibrio. Los experimentos se realizaron por triplicado con un error relativo promedio del 3%.

Materiales para la co-encapsulación de cisplatino y NPs de magnetita en la nanoplateforma y ensayos celulares *in vitro*.

Para la co-encapsulación de cisplatino y NPs de magnetita en la nanoplateforma se utilizaron cisplatino (peso molecular de 300.05 Da), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) 50:50 (peso molecular de 30,000-60,000 Da), cloruro ferroso ($\text{FeCl}_2 > 98\%$), cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 > 97\%$), isotiocianato de fluoresceína (FITC), polivinil alcohol (peso molecular de 31000-50000 Da), ácido oleico ($> 99\%$), ácido acético ($> 99\%$), hidróxido de amonio (28-30 % peso.) y acetona ($> 99\%$), todos adquiridos de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Quitosano de baja viscosidad con grado de acetilación de 79% y peso molecular promedio de 150,000 Da fue adquirido de Fluka y empleado tal como se recibió.

Para los ensayos celulares, células HeLa, MDA-MB-231 y Arpe-19 fueron adquiridas de cell Biolabs (San Diego, CA, USA). Prolong Gold Antifade con DAPI, medio DMEM, suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina, piruvato de sodio y aminoácidos no esenciales fueron adquiridos de Invitrogen (Carlsbad, USA).

Co-encapsulación de cisplatino y NPs de magnetita en la nanoplateforma

La co-encapsulación de cisplatino y NPs de magnetita en la nanoplateforma (cisplatino-MPNPs) se realizó siguiendo el mismo protocolo para la formulación de la nanoplateforma, con algunas modificaciones. Primero, diferentes cantidades de cisplatino (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 mg) fueron añadidos y mezclados con magnetita y PLGA (relación molar 3:1) en acetona. Después, esta disolución fue dispersada gota a gota en 10 ml de agua desionizada bajo agitación mecánica durante 10 minutos. Posteriormente, esta suspensión fue colocada

en una campana de extracción para la evaporación del solvente (acetona) y, luego, depositada gota a gota en una mezcla de quitosano ($3.33 \times 10^{-8} \text{M}$), PVA (1, 1.5, 2, 2.5 y 3% peso) y 0.5 mg de cisplatino bajo agitación mecánica durante 2 horas. Las nanoplateformas cargadas con cisplatino y NPs de magnetita (cisplatino-MPNPs) en suspensión fueron recolectadas por centrifugación a 13500 rpm durante 45 min y lavadas dos veces con agua desionizada. Finalmente, las cisplatino-MPNPs fueron liofilizadas y almacenadas para futuras caracterizaciones.

Determinación de cisplatino encapsulado en la nanoplateforma

La eficiencia de encapsulamiento (EE por sus siglas en inglés) de cisplatino dentro de MPNPs fue determinada mediante el método de o-Fenilendiamina (OPDA) propuesto por Basorta *et al.* [112], con algunas modificaciones. La suspensión de cisplatino-MPNPs fue centrifugada a 13500 rpm y, a continuación, se tomaron 100 μl del sobrenadante que fueron mezclados con 100 μl de PBS y 100 μl de una solución de OPDA de concentración de 1.4 g/l en dimetilformamida (DMF). Después, la mezcla se llevó a 90 °C durante 30 minutos para conseguir una disolución color azul-verde. Estas disoluciones fueron enfriadas a temperatura ambiente y luego el volumen se llevó a 1 ml con DMF, finalmente la absorbancia de las disoluciones finales fueron medida a 706 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible. El cisplatino encapsulado fue calculado a partir de la diferencia entre la cantidad de cisplatino en el sobrenadante y la cantidad inicial de cisplatino utilizado en la preparación de cisplatino-MPNPs mediante la siguiente ecuación (7):

$$EE (\%) = \frac{\text{total amount drug-free amount drug in supernatant}}{\text{total amount of drug}} \times 100\% \quad (7)$$

La eficiencia de carga (DL por sus siglas en inglés) fue determinada mediante el método de SnCl_2 propuesto por Cafaggi *et al.* [27], con algunas modificaciones. Para ello, 5 mg de cisplatino-MPNPs fueron disueltos en 1 ml de ácido nítrico concentrado a una temperatura de 120 °C durante 24 h. Después de que el ácido nítrico fue evaporado se agregó 1 ml de agua regia para asegurar la completa solubilización de cualquier residuo de platino. A continuación, se aumentó la temperatura a 90 °C durante 2 h para evaporar el agua regia y los residuos resultantes fueron disueltos con una disolución de SnCl_2 4 M y HCl 0.4 M. la concentración de cisplatino contenido en la disolución fue determinada con un

espectrofotómetro después de 30 minutos a una longitud de onda de 403 nm, y de acuerdo a la curva de calibración previamente obtenida a partir de disoluciones estándar de cisplatino. La eficiencia de carga fue calculada mediante la siguiente ecuación (8).

$$DL (\%) = \frac{\text{weight of the drug in nanoparticles}}{\text{weigh of the nanoparticles}} \times 100\% \quad (8)$$

Cinética de liberación de cisplatino a partir de cisplatino-MPNPs

La liberación de cisplatino de cisplatino-MPNPs fue evaluada mediante el método de diálisis. En un típico experimento, 5 mg de cisplatino-MPNPs fueron dispersados en 1 ml de PBS (a pH 5.8, 6.8 y 7.4) y colocados dentro de varias bolsas de diálisis (Spectra/Por® 7 tubos de diálisis, 3.5 kDa de corte de membrana). Posteriormente, las bolsas de diálisis fueron inmersas en 10 ml de PBS a diferentes pH a 37 °C con agitación magnética de 150 rpm. A determinados tiempos, alícuotas de 1 ml fueron retiradas del medio de incubación e, inmediatamente, el mismo volumen de 1 ml repuesto con PBS. Después del muestreo, la cantidad de cisplatino contenida en cada alícuota fue determinada mediante el método OPDA [112], en relación a la curva de calibración obtenida a partir de disoluciones estándar de cisplatino en PBS. La concentración de cisplatino liberado a partir de las MPNPs fue calculada como un porcentaje de la cantidad total de cisplatino contenido en la MPNPs y representado en función del tiempo de incubación bajo diálisis. Todas las medidas fueron hechas por triplicado.

Determinación de eficiencia de carga de NPs de magnetita

La eficiencia de carga de las NPs de magnetita dentro de la nanoplataformas fue determinada en un equipo de plasma acoplado inductivo-espectrometría de masas (ICP-MS de sus siglas en inglés) Varian modelo 820-MS (Agilent Technology, USA).

Susceptibilidad magnética (VSM) y resonancia magnética de imagen (MRI)

Las propiedades magnéticas de NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico y cisplatino-MPNPs se determinaron mediante VSM. El ciclo de histéresis fue medido bajo un campo magnético aplicado de ± 45 kOe a 5 y 300 K, con el objetivo de evaluar el campo coercitivo y la saturación magnética (M_s). También se midieron las curvas de magnetización para *Zero field cooling* (ZFC) y *field cooling* (FC) a 500 Oe, en un rango de temperatura entre 5 y 300 K.

Los tiempos de relajación T_2 se obtuvieron a 4.7 T mediante un instrumento Bruker Biospin USR92/20 (Ettlingen Alemania). La evaluación como agente de contraste MRI de cisplatino-MPNPS se realizó adquiriendo una imagen eco gradiente 3D ponderada en T_2 a varias concentraciones de Fe (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.2 y 1.5 mM) en gel de agarosa al 1.6 % peso/volumen. Los parámetros de imagen fueron: campo de visión $80 \times 80 \times 40$; tamaño de matriz de $512 \times 512 \times 256$ puntos dando una resolución espacial de $156 \times 156 \times 156 \mu\text{m}$; tiempo eco (TE) de 7.89 ms y tiempo de repetición (TR) de 100 ms; ángulo de inclinación de 20° y se llevaron a cabo dos promedios.

Ensayos citotóxicos in vitro en líneas celulares Arpe-19, MDA-MB-231 y HeLa

Se realizaron ensayos de citotoxicidad *in-vitro* para evaluar el potencial anticancerígeno de las cisplatino-MPNPs en células de tejido epitelial retinal (Arpe-19), células de cáncer de mama (MDA-MB-231) y células de cuello de útero (HeLa), utilizando el ensayo MTT. Todas las células fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 10,000 células/pozo, y cultivadas durante 24 h bajo una atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C . las células fueron cultivadas utilizando medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de piruvato de sodio. Después de 24 h de incubación, el medio celular fue reemplazado por medio fresco, y las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de cisplatino libre, MPNPs vacías y cisplatino-MPNPs contenidas en medio DMEN a 37°C . Después de 48 h de incubación, el medio de cultivo fue retirado y se añadieron 100 μl de medio nuevo con 10% v/v de la disolución de MTT (5 mg/ml en PBS, pH 7.4) en cada pozo y las células fueron incubadas durante otras 4 h a 37°C . Posteriormente, 150 μl de isopropanol acidificado al 2% (v/v) fueron añadidos en cada pozo y estos fueron agitados vigorosamente con el objetivo de disolver los cristales de formazan formados. Inmediatamente después de la homogenización la viabilidad celular fue determinada utilizando un lector de micro-placas BioRad (USA) a una longitud de onda de 650 nm. Disoluciones de células en medio de cultivo y células en presencia de una disolución de cisplatino libre fueron utilizadas como controles negativo y positivo, respectivamente. El porcentaje de viabilidad celular fue expresado en proporción al grupo control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Modificación de nanoplataforma con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Las MPNPs fueron modificadas con el fluoróforo FITC antes de realizar los ensayos de internalización. La modificación de las NPs se llevó a cabo aprovechando la reacción entre el grupo isotiocianato del FITC y el grupo amino del quitosano expuesto en la superficie de las MPNPs [27]. La reacción se realizó dispersando 5 mg de MPNPs en 10 ml de agua desionizada; luego, 0.5 mg de FITC fueron añadidos a la suspensión de MPNPs y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente la suspensión fue dializada durante 48 h utilizando bolsas diálisis semipermeables (Spectra/Por® 7 Dialysis Tubing, 3.5 kDa de corte de membrana). Finalmente, las FITC-MPNPs fueron centrifugadas a 13,500 rpm durante 45 min y lavadas dos veces con agua desionizada. Las FITC-MPNPs fueron utilizadas inmediatamente después de su preparación.

Internalización celular de FITC-MPNPs por células cancerosas

Los ensayos de internalización celular de las FITC-MPNPs se llevaron a cabo utilizando células HeLa y MDA-MB-231. Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 100000 células/pozo en 3 ml de medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de piruvato de sodio. Las células fueron incubadas bajo una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C hasta obtener una confluencia del 90%. Después de alcanzar la confluencia necesaria, el medio de cultivo fue retirado y las células fueron lavadas con PBS a pH 7.4. Posteriormente, las células fueron expuestas a FITC-MPNPs (1.8×10^{12} NPs) presentes en 3 ml de DMEM. Después de 4 h de incubación el medio con FITC-MPNPs fue aspirado, y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (w/v) durante 10 min, lavadas con PBS tres veces, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.2% (v/v) durante 10 min, lavadas 3 veces con PBS, y teñidas con BODIPY faloidina (Invitrogen, USA) durante 30 min. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS tres veces, y después montadas en porta muestras para su tinción con DAPI (ProLong® Gold antifade DAPI, Invitrogen), y posteriormente almacenadas durante 24 h a -20 °C antes de ser visualizadas en un microscopio confocal (Leica TCS SP5, Germany).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Síntesis de la nanoplataforma

Síntesis y caracterización de NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico

Las NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico se obtuvieron mediante el método de co-precipitación química. La figura 9 muestra el patrón de difracción de las NPs de óxido de hierro sintetizadas. Se observan picos bien definidos a 18.4° , 30.2° , 35.5° , 37.3° , 43.1° , 53.5° , 57.1° y 62.7° , correspondientes a los planos (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) y (440) respectivamente, que pueden ser indexados a la estructura de espinela inversa de la magnetita [55]. La ausencia de picos adicionales indica que las NPs de magnetita sintetizadas tienen alta pureza; sin embargo, con el método de co-precipitación química es inevitable la formación trazas de otras fases cristalinas como hematita y maghemita [49,55,62].

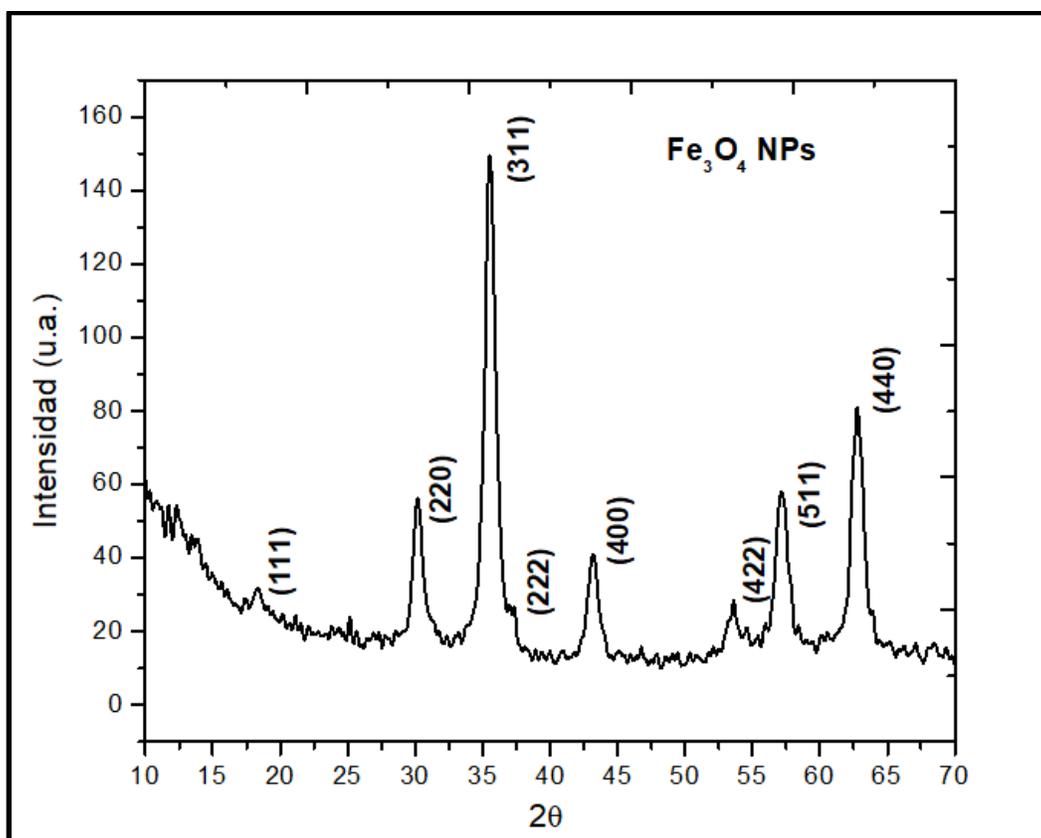


Figura 9. Patrón de difracción de NPs de magnetita.

A partir de los resultados de XRD, se realizó una estimación del tamaño de cristal utilizando el pico de mayor intensidad (311) y la ecuación de Scherrer (9) [53,113]:

$$D = \frac{k*\lambda}{B*cos\theta} \quad (9)$$

donde λ es la longitud de onda (1.5406 Å), B es el ancho a media altura del pico con mayor intensidad (311) (FWHM por sus siglas en inglés), θ es el ángulo de Bragg y K es un parámetro de forma (alrededor de 0.9 para magnetita). El tamaño de cristalito obtenido fue de 9 ± 0.7 nm.

La espectroscopia Raman fue utilizada para complementar los resultados obtenidos por XRD y confirmar el tipo de óxido de hierro que compone las NPs. La figura 10 muestra el espectro Raman de las NPs sintetizadas. Se observa una fuerte banda a 671 cm^{-1} que es atribuida a vibraciones de estiramiento de los átomos de oxígeno en el enlace Fe-O; este estiramiento es asignado al modo A_{1g} [38]. Por otro lado, las bandas débiles presentes a 321, 439 y 549 cm^{-1} son asignadas al modo vibracional T_{1g} [39]. Estos resultados concuerdan con los reportados para magnetita por otros autores [38-42].

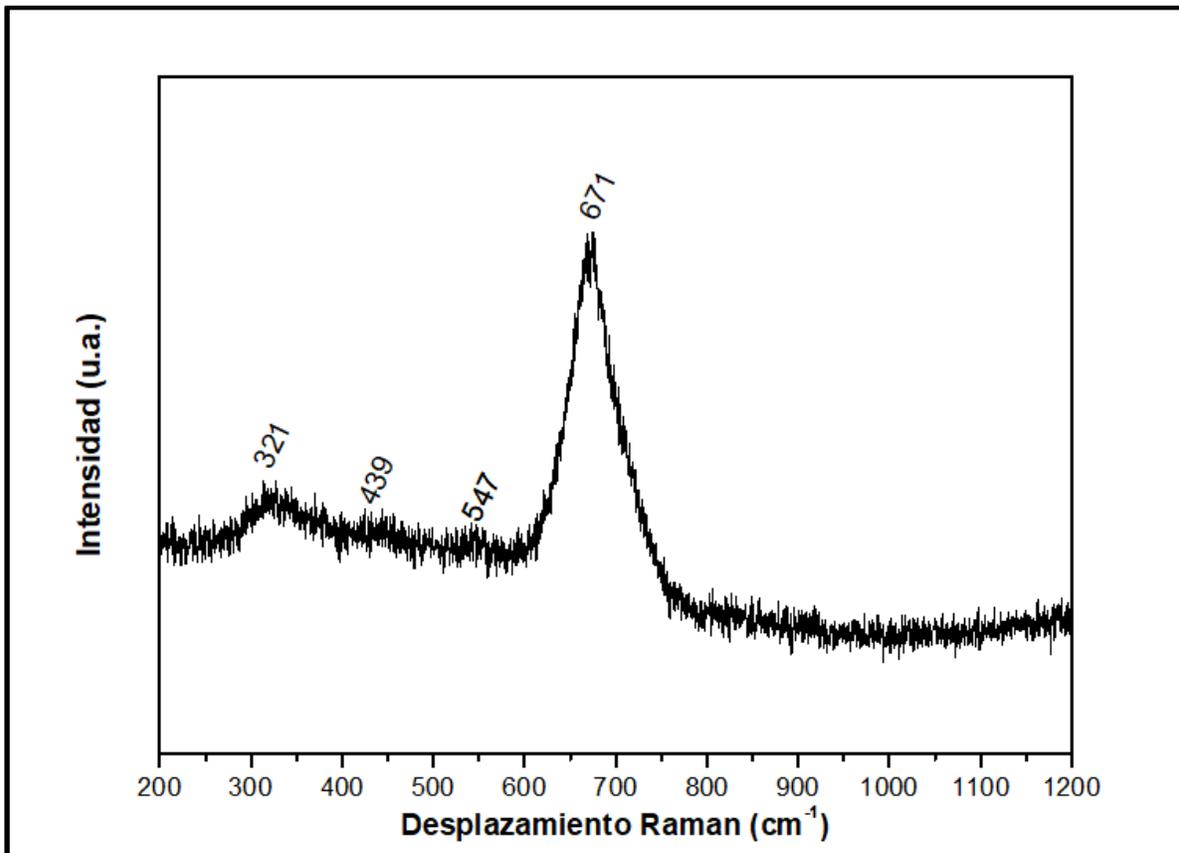


Figura 10. Espectro Raman de NPs de magnetita.

Se realizaron mediciones de FTIR para confirmar la adsorción del ácido oleico en la superficie de las NPs de magnetita. La figura 11 muestra los espectros FTIR del ácido oleico puro (a) y de NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico (b). El espectro correspondiente al ácido oleico puro presenta dos bandas agudas a 2856 y 2929 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos $-\text{CH}_2$ simétrico y asimétrico, respectivamente [114]. La intensa banda observada a 1709 cm^{-1} fue asignada al estiramiento asimétrico $-\text{C}=\text{O}$ y la banda a 1285 cm^{-1} corresponde al estiramiento $-\text{C}-\text{O}$ del grupo carboxílico [115,116]. Las bandas exhibidas a 1463 y 936 cm^{-1} representan los estiramientos $-\text{O}-\text{H}$ dentro y fuera de plano, respectivamente [117]. Por otro lado, el espectro de las NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico muestra una fuerte banda de absorción en el rango de 630-550 cm^{-1} , correspondiente a la vibración (ν_1) asociada con el enlace Fe-O [118]. La banda de absorción observada a 442 cm^{-1} corresponde al desplazamiento de la banda ν_2 del enlace Fe-O de la magnetita, que sucede a mayor número de onda si se compara con el de la magnetita con dimensiones macroscópicas (375 cm^{-1}) [116,119,120]. También se observan cambios en las posiciones de las bandas correspondientes a los estiramientos $-\text{CH}_2$ simétrico y asimétrico, que cambian a 2849 y 2918 cm^{-1} , respectivamente. El desplazamiento a una menor frecuencia indica que las moléculas de ácido oleico fueron adsorbidas sobre la superficie de las NPs. Otras evidencias de la presencia del ácido oleico en la superficie de las NPs magnéticas es la ausencia de la banda a 1709 cm^{-1} y la presencia de dos nuevas bandas a 1629 y 1528 cm^{-1} , atribuidas a los estiramientos $-\text{COO}^-$ asimétricos y simétricos, respectivamente. La presencia de estas bandas es consecuencia de la unión entre los átomos del óxido de hierro de las NPs de magnetita y los grupos carboxilato del ácido oleico [115,117]. Estos resultados confirman la adsorción del ácido oleico sobre la superficie de las NPs de magnetita y, por lo tanto, de la formación de una capa sobre la superficie de estas, lo que les confiere cierta hidrofobicidad que facilitará su incorporación dentro de la matriz de PLGA [121,122].

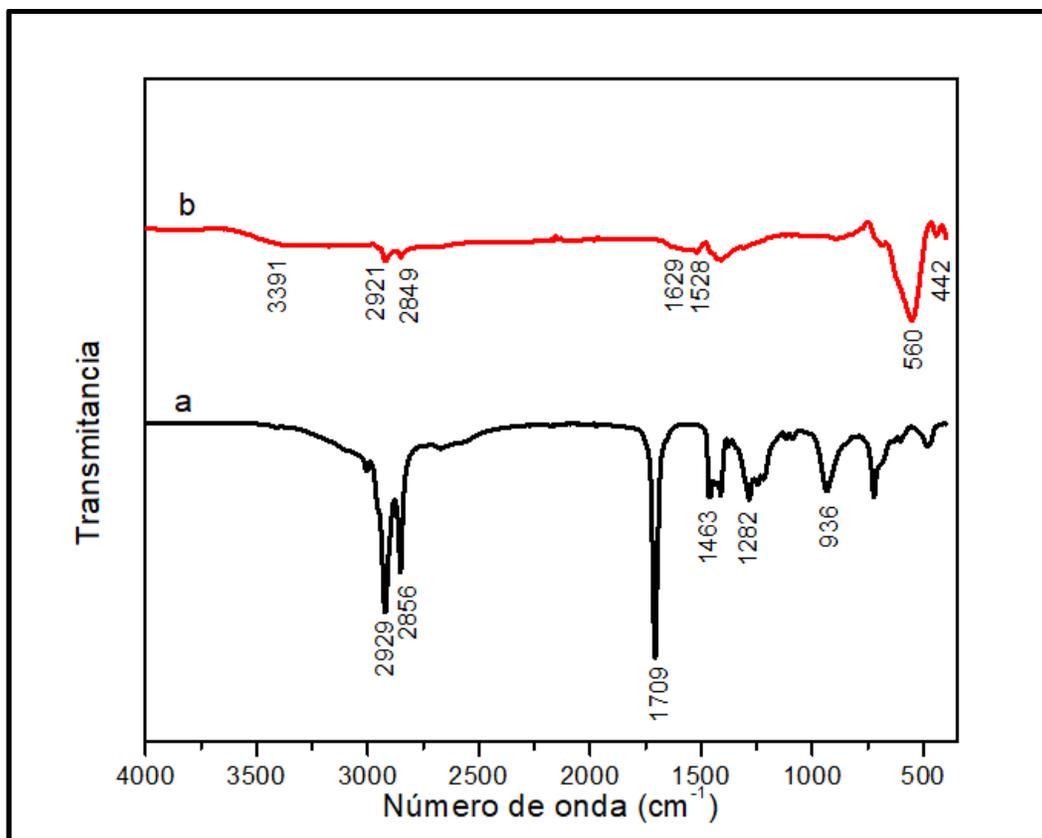


Figura 11. Espectros FTIR de ácido oleico puro (a) y NPs de magnetita cubiertas con ácido oleico (b).

La morfología y tamaño de las NPs de magnetita fueron determinados utilizando AFM y TEM. La figura 12 muestra la apariencia de las NPs de magnetita recubiertas con ácido oleico. La micrografía de AFM muestra la presencia de *clústers* de diferente tamaño, producto de la agregación de NPs de magnetita. Este fenómeno de agregación puede ser atribuido a las propiedades magnéticas intrínsecas de las NPs; sin embargo, algunos autores mencionan que la formación de agregados es producto del proceso de preparación de la muestra para su análisis asociado a fenómenos de secado. Por otro lado, la micrografía TEM muestra NPs con morfología esférica y tamaño de partícula de aproximadamente 10 nm. Este resultado concuerda con el tamaño de cristal obtenido a partir del patrón de difracción de rayos-X utilizando la ecuación de Debye-Scherrer. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante XRD, FTIR, Raman, AFM y TEM confirman que las moléculas de ácido oleico fueron adsorbidas en la superficie de las NPs de magnetita otorgándoles hidrofobicidad y que el tamaño de partícula es adecuado para utilizarse en aplicaciones biomédicas [45–47].

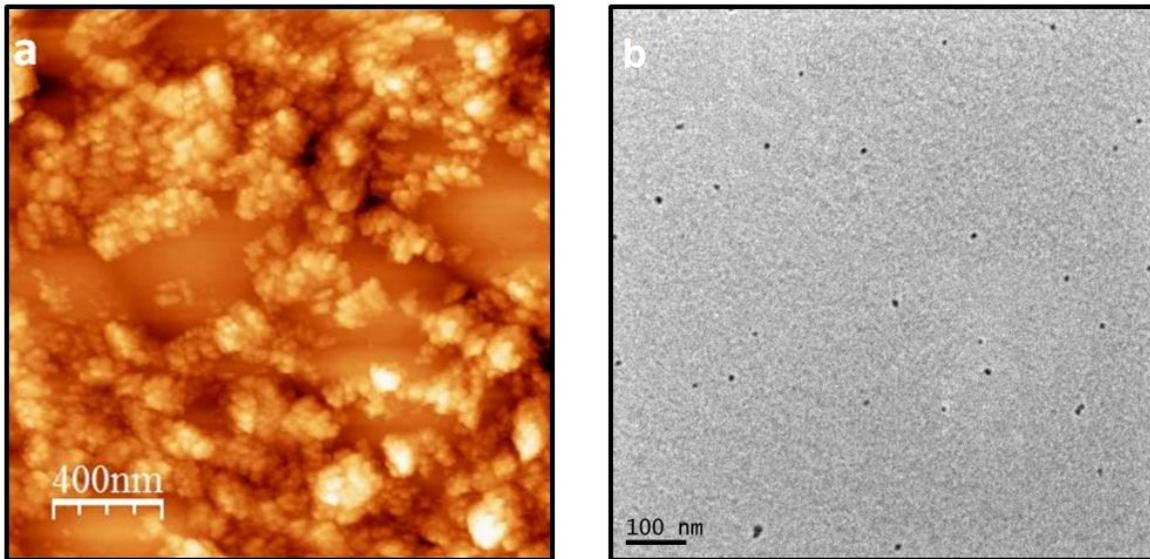


Figura 12. Micrografías AFM y TEM de NPs magnetita recubiertas con ácido oleico.

Las propiedades magnéticas de las NPs de magnetita fueron determinadas mediante VSM. La figura 13 muestra las curvas de histéresis, FC y ZFC derivadas de las medidas de las NPs de magnetita sintetizadas. Las figuras 13a y 13b muestran las curvas de magnetización a 5 y 300 K, respectivamente. La curva de magnetización a 5 K indica un comportamiento ferromagnético con baja coercitividad. Sin embargo, en la curva a 300 K no se observa histéresis, ni coercitividad, ni remanencia, indicando que las NPs sintetizadas exhiben un comportamiento superparamagnético. La magnetización de saturación (M_s) fue de 66.7 emu/g, valor más pequeño que el reportado para la magnetita macroscópica (98 emu/g). Esta diferencia puede ser atribuida a factores que desencadenan una disminución del momento magnético efectivo como el efecto de tamaño, la gran relación superficie-volumen, el efecto de inclinación de spín presente en los límites de grano y/o la incompleta cristalización de las NPs [55].

La figura 13c muestra las curvas de ZFC y FC a 500 Oe en el rango de temperatura de 0 a 300 K. La curva de ZFC exhibe un máximo indicando una transición de un estado ferromagnético a un estado superparamagnético. Este máximo define la temperatura de bloqueo, donde la energía térmica es comparable a la barrera de la energía de anisotropía [123]. La temperatura de bloqueo para las NPs de magnetita fue de aproximadamente 116 K, muy similar a la reportada previamente [55,56] para el mismo tipo de partícula con un tamaño aproximado de 10 nm.

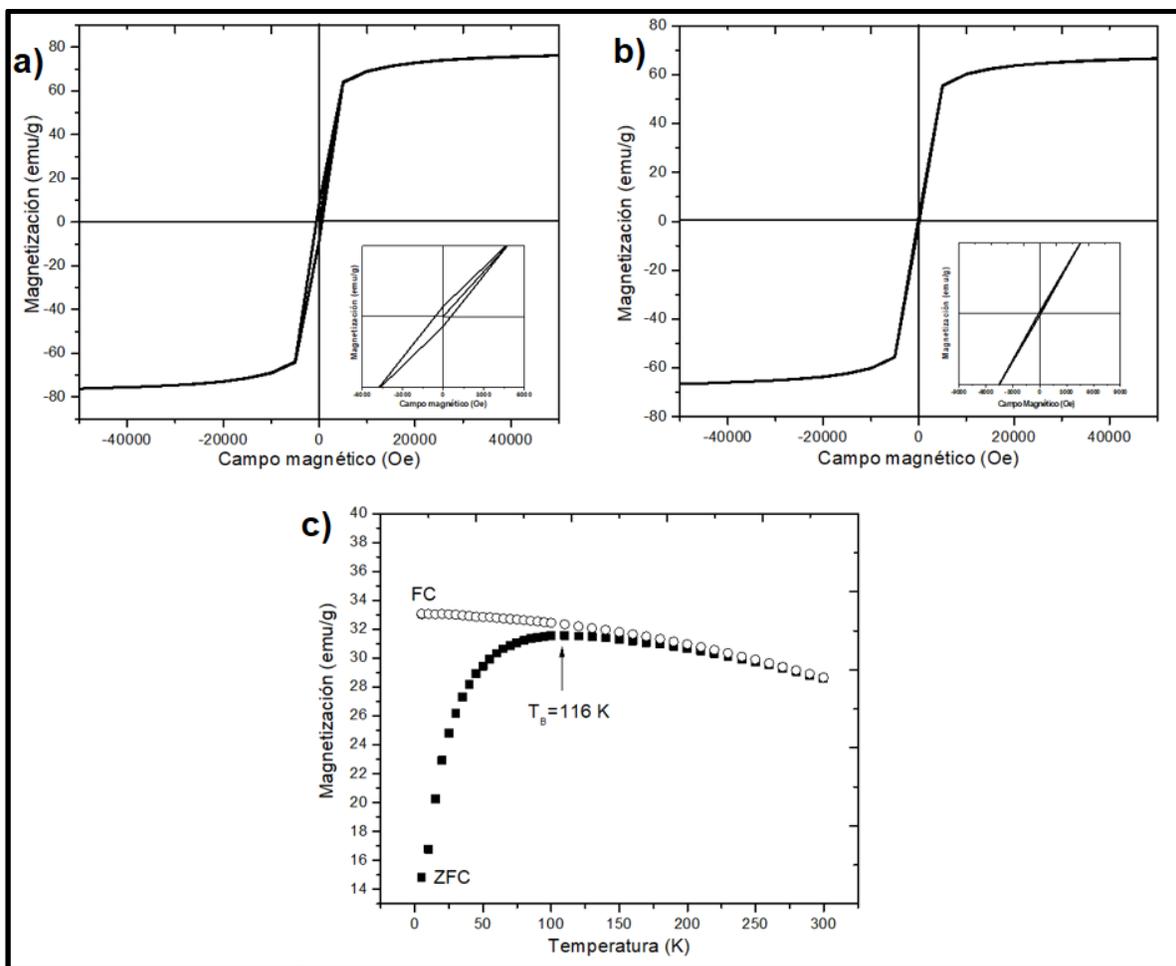


Figura 13. Curvas de magnetización vs campo magnético de NPs de magnetita a 5 (a) y 300 K (b). Los recuadros muestran un aumento de la región bajo campo magnético. c) Curvas de ZFC y FC indicando la presencia de la temperatura de bloqueo T_B .

NPs de magnetita/PLGA

El carácter hidrofóbico y el tamaño de partícula inferior a 10 nm de las NPs de magnetita son características muy importantes para facilitar su incorporación en la matriz polimérica de PLGA. Liu *et al.* reportaron previamente la síntesis de nanoesferas de PLGA con de NPs de magnetita hidrofílicas e hidrofóbicas embebidas mediante el método de emulsión simple tipo aceite/agua [124]. El porcentaje de carga obtenido para las NPs de magnetita hidrofóbicas estuvo entre 40 y 60% w/w, mientras que, para el caso de las hidrofílicas el porcentaje fue de aproximadamente el 1% w/w. La baja eficiencia de carga cuando se utilizaron NPs hidrofílicas probablemente se deba a la naturaleza hidrofóbica del PLGA [125].

Diversos factores relacionados con el proceso de emulsificación en la formación de NPs de magnetita/PLGA pueden influir en sus características físicas y químicas [28]. Por ejemplo, la cantidad de NPs de magnetita es un factor importante que puede afectar el tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial ζ de la matriz polimérica de PLGA [126]. Con el objetivo de determinar la óptima concentración de magnetita para la elaboración de las NPs de magnetita/PLGA, se evaluaron tres diferentes relaciones molares. La figura 14 muestra micrografías de TEM de NPs de magnetita/PLGA sintetizadas con relaciones molares de magnetita:PLGA 0:1, 1:1, 3:1 y 5:1, respectivamente. Para todas las formulaciones se observaron tamaños de partícula comprendidos entre 80 y 100 nm con morfología esférica. La figura 14a muestra el resultado de la síntesis de NPs de PLGA sin magnetita en su formulación, donde se puede observar claramente la tendencia a la morfología esférica. Todas las micrografías de las distintas formulaciones donde se utilizaron NPs de magnetita muestran que estas fueron atrapadas en la matriz polimérica, ya que se observan dominios oscuros dentro de las NPs poliméricas. Cuando se utilizó una relación molar 1:1 (figura 14b) se observan NPs de magnetita inmersas en la matriz de PLGA, sin embargo, también se observan NPs de PLGA sin NPs de magnetita en su interior. La figura 14c, corresponde a la síntesis de NPs de magnetita/PLGA utilizando una relación molar 3:1; esta micrografía muestra una completa incorporación de las NPs de magnetita en la matriz de PLGA, sin la presencia de magnetita fuera de estas. La figura 14d muestra la micrografía de NPs de magnetita/PLGA sintetizadas con una relación molar 5:1, donde se observan NPs de forma irregular y, aparentemente, se presenta el fenómeno de coalescencia entre las partículas posiblemente como consecuencia del exceso de NPs de magnetita en el proceso de síntesis. Es importante mencionar que cuando se realizó la síntesis utilizando una relación molar de 3:1, las NPs conservaron su morfología esférica. El análisis de las micrografías sugiere que el incremento de la concentración de NPs de magnetita no afecta significativamente el tamaño de partícula; sin embargo, ciertos cambios en la integridad y morfología de las NPs sí fueron evidentes.

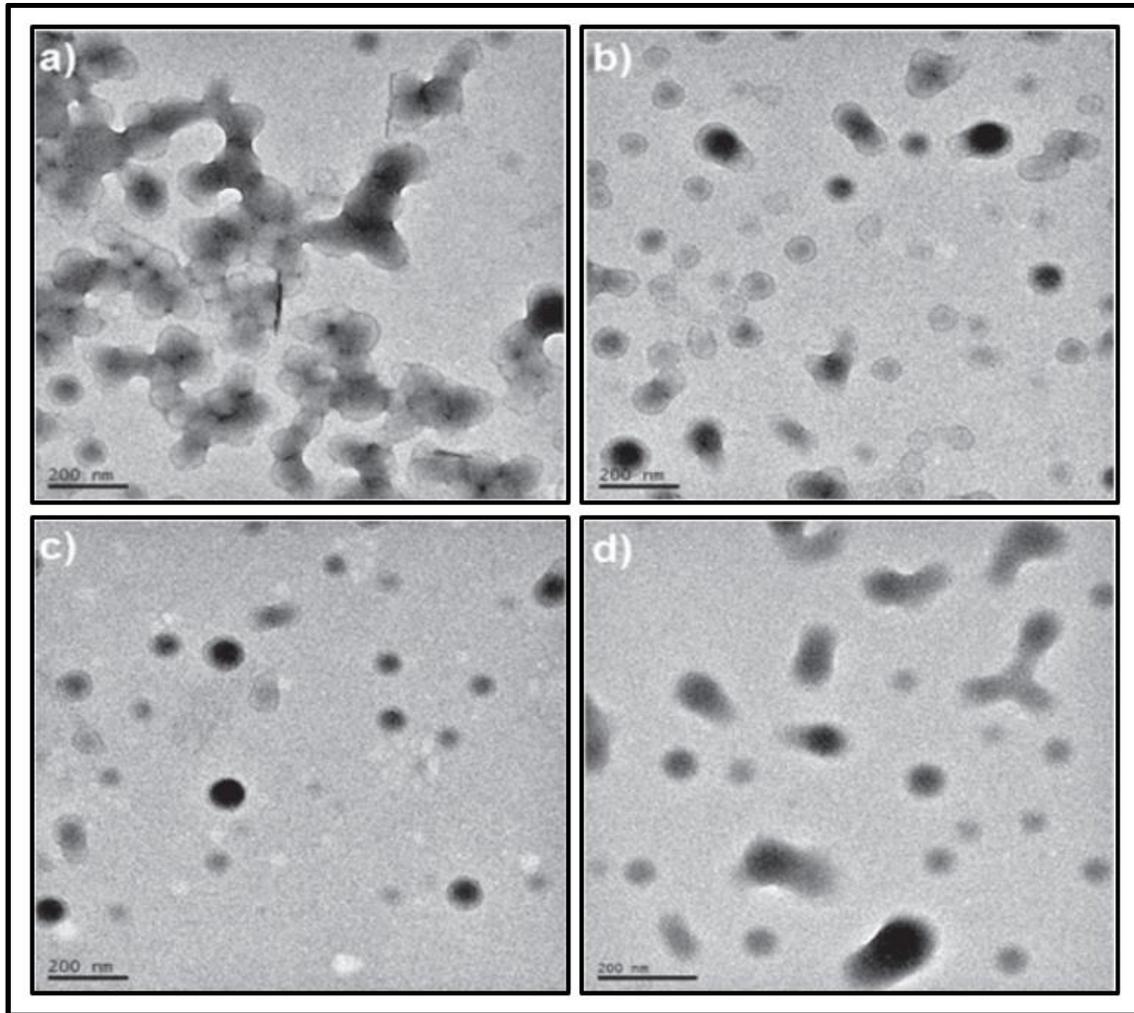


Figura 14. Micrográficas de TEM de las NPs de magnetita/PLGA sintetizadas a diferentes relaciones molares: a) NPs de puro PLGA, b) relación molar 1:1, c) relación molar 3:1 y d) relación molar 5:1.

La tabla 1 muestra el diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad y potencial ζ de NPs de magnetita/PLGA en función de la relación molar magnetita:PLGA. El diámetro hidrodinámico promedio para todas las relaciones molares utilizadas estuvo comprendido entre 130-140 nm con un índice de polidispersidad entre 0.07-0.09, indicando una estrecha distribución de tamaños, por tanto, sumamente monodispersa. El potencial ζ de las NPs híbridas fue de aproximadamente de -26 mV para todas las formulaciones, sin diferencia significativa entre las NPs de PLGA vacías y las NPs de magnetita/PLGA. Este potencial negativo es atribuido a la presencia de grupos carboxilo terminal del PLGA en la superficie de las NPs [127]. La cantidad de NPs de magnetita utilizadas en las tres diferentes relaciones molares evaluadas no afecta el tamaño y carga superficial de las NPs de

magnetita/PLGA [28,124,125]. Los resultados obtenidos en cuanto a tamaño y forma de partícula sugieren que las NPs sintetizadas con una relación molar 3:1 son las más adecuadas para realizar el recubrimiento con quitosano.

Tabla 1. Resumen de las diferentes relaciones molares utilizadas en la preparación de NPs de magnetita/PLGA: Tamaño hidrodinámico, índice de polidispersidad y potencial ζ .

Relación molar magnetita:PLGA	Diámetro promedio TEM (nm)	Diámetro promedio DLS (nm)	Potencial ζ (mV)	PDI
1:0	90	133	-26	0.07
1:1	85	137	-26	0.09
3:1	90	140	-27	0.08
5:1	90	135	-25	0.09

*n = 3

Estabilización de NPs de magnetita/PLGA con quitosano

Con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración de quitosano sobre las propiedades fisicoquímicas de las NPs de magnetita/PLGA, primero se determinó la densidad de carga del quitosano mediante una titulación conductimétrica para conocer el número de grupos amino libres por cadena de quitosano [111]. La figura 15 muestra las gráficas de conductividad y pH en función del volumen de ácido clorhídrico (HCl). A partir de estos dos parámetros se puede determinar la concentración de HCl necesaria para protonar los grupos aminos disponibles en las cadenas de quitosano. este biopolímero es completamente insoluble a pH neutro y conforme se incrementa el volumen de HCl gradualmente incrementa su solubilidad. Esto es debido a la protonación de los grupos amino ($-\text{NH}_3^+$) que promueven el despliegue de las moléculas de quitosano por repulsión electrostática. La gráfica muestra una disminución del pH al inicio de la titulación atribuida a la estabilización del sistema [111]. Posteriormente, el valor del pH en la dispersión se mantiene estable a pH 5 debido a la continua protonación de los grupos $-\text{NH}_2$, mientras que los valores de la conductividad incrementan ligeramente debido a la liberación de iones Cl^- producto de la disociación del HCl. El final de la zona marcada con el número 1, donde se observa el inicio tanto de la disminución del pH como el incremento de la conductividad, es considerado el punto donde se consigue una completa protonación de los grupos amino. La

adición de HCl después de este punto promueve un incremento en la conductividad debido a la presencia de cationes hidrógeno (H^+) libres en el medio, los cuales presentan una conductividad de $350 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, que es mucho mayor con respecto al anión Cl^- , que presenta una conductividad de $75.5 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ [111]. A partir de estas observaciones se obtiene el volumen de HCl necesario para protonar el total de grupos amino en la solución de quitosano y, con esto, el número de grupos amino por cadena de quitosano.

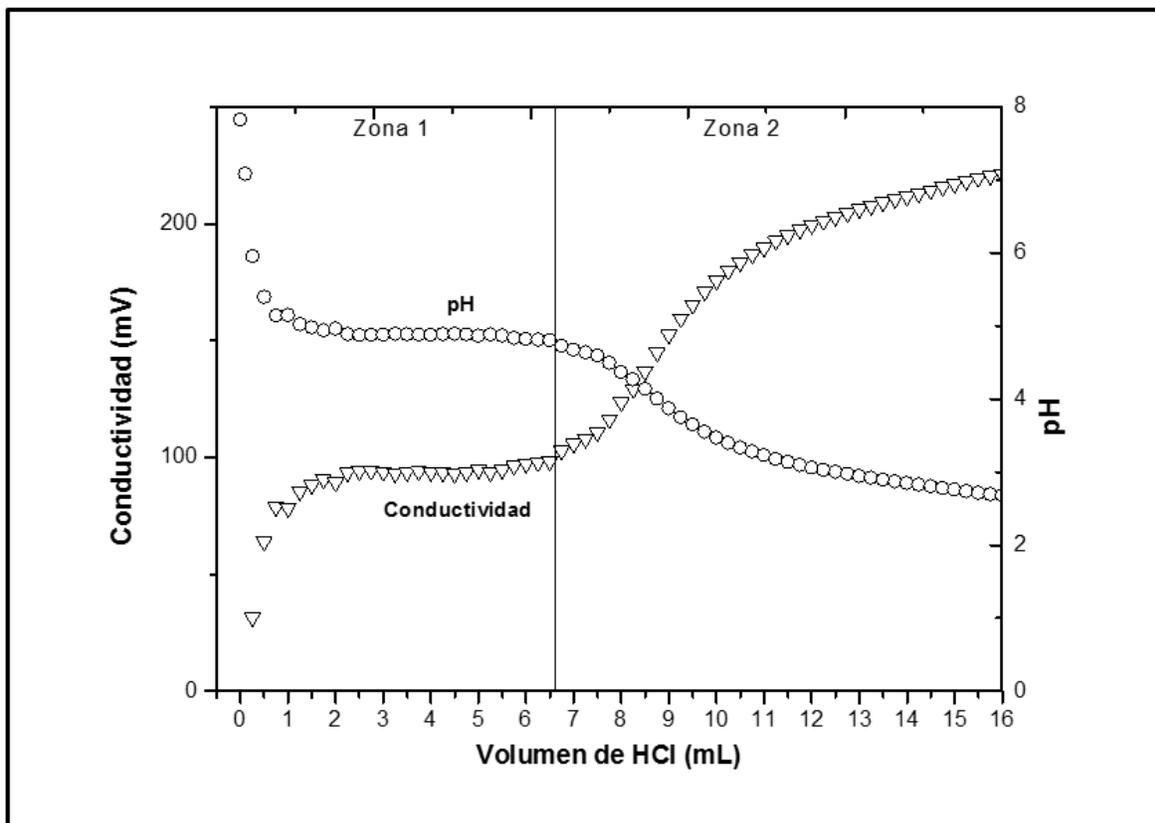


Figura 15. Experimento de titulación conductimétrica para determinar la densidad de carga del quitosano.

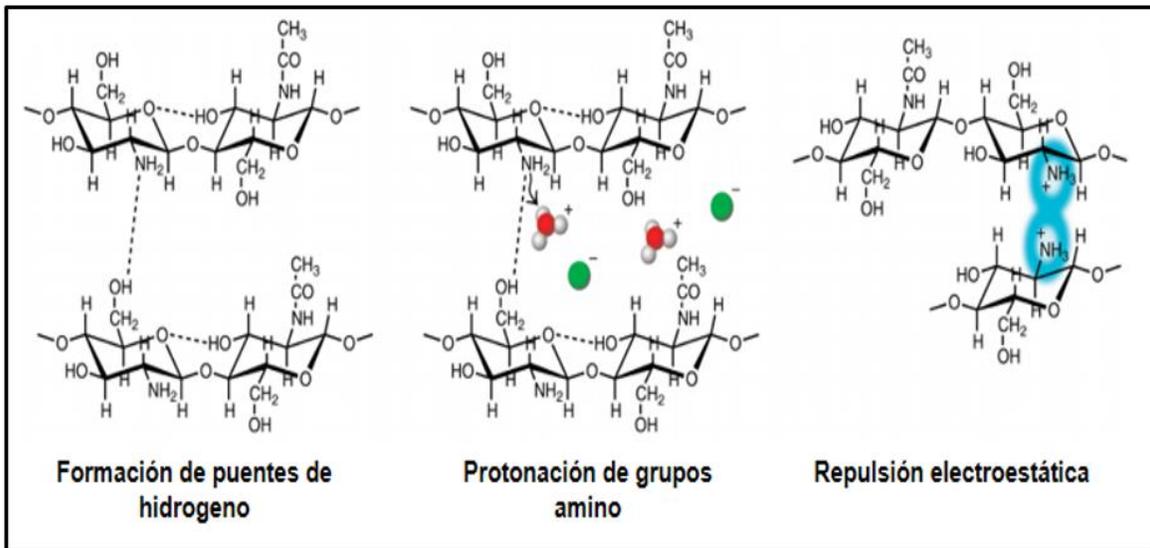


Figura 16. Representación esquemática del proceso de protonación inducido por la titulación con HCl de la cadena de quitosano: a) quitosano insoluble con grupos amino desprotonados (puentes de hidrogeno); b) protonación parcial de grupos amino promovida por la adición de HCl; c) protonación total de grupos amino. Imagen tomada de referencia 52.

Una vez determinada la densidad de carga del quitosano, se realizó la estabilización de las NPs de magnetita/PLGA utilizando diferentes concentraciones de quitosano. El proceso de estabilización fue conducido por la interacción electrostática entre los grupos carboxilo expuestos en la superficie de las NPs de magnetita/PLGA, que presentan carga superficial negativa, y los grupos amino presentes en las cadenas de quitosano, con carga positiva. Como previamente se ha reportado, la adsorción de polielectrólitos sobre partículas coloidales con carga opuesta da lugar a un efecto de inversión de carga [128]. Este efecto fue observado mediante la determinación de potencial ζ , donde el valor inicial de la carga superficial para NPs de magnetita/PLGA es negativa y modificada conforme incrementa la concentración de quitosano, pasando a través del punto isoeléctrico hasta conseguir una carga positiva, lo que indica que el quitosano adsorbido ha invertido la carga de las NPs.

Las propiedades fisicoquímicas de las NPs de magnetita/PLGA estabilizadas con quitosano fueron caracterizadas mediante DLS, AFM y potencial ζ . La figura 17 muestra los resultados de DLS y AFM para NPs de magnetita/PLGA con una relación molar 3:1 estabilizadas con diferentes concentraciones de quitosano. En la gráfica se observa como el diámetro hidrodinámico de la partícula incrementa sostenidamente conforme la concentración de quitosano incrementa de 8.33×10^{-9} a 3.33×10^{-6} M. Cuando las NPs fueron

preparadas utilizando concentraciones de quitosano entre 8.33×10^{-9} y 1.06×10^{-6} M, el diámetro de las NPs aumentó aproximadamente entre 10 y 60 nm comparado con el diámetro promedio de las NPs de magnetita/PLGA sin quitosano (135 nm); por otro lado, para NPs preparadas utilizando concentraciones mayores a 1.59×10^{-6} M, el incremento en el tamaño fue más significativo, obteniéndose un tamaño de 793 nm para la mayor concentración de quitosano utilizada. La figura 17 muestra también imágenes de AFM de las NPs de magnetita/PLGA recubiertas con quitosano. La figura 17a muestra NPs de magnetita/PLGA sin quitosano, en las que se observa una tendencia a la morfología esférica y un tamaño de partícula de aproximadamente 130 nm. Las figuras 17b, 17c y 17d muestran imágenes de AFM de NPs recubiertas con bajas concentraciones del biopolímero (entre 8.33×10^{-9} a 1.06×10^{-6} M), en las que se aprecian tamaños de partícula entre 130 y 220 nm de morfología pseudoesférica, pero con cierta deformación e irregularidades en su superficie. El incremento de tamaño de partícula a bajas concentraciones del biopolímero es producto de la adsorción de molécula de este en forma de bucles o trenes, resultando en la formación de una capa uniforme sobre la superficie de la partícula [82]. La figura 17c muestra NPs de magnetita/PLGA/quitosano con tamaños de partícula de aproximadamente 160 nm y morfología esférica, justo como las NPs de magnetita/PLGA sin quitosano. En esta concentración de quitosano (3.33×10^{-8} M) se obtiene un recubrimiento total de la superficie de las NPs de magnetita/PLGA. En el caso de NPs de magnetita/PLGA/quitosano preparadas con concentraciones superiores a 1.59×10^{-6} M (figura 17e y 17f), la adsorción de quitosano en la superficie de las NPs continúa incluso después de formarse la primera capa, dando lugar a la formación de multicapas o agregados en forma de ovillos sobre la primera capa de quitosano. Por lo tanto, el diámetro de partícula incrementa significativamente observándose NPs con ciertas irregularidades. Las multicapas pueden estar formadas por quitosano adsorbido en forma de bucles y colas, o bien por cadenas de quitosano enlazadas unas con otras [82].

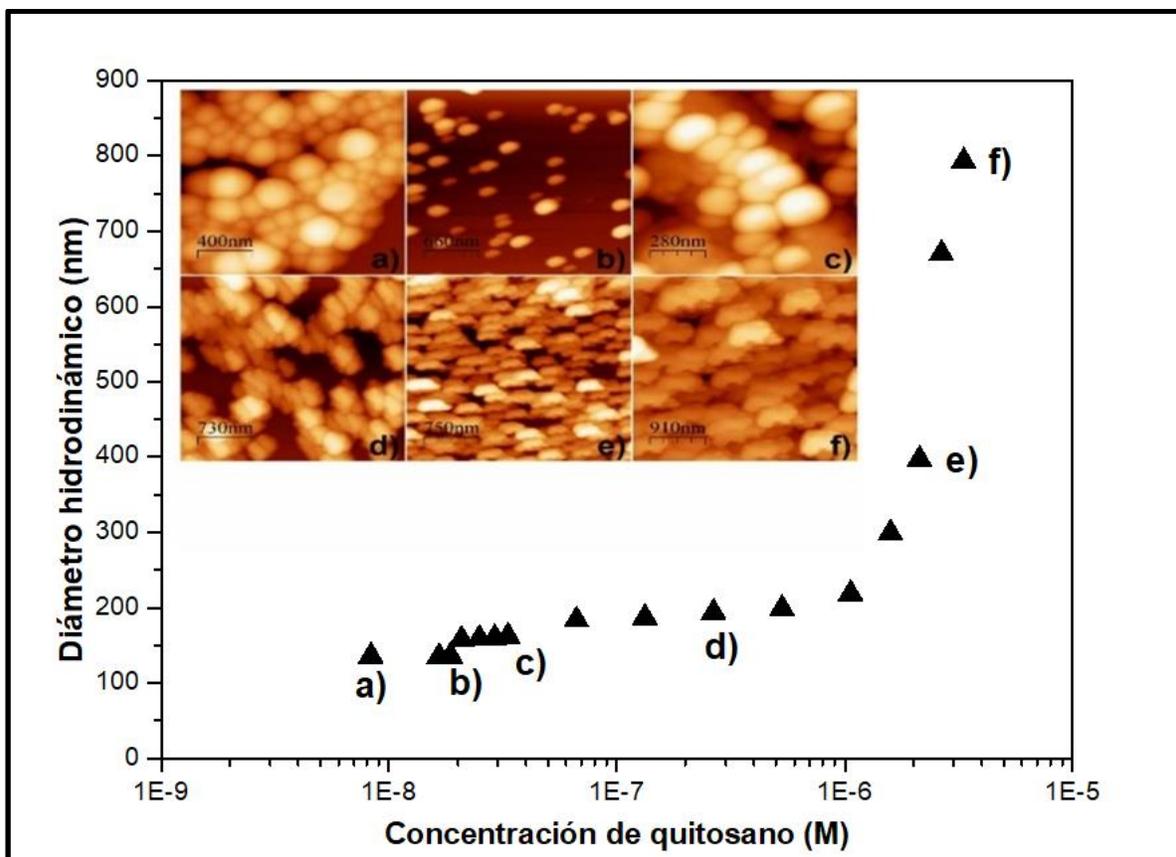


Figura 17. Comportamiento del diámetro hidrodinámico obtenidos por DLS e imágenes de AFM de NPs de magnetita/PLGA modificadas con diferentes concentraciones de quitosano. a) NPs de magnetita/PLGA sin quitosano, b) 1.66×10^{-8} M, c) 3.33×10^{-8} M, d) 2.66×10^{-7} M, e) 2.13×10^{-6} M y f) 3.33×10^{-6} M.

A partir de los resultados obtenidos, se puede inferir que las NPs de magnetita/PLGA/quitosano sintetizadas utilizando una concentración de quitosano de 3.33×10^{-8} M, se consideran pues, como las más adecuadas para futuros trabajos dirigidos al diagnóstico y liberación controlada de fármacos contra enfermedades como el cáncer [83,129]. Además, la presencia de NPs magnéticas abre la posibilidad para su uso en lo que se conoce como terapia dirigida mediante campos magnéticos externos.

Estudio termodinámico de la interacción NPs de PLGA-quitosano

Con el objetivo de determinar los parámetros termodinámicos involucrados en la interacción de las NPs de magnetita/PLGA-quitosano se realizaron dos experimentos de ITC. En un primer experimento, las NPs de magnetita/PLGA fueron colocadas dentro de la celda de muestra y fueron tituladas con una disolución de quitosano. En el segundo experimento, el cual fue tomado como blanco, las NPs de magnetita/PLGA fueron

colocadas en la celda muestra y, posteriormente, fueron tituladas con una disolución ácida libre de quitosano de pH 5.1, igual al de la disolución de quitosano. Los datos de la unión del ligando entre las NPs de magnetita/PLGA y quitosano se analizaron siguiendo el protocolo descrito por Robles *et al.* [130] utilizando el modelo de un solo e idéntico sitio de unión proporcionado por el software de MicroCal.

Recientemente, la calorimetría ITC ha sido utilizada para determinar los parámetros termodinámicos de formación de NPs de quitosano hidrofobizado [130,131]. Estos estudios calorimétricos demostraron que las interacciones electrostáticas son las principales fuerzas que intervienen en la formación de NPs de quitosano; sin embargo, las interacciones por puentes de hidrógeno pueden contribuir a la formación de NPs y complejos poliméricos [132]. La figura 18 muestra el comportamiento del calor integrado de la interacción de las NPs de magnetita/PLGA-quitosano para diferentes relaciones molares quitosano/NPs. La entalpía exotérmica correspondiente a las interacciones electrostáticas entre las NPs y el quitosano, mostró un valor más alto en comparación con los obtenidos por Robles *et al.* [130] para la interacción insulina-quitosano o respecto a la formación de complejos poliméricos reportados por otros investigadores [131–133].

A partir de la de curva obtenida (línea sólida), y asumiendo sitios de unión idénticos e independientes, se puede deducir que la adsorción de las moléculas de quitosano sobre la superficie de las NPs está mediada por interacciones electrostáticas. El valor de la constante de unión obtenida resultó del orden de $1.19 \times 10^8 \pm 2.23 \times 10^7$, similar a la reportada por Ma *et al.* [133] y Alatorre-Meda *et al.* [132] para la interacción de quitosano con ADN. El número de sitios de unión fue de 3.4, que corresponde al número de cadenas de quitosano por NP. Finalmente, el cambio de entropía calculado fue de $-9.0 \times 10^3 \text{ cal mol}^{-1}$, que corresponde a un incremento de orden en el sistema de NPs, confirmando asimismo que el proceso de unión es eminentemente entálpico.

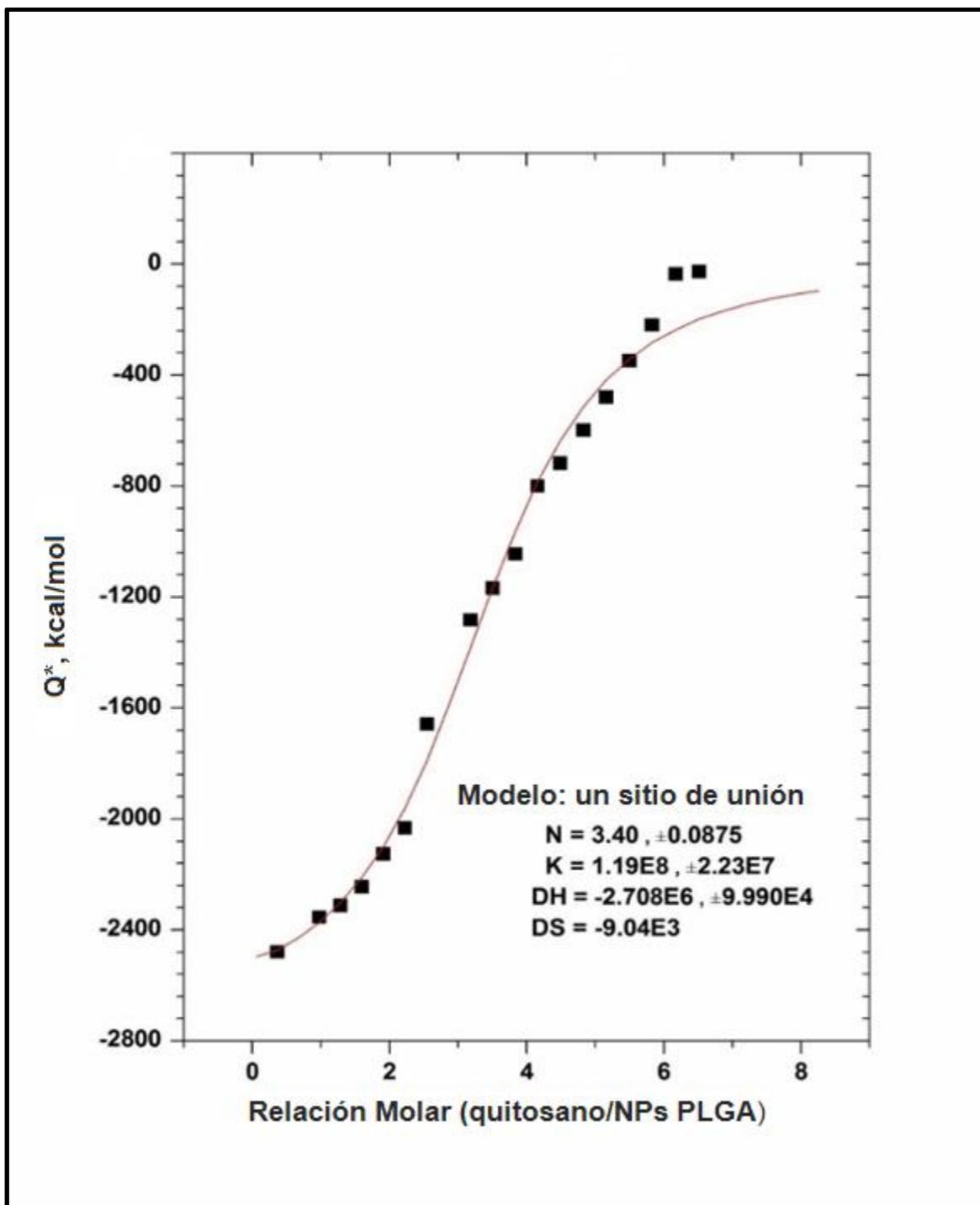


Figura 18. Calor integrado de la interacción entre nanopartículas de magnetita/PLGA y quitosano. La línea sólida representa el ajuste al modelo de un sitio de unión de los datos experimentales.

Potencial ζ

La figura 19 muestra el comportamiento del potencial ζ de las NPs de magnetita/PLGA a diferentes concentraciones de quitosano, observándose la presencia de una meseta a concentraciones entre 2.8×10^{-8} y 1.38×10^{-7} M. Estos resultados son muy similares a los reportados por Guo y Gemeinhart [82]; sin embargo, estos investigadores obtuvieron este comportamiento a concentraciones de quitosano entre 4.5×10^{-6} y 6.8×10^{-6} M. Como se observa en la figura 19, las NPs de magnetita/PLGA presentan una carga superficial negativa de -27 mV, similar a los valores reportados por Bootdee *et al.* [22] de -26 mV, y al de Guo *et al.* [82] de -20 mV, para NPs de PLGA puro. La diferencia observada en el potencial ζ respecto al trabajo de Guo *et al.* probablemente se deba a que, en este caso, las cadenas de PLGA alrededor de las NPs de magnetita presentan una mayor proporción de grupos carboxilos.

El comportamiento de potencial ζ muestra que conforme se incrementa la concentración del biopolímero hasta aproximadamente 3×10^{-8} M, el potencial ζ incrementa hasta el desarrollo de una pequeña meseta alrededor de 25 mV, también descrita por Guo *et al.* para NPs de PLGA sin magnetita [82]. Sin embargo, esta última se presentó a valores cercanos de 55 mV y mayores concentraciones de quitosano, como se mencionó previamente. La presencia de esta meseta significa que incluso cuando la concentración de quitosano se incrementa, el tamaño de partícula y la carga de superficie no presentan cambios significativos probablemente debido a que el biopolímero es adsorbido parcialmente en la superficie de las NPs de magnetita/PLGA. A la concentración de quitosano 3×10^{-8} M, el diámetro promedio de partícula aumento a 300 nm (ver figura 17), y el valor de potencial ζ alcanza los 52 mV (figura 19). Después de alcanzar este valor, incluso cuando se aumenta la concentración de quitosano, el valor de potencial ζ no presenta más cambios significativos. Guo *et al.* Asignaron esta ausencia de variaciones a que, probablemente, las últimas capas de quitosano alrededor de las NPs no se forman ordenadamente, estas se repelen unas a otras debido a las interacciones electrostáticas pero, al mismo tiempo, son atraídas por otras cadenas mediante la formación de puentes de hidrógeno o interacciones de Van der Waals dando lugar a la formación de agregados alrededor de la NP, provocando que la carga superficial no aumente, pero si se presente un incremento significativo en el tamaño de partícula.

Diversos grupos de investigación han intentado correlacionar el tamaño de partícula y la concentración de polímero con el valor de potencial ζ observado experimentalmente [134,135]. Por ejemplo, recientemente, Leroy *et al.* [136] analizaron el comportamiento de potencial ζ en NPs de sílice en base al modelo de Stern. En el presente trabajo se analiza el comportamiento del potencial ζ de las NPs obtenidas con diferentes concentraciones de quitosano, comparándose con el comportamiento de NPs ideales utilizando, para ello, la ecuación de Grahame (10) [29].

$$\sigma = (8RT\epsilon\epsilon_0C^\infty)^{\frac{1}{2}} \sinh\left(\frac{ze\psi}{2kT}\right) \quad (10)$$

donde σ , R , T , ϵ , ϵ_0 , C^∞ , z , e , ψ y k son la densidad de carga superficial de las NPs, constante de los gases ideales, temperatura absoluta, permitividad dieléctrica del agua, constante dieléctrica en el vacío, concentración de co-iones, valencia de los iones, carga del electrón, potencial ζ y constante de Boltzmann, respectivamente.

Utilizando una concentración de co-iones de 1 M m^{-3} , una valencia de 1, la densidad de carga del quitosano obtenida mediante titulación conductimétrica [111] (600 grupos aminos disponibles por cadena de quitosano) y el valor del diámetro de partícula obtenido por DLS, se determinó la densidad de carga para una partícula ideal para diferentes concentraciones de quitosano y, a partir de la ecuación (10) se ajustaron los valores del potencial ζ a los valores experimentales. La figura 19 muestra el ajuste de la curva.

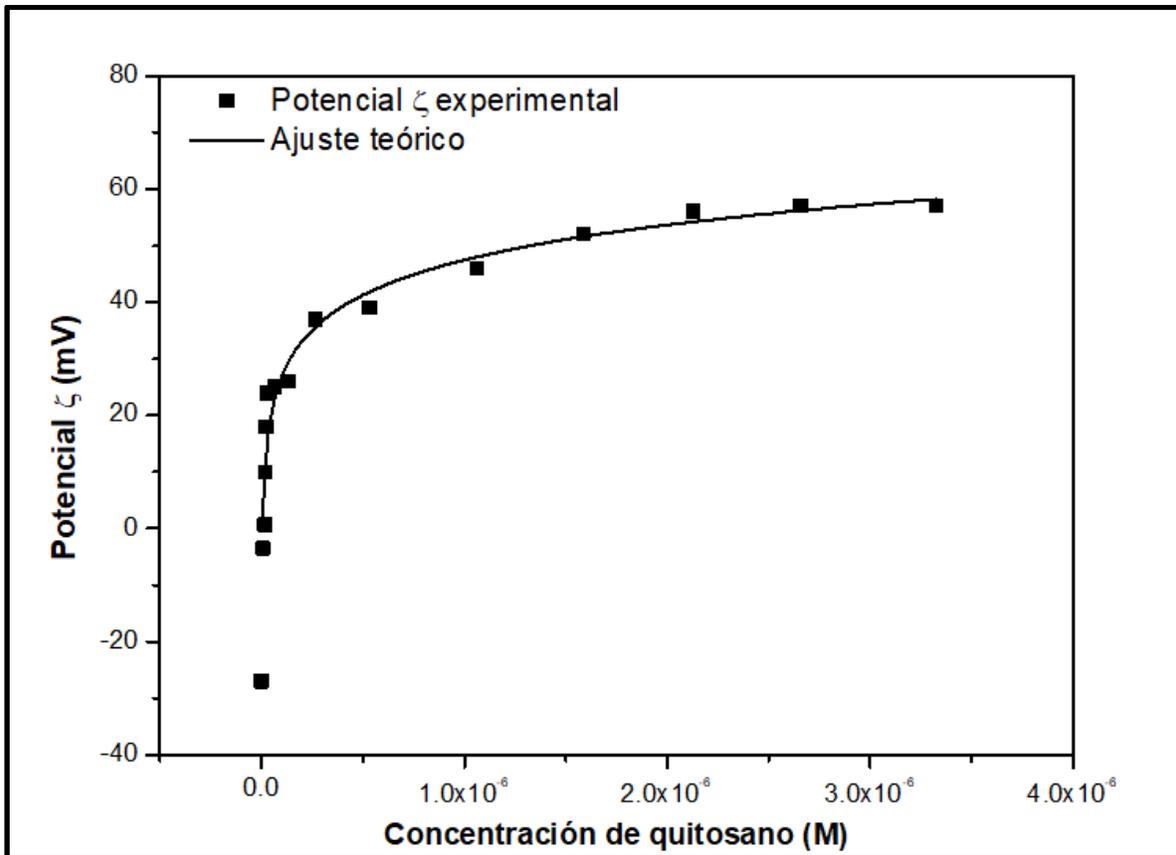


Figura 19. Medidas de potencial ζ para NPs de magnetita/PLGA cubiertas con diferentes concentraciones de quitosano. La línea sólida representa el ajuste de la curva obtenido con un modelo teórico basado en la ecuación de Grahame.

A partir de la densidad de carga de las NPs (σ) y los valores experimentales de potencial ζ en la ecuación (10) también se puede obtener el número de cadenas de quitosano adsorbidas en la superficie de las NPs. La figura 20 muestra una comparación entre el número de cadenas de quitosano experimental y teóricamente.

Se puede observar que la diferencia entre ambos valores se hace más evidente conforme incrementa la concentración de quitosano, donde la carga de superficie no presenta cambios apreciables, es decir, cuando las cadenas de quitosano forman agregados aislados, como se mencionó anteriormente. Asimismo, a partir de los resultados obtenidos mediante ITC, se encontró que por cada NP se adsorbían 3.4 cadenas de quitosano a su alrededor para una concentración de quitosano de 2.66×10^{-7} M; a esta misma concentración, utilizando el modelo teórico a partir de la ecuación de Grahame se obtiene un total de 3.6 cadenas de quitosano alrededor de cada NPs, como se observa en la figura 20.

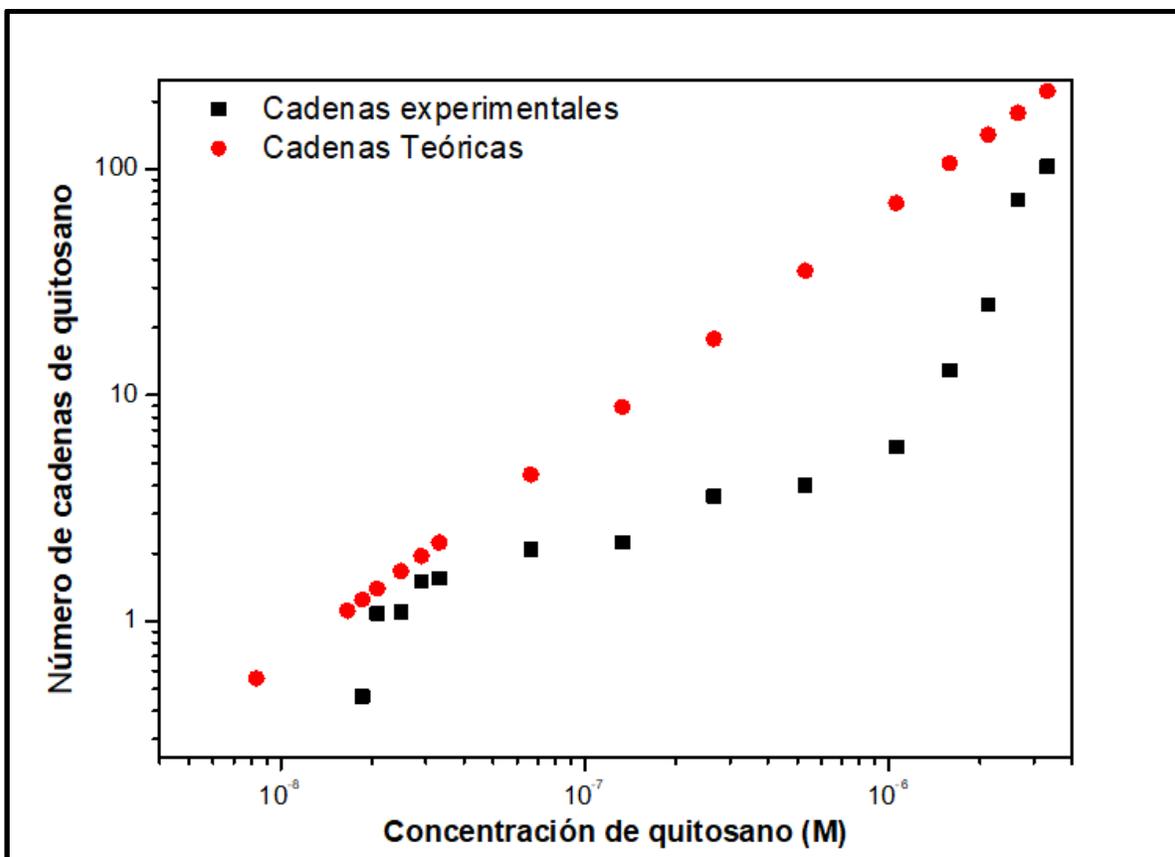


Figura 20. Representación de número de cadenas por NP de magnetita/PLGA obtenidas (●) y mediante el modelo teórico utilizando la ecuación de Grahame (■).

Interacción de NPs con un modelo de membrana celular

La figura 21 muestra las isotermas de la mezcla de fosfolípidos en la interfase aire-agua y una subfase que consiste en una suspensión de NPs magnetita/PLGA/quitosano con diferente carga superficial. La isoterma correspondiente a la mezcla de fosfolípidos con agua pura en la subfase muestra una pequeña meseta alrededor de $15\text{-}20 \text{ mN m}^{-1}$, muy similar a la previamente reportada por Valencia *et al.* para 1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) [137]. El área molecular promedio de la mezcla de fosfolípidos fue de $64 \text{ Å}^2/\text{molécula}$, un valor mayor en comparación con los resultados reportados por López Oyama *et al.* [138] para el DPPC ($55 \text{ Å}^2/\text{molécula}$), probablemente como consecuencia de la presencia de los otros fosfolípidos en la mezcla.

Cuando se colocaron las NPs con diferente carga superficial en la subfase, se observó que conforme se incrementa la carga superficial de las partículas el área por molécula aumentaba. Los valores de área por molécula encontrados para las NPs con potencial ζ de -

27, 0.7 y 24 mV fue de 85, 92 y 95 A²/molécula, respectivamente. Este comportamiento demuestra que las NPs se mantienen en la monocapa de fosfolípidos incluso a presiones altas, y la interacción de estas con el modelo de membrana es mayor para las que presentan carga positiva. Similares resultados fueron reportados por Schulz *et al.* [139], quienes concluyeron que las NPs cargadas positivamente interactúan con las terminaciones fosfato de los lípidos. Otro efecto observado en las isothermas en presencia de las NPs es la ausencia de la pequeña meseta observada en la isoterma de la mezcla de fosfolípidos en ausencia de NPs en la subfase. Este fenómeno también se ha observado en monocapas de DPPC utilizando NPs hidrofóbicas [140], péptidos catiónicos [138] y quitosano hidrofobizado [141] en la subfase. Este hecho también concuerda con los resultados de Schulz *et al.*, que notaron el cambio del equilibrio líquido condensado/líquido expandido (LC/LE) y la eliminación de la fase LC a medida que se incrementa la concentración de polímero interaccionando con el modelo de membrana.

Para grandes áreas, correspondientes a la fase gaseosa o fase LE, se ha observado que antes de iniciar la compresión de la monocapa las nanoplataformas estaban presentes en esta, incrementando la presión superficial conforme la carga superficial de estas era más positiva.

El módulo de compresibilidad, definido como $C_s^{-1} = -A d\pi/dA$ para cada presión (π), y área (A) de la isoterma, es utilizado por varios autores para caracterizar la compresibilidad de las monocapas en la interfase aire-agua [136–138]. Los resultados observados en el recuadro de la figura 21 muestran el efecto de las NPs con diferente carga superficial sobre la flexibilidad de la membrana. Se ha observado que para las NPs con carga superficial más positiva (24 mV) que interaccionan con la monocapa presentan un módulo de compresibilidad más pequeño a todas las presiones. Particularmente, a una presión superficial de 30 mN m⁻¹ el módulo de compresibilidad cae de 77 mN m⁻¹ para la mezcla de fosfolípidos a 64, 56 y 24 mN m⁻¹ cuando las nanoplataformas con potencial ζ de -27, 0.7 y 24 mV están presentes en la subfase acuosa, respectivamente. Esto confirma que las NPs cargadas positivamente inducen una membrana más fluida, de acuerdo con los estudios de Wang *et al.* [142] y Cámara *et al.* [143] con un modelo de membrana de fosfolípidos.

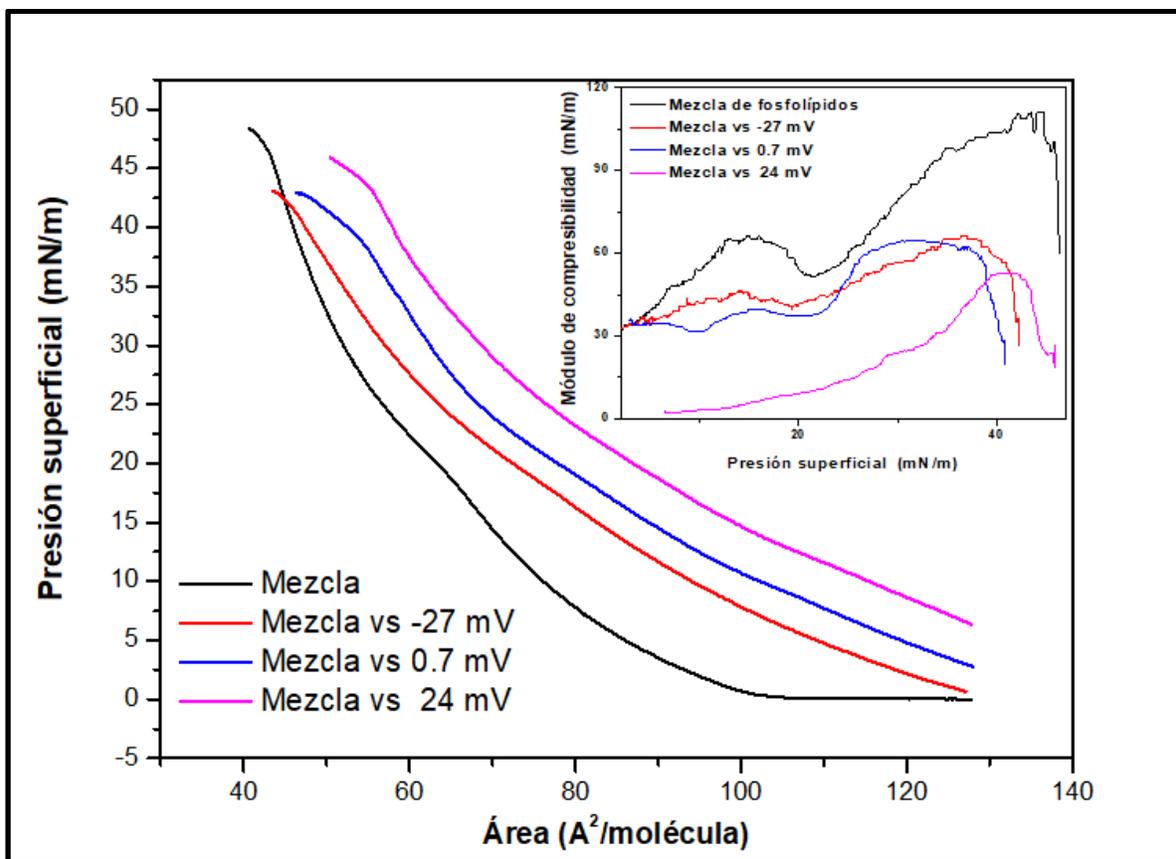


Figura 21. Isothermas de presión superficial para monocapas extendidas y módulos de compresibilidad para NPs de magnetita/PLGA/quitosano con diferente carga superficial presentes en la subfase para un modelo de membrana constituido por una mezcla de fosfolípidos en la interfase aire-agua.

Penetración de NPs en monocapas

Finalmente, se muestra el comportamiento de la adsorción de NPs dentro de la mezcla de fosfolípidos en la interface aire-agua. El efecto de la adsorción de NPs con diferente carga superficial en la mezcla de fosfolípidos en la interface aire -agua, se muestra en la figura 22. En esta figura, se observa una débil estabilidad en la mezcla de fosfolípidos. Similar inestabilidad fue observada previamente por Almada *et al.* [140] para una mezcla de dos fosfolípidos y por Barzyk *et al.* [144] para un solo fosfolípido en la interfase aire-agua. Es importante notar que la disminución de la presión superficial fue menor cuando las NPs fueron depositadas en la subfase, es decir, se obtuvo un incremento en la presión con las NPs adsorbidas en la monocapa. El incremento de presión para las NPs con potencial ζ de -27, 0.7, 24 y 34 mV fue de 10, 13, 20 y 21 mN m^{-1} , respectivamente. Estos resultados muestran que NPs con carga positiva y negativa fueron capaces de interactuar con el

modelo de membrana, incluso cuando la proporción de fosfolípidos con carga negativa en la mezcla fue baja (aproximadamente 17%), siendo este porcentaje suficiente para la adsorción de NPs con carga positiva en la monocapa de fosfolípidos.

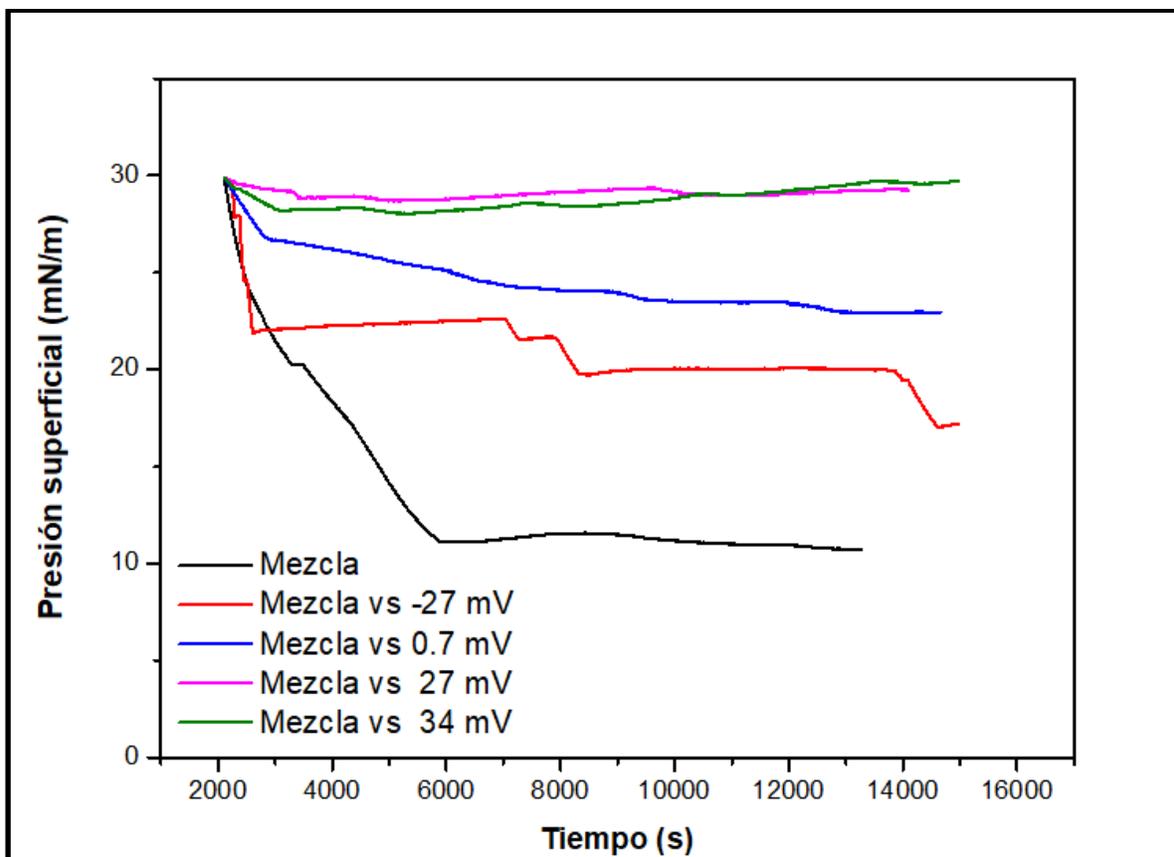


Figura 22. Isothermas de adsorción para NPs de magnetita/PLGA/quitosano con diferente carga superficial en un modelo de membrana compuesto por una mezcla de tres fosfolípidos en la interface aire-agua.

Una vez establecido el método para la formulación de la NPs magnetita/PLGA/quitosano (nanoplataforma) con carga superficial modulable y realizar ensayos para obtener una buena aproximación sobre la interacción de estas con modelos de membrana, información muy importante para determinar posibles interacciones con células y para el desarrollo de sistemas efectivos para liberación controlada de fármacos, se procedió a la incorporación de cisplatino como agente anticancerígeno en la nanoplataforma y se realizaron ensayos para evaluar su potencial citotoxicidad e internalización celular. Los resultados se presentan a continuación.

Co-encapsulación de cisplatino y NPs de magnetita en la nanoplataforma y ensayos celulares.

Caracterización fisicoquímica de co-encapsulamiento de NPs de magnetita y cisplatino en la nanoplataforma (cisplatino-MPNPs)

Como se mencionó en la sección anterior, se han determinado las condiciones óptimas para preparar nanoplataformas de magnetita/PLGA/quitosano (MPNPs) con carga superficial modulable. Así, se preparó una nanoplataforma multifuncional compuesta de NPs de magnetita y cisplatino, cargados en una matriz de PLGA recubierta con quitosano para modificar su superficie. Además, se empleó polivinil alcohol (PVA) como agente surfactante para favorecer la estabilidad de las MPNPs. La formulación de la nanoplataforma se llevó a cabo utilizando varias relaciones peso/volumen de PVA (1, 1.5, 2, 2.5 y 3%) para evaluar su efecto en las propiedades fisicoquímicas. La figura 23 muestra el comportamiento del tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PDI) y potencial ζ de las MPNPs sintetizadas en presencia de PVA. Cuando este polímero fue utilizado se observa un incremento en el tamaño de la nanopartícula comparado con el tamaño de MPNPs sintetizadas en ausencia de PVA (160 nm). Toda las MPNPs preparadas a diferentes relaciones peso/volumen de PVA mostraron tamaños similares, entre 202 y 213 nm, con un índice de polidispersidad de 0.1, lo que indica una estrecha distribución de tamaños. Por otro lado, conforme la concentración de PVA aumenta, el potencial ζ de las partículas disminuye. Este efecto se debe a la interacción entre los grupos hidroxilo del PVA y los grupos amino y oxidrilo del quitosano dando lugar a la formación de puentes de hidrógeno, lo que implica una reducción de la carga superficial [145,146].

El tamaño de partícula y el potencial ζ son muy importantes cuando se pretende utilizar sistemas de NPs en liberación controlada de fármacos. La tabla 2 muestra los resultados para las NPs sintetizadas utilizando 1.5% peso/volumen de PVA, en las que se observa un tamaño de partícula y potencial ζ de 205 ± 4 nm y 13 ± 2 mV, respectivamente. Los estudios evaluando la internalización celular de partículas en función de su carga superficial han demostrado que el potencial eléctrico negativo en la superficie de células cancerosa es desfavorable para la interacción con NPs cargadas negativamente; por lo tanto, NPs con carga superficial positiva son mejores que NPs neutras y con carga superficial negativa [147–149]. Sin embargo, NPs con carga superficial muy positiva

provocan daños en la membrana celular como perforaciones en la bicapa lipídica celular para ingresar a las células, evitando las vías endocíticas [150]. Por ello, se ha considerado que el tamaño de esta nanoplataforma está dentro del límite para su uso por vía parenteral, y su moderada carga superficial positiva facilita la interacción con la membrana celular garantizando una mayor captación por parte de las células sin comprometer la integridad celular [151].

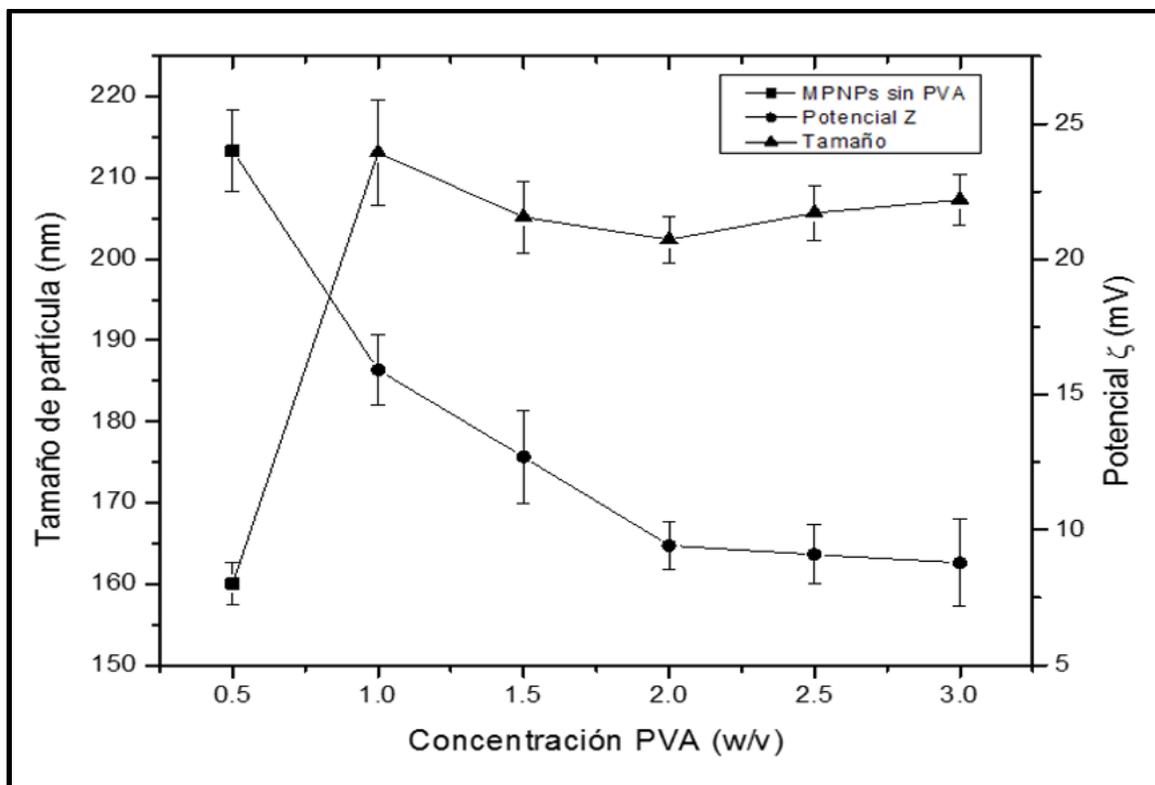


Figura 23. Variación del tamaño y potencial ζ de MPNPs formuladas con diferentes relaciones peso/volumen de PVA.

Con el objetivo de conseguir la cantidad óptima de cisplatino para una alta eficiencia de encapsulamiento se utilizaron diferentes cantidades iniciales del fármaco (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1 mg) durante la síntesis de la nanoplataforma.

Las nanoplataformas cisplatino-MPNPs se evaluaron para determinar su tamaño (mediante DLS), índice de polidispersidad (PDI) y potencial ζ . En la tabla 2 se puede observar que no hay cambios significativos en cuanto a tamaño, PDI y potencial ζ entre las MPNPs y las cisplatino-MPNPs. Resultados similares fueron reportados por Moreno *et al.* y Portaccio *et*

al. para cisplatino encapsulado en NPs de PLGA utilizando una emulsión doble agua/aceite/agua [152,153].

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de nanoplateformas MPNPs y cisplatino-MPNPs.

	MPNPs	CDDP-MPNPs
Size (nm)	205 ± 4	208 ± 4
ζ potential (mV)	13 ± 2	10 ± 1
PDI	0.051	0.084
EE %	—	32 ± 3
DL %	—	6 ± 1
Iron loading %	90 ± 5	85 ± 6

La figura 24a muestra la morfología y tamaño de las nanoplateformas obtenidas por micrografías de SEM. Las cisplatino-MPNPs exhiben forma esférica con diámetros de aproximadamente 100 nm, mas pequeños que los encontrados por DLS. No se encontraron diferencias en cuanto al tamaño y forma de partícula entre las nanoplateformas MPNPs y cisplatino-MPNPs [15,152,153]. En la figura 24b, la micrografía TEM muestra claramente que las NPs de magnetita fueron exitosamente atrapadas dentro de la matriz de PLGA, ya que se observan dominios oscuros dentro de las NPs de PLGA, como se mencionó en la seccion anterior. La eficiencia de carga de las NPs de magnetita en la matriz de PLGA se determinó utilizando espectroscopía de masas por inducción de plasma (ICP-MS). La tabla 2 muestra las eficiencias de carga de 90 ± 5 % y 85 ± 6 % para las nanoplateformas MPNPs y cisplatino-MPNPs, respectivamente. La alta eficiencia de encapsulación se debe a la presencia de ácido oleico en la superficie de las NPs de magnetita, que les confiere un carácter hidrofóbico permitiendo su encapsulamiento en la matriz de PLGA. Por otro lado, la figura 24c muestra la curva de magnetización a 300 K para las cisplatino-MPNPs, donde se observa claramente un comportamiento superparamagnético ya que no se observa ciclo de histéresis, muy similar al de las NPs de magnetita libres. La M_s fue de 26.5 emu/g, más pequeña que la obtenida para NPs de magnetita libres (66.7 emu/g). Esta disminución en la magnetización es producto de un efecto de apantallamiento tanto de la matriz polimérica donde se encuentran atrapadas las NPs de magnetita, como de los polímeros que estabilizan y modulan la carga de la nanoplateforma [86,90]. Singh *et al.* encapsularon NPs de

magnetita dentro de PLGA y también observaron que la M_s fue más pequeña cuando las NPs de magnetita se encontraban dentro de la matriz de PLGA [103]. Sin embargo, estos valores de M_s aunque sean más pequeños permiten su uso como agentes de contraste. Por ejemplo, Ling *et al.* obtuvieron NPs poliméricas magnéticas con M_s de 23.3 emu/g y con excelente contraste negativo en secuencias de MRI ponderadas en T_2 en células PC3 [16]. Por otro lado, Patel *et al.* formularon NPs de magnetita@PLGA como agente de contraste para MRI, con M_s de 22.5 emu/g. En este trabajo las NPs fueron dirigidas al hígado de conejo como modelo animal, mostrándose que el contraste en la imagen MRI fue mejorado después de la aplicación de las NPs, confirmando que una vez que las NPs están en el hígado estas interactúan con los núcleos hidrógeno de su alrededor, dando lugar al cambio de tiempo de relajación de espín [77]. Por lo tanto, la M_s que poseen nuestras cisplatino-MPNPs es suficiente para su uso en aplicaciones biológicas como agente de contraste.

En la figura 24d podemos observar un incremento en la T_B para las nanoplataformas cisplatino-MPNPs con respecto a las NPs de magnetita libres. La T_B depende de las interacciones inter-partícula, del estado de la superficie de las partículas, del tamaño de partícula y la distribución de tamaños. Por lo tanto, el incremento en la T_B podría atribuirse a la formación de agregados de NPs de magnetita dentro de la matriz polimérica, lo que da lugar a una menor separación entre partículas, incrementando la interacción magnética dipolo-dipolo y por tanto, dando lugar al incremento de la T_B observada [55].

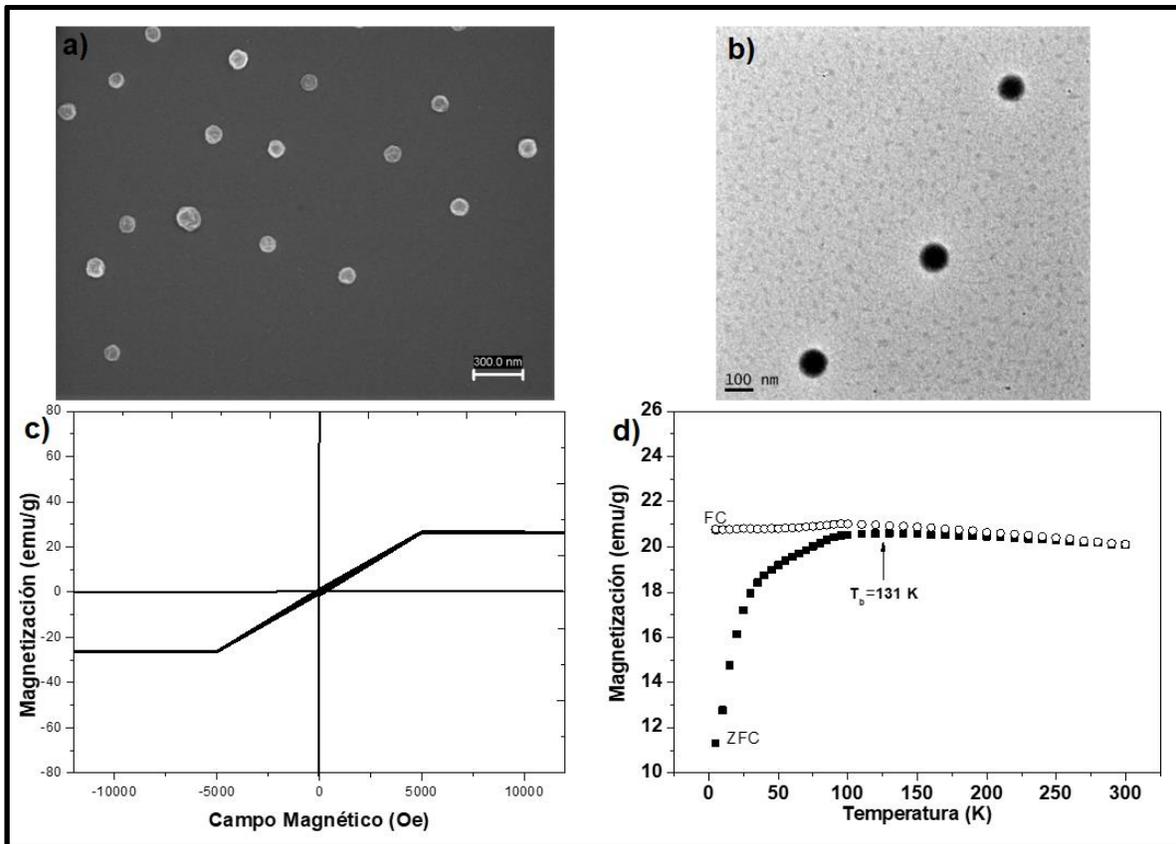


Figura 24. Caracterización de cisplatino-MPNPs a) micrografía SEM, b) micrografía TEM, c) curva de magnetización a 300 K y d) ZFC y FC.

Determinación de cisplatino en MPNPs y perfiles de liberación In-vitro.

La tabla 2 muestra la eficiencia de carga y eficiencia de encapsulamiento de la nanoplateforma cisplatino-MPNPs, con valores de 32 % y 6.4%, respectivamente. Estos valores se consiguieron después de saturar la fase acuosa de PVA-quitosano con 0.5 mg de cisplatino. Previamente Avgoustakis *et al.* [154] y Moreno *et al.* [153] reportaron que cuando no se realizaba la saturación con cisplatino el porcentaje de encapsulamiento se reducía considerablemente, con una importante pérdida de cisplatino durante el proceso de preparación de las NPs. La técnica de emulsión simple es poco utilizada para encapsular fármacos hidrofílicos dentro de NPs de PLGA. Sin embargo, existen trabajos previos en que se reporta el uso de esta técnica para la encapsulación de cisplatino. Así, Li *et al.* [30] prepararon cisplatino cargado en microesferas de PLGA mediante esta técnica, con una eficiencia de encapsulamiento y eficiencia de carga de 68.7 % y 6.83 % respectivamente. Sin embargo, aunque el porcentaje de fármaco encapsulado es alto, desafortunadamente el

tamaño de partícula es demasiado grande para su posible uso como sistema de liberación controlada.

Por otro lado, la técnica de emulsión doble es ampliamente utilizada para la encapsulación de cisplatino, obteniendo diferentes eficiencias de carga, dependiendo del protocolo utilizado para la formulación de las NPs. Por ejemplo, Portaccio *et al.* [152] y Nejati *et al.* [155] sintetizaron NPs de PLGA con cisplatino en su interior, obteniendo una eficiencia de encapsulamiento del 47 y 70%, respectivamente; sin embargo, encontraron dificultades para controlar el tamaño de partícula. Por tanto, los resultados del presente trabajo muestran que las cisplatino-MPNPs presentan una cantidad de fármaco en su interior comparable a estudios previos que emplean la técnica de emulsión doble y, especialmente, poseen un tamaño de partícula apropiado para su uso como sistema de liberación controlada de fármacos. La tabla 3 muestra una comparación entre las cisplatino-MPNPs y las NPs obtenidas por otros grupos de investigación.

Tabla 3. Comparación de tamaño, potencial ζ y EE% de nuestras cisplatino-MPNPs con otras obtenidas por otros grupos de investigación.

	Ibarra et al	Ref 23	Ref 50	Ref 16
Tamaño (DLS)	208 \pm 4nm	-----	195 \pm 2 nm	-----
Tamaño (TEM)	100 \pm 5 nm	190-300 nm	197 \pm 16 nm	> 100 μ m
Potencial ζ	10 \pm 1 mV	-----	-20.2 \pm 0.5 mV	-----
EE %	32 \pm 3	70	47.1 \pm 5.3	68.7 \pm 0.37

La figura 25 muestra los perfiles de liberación de cisplatino liberado de las cisplatino-MPNPs a tres diferentes pH, 5.8, 6.8 y 7.4, que aproximadamente se corresponden a los pH de diferentes compartimentos intracelulares. Para los tres diferentes pH, la liberación de cisplatino ocurre en 2 fases: una fase inicial de liberación rápida (*burst*), seguida por una segunda fase de liberación sostenida hasta una zona casi de constancia después de 10 días de diálisis. La concentración liberada del fármaco a partir de las cisplatino-MPNPs a pH 7.4 fue de alrededor del 16% de la carga total durante las primeras 6 horas de incubación, inferior al previamente reportado [30,154,156]. Este resultado sugiere que este efecto se debe a la presencia de PVA y quitosano en la superficie de las nanoplataformas que actúan

como una barrera física, provocando una liberación más lenta. Por otro lado, la velocidad de liberación del cisplatino fue mayor a pH 5.8 y 6.8, lo que confirma una liberación dependiente del pH. Estos resultados confirmaron nuestra hipótesis de considerar a la capa de PVA/quitosano como una barrera física, ya que a pH ácido los grupos amino presentes en la capa de quitosano están mayormente protonados, extendiendo sus cadenas y permitiendo la difusión del cisplatino al exterior de la partícula [87]. A manera de comparación, en la figura 25 también se muestra el perfil de liberación para cisplatino libre en disolución tampón de PBS pH 7.4, donde se observa una liberación del fármaco de más del 90% en las primeras 24 h de incubación.

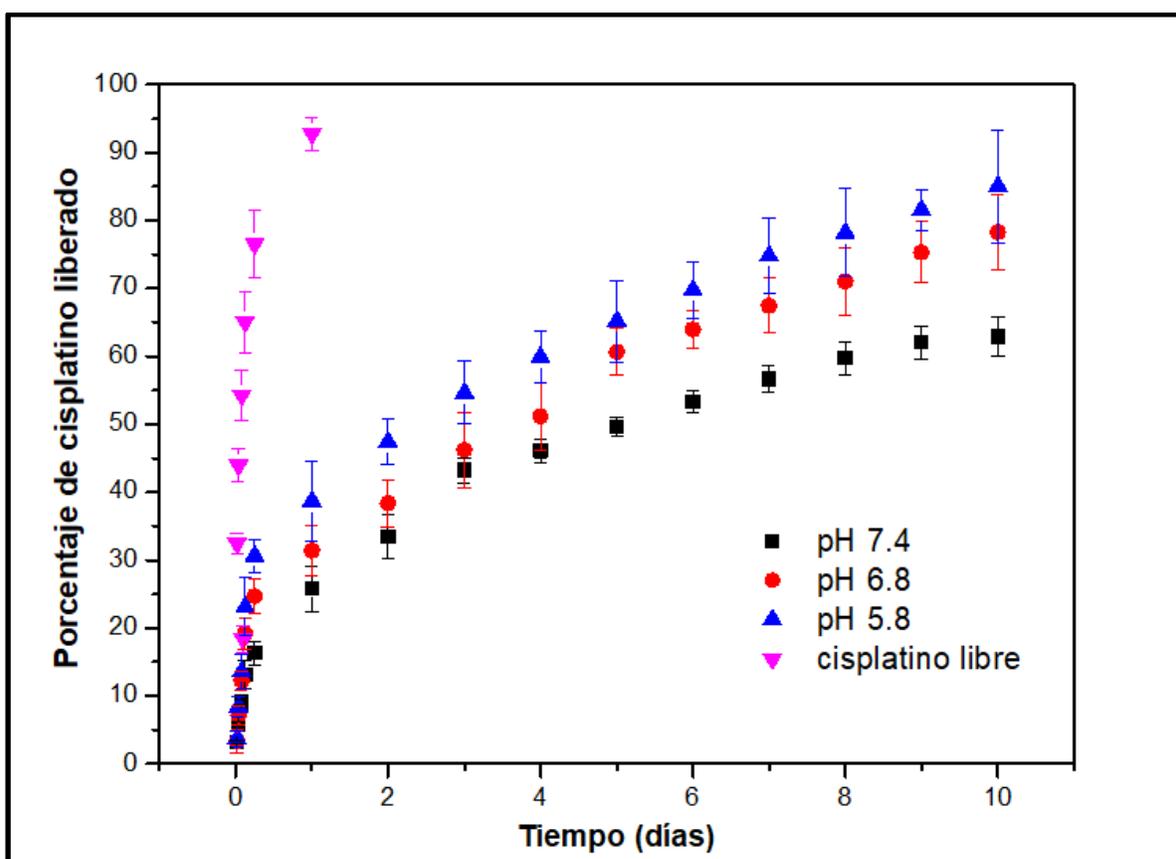


Figura 25. Perfiles de liberación de cisplatino encapsulado en cisplatino-MPNPs a diferentes pH. Como control se muestra el perfil de liberación del cisplatino libre en el mismo experimento de diálisis.

Caracterización de cisplatino-MPNPs como agente de contraste por MRI

Las NPs de magnetita son comúnmente utilizadas como agentes de contraste T_2 en MRI. Este tipo de NPs pueden disminuir la intensidad de la señal por el desfase protón-espín. Se realizaron medidas de relajación de protón para evaluar la capacidad de cisplatino-MPNPs como agente de contraste T_2 en MRI. Como se muestra en la figura 26a, existe una relación lineal entre la velocidad de relajación T_2 ($1/T_2$) y la concentración de Fe contenida en las cisplatino-MPNPs. La relajatividad (r_2), que se obtiene a partir del valor de la pendiente de la representación gráfica de velocidad de relajación espín-espín frente la concentración molar de átomos Fe, fue de $10.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Los resultados indican que las cisplatino-MPNPs pueden incrementar la velocidad de relajación, lo que permite que estas NPs sean útiles como agentes de contraste para MRI. Por otro lado, varias concentraciones de Fe contenidas en las cisplatino-MPNPs fueron estudiadas mediante resonancia magnética ponderada en T_2 para evaluar su capacidad de mejora de contraste en imágenes T_2 . Como se puede ver en la figura 26b, las cisplatino-MPNPs muestran un aumento en el contraste negativo dependiente de la concentración de Fe contenido en las NPs, lo que sugiere su posible uso como agente de contraste T_2 .

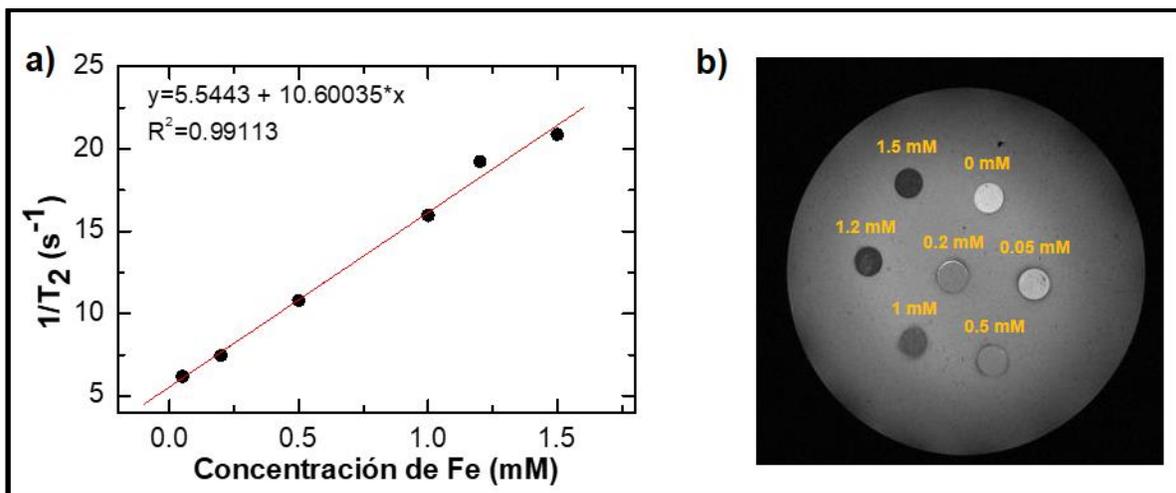


Figura 26. Caracterización de las cisplatino-MPNPs como agente de contraste. a) Velocidad de relajación T_2 en función de la concentración de Fe; b) Imágenes ponderadas en T_2 de cisplatino-MPNPs en gel de agar en función de la concentración de Fe.

Ensayos de internalización celular de FITC-MPNPs

Como se mencionó anteriormente, las propiedades fisicoquímicas como el tamaño, forma y carga superficial de las NPs juegan un rol importante en la captación e internalización celular. Específicamente, la interacción de NPs con la membrana celular está determinada en parte por la carga superficial de las mismas. Su variación/cambio/modulación pueden mejorar potencialmente la interacción con las células y permitir su internalización en el interior celular [151]. Debido a que los niveles de citotoxicidad de las NPs pueden verse afectados por su grado de internalización en las células cancerosas, en primer lugar, se procedió a evaluar la internalización de la nanoplataforma MPNPs modificada con la sonda fluorescente FITC en células cancerosas HeLa, y MDA-MB-231. La internalización de FITC-MPNPs en las células cancerosas después de un tiempo de incubación de 4 h, se visualizó utilizando un microscopio confocal. Las figuras 27 y 28 muestran la correcta internalización celular de las FITC-MPNPs en ambas líneas celulares. Se observa claramente patrones granulares de fluorescencia dentro y fuera de las mismas con una distribución de las FITC-MPNPs no nuclear y, principalmente en el citoplasma. Las figuras 27f y 28f muestran imágenes de una reconstrucción 3D, correspondientes a delgadas secciones ópticas a lo largo del eje z, lo que nos permite confirmar la presencia de las FITC-MPNPs en el interior celular. La internalización celular probablemente se inicia por interacciones no específicas entre las FITC-MPNPs y la membrana celular. El potencial ζ positivo, de las NPs permite su interacción electrostática con los dominios negativos presentes en la membrana celular, en concordancia con el estudio previo realizado acerca de las interacciones biofísicas entre NPs de magnetita/PLGA/quitosano y con un modelo de membrana endotelial, en el cual, se determinó una fuerte interacción electrostática entre los componentes negativamente cargados del modelo de membrana y la superficie de las NPs con carga positiva. Previamente, Huang *et al.* [157] observaron que la captación celular de NPs de quitosano@MNPs por parte de células A549 de cáncer de pulmón se produce predominantemente por endocitosis adsorptiva mediada en parte por clatrina, pero no por difusión pasiva o endocitosis en fase fluida. Por lo que es esperable que un mecanismo bastante similar se produzca con las NPs aquí desarrolladas. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que las FITC-MPNPs pueden ser utilizados como buenos vehículos para liberación intracelular de agentes terapéuticos.

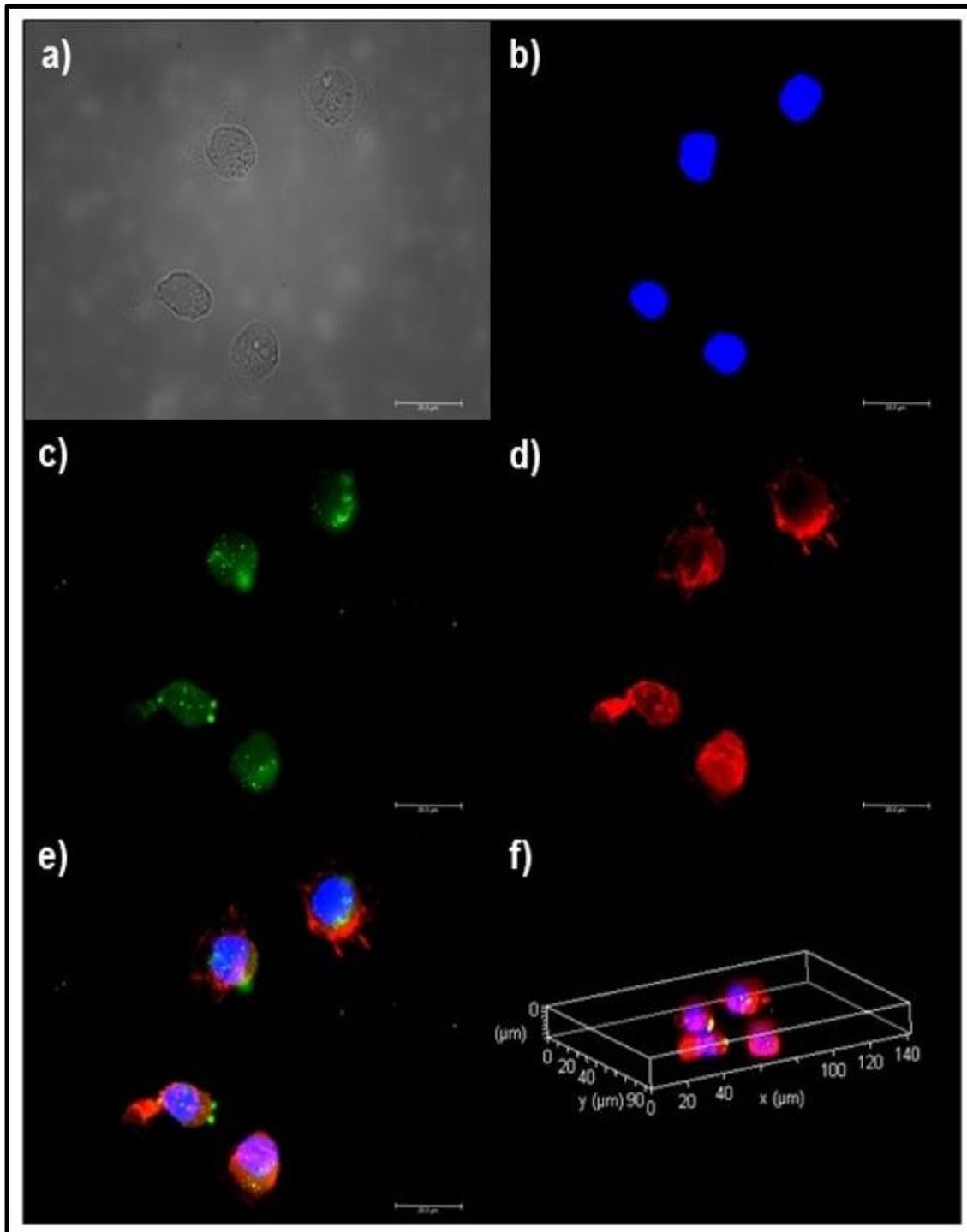


Figura 27. Imágenes de microscopía de fluorescencia demostrando la captación e internalización celular de las FITC-MPNP dentro de células MDA-MB-231. En todas las imágenes el núcleo celular fue teñido con DAPI (azul). a) Imagen de microscopía de campo brillante; b) Canal DAPI (canal azul, $\lambda= 355$ nm), c) Canal FITC (canal verde, $\lambda= 495$ nm); d) Canal BODIPY phalloidin (canal rojo, $\lambda= 633$ nm); e) imágenes superpuestas y f) reconstrucción 3D de secciones ópticas a lo largo del eje z. Barra de escala es 20 μm .

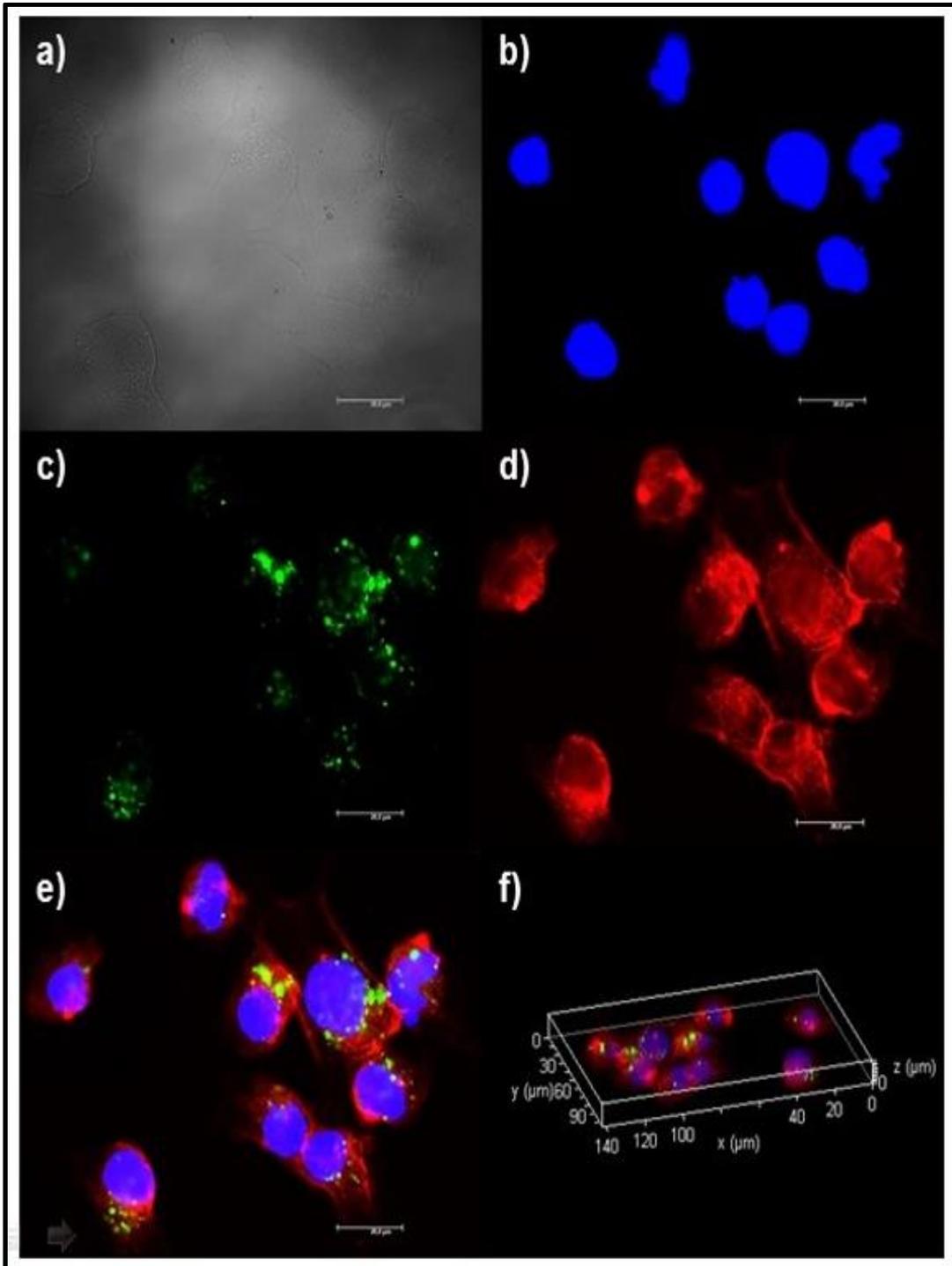


Figura 28. Imágenes de microscopía de fluorescencia demostrando la captación e internalización celular de las FITC-MPNP dentro de células HeLa. En todas las imágenes el núcleo celular fue teñido con DAPI (azul). a) Imagen de microscopía de campo brillante; b) Canal DAPI (canal azul, $\lambda= 355$ nm), c) Canal FITC (canal verde, $\lambda= 495$ nm); d) Canal BODIPY phalloidin (canal rojo, $\lambda= 633$ nm); e) imágenes superpuestas y f) reconstrucción 3D de secciones ópticas a lo largo del eje z. Barra de escala es 20 μm .

Citotoxicidad de cisplatino-MPNPs en células MDA-MB-231 y células HeLa.

A continuación, se evaluó la actividad citotóxica de MPNPs, cisplatino-MPNPs y cisplatino libre, en células Arpe-19, Hela y MDA-MB-231 mediante el ensayo MTT. En un primer ensayo, las células Arpe-19 fueron expuestas a diferentes concentraciones de MPNPs. La figura 29a muestra como la citotoxicidad aumenta conforme la concentración de MPNPs se incrementaba, encontrando un IC_{50} de 9.78×10^{13} NPs/ml. A partir de estos resultados, se utilizaron concentraciones de MPNPs que daban lugar a una viabilidad celular superior al 90% (menor que 9.78×10^{12} NPs/ml) para minimizar el efecto citotóxico de las MPNPs y, así, evaluar la actividad anti-proliferativa del cisplatino cargado en las MPNPs. Las figuras 29b y 29c muestran la citotoxicidad inducida en células HeLa y MDA-MB-231 tratadas con cisplatino libre y cisplatino-MPNPs, respectivamente. Se puede ver claramente que la citotoxicidad es dependiente de la concentración de fármaco para ambos tipos de células. Cabe recordar que el cisplatino es principalmente considerado con un fármaco anticancerígeno que actúa sobre el ADN, y su citotoxicidad es atribuida a su interacción con los sitios nucleófilos N7 de las bases púricas del ADN para formar entrecruzamientos ADN-proteínas y ADN-ADN, que resulta en la inducción de apoptosis [106]. Para células HeLa, a concentraciones por debajo de $6 \mu\text{M}$ de cisplatino-MPNPs se observó mayor actividad citotóxica del fármaco cuando se libera que en su forma libre (figura 2.10b). El IC_{50} para el cisplatino libre y cisplatino-MPNPs fue de 4.8 y $3.9 \mu\text{M}$, respectivamente. Por lo tanto, las cisplatino-MPNPs inducen una mayor actividad citotóxica que el cisplatino libre en células HeLa, sugiriendo el potencial uso de estas NPs para el tratamiento del cáncer cervical [158].

Por otro lado, en el caso de las células MDA-MB-231 se determinaron valores de IC_{50} de 6.59 y $12.25 \mu\text{M}$ para el cisplatino libre y las cisplatino-MPNPs, respectivamente (figura 2.10c). Las cisplatino-MPNPs mostraron una menor citotoxicidad que el cisplatino libre a todas las concentraciones analizadas. Este hecho podría ser debido a la liberación sostenida del fármaco a partir de la nanoplataforma, provocando que la concentración de fármaco disponible se insuficiente para alcanzar valores de toxicidad similares a los del fármaco libre. Como se mencionó anteriormente, la capa de PVA/quitosano depositada sobre las NPs actúa como una barrera física impidiendo la pronta liberación del cisplatino; por lo tanto, se requiere más tiempo para conseguir una mayor concentración de cisplatino en el

medio celular, y como consecuencia una mayor citotoxicidad [159]. Previamente, Wawruszak *et al.* evaluaron la actividad antiproliferativa del cisplatino frente a diferentes líneas celulares de cáncer de mama, obteniendo una IC_{50} de 8.23 μ M para células MDA-MB-231 expuestas a cisplatino libre, similar al valor aquí obtenido y en contraposición a los determinados por Fuller *et al.*, quienes analizaron el incremento de la citotoxicidad del cisplatino en la presencia de Terbio también en células MDA-MB-231, obteniendo una IC_{50} de $43.5 \pm 3 \mu$ M [160]. En base a estos resultados algo contradictorios se realizó un ensayo comparativo del efecto citotóxico de las cisplatino-MPNPs y disoluciones de cisplatino libre con un 50 y 100% del fármaco teórico liberado después de 48 h de incubación en las dos líneas celulares cancerígenas mencionadas anteriormente. La figura 29d muestra como las cisplatino-MPNPS presentan mayor efecto citotóxico que la disolución de 100% de cisplatino teóricamente liberado tras la incubación, en concordancia con el trabajo de Jayasuriya *et al.* quienes emplearon cisplatino encapsulado en NPs de PLGA en células de cáncer de ovario A2780 [29]. Estos investigadores encontraron que el cisplatino encapsulado en NPs de PLGA presentaba el mismo nivel de apoptosis celular que la disolución de cisplatino libre al 50% de anticancerígeno teórico liberado. En resumen, los presentes resultados muestran que las cisplatino-MPNPs presentan mayor efecto citotóxico que el cisplatino libre, y pueden ser utilizadas para el tratamiento de cáncer de cuello de útero y de mama.

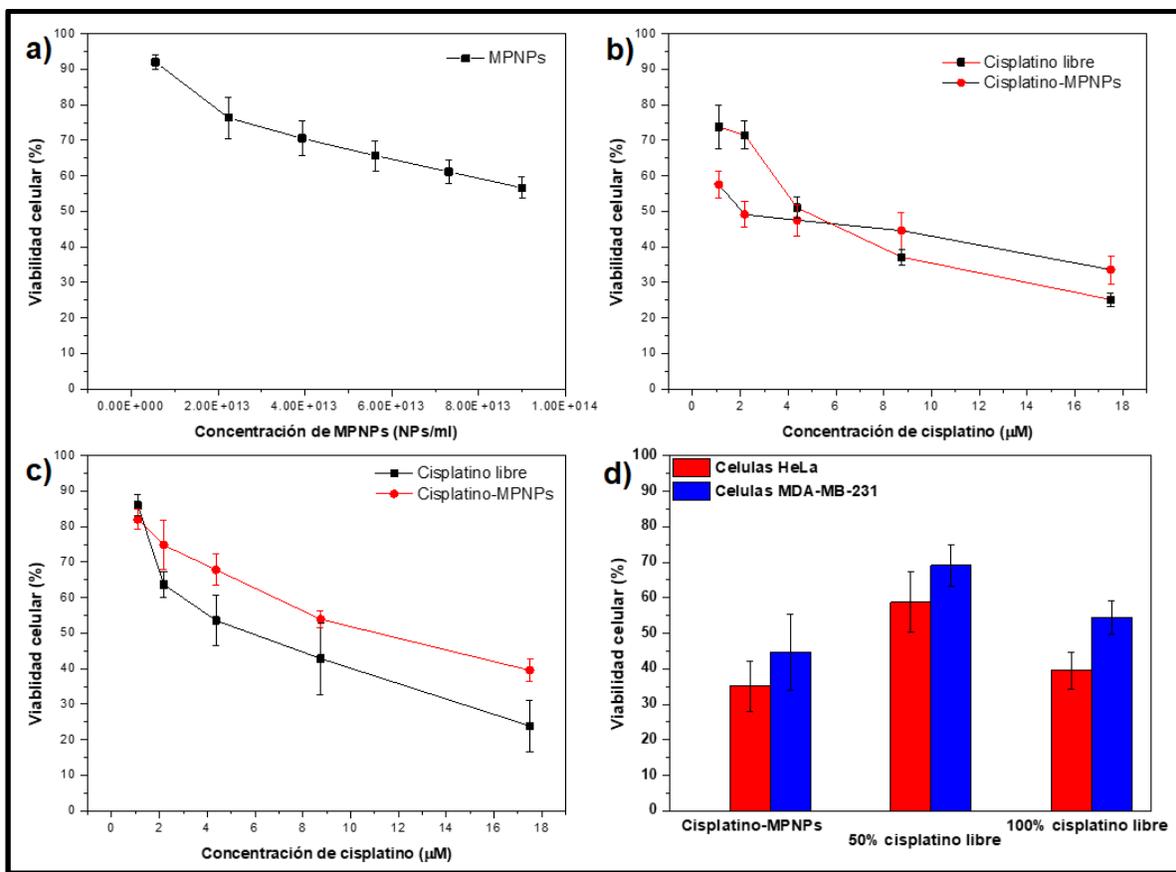


Figura 29. Citotoxicidad celular de MPNPs y cisplatino-MPNPs: a) MPNPs en células Arpe-19; b) cisplatino-MPNPs en células Hela; c) cisplatino-MPNPs en células MDA-MB-231 y d) citotoxicidad celular empleando cisplatino-MPNPs y concentraciones teóricas de cisplatino liberado a 48 h, en células Hela y MDA-MB-231.

CONCLUSIONES

- En este trabajo se sintetizó un novedoso nanosistema multifuncional basado en cisplatino, magnetita, PLGA y quitosano con posibles aplicaciones como agente terapéutico y de diagnóstico de cáncer de cuello de útero y de mama.
- Durante el proceso de formulación de la nanoplataforma, se prepararon e hidrofobizaron NPs de magnetita mostrando tamaños de partícula y propiedades magnéticas características de un material superparamagnético.
- Se establecieron las condiciones para la síntesis de NPs de magnetita encapsuladas en una matriz de PLGA estabilizada con quitosano, y a partir de experimentos de potencial ζ y estudios calorimétricos se determinó que es posible modular la carga superficial de las NPs y el tipo de interacciones que se presentan en la interacción de las NPs de PLGA-quitosano.
- A partir de los resultados obtenidos en el estudio de interacciones biofísicas entre NPs de magnetita/PLGA/quitosano con diferentes cargas superficiales y un modelo de membrana (mimetizando células endoteliales), se obtuvo una aproximación de la interacción entre NPs y células cancerosas; información crítica para el desarrollo de nano-vectores efectivos para aplicaciones biomédicas.
- Se incorporaron simultáneamente cisplatino y NPs magnéticas en la nanoplataforma y los resultados obtenidos en cuanto a tamaño, forma, carga superficial, propiedades magnéticas, perfiles de liberación y ensayos celulares de internalización y citotoxicidad, sugieren que la nanoplataforma cisplatino-MPNPs tiene potencial para ser considerada como un sistema para la obtención de imágenes de detección, administración controlada de fármacos y monitorización en tiempo real de la respuesta terapéutica para el cáncer de cuello de útero y de mama de forma simultánea, esto es, una nanoplataforma teragnóstica.

ANEXOS

Materials Research Express



PAPER

Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles

RECEIVED
25 May 2015

REVISED
10 July 2015

ACCEPTED FOR PUBLICATION
31 July 2015

PUBLISHED
11 September 2015

Jaime Ibarra¹, Julio Melendres¹, Mario Almada¹, María G Burboa², Pablo Taboada³, Josué Juárez¹ and Miguel A Valdez¹

¹ Departamento de Física, Posgrado en Nanotecnología, Universidad de Sonora, Rosales y Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, México

² Departamento. de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Rosales y transversal, 83000, Hermosillo, Sonora, México

³ Departamento de Física de la Materia Condensada, Facultad de Física, Universidad de Santiago de Compostela, España

E-mail: miguel.valdez@correo.fisica.uson.mx

Keywords: hybrid nanoparticle, magnetite nanoparticles, PLGA nanoparticles, chitosan, zeta potential, model membrane

Abstract

In this work, we report the synthesis and characterization of a new hybrid nanoparticles system performed by magnetite nanoparticles, loaded in a PLGA matrix, and stabilized by different concentrations of chitosan. Magnetite nanoparticles were hydrophobized with oleic acid and entrapped in a PLGA matrix by the emulsion solvent evaporation method, after that, magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles were obtained by adding dropwise magnetite/PLGA nanoparticles in chitosan solutions. Magnetite/PLGA nanoparticles produced with different molar ratios did not show significant differences in size and the 3:1 molar ratio showed best spherical shapes as well as uniform particle size. Isothermal titration calorimetry studies demonstrated that the first stage of PLGA-chitosan interaction is mostly regulated by electrostatic forces. Based on a single set of identical sites model, we obtained for the average number of binding sites a value of 3.4, which can be considered as the number of chitosan chains per nanoparticle. This value was confirmed by using a model based on the DLVO theory and fitting zeta potential measurements of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles. From the adjusted parameters, we found that an average number of chitosan molecules of 3.6 per nanoparticle are attached onto the surface of the PLGA matrix. Finally, we evaluated the effect of surface charge of nanoparticles on a membrane model of endothelial cells performed by a mixture of three phospholipids at the air–water interface. Different isotherms and adsorption curves show that cationic surface of charged nanoparticles strongly interact with the phospholipids mixture and these results can be the basis of future experiments to understand the nanoparticles- cell membrane interaction.

Introduction

Polymeric nanoparticles (NPs) composed of biocompatible and biodegradable synthetic polymers, such as poly(lactide acid) (PLA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL), and poly(lactide-co-glycolide acid) (PLGA), have been investigated by the scientific community because of their potential uses in medicine as biodegradable and biocompatible support materials and drug delivery vehicles [1, 2].

PLGA-based NPs systems are one of the most successful and interesting colloidal systems. One of the main advantages of PLGA NPs is their capability of encapsulating therapeutic agents, protecting them, and increasing their stability so that therapeutic agents can be released in the body as the polymeric matrix progressively degrades, improving pharmacokinetic and pharmacodynamics profiles [3]. Moreover, the effectiveness of these NPs can be improved by encapsulating inside other material, which offers an additional functionality [1]. Magnetite NPs are particularly of great interest due to their superparamagnetic properties allowing their use in

Materials Research Express



PAPER

Co-encapsulation of magnetic nanoparticles and cisplatin within biocompatible polymers as multifunctional nanoplatforms: synthesis, characterization, and *in vitro* assays

RECEIVED
19 October 2017

REVISED
30 November 2017

ACCEPTED FOR PUBLICATION
11 December 2017

PUBLISHED
8 January 2018

Jaime Ibarra¹ , David Encinas¹ , Mateo Blanco², Silvia Barbosa², Pablo Taboada², Josué Juárez¹ and Miguel A Valdez¹

¹ Departamento de Física, Universidad de Sonora, 83000 Hermosillo, Sonora, México

² Departamento de Física de Partículas, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, A Coruña, España

E-mail: miguel.valdez@correo.fisica.uson.mx

Keywords: multifunctional nanoplatform, anti-tumoral activity, theragnostic properties, magnetic nanoparticles, poly(lactic-co-glycolic acid)

Abstract

In this work, we report the synthesis, characterization and biological evaluation of a multifunctional hybrid biocompatible nanoplatform consisting of a biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) matrix functionalized with a polyvinyl alcohol/chitosan mixed surface layer, and co-loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and the anticancer drug cisplatin. In this manner, problems associated with cisplatin low aqueous solubility are precluded as well as a sustained controlled release of the drug is obtained. The hybrid nanoplatforms displayed slightly positive charges and spherical shapes, with an average diameter of ca 100 nm and very low polydispersity. This size range makes these particles suitable a priori to avoid extensive macrophage recognition whilst ensures exploitation of passive targeting in tumoral cells by the enhanced permeation and retention effect and successful interaction with cell surfaces. SPIONs and drug loading extents were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry and UV–vis absorption spectroscopy, respectively. The presence of the magnetic nanoparticle in the hybrid platform should enable their intended use as T₂ imaging contrast agents as denoted from magnetic imaging measurements *in vitro*. Furthermore, *in vitro* release profiles of cisplatin from nanoplatform showed an initial burst release of about 16% in the first 6 h, followed by a sustained release over 10 days ensuring a slow delivery of the drug in the site of action to enhance chemotherapeutic activity. This was confirmed by *in vitro* cytotoxicity assays denoting that the chemotherapeutic effect of cisplatin on both cervical HeLa and breast MDA-MB-231 cancer cell lines is largely improved when encapsulated in the nanoplatform. Thus, the present characterization and *in vitro* biological evaluation data indicate that this nanoplatform can be considered as a promising theragnostic nanoplatform for combined imaging and therapy of several tumors. Moreover, its design using different biocompatible materials approved by regulatory agencies might open further expectatives to clinical translation once performing additional *in vivo* experiments currently on development.

Introduction

Cervical and breast cancer are the most frequent type of cancer among women and they are the leading cause of women death over any other forms of cancer in developing countries [1, 2] with approximately 200 000 deaths each year around the world, especially due to the lack of diagnosis of women with early cervical cancer tumors [3].

REFERENCIAS

- [1] J. Gamo-aranda, T.-S. Joaquin, ENSEÑAR NANOTECNOLOGIA A TRAVES DE NUESTROS ANTEPASADOS, *Rev. Física*. (2015) 56–67.
- [2] K.H. Bae, H.J. Chung, T.G. Park, *Nanomaterials for Cancer Therapy and Imaging*, (2011) 295–302. doi:10.1007/s10059-011-0051-5.
- [3] A.O. HIROSHI KOMATSU, *Applying Nanotechnology to Electronics*, *SCIENCE TECHNOLOGY TRENDS*. 16 (2005) 36–45.
- [4] C. Chellaram, G. Murugaboopathi, A.A. John, R. Sivakumar, S. Ganesan, *Significance of Nanotechnology in Food Industry*, *Procedia - Soc. Behav. Sci.* 8 (2014) 109–113. doi:10.1016/j.apcbee.2014.03.010.
- [5] O. V Salata, *Journal of Nanobiotechnology*, 6 (2004) 1–6.
- [6] K. V Singh, S.S. Pang, G. Li, D. Hui, *Modern Applications of Nanotechnology in Textiles Improvements in Fiber / Yarn Manufacturing by using*, 78 (2008) 731–739. doi:10.1177/0040517508091066.
- [7] E. Serrano, G. Rus, J. Garc1, *Nanotechnology for sustainable energy*, 13 (2009) 2373–2384. doi:10.1016/j.rser.2009.06.003.
- [8] M. Srinivasan, M. Rajabi, S.A. Mousa, *Multifunctional Nanomaterials and Their Applications in Drug Delivery and Cancer Therapy*, (2015) 1690–1703. doi:10.3390/nano5041690.
- [9] S.T. Selvan, T. Thatt, Y. Tan, D.K. Yi, N.R. Jana, *Functional and Multifunctional Nanoparticles for Bioimaging and Biosensing*, 26 (2010) 11631–11641. doi:10.1021/la903512m.
- [10] K. Park, S. Lee, E. Kang, K. Kim, K. Choi, I.C. Kwon, *New generation of multifunctional nanoparticles for cancer imaging and therapy*, *Adv. Funct. Mater.* 19 (2009) 1553–1566. doi:10.1002/adfm.200801655.
- [11] F. Jia, X. Liu, L. Li, S. Mallapragada, B. Narasimhan, Q. Wang, *Multifunctional nanoparticles for targeted delivery of immune activating and cancer therapeutic agents*, *J. Control. Release*. 172 (2013) 1020–1034. doi:10.1016/j.jconrel.2013.10.012.
- [12] D. Encinas-basurto, J. Ibarra, J. Juarez, M.G. Burboa, P. Taboada, M.A. Valdez, J. Ibarra, J. Juarez, M.G. Burboa, *Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization, in vitro release and biological activit*, *J. Microencapsul.* 0 (2017) 000. doi:10.1080/02652048.2017.1323037.
- [13] Y. Pei, A.B. Lowe, P.J. Roth, *Stimulus-Responsive Nanoparticles and Associated (Reversible) Polymorphism via Polymerization Induced Self-assembly (PISA)*, 201600528 (2017) 1–14. doi:10.1002/marc.201600528.

- [14] X. An, A. Zhu, H. Luo, H. Ke, H. Chen, Y. Zhao, Rational Design of Multi-Stimuli-Responsive Nanoparticles for Precise Cancer Therapy, (2016). doi:10.1021/acsnano.6b01296.
- [15] L. Cheng, C. Jin, W. Lv, Q. Ding, X. Han, Developing a highly stable PLGA-mPEG nanoparticle loaded with cisplatin for chemotherapy of ovarian cancer, PLoS One. 6 (2011) 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0025433.
- [16] Y. Ling, K. Wei, Y. Luo, X. Gao, S. Zhong, Biomaterials Dual docetaxel / superparamagnetic iron oxide loaded nanoparticles for both targeting magnetic resonance imaging and cancer therapy, Biomaterials. 32 (2011) 7139–7150. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.089.
- [17] H. Joon, S. Lee, K. Park, C. Hee, Y. Park, K. Yoo, Biomaterials Drug-loaded gold / iron / gold plasmonic nanoparticles for magnetic targeted chemo-photothermal treatment of rheumatoid arthritis, 61 (2015).
- [18] M. Huang, M. Hu, Q. Song, H. Song, J. Huang, X. Gu, X. Wang, GM1-Modified Lipoprotein-like Nanoparticle: Multifunctional Nanoplatfor for the Combination Therapy of Alzheimer's Disease, (2015).
- [19] K. Landfester, L.P. Ram, Encapsulated magnetite particles for biomedical, 1345 (2003).
- [20] C.E. Astete, C.S.S.R. Kumar, C.M. Sabliov, Size control of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide)-magnetite nanoparticles synthesized by emulsion evaporation technique, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 299 (2007) 209–216. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.11.055.
- [21] S. Manoochchri, B. Darvishi, G. Kamalinia, M. Amini, M. Fallah, S.N. Ostad, Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel, (2013) 1–10.
- [22] K. Bootdee, M. Nithitanakul, B.P. Grady, Synthesis and encapsulation of magnetite nanoparticles in PLGA: Effect of amount of PLGA on characteristics of encapsulated nanoparticles, Polym. Bull. 69 (2012) 795–806. doi:10.1007/s00289-012-0773-3.
- [23] M.P. Decatris, S. Sundar, K.J.O. Byrne, Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status, 7372 (2004) 53–81. doi:10.1016/S0305-7372(03)00139-7.
- [24] M. Vassilomanolakis, G. Koumakis, V. Barbounis, M. Demiri, First-line chemotherapy with docetaxel and cisplatin in metastatic breast cancer, (2005) 136–141. doi:10.1016/j.breast.2004.08.017.
- [25] Y.A. Larasati, D. Dewi, P. Putri, R.Y. Utomo, A. Hermawan, E. Meiyanto, Combination of Cisplatin and Cinnamon Essential Oil Inhibits HeLa Cells Proliferation through Cell Cycle Arrest, 4 (2014) 14–19. doi:10.7324/JAPS.2014.41203.
- [26] F. Ordikhani, M.E. Arslan, R. Marcelo, I. Sahin, P. Grigsby, J.K. Schwarz, A.K. Azab, Drug Delivery Approaches for the Treatment of Cervical Cancer, Pharmaceutics. 8

- (2016) 1–15. doi:10.3390/pharmaceutics8030023.
- [27] S. Cafaggi, E. Russo, R. Stefani, R. Leardi, G. Caviglioli, B. Parodi, G. Bignardi, D. De Toterò, C. Aiello, M. Viale, Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin-alginate complex, *J. Control. Release.* 121 (2007) 110–123. doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.037.
- [28] R.A. Wassel, B. Grady, R.D. Kopke, K.J. Dormer, Dispersion of super paramagnetic iron oxide nanoparticles in poly(d,l-lactide-co-glycolide) microparticles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 292 (2007) 125–130. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.06.012.
- [29] A.C. Jayasuriya, A.J. Darr, Controlled release of cisplatin and cancer cell apoptosis with cisplatin encapsulated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, *J. Biomed. Sci. Eng.* 6 (2013) 586–592. doi:10.4236/jbise.2013.65074.
- [30] D. Moreno, C.T. de Ilarduya, E. Bandrés, M. Buñuales, M. Azcona, J. García-Foncillas, M.J. Garrido, Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 503–512. doi:10.1016/j.ejpb.2007.08.006.
- [31] Y. Li, S. Lim, C.P. Ooi, Fabrication of cisplatin-loaded poly(lactide-co-glycolide) composite microspheres for osteosarcoma treatment, *Pharm. Res.* 29 (2012) 756–769. doi:10.1007/s11095-011-0600-9.
- [32] N. Nafee, M. Schneider, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile, *Int. J. Pharm.* 381 (2009) 130–139. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.049.
- [33] R. Yang, W. Shim, F. Cui, G. Cheng, X. Han, Q. Jin, D. Kim, Enhanced electrostatic interaction between chitosan-modified PLGA nanoparticle and tumor, 371 (2009) 142–147. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.12.007.
- [34] T. Neuberger, B. Scho, M. Hofmann, B. Von Rechenberg, Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications : Possibilities and limitations of a new drug delivery system, 293 (2005) 483–496. doi:10.1016/j.jmmm.2005.01.064.
- [35] G. Ciofani, V. Raffa, A. Menciassi, S. Micera, P. Dario, A drug delivery system based on alginate microspheres : Mass-transport test and in vitro validation, (2007) 395–403. doi:10.1007/s10544-006-9044-0.
- [36] M. Manca, S. Mourtas, V. Dracopoulos, A. Maria, S.G. Antimisiaris, PLGA , chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery ? A comparative study of particle stability during nebulization, 62 (2008) 220–231. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.10.005.
- [37] M.D. Mehta, M.D. Mehta, *Bulletin of Science , Technology & Society Nanoscience and Nanotechnology : Assessing the Nature of Innovation in These Fields*, (2002). doi:10.1177/027046760202200402.
- [38] V. Balzani, *Nanoscience and Nanotechnology : A Personal View of a Chemist ***, (2005) 278–283. doi:10.1002/sml.200400010.

- [39] H.M. Pathan, R.S. Mane, Y.A. Ismail, A. Subramania, W. Ramadan, S.D. Bhagat, *Functional Nanomaterials*, 2012 (2012) 2012–2014. doi:10.1155/2012/732368.
- [40] A. Yin Yadong, Talapin Dmitri, *The chemistry of functional nanomaterials*, Chem Soc Rev. (2013). doi:10.1039/c3cs90011h.
- [41] K. Mcnamara, S.A.M. Tofail, K. Mcnamara, S.A.M. Tofail, *Nanoparticles in biomedical applications*, Adv. Phys. X. 2 (2017) 1–35. doi:10.1080/23746149.2016.1254570.
- [42] A.A. Kulkarni, P.S. Rao, *Synthesis of polymeric nanomaterials for biomedical applications*, Woodhead Publishing Limited, 2013. doi:10.1533/9780857097231.1.27.
- [43] R. Srikar, A. Upendran, R. Kannan, *Polymeric nanoparticles for molecular imaging*, (2014). doi:10.1002/wnan.1259.
- [44] J.K. Carrow, A.K. Gaharwar, *Bioinspired Polymeric Nanocomposites for Regenerative Medicine*, (2014) 1–17. doi:10.1002/macp.201400427.
- [45] P. Periyathambi, T.P. Sastry, S.K. Anandasadagopan, K. Manickavasagam, *Macrophages mediated diagnosis of rheumatoid arthritis using fibrin based magnetic nanoparticles as MRI contrast agents*, Elsevier B.V., 2016. doi:10.1016/j.bbagen.2016.09.018.
- [46] C. Yang, S. Yang, J. Chieh, H. Horng, C. Hong, *Biofunctionalized Magnetic Nanoparticles for Specifically Detecting*, (2011) 500–505.
- [47] O.L. Gobbo, K. Sjaastad, M.W. Radomski, Y. Volkov, *Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics*, Theranostics. 5 (2015). doi:10.7150/thno.11544.
- [48] A. Akbarzadeh, M. Samiei, S. Davaran, *Magnetic nanoparticles : preparation , physical properties , and applications in biomedicine*, Nanoscale Res. Lett. 7 (2012) 144. doi:10.1186/1556-276X-7-144.
- [49] R.M. Cornell, U. Schwertmann, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses, Techniques*. 39 (2003) 9–12. doi:10.1002/3527602097.
- [50] Y. Gossuin, P. Gillis, A. Hocq, Q.L. Vuong, A. Roch, *Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles*, (2009). doi:10.1002/wnan.036.
- [51] M. Benz, *Superparamagnetism : Theory and Applications*, Superparamagnetism Theory Appl. (2012) 1–27.
- [52] Z.V.P. and Z.D.D.-M. N Paunovi'c, *Superparamagnetism in iron-doped CeO₂ - y nanocrystals*, J. Phys. Condens. Matter. 24 (2012) 456001. doi:10.1088/0953-8984/24/45/456001.
- [53] M.C. Mascolo, Y. Pei, T.A. Ring, *Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases*, Materials (Basel). 6 (2013) 5549–5567. doi:10.3390/ma6125549.
- [54] D.K. Kim, Y. Zhang, W. Voit, K. V Rao, M. Muhammed, *Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide*

nanoparticles, 225 (2001) 30–36.

- [55] R.A. Bini, R.F.C. Marques, F.J. Santos, J.A. Chaker, M. Jafelicci, Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes, *J. Magn. Mater.* 324 (2012) 534–539. doi:10.1016/j.jmmm.2011.08.035.
- [56] K. Chesnel, M. Trevino, Y. Cai, J.M. Hancock, S.J. Smith, R.G. Harrison, Particle size effects on the magnetic behaviour of 5 to 11 nm Fe₃O₄ nanoparticles coated with oleic acid, *J. Phys. Conf. Ser.* 521 (2014) 12004. doi:10.1088/1742-6596/521/1/012004.
- [57] C.P. Bean, J.D. Livingston, Superparamagnetism, *JOURKAL Appl. Phys.* 120 (1959). doi:10.1063/1.2185850.
- [58] M. Knobel, PROPIEDADES MAGNETICAS DE SISTEMAS NANOCRISTALINOS : CONCEPTOS BASICOS, *Rev. Cuba. Fis.* 20 (2003) 3–11.
- [59] S. Laurent, D. Forge, M. Port, a Roch, C. Robic, L. V Elst, R.N. Muller, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications (vol 108, pg 2064, 2008), *Chem. Rev.* 108 (2008) 2064–2110. doi:Doi 10.1021/Cr900197g.
- [60] B. Lee, Magnetite (Fe₃O₄): Properties, Synthesis, and Applications, 2012. doi:10.1016/j.ceramint.2011.11.027.
- [61] A. Ali, H. Zafar, M. Zia, I. ul Haq, A.R. Phull, J.S. Ali, A. Hussain, Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 9 (2016) 49–67. doi:10.2147/NSA.S99986.
- [62] W. Wu, Q. He, C. Jiang, Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies, *Nanoscale Res. Lett.* 3 (2008) 397–415. doi:10.1007/s11671-008-9174-9.
- [63] L. Tong, M. Zhao, S. Zhu, J. Chen, Synthesis and application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in targeted therapy and imaging of cancer, 5 (2011) 379–387. doi:10.1007/s11684-011-0162-6.
- [64] M. Johannsen, U. Gneveckow, L. Eckelt, A. Feussner, Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles : Presentation of a new interstitial technique, *Int. J. Hyperth.* (2005) 1–11. doi:10.1080/02656730500158360.
- [65] K.M.Æ. Ronny, R.Æ. Regina, S.Æ. Uwe, P. Wust, Æ.B. Thiesen, Æ.A. Feussner, Æ.A. Von Deimling, N. Waldoefner, Æ.R. Felix, Æ.A. Jordan, Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy : Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme, (2007) 53–60. doi:10.1007/s11060-006-9195-0.
- [66] C. Yuan, Y. An, J. Zhang, H. Li, H. Zhang, Magnetic nanoparticles for targeted therapeutic gene delivery and magnetic- inducing heating on hepatoma, *Nanotechnology.* 345101 (n.d.). doi:10.1088/0957-4484/25/34/345101.
- [67] F. Scherer¹, M. Anton¹, U. Schillinger¹, J. Henke¹, C. Bergemann², A. Kru¹ger¹, B.

- Ga'nsbacher¹, and C. Plank¹, Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo, *Gene Ther.* 9 (2002) 102–109. doi:10.1038/sj/gt/3301624.
- [68] J. Pardo, Y.E. Sosa, P.C. Reggiani, M.L. Arciniegas, F.H. Sánchez, R.G. Goya, Transferencia génica asistida por campos magnéticos: Estudios en células gliales, *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 47 (2013) 399–406.
- [69] L. Douziech-Eyrolles, H. Marchais, K. Herve, E. Munnier, M. Souce, C. Linassier, P. Dubois, I. Chourpa, Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles., *Int. J. Nanomedicine.* 2 (2007) 541–550.
- [70] B.T. Farrell, B.E. Hamilton, C.A. Lacy, E.P. Frenkel, N.D. Doolittle, P.M. Jacobs, E.A. Neuwelt, Using iron oxide nanoparticles to diagnose CNS inflammatory diseases and PCNSL, (2013).
- [71] V. V Mody, A. Cox, S. Shah, Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor, (2014) 385–392. doi:10.1007/s13204-013-0216-y.
- [72] H. Liu, M. Hua, H. Yang, C. Huang, P. Chu, J. Wu, I. Tseng, Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound / magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain, 107 (2010) 15205–15210. doi:10.1073/pnas.1003388107.
- [73] J. Rivas, Y. Kolen'ko, M. Bañobre-Lopez, *Magnetic Nanocolloids*, 2016. doi:10.1016/B978-0-12-801578-0.00003-5.
- [74] D. Azria, J. Verdier, E. Belamie, Nanoparticles as contrast agents for brain nuclear magnetic resonance imaging in Alzheimer ' s disease diagnosis, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 7216–7237. doi:10.1039/c7tb01599b.
- [75] J. Estelrich, M.J. Sánchez-Martín, M.A. Busquets, Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 1727–1741.
- [76] T. Lam, P. Pouliot, P.K. Avti, F. Lesage, A.K. Kakkar, Superparamagnetic iron oxide based nanoprobcs for imaging and theranostics, *Adv. Colloid Interface Sci.* 199–200 (2013) 95–113. doi:10.1016/j.cis.2013.06.007.
- [77] D. Patel, J. Yong, Y. Chang, T. Jeong, G. Ho, Poly (d , l -lactide-co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles : Synthesis , characterization and in vivo study as MRI contrast agent, 314 (2008) 91–94. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.04.078.
- [78] N. Ding, K. Sano, K. Kanazaki, M. Ohashi, J. Deguchi, Y. Kanada, M. Ono, H. Saji, In Vivo HER2-Targeted Magnetic Resonance Tumor Imaging Using Iron Oxide Nanoparticles Conjugated with Anti-HER2 Fragment Antibody, *Mol. Imaging Biol.* 1996 (2016). doi:10.1007/s11307-016-0977-2.
- [79] R. Je, J. Rieger, C. Je, R. Auze, *Polymeric Nanomaterials – Synthesis , Functionalization and Applications in Diagnosis and Therapy*, 2007.
- [80] R.P.F. Lanao, A.M. Jonker, J.G.C. Wolke, J.A. Jansen, J.C.M. van Hest, Sander C.G.

- Leeuwenburgh, Physicochemical Properties and Applications of Poly(lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration, *TISSUE Eng. Part B*. 19 (2013) 380–390. doi:10.1089/ten.teb.2012.0443.
- [81] P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, P. V Hatton, An Overview of Poly (lactic- co - glycolic) Acid (PLGA) -Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering, (2014) 3640–3659. doi:10.3390/ijms15033640.
- [82] C. Guo, R.A. Gemeinhart, Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 597–604. doi:10.1016/j.ejpb.2008.06.008.
- [83] M. Guo, W.-T. Rong, J. Hou, D.-F. Wang, Y. Lu, Y. Wang, and Q.X. , Shu-Qin Yu, Mechanisms of chitosan-coated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for improving oral absorption of, *Nanotechnology*. 24 (2013). doi:10.1088/0957-4484/24/24/245101.
- [84] C. Lee, J.S. Choi, I. Kim, K.T. Oh, E.S. Lee, E.S. Park, K.C. Lee, Y.S. Youn, Long-acting inhalable chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles containing hydrophobically modified exendin-4 for treating type 2 diabetes, *Int. J. Nanomedicine*. 8 (2013) 2975–2983. doi:10.2147/IJN.S48197.
- [85] N. Nafee, S. Taetz, M. Schneider, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 3 (2007) 173–183. doi:10.1016/j.nano.2007.03.006.
- [86] X. Wang, H. Liu, D. Chen, X. Meng, T. Liu, C. Fu, N. Hao, Y. Zhang, X. Wu, J. Ren, F. Tang, Multifunctional Fe₃O₄@P(St/MAA)@Chitosan@Au Core/Shell Nanoparticles for Dual Imaging and Photothermal Therapy, (2013).
- [87] L. Chronopoulou, A. Cutonilli, C. Cametti, M. Dentini, C. Palocci, PLGA-based nanoparticles: Effect of chitosan in the aggregate stabilization. A dielectric relaxation spectroscopy study, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 97 (2012) 117–123. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.04.016.
- [88] K. Kaushik, R.B. Sharma, S. Agarwal, H. Pradesh, Review Article Natural Polymers and their Applications, 37 (2016) 30–36.
- [89] A.P. Anwunobi, M.O. Emeje, Recent Applications of Natural Polymers in Nanodrug Delivery, (2011) 2–7. doi:10.4172/2157-7439.S4-002.
- [90] M. Khalkhali, S. Sadighian, K. Rostamizadeh, F. Khoeini, M. Naghibi, N. Bayat, M. Habibizadeh, M. Hamidi, Synthesis and characterization of dextran coated magnetite nanoparticles for diagnostics and therapy, *BioImpacts*. 5 (2015) 141–150. doi:10.15171/bi.2015.19.
- [91] M.R. Ñ, Chitin and chitosan : Properties and applications, 31 (2006) 603–632. doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
- [92] C. Gómez-gaete, NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS : TECNOLOGÍA Y APLICACIONES FARMACÉUTICAS (Polymeric nanoparticles : technologie and

- pharmaceutical applications), *Rev. Farmacol. Chile.* 7 (2014) 7–16.
- [93] M. Mir, N. Ahmed, A. Rehman, RECENT APPLICATIONS OF PLGA BASED NANOSTRUCTURES IN DRUG DELIVERY, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* (2017). doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.038.
- [94] C.E. Astete, C.M. Sabliov, Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, 17 (2006) 247–289. doi:10.1163/156856206775997322.
- [95] R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide- co -glycolide) (PLGA) devices, 21 (2000).
- [96] F. Jiménez-colmenero, Emulsiones múltiples ; compuestos bioactivos y alimentos funcionales *, 28 (2013) 1413–1421. doi:10.3305/nh.2013.28.5.6673.
- [97] G. Tansik, A. Yakar, U. Gündüz, Tailoring magnetic PLGA nanoparticles suitable for doxorubicin delivery, *J. Nanoparticle Res.* 16 (2014). doi:10.1007/s11051-013-2171-7.
- [98] Z. Hajikarimi, S. Khoei, S. Khoei, S.R. Mahdavi, Evaluation of the cytotoxic effects of PLGA coated iron oxide nanoparticles as a carrier of 5- fluorouracil and megavoltage X-ray radiation in DU145 prostate cancer cell line, *IEEE Trans Nanobioscience.* 13 (2014) 403–408. doi:10.1109/tnb.2014.2328868.
- [99] M. Koneracká, V. Závěšová, M. Timko, P. Kopčanský, N. Tomašovičová, K. Csach, Magnetic properties of encapsulated magnetite in PLGA nanospheres, *Acta Phys. Pol. A.* 113 (2008) 595–598.
- [100] S. Lee, J. Jeong, S. Shin, J. Kim, Y. Chang, K. Lee, J. Kim, Magnetic enhancement of iron oxide nanoparticles encapsulated with poly (d , l -lactide-co-glycolide), 255 (2005) 19–25. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.12.019.
- [101] R.A. Wassel, B. Grady, R.D. Kopke, K.J. Dormer, Dispersion of super paramagnetic iron oxide nanoparticles in poly (d , l -lactide-co-glycolide) microparticles, 292 (2007) 125–130. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.06.012.
- [102] N. Schleich, P. Sibret, P. Danhier, B. Ucakar, S. Laurent, R.N. Muller, C. Jérôme, B. Gallez, V. Préat, F. Danhier, Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging, *Int. J. Pharm.* 447 (2013) 94–101. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.042.
- [103] A. Singh, F. Dilnawaz, S. Mewar, U. Sharma, N.R. Jagannathan, S.K. Sahoo, Composite polymeric magnetic nanoparticles for co-delivery of hydrophobic and hydrophilic anticancer drugs and MRI imaging for cancer therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 3 (2011) 842–856. doi:10.1021/am101196v.
- [104] S. Dasari, P. Bernard Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- [105] D.E. Szymkowski, K. Yaremat, J.M. Essigmann, S.J. Lippardt, R.D. Wood, An intrastrand d(GpG) platinum crosslink in duplex M13 DNA is refractory to repair by human cell extracts, 89 (1992) 10772–10776.

- [106] Z.H. Siddik, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance., *Oncogene*. 22 (2003) 7265–79. doi:10.1038/sj.onc.1206933.
- [107] sarmiento salinas F., santillan B. J., M.Z. H., H.N. M., NF-kB e IKK asociadas con baja respuesta al tratamiento con compuestos de platino en cáncer epitelial de ovario, *Med. E Investig.* 2 (2014) 174–181.
- [108] G.C. M. Racuciu, D. Creanga, SYNTHESIS AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF AN AQUEOUS, 7 (2005) 2859–2864.
- [109] L. Thi, M. Hoa, N.T. Chi, L.H. Nguyen, D. Mau, Preparation and characterisation of nanoparticles containing ketoprofen and acrylic polymers prepared by emulsion solvent evaporation method, (2010) 37–41. doi:10.1080/17458080.2010.515247.
- [110] F. Reynolds, T.O. Loughlin, R. Weissleder, L. Josephson, Method of Determining Nanoparticle Core Weight, 77 (2005) 814–817.
- [111] S. Farris, L. Mora, G. Capretti, L. Piergiovanni, Charge Density Quantification of Polyelectrolyte Polysaccharides, (2012) 121–124.
- [112] M. Basotra, S. Singh, M. Gulati, Development and Validation of a Simple and Sensitive Spectrometric Method for Estimation of Cisplatin Hydrochloride in Tablet Dosage Forms: Application to, *ISRN Anal. Chem.* 2013 (2013) 1–8. doi:10.1155/2013/936254.
- [113] L. Alexander, H.P. Klug, Determination of Crystallite Size with the XRay Spectrometer Determination of Crystallite Size with the X-Ray Spectrometer*, *J. Appl. Phys.* 21 (1950). doi:10.1063/1.1699612.
- [114] Q. Lan, C. Liu, F. Yang, S. Liu, J. Xu, D. Sun, Synthesis of bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles and their application in pH-responsive Pickering emulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 310 (2007) 260–269. doi:10.1016/j.jcis.2007.01.081.
- [115] K. Yang, H. Peng, Y. Wen, N. Li, Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 3093–3097. doi:10.1016/j.apsusc.2009.11.079.
- [116] A. M. Awwad, N. M. Salem, A Green and Facile Approach for Synthesis of Magnetite Nanoparticles, *Nanosci. Nanotechnol.* 2 (2013) 208–213. doi:10.5923/j.nn.20120206.09.
- [117] L. Zhang, R. He, H.C. Gu, Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 253 (2006) 2611–2617. doi:10.1016/j.apsusc.2006.05.023.
- [118] A.K. Bordbar, A.A. Rastegari, R. Amiri, E. Ranjbakhsh, M. Abbasi, A.R. Khosropour, Characterization of modified magnetite nanoparticles for albumin immobilization., *Biotechnol. Res. Int.* 2014 (2014) 705068. doi:10.1155/2014/705068.
- [119] M. Yamaura, R.L. Camilo, L.C. Sampaio, M.A. Macêdo, M. Nakamura, H.E. Toma, Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles, *J. Magn. Mater.* 279 (2004) 210–217.

doi:10.1016/j.jmmm.2004.01.094.

- [120] R. D. WALDRON, Infrared Spectra of Ferrites~, P H YS ICAL Rev. 99 (1955).
- [121] s. a. vorobyova V.n. naumenko, Dispersity of magnetite in magnetic liquids and the interaction with a surfactant, J. Magn. Magn. Mater. 85 (1990) 14–16.
- [122] K.J. Davies, The effect of temperature and oleate adsorption on the growth of maghemite particles, 122 (1993) 24–28.
- [123] B. Issa, I.M. Obaidat, B.A. Albiss, Y. Haik, Magnetic nanoparticles: Surface effects and properties related to biomedicine applications, Int. J. Mol. Sci. 14 (2013) 21266–21305. doi:10.3390/ijms141121266.
- [124] X. Liu, M.D. Kaminski, H. Chen, M. Torno, L. Taylor, A.J. Rosengart, Synthesis and characterization of highly-magnetic biodegradable poly (D , L -lactide- co -glycolide) nanospheres, 119 (2007) 52–58. doi:10.1016/j.jconrel.2006.11.031.
- [125] L. Ngaboni Okassa, H. Marchais, L. Douziech-Eyrolles, S. Cohen-Jonathan, M. Soucé, P. Dubois, I. Chourpa, Development and characterization of sub-micron poly(D,L-lactide-co- glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles, Int. J. Pharm. 302 (2005) 187–196. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.06.024.
- [126] M. Furlan, J. Kluge, M. Mazzotti, M. Lattuada, The Journal of Supercritical Fluids Preparation of biocompatible magnetite – PLGA composite nanoparticles using supercritical fluid extraction of emulsions, J. Supercrit. Fluids. 54 (2010) 348–356. doi:10.1016/j.supflu.2010.05.010.
- [127] S. Stolnik, C. Garnett, C. Davies, L. Illum, M. Boust, M. Vert, S. Davis, The colloidal properties of surfactant-free biodegradable nanospheres from poly(/ -malic acid-co-benzyl malate)s and poly(lactic acid-co-glycolide), (1995).
- [128] L. Chronopoulou, M. Massimi, M.F. Giardi, C. Cametti, L.C. Devirgiliis, M. Dentini, C. Palocci, Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 103 (2013) 310–317. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.063.
- [129] B. Kim, C. Kim, K. Lee, The Intracellular Uptake Ability of Chitosan-coated Poly (D , L -lactide- co -glycolide) Nanoparticles, 31 (2008) 1050–1054. doi:10.1007/s12272-001-1267-5.
- [130] G. Burboa, M.A. Valdez, E. Robles, E. Villar, M. Alatorre-meda, P. Taboada, Effects of the Hydrophobization on Chitosan – Insulin Nanoparticles Obtained by an Alkylation Reaction on Chitosan, (2013) 822–834. doi:10.1002/app.38870.
- [131] P. Taboada, E. Robles, G. Burboa, L.E. Guti, M.A. Valdez, Properties of Insulin – Chitosan Complexes Obtained by an Alkylation Reaction on Chitosan, 39999 (2014) 1–10. doi:10.1002/app.39999.
- [132] M. Alatorre-meda, P. Taboada, F. Hartl, T. Wagner, M. Freis, J.R. Rodríguez, Colloids and Surfaces B : Biointerfaces The influence of chitosan valence on the complexation and transfection of DNA : The weaker the DNA – chitosan binding the higher the

- transfection efficiency, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 82 (2011) 54–62. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.08.013.
- [133] P.L. Ma, M. Lavertu, M. Winnik, M.D. Buschmann, New Insights into Chitosan - DNA Interactions Using Isothermal Titration Microcalorimetry, (2009) 1490–1499.
- [134] L.Y. Ing, N.M. Zin, A. Sarwar, H. Katas, Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties, 2012 (2012). doi:10.1155/2012/632698.
- [135] G.E. de Souza Brito, C. Sorrhachitawatwong, N. Tipchuwong, S. Pouthai, Effect of Formulation Compositions on Particle Size and Zeta Potential of Diclofenac Sodium-Loaded, *Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci.* 7 (2013) 568–570.
- [136] P. Leroy, N. Devau, A. Revil, M. Bizi, Influence of surface conductivity on the apparent zeta potential of amorphous silica nanoparticles 3 Avenue Claude Guillemin, *J. Colloid Interface Sci.* (2013). doi:10.1016/j.jcis.2013.08.012.
- [137] M.G. Burboa, M.A. Valdez, Interaction of N -nitrosodiethylamine / bovine serum albumin complexes at the air – water interface, 316 (2007) 238–249. doi:10.1016/j.jcis.2007.07.079.
- [138] A.B. López-oyama, P. Taboada, M.G. Burboa, E. Rodríguez, V. Mosquera, M.A. Valdez, *Journal of Colloid and Interface Science* Interaction of the cationic peptide batenecin with mixed phospholipid monolayers at the air – water interface, 359 (2011) 279–288. doi:10.1016/j.jcis.2011.03.081.
- [139] M. Schulz, A. Olubummo, W.H. Binder, Beyond the lipid-bilayer : interaction of polymers and nanoparticles with membranes, (2012) 4849–4864. doi:10.1039/c2sm06999g.
- [140] M. Almada, M.G. Burboa, E. Robles, L.E. Gutiérrez, M.A. Valdés, Interaction and Cytotoxic Effects of Hydrophobized Nanoparticles on MDA-MB-231 , HeLa and Arpe-19 Cell Lines Chitosan, (2014) 692–701.
- [141] H. Parra-barraza, G. Burboa, M. Sa, F.M. Goycoolea, M.A. Valdez, Chitosan - Cholesterol and Chitosan - Stearic Acid Interactions at the Air - Water Interface †, (2005) 2416–2426.
- [142] B. Wang, L. Zhang, S. Chul, S. Granick, Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes *SCIENCES*, 105 (2008).
- [143] J.M.D. Coey, L.M. Yudi, Interaction of magnetic nanoparticles with phospholipid films adsorbed at a liquid / liquid interface, (2014). doi:10.1039/C4CP04464A.
- [144] W. Barzyk, E. Rogalska, K. Wi, Penetration of Milk-Derived Antimicrobial Peptides into Phospholipid Monolayers as Model Biomembranes, 2013 (2013) 11–13.
- [145] P. Srinivasa Rao, B. Smitha, S. Sridhar, A. Krishnaiah, Preparation and performance of poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine blend membranes for the dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation: Comparison with glutaraldehyde cross-linked membranes, *Sep. Purif. Technol.* 48 (2006) 244–254. doi:10.1016/j.seppur.2005.07.031.

- [146] H. Shagholani, S.M. Ghoreishi, M. Mousazadeh, Improvement of interaction between PVA and chitosan via magnetite nanoparticles for drug delivery application, *Int. J. Biol. Macromol.* 78 (2015) 130–136. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.042.
- [147] A.G. Roca, A. Villanueva, M. Ca, M. Calero, S. Veintemillas-verdaguer, P. Morales, R. Miranda, C.J. Serna, The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells, 115103 (2009). doi:10.1088/0957-4484/20/11/115103.
- [148] D.L.J. Thorek, A. Tsourkas, Biomaterials Size , charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells, 29 (2008) 3583–3590. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.05.015.
- [149] E. Fröhlich, The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, (2012) 5577–5591.
- [150] S.M.A. Sadat, S.T. Jahan, A. Haddadi, Effects of Size and Surface Charge of Polymeric Nanoparticles on in Vitro and in Vivo Applications, (2016) 91–108.
- [151] S. Honary, F. Zahir, Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2), *Trop. J. Pharm. Al Res.* 12 (2013) 265–273. doi:10.4314/tjpr.v12i2.19.
- [152] M. Portaccio, C. Menale, N. Diano, C. Serri, D.G. Mita, M. Lepore, Monitoring production process of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles by FT-IR microspectroscopy and univariate data analysis, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2015) 1–9. doi:10.1002/app.41305.
- [153] D. Moreno, S. Zalba, I. Navarro, C. Tros de Ilarduya, M.J. Garrido, Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74 (2010) 265–274. doi:10.1016/j.ejpb.2009.10.005.
- [154] K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, A.G. Karydas, D.S. Ithakissios, PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: In vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties, *J. Control. Release.* 79 (2002) 123–135. doi:10.1016/S0168-3659(01)00530-2.
- [155] K. Nejati-Koshki, M. Mesgari, E. Ebrahimi, F. Abbasalizadeh, S. Fekri Aval, A.A. Khandaghi, M. Abasi, A. Akbarzadeh, Synthesis and in vitro study of cisplatin-loaded Fe₃O₄ nanoparticles modified with PLGA-PEG6000 copolymers in treatment of lung cancer, *J. Microencapsul.* 31 (2014) 815–823. doi:10.3109/02652048.2014.940011.
- [156] X. Li, R. Li, X. Qian, Y. Ding, Y. Tu, R. Guo, Y. Hu, X. Jiang, W. Guo, B. Liu, Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 726–734. doi:10.1016/j.ejpb.2008.06.016.
- [157] M. Huang, E. Khor, L.Y. Lim, Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation, *Pharm. Res.* 21 (2004) 344–353. doi:10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.a5.

- [158] L.N. Putral, M.J. Bywater, W. Gu, N.A. Saunders, B.G. Gabrielli, G.R. Leggatt, N.A. McMillan, RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin, *Mol Pharmacol.* 68 (2005) 1311–1319. doi:mol.105.014191 [pii]r10.1124/mol.105.014191.
- [159] A. Wawruszak, J.J. Luszczki, A. Grabarska, E. Gumbarewicz, M. Dmoszynska-Graniczka, K. Polberg, A. Stepulak, Assessment of interactions between cisplatin and two histone deacetylase inhibitors in MCF7, T47D and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines - An isobolographic analysis, *PLoS One.* 10 (2015) 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0143013.
- [160] T.L. Fuller, Enhancement of cisplatin cytotoxicity by terbium in cisplatin-resistant MDA / CH human breast cancer cells, (2008) 249–252.