

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Posgrado en Nanotecnología

Tesis

***“Síntesis y caracterización de poliaminoácidos
para la obtención de sistemas
nanoestructurados y su posible aplicación como
nanoencapsulante”***

Que para obtener el grado de:
Doctor en Nanotecnología

Presenta:

MC. Marco Antonio Vizcarra Pacheco.

Teniendo como directores a:

Dr. Paul Zavala Rivera.

Dr. Jesús Armando Lucero Acuña.

Hermosillo, Sonora

agosto 2021.

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 intitulada: "***Síntesis y caracterización de poliaminoácidos para la obtención de sistemas nanoestructurados y su posible aplicación como nanoencapsulante***", presentada por:

Marco Antonio Vizcarra Pacheco

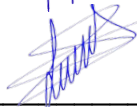
La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos para la obtención del Título de Grado de Doctor en Nanotecnología:



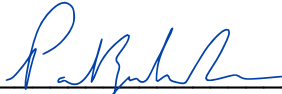
Dra. Patricia Guerrero German.



Dr. Josué Efraim Juárez Onofre.



Dr. Jesús Armando Lucero Acuña.



Dr. Paul Zavala Rivera.



Dr. Eduardo Ortiz Rascón.
Externo.

AGRADECIMIENTOS.

Mi más grande agradecimiento a CONACYT por el apoyo otorgado en la beca para mis estudios de posgrado, al Departamento de Física de la Universidad de Sonora por brindar sus espacios para el desarrollo de mi trabajo, al Departamento de Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora, por brindar los equipos de caracterización para mis muestras de trabajo, a mis maestros en el aula y en el laboratorio que con su enorme paciencia y compañerismo siempre me apoyaron en mis dudas y atrasos, a mis compañeros estudiantes en los que siempre es necesario apoyarse para seguir adelante cuanto consideras que ya has hecho lo suficiente, a la Universidad de Sonora por ser un ejemplo en nuestro estado y nuestro país al crear los programas necesarios para el desarrollo científico y tecnológico y por último a mi familia, que ha sido mi principal apoyo en la culminación de mis estudios de posgrado.

INDICE

UNIVERSIDAD DE SONORA.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	5
INDICE.....	6
Tabla de figuras.	8
RESUMEN.	10
Español.	10
English.	10
1. INTRODUCCIÓN.	11
1.1. Antecedentes.	11
1.2. Relación entre el factor de empaquetamiento y la morfología del agregado.	14
1.3. Objetivo de la investigación.	16
1.4. Planteamiento del problema.	17
2. MARCO CONTEXTUAL Y ESTADO DEL ARTE.	18
2.1. Marco de referencia.	18
2.2. Conceptos básicos.	18
2.3 Modelos clásicos.	19
2.4 Revisión del estado del arte.	22
2.5. Tipos de nanosistemas.	25
3. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN.....	37
3.1. Hipótesis.....	37
3.2. Objetivo general.....	37
3.3 Objetivos particulares.	37
3.4. Materiales y métodos.	37
4. TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN.	41
4.1. Tratamiento de la muestra.....	41
4.2. Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).....	41
4.3. Espectroscopia Raman.	43
4.4. Resonancia magnética nuclear.....	43
4.5. Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis).	47
4.6. Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	48

4.7. Microscopia electrónica de transmisión.	48
4.8. Limitaciones de la microscopia electrónica de transmisión.	49
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
5.1. Interpretación y discusión de RMN.....	50
5.2. Interpretación y discusión de espectroscopia infrarroja.	51
5.3. Interpretación y discusión de espectroscopia raman.	54
5.4. Obtención de concentración micelar crítica (CMC)por UV-Vis.	58
5.5. Obtención de radio hidrodinámico por dispersión dinamica de luz (DLS).....	59
5.6. Caracterización por microscopia de transmisión electrónica.	61
6. CONCLUSIONES.	63
7. BIBLIOGRAFÍA.....	64
8. ANEXOS.	71
8.1 Solicitud de patente:	71
8.2 Certificado de publicación de artículo.	72
8.3 Participación en XXVII International Materials Research Congress, 2018.	73
8.4 Participación en el 2do. Congreso internacional de Nano Bioingeniería.....	75

Tabla de figuras.

Figura 1. Representación gráfica de la escala nanométrica [7].	12
Figura 2. Diferentes rutas de derivatización de aminoácidos con cadenas alifáticas hidrofóbicas..	14
Figura 3. Relación entre el factor de empaquetamiento y la morfología del agregado [18].....	15
Figura 4. El efecto del DMSO en el comportamiento de las moléculas de agua. (A, B) Organización natural del agua. (C) La adición de moléculas de DMSO [36].	17
Figura 5. Molécula de ácido oleico. Fuente: Base de datos de Chem Draw.	18
Figura 6. Molécula de L-cisteína. Fuente: Base de datos de Chem Draw.	19
Figura 7. Estructura química de copolímero denominado Pluronic.	20
Figura 8. Esquema de la estructura micelar del Pluronic en agua. En azul la parte hidrófoba (PPG) y en verde la parte hidrófila (PEG).....	20
Figura 9. Orientación preferida de moléculas de jabón y fosfolípidos en una interfaz aire / aire, aire / agua y agua / agua según Karol Mysels. (Cortesía de Taylor and Francis Ltd., Publishers).....	21
Figura 10. Representación esquemática del autoensamblaje en vesículas del copolímero dibloque PGA15-b-PLys15.	22
Figura 11. Dibujo de nanotubos de pared múltiple y pared simple. Fuente: Marlene Lariza Andrade Guel. Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. (2012).....	25
Figura 12. Nanotubos de carbono y sus aplicaciones [43].....	26
Figura 13. Varios ejemplos de medicamentos que se administran a través de Quantum Dots [43].	29
Figura 14. Ilustraciones conceptuales de micela esférica (a), micela cilíndrica (b), micela de disco (c) y vesícula (d) [61].	33
Figura 15. Varias nano formas y sus características morfológicas [43].	34
Figura 16. Ejemplo de un enlace peptídico entre aminoácidos [63].....	36
Figura 17. Los aminoácidos individuales consisten en una amina primaria (α), un grupo de ácido carboxílico y una estructura de cadena lateral única (R). A pH fisiológico, la amina está protonada y tiene carga positiva, mientras que el carboxilato está ionizado y posee carga negativa [63].....	36
Figura 18. Esquema general de la reacción de conjugación [67].....	39
Figura 19. Proceso I de separación del bioconjugado de Ácido Oleico y L-Cisteína: (A) Formación de gel a pH 12, (B) extracción física del gel, (C) secado y (D) trituración de la muestra.....	40
Figura 20. Espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet Is50.	42

Figura 21. Diagrama de los procesos de dispersión de Rayleigh y Raman.	43
Figura 22. Representación del campo magnético generado por un núcleo atómico [72].....	44
Figura 23. Posibles orientaciones del spin nuclear en presencia de campo magnético externo como función de "I" [72].	45
Figura 24. Precisión del spin nuclear en presencia de campo magnético externo para $I=1/2$ [72]..	46
Figura 25. Señales que se generan cuando un haz de electrones de alta energía interactúa con una muestra delgada [73].	49
Figura 26. Espectro de resonancia magnética nuclear de bioconjugado. Disuelto en DMSO deuterado [67].	51
Figura 27. Espectro de FTIR de ácido oleico. Técnica ATR.	52
Figura 28. Espectro de FTIR de L-cisteína. Técnica ATR.	53
Figura 29. Espectros de FTIR, comparativo entre materiales precursores y el bioconjugado (MAT). Técnica ATR.	54
Figura 30. Espectro de raman de L-cisteína. Sobre estrato de silicio.....	55
Figura 31. Espectro de raman de ácido oleico. Sobre estrato de silicio.	56
Figura 32. Espectro de raman de bioconjugado (MAT). Sobre estrato de silicio.....	57
Figura 33. Imagen del bioconjugado (MAT) sin diluir a 100 X. En equipo de raman.	57
Figura 34. Espectro UV-Vis del bioconjugado de ácido oleico y L-Cisteína (MAT).....	58
Figura 35. Gráficas de absorbancia versus concentración de bioconjugado de ácido oleico y L-cisteína (MAT). Longitud de onda 204 nm.	59
Figura 36. Curva de correlación obtenida por DLS de la muestra MAT a 0.3 g / L a 25 ° C.....	60
Figura 37. Distribución del diámetro hidrodinámico de 101.14 nm de la muestra de MAT a 0.3 g / L por DLS.	60
Figura 38. Las imágenes TEM muestran partículas esféricas y cilíndricas con tamaños inferiores a 100 nm.	61
Figura 39. Histograma de tamaños obtenidos en TEM. En el eje X tenemos rangos de tamaño (nm) y en el eje Y tenemos el número de partículas.	62

RESUMEN.

Español.

Este trabajo se centró en la síntesis de nuevos biomateriales a partir de la bioconjugación de ácido oleico con L-cisteína utilizando carbodiimida. El uso de un aminoácido como grupo polar y que cuenta con un grupo carboxílico y un grupo amino primario nos otorga la posibilidad de agregar el componente hidrófobo en cualquiera de las dos partes. Estos bioconjugados son importantes para el control de autoensamblaje e interacciones hidrofóbicas, así como para evaluar estrategias sintéticas para acoplamientos más versátiles y eficientes. El proceso de bioconjugación es gracias al uso de un agente llamado reticulador, en este trabajo la carbodiimida. La propiedad más importante de un reticulante es su grupo químico reactivo. El grupo reactivo establece el método y mecanismo de modificación química. Los reticulante contienen al menos dos grupos reactivos, que se dirigen a grupos funcionales comunes que se encuentran en biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos.

English.

This work focused on synthesizing new biomaterials from the bioconjugation of oleic acid with L-cysteine using carbodiimide. The use of an amino acid as a polar group that has a carboxylic group, and a primary amino group gives us the possibility of adding the hydrophobic component in either of the two parts. These bioconjugates are essential for the control of self-assembly and hydrophobic interactions and for evaluating synthetic strategies for more versatile and efficient couplings. The bioconjugation process is thanks to use an agent called a crosslinker, in this work, carbodiimide. The most important property of a crosslinker is its reactive chemical group. The reactive group establishes the method and mechanism of chemical modification. Crosslinkers contain at least two reactive groups, which target common functional groups found in biomolecules such as proteins and nucleic acids.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Antecedentes.

La nanociencia es la ciencia de lo muy pequeño donde las propiedades de la estructura macroscópica vienen dictadas por el nano-componente. A esta escala la materia ofrece propiedades diferentes y muchas veces sorprendentes de tal manera que las fronteras entre disciplinas científicas y técnicas preestablecidas se difuminan [1]. La nanociencia y la nanotecnología se presentan como un área nueva de investigación en el estudio de los materiales donde convergen diversas ramas del conocimiento que permiten estudiar fenómenos inéditos que ocurren a nivel atómico y molecular. La importancia de la nanotecnología radica en que en mundo nanométrico los materiales pueden adquirir o realzar propiedades diferentes a las que tienen a escala macroscópica [2].

En 1959 Richard Feynman presentó su conferencia titulada “There´s Plenty of Room at the Bottom” en ella se avizoraba maquinas fabricando partes para maquinas más pequeñas. En Feynman encontramos la idea básica del ensamblado de máquinas a nanoescala. Pero ¿Qué es la nanotecnología? La Nanotecnología, es el diseño, caracterización, producción y aplicación de materiales, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y el tamaño en la nanoescala. La Nanoescala se considera en si un intervalo de 1 a 100 nm. véase Figura 1. En la actualidad a las “maquinas” se les llama dispositivos y convierten algo en algo más [3]. Los diseños de dispositivos nanoestructurados ofrecen tecnologías nuevas o mejoradas que impliquen reacciones electroquímicas mejorando su capacidad de almacenar y transportar [4].

Por otra parte, también encontramos sistemas de liberación controlada, los cuales pueden ser nano esferas o nano capsulas (nano acarreadores). Estos sistemas generalmente se refieren a tecnologías o biomateriales que pueden ser diseñados para liberar fármacos a velocidades predeterminadas y/o ajustables, o en respuesta a estímulos externos y desencadenantes [5].

Una de las clases más importantes de sistemas sintéticos para crear las nanoestructuras son los poliaminoácidos.

Por control de la arquitectura de las moléculas individuales, es posible generar nanoestructuras ya sea en una masa fundida sin diluir o en solución. Estas nanoestructuras ordenadas son ajustables en una amplia variedad de las morfologías, que van desde micelas y vesículas discretas hasta estructuras de red continuas. Su naturaleza sintética permite el diseño de interfaces con diferentes grupos funcionales químicos y propiedades geométricas. Esto, en combinación con su arquitectura, determina los niveles de ordenación en la auto organización de materiales poliméricos. Por estas y otras razones, el copolímero de bloques, micelas, vesículas y mesofases están encontrando aplicaciones desde varios nanocompósitos hasta dispositivos biomédicos [6].

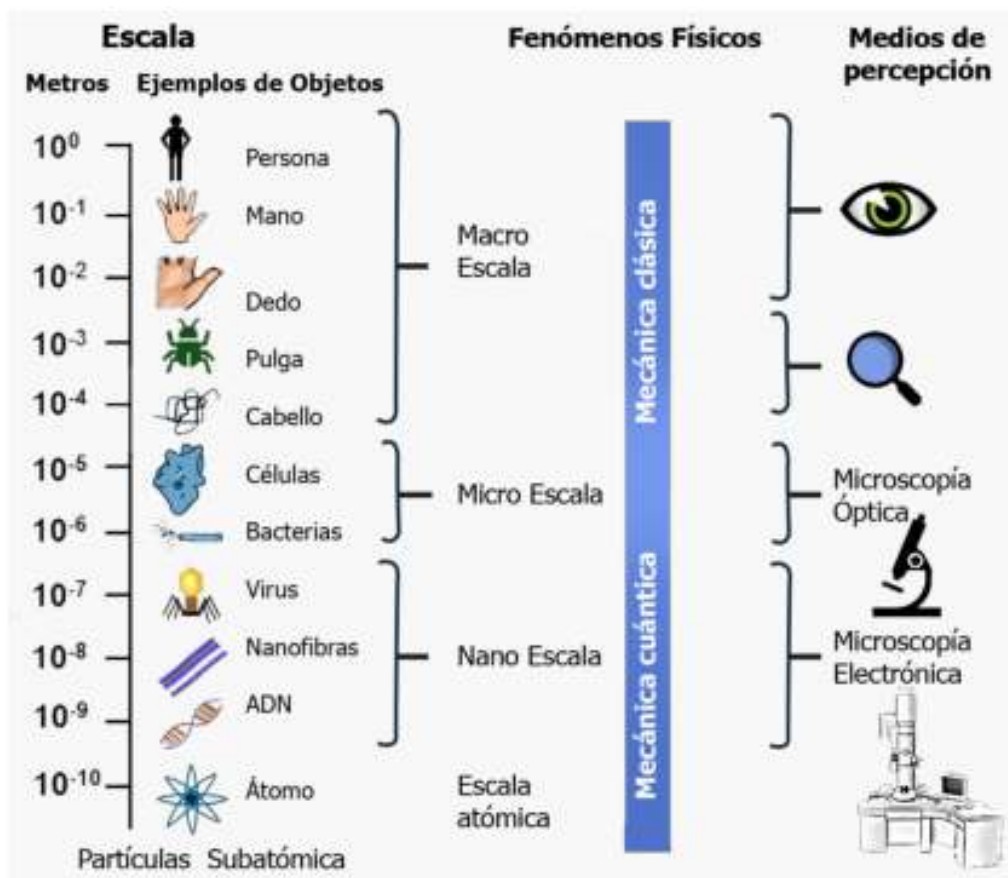


Figura 1. Representación gráfica de la escala nanométrica [7].

Como una alternativa en esta rama de los nanomateriales surgen los polipéptidos, cadenas generalmente conformadas de aminoácidos variados; y los, poli(aminoácidos) cadenas poliméricas formadas de unidades repetitivas de aminoácidos. Que tienen el potencial de contribuir significativamente como nanoacarreadores biológicos, debido a su origen de biomasa, funcionalidad y propiedades físicas únicas [8]. Adicionalmente, los polipéptidos pueden diseñarse para servir como materiales funcionales y estructurales. El uso de péptidos como portadores de ácidos nucleicos para la liberación en células diana y organelos es una aplicación importante de tales materiales funcionales. Los estudios sobre polipéptidos como también se revisan los materiales estructurales [9]. En la actualidad el uso de biosensores tiene un enorme problema, que es la bioincrustación, como la adsorción de proteínas inespecíficas, la adhesión de microorganismos y la formación de biopelículas [10]. Los polímeros zwitteriónicos son alternativas perfectas para resolver este problema, debido a sus propiedades de biocompatibilidad y de auto ensamblado [11].

La demanda de materiales biocompatibles y biodegradables para aplicaciones médicas ha aumentado la investigación de nuevos compuestos que satisfagan esas propiedades. Dentro de estos nuevos compuestos, algunos tensioactivos podrían cumplir estas características [12][13].

Los tensioactivos tienen una estructura molecular característica que comprende un grupo (generalmente una cadena de alquilo larga) con poca atracción por el solvente (hidrófobo, si el solvente es agua), junto con otro grupo (iónico o no iónico) que muestra una fuerte atracción. del solvente (hidrofílico en sistemas acuosos). Estas moléculas también se les conoce como anfifílicas.

El termino anfifílica hace referencia a una estructura molecular que se compone de al menos una parte liofílica y liofóbica [14]. Debido a que el agua es uno de los solventes más utilizados, generalmente se refiere como moléculas anfifílicas a aquellas moléculas compuestas de una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica (o lipofílica). En su forma más sencilla, dichas moléculas consisten en una larga cadena de hidrocarburos unida a una cabeza polar, la cual puede ser iónica o no iónica [15].

La presencia de un aminoácido como grupo polar en una molécula anfifílica caracteriza este tipo de tensoactivos. Para su síntesis se utilizan los 21 aminoácidos utilizados como unidades de construcción de proteínas como la materia prima natural. Estos, a excepción de la glicina (la cual es aquiral) se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su grupo R, de esta manera se pueden obtener surfactantes catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros [12]. Con los aminoácidos que tienen un grupo carboxílico y un grupo amino primario, los tensioactivos sintetizados a partir de ellos se pueden preparar agregando el componente hidrófobo en cualquiera de las dos partes, como se presenta en la literatura [13] Figura 2.

El aminoácido puede derivatizarse haciendo reaccionar a su grupo carboxilato con un alcohol para producir un éster aminado o con una amina para producir una amino amida (véase Figura 2).

Alternativamente, el grupo amino puede iniciarse haciéndolo reaccionar con un ácido graso para obtener una amida ácida o con un haluro de alquilo para formar una amina secundaria o terciaria produciendo así un N-alquilaminoácido [12][13].

El grado de actividad superficial y el tipo de aplicación dependen de las características del equilibrio hidrófilo / lipófilo (HLB) de esta estructura anfifílica [16]. Lo anterior también se conoce como factor de empaquetamiento, la cual es una característica muy valiosa y ampliamente utilizada en la literatura.

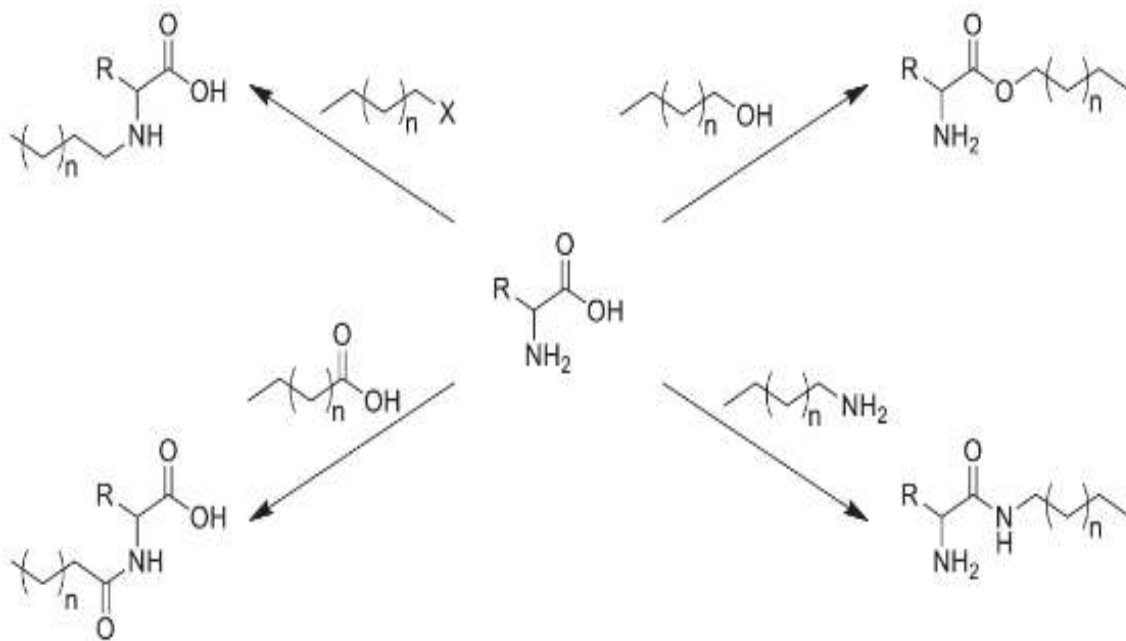


Figura 2. Diferentes rutas de derivatización de aminoácidos con cadenas alifáticas hidrofóbicas.

1.2. Relación entre el factor de empaquetamiento y la morfología del agregado.

La relación entre el factor de empaquetamiento y la forma del agregado está bien establecida y se puede resumir de la siguiente manera. Si v es el volumen de la porción hidrofílica de un tensioactivo y a y l son, respectivamente, el área del grupo de cabeza y la longitud de la cadena hidrófoba, entonces el factor de empaquetamiento viene dado por [17]:

$$p = \frac{v}{al}$$

Este factor de empaquetamiento proporciona la información necesaria para la caracterización de la geometría de las micelas que se formarán a partir de determinada molécula de surfactante. Algunas formas geométricas definidas por esta relación se muestran en la siguiente Figura 3.

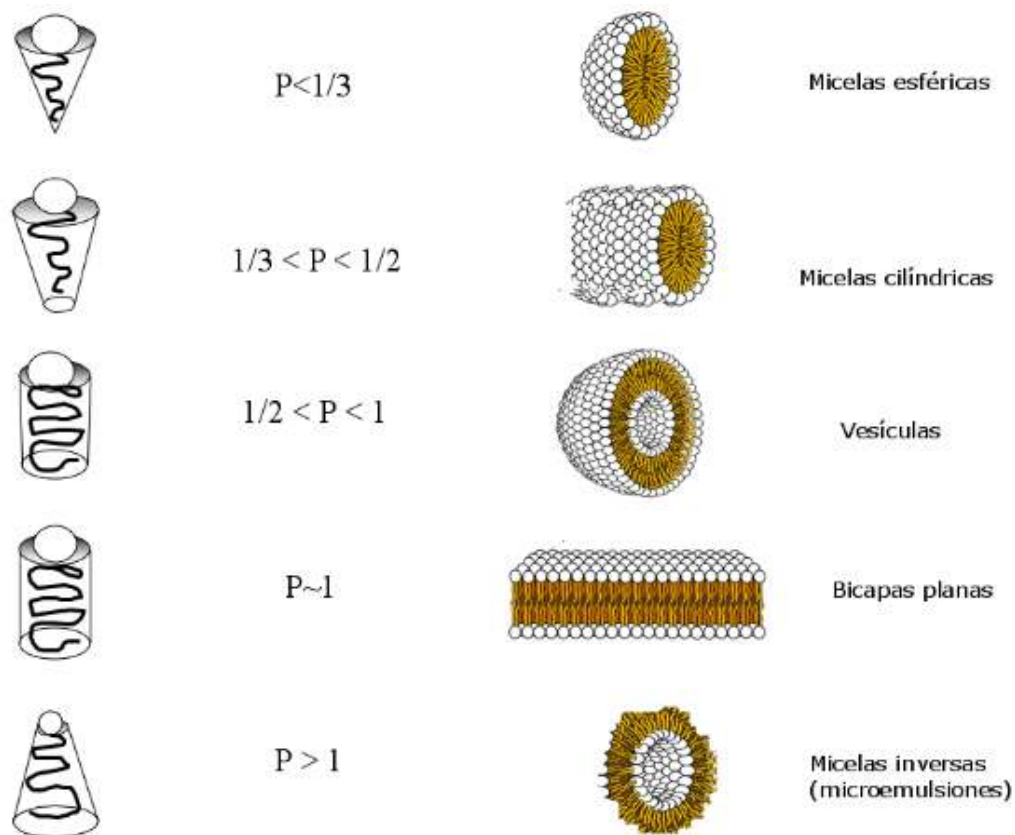


Figura 3. Relación entre el factor de empaquetamiento y la morfología del agregado [18].

Las moléculas tensioactivas de materias primas renovables que imitan los lipoaminoácidos naturales son una de las opciones preferidas para aplicaciones alimentarias, farmacéuticas y cosméticas [12]. Estos tensioactivos se pueden obtener a partir de moléculas que imitan estructuras anfifílicas naturales. Con base en estas consideraciones, y como parte del objetivo de nuestro estudio, se sintetizó un surfactante a partir de ácido oleico y cisteína (lipoaminoácidos). La asociación de aminoácido polar y un compuesto no polar de cadena larga para construir estructuras anfifílicas permite obtener moléculas con una alta actividad superficial [19]. Cuando se disuelve una molécula anfifílica, el grupo liofóbico distorsiona la estructura del solvente, aumentando la energía libre en el sistema [20].

La presencia de un aminoácido como grupo polar en una molécula anfifílica caracteriza este tipo de tensioactivo. Para su síntesis, se utilizan aminoácidos utilizados como unidades constructoras de proteínas, como materiales naturales. Algunos estudios indican que los tensioactivos a base de aminoácidos forman estructuras fibrilares y son capaces de gelificar aceites [21]. La naturaleza de estas fibras radica en el autoensamblaje quiral de moléculas anfifílicas. Las fibras forman una red tridimensional a través del medio para formar un gel. En general, los

materiales que exhiben estas propiedades se denominan agentes gelificantes de bajo peso molecular [22].

El término lipoaminoácidos se aplica a aquellos compuestos en los que un solo aminoácido está unido, ya sea a través de su grupo carboxilo o amino, a un ácido graso de cadena larga [23]. En 1909, S. Bondi sintetizó lipoaminoácidos a partir de glicina y alanina como N-lauroil-aminoácidos para dilucidar la teoría de que la necrosis grasa en las células se atribuía a la descomposición de acilaminoácidos en aminoácidos y ácidos grasos [24]. Posteriormente, en 1955, se confirma la existencia natural de lipoaminoácidos [25]. Desde entonces, se han encontrado varios lipoaminoácidos en diferentes seres vivos [23].

1.3. Objetivo de la investigación.

Este trabajo se centró en la síntesis de nuevos biomateriales a partir de la bioconjugación de ácido oleico con L-cisteína utilizando carbodiimida. El proceso de unir químicamente dos o más moléculas a través de un enlace covalente con la ayuda de un agente de reticulación se llama bioconjugación. Estos agentes tienen extremos reactivos para grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfhidrilos, etc.) [26].

En el proceso de investigación se eligió la L-cisteína porque contiene un grupo tiol (-SH). La ventaja de contener un grupo tiol es que el azufre en sus diferentes estados de oxidación representa uno de los elementos más versátiles en biología molecular. Muchos de los compuestos de azufre en los seres vivos, como algunas vitaminas, metionina y cisteína, son esenciales para la nutrición humana al realizar funciones como el transporte de electrones en los centros de Fe-S y funciones estructurales a través de puentes disulfuro [27]. Los puentes disulfuro en las proteínas mejoran la estabilidad termodinámica de la molécula y pueden ser reversibles en entornos reductores. La reactividad de los tioles de cisteína individuales se puede utilizar para manipular las reacciones de ensamblaje oxidativo [28][29]. Estas moléculas se autoensamblan como resultado de las fuerzas de dispersión de London, Van der Waals, los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de atracción y repulsión electrostáticas e interfaciales [21]. Además, los grupos tiol son bien conocidos en nanotecnología por su propiedad de autoensamblarse o autoorganizarse en superficies metálicas específicas, como oro, plata, cobre, entre otras. La bioconjugación se centra en la reacción entre un ácido carboxílico como el ácido oleico con el grupo amino de un aminoácido como la L-cisteína, formando un enlace amida. Sin embargo, el método ideal de síntesis de amidas por condensación directa de un ácido carboxílico y una amina para la formación de una molécula equivalente de agua como único subproducto no es práctico. Como resultado, la activación del componente ácido es necesaria para promover el acoplamiento de amidas y desarrollar un proceso de síntesis eficiente [30]. Como alternativa se usa la conjugación mediada por carbodiimida, reportada en 1955 [31]. Para este tipo de conjugación, es importante seleccionar carbodiimida en base al solvente considerando que debe ocurrir una separación de la urea correspondiente. Se debe utilizar el caso de reacciones que parten de ácidos grasos o de un compuesto que

también sea soluble en disolventes no polares o anfifílicos, como el DMSO, y que la urea correspondiente se pueda eliminar fácilmente.

El DMSO es un solvente aprótico polar que contiene en su estructura un grupo sulfóxido altamente polar, así como dos grupos metilo CH₃ de naturaleza no polar. A diferencia de solventes polares próticos como el agua y los alcoholes, tiende a aceptar en lugar de donar protones [32]. El efecto del DMSO en el comportamiento de las moléculas de agua ocasiona una disrupción en la interacción de las moléculas de agua debido a que la interacción DMSO-agua es 1.3 veces más fuerte que la de las moléculas de agua [33] Figura 4.

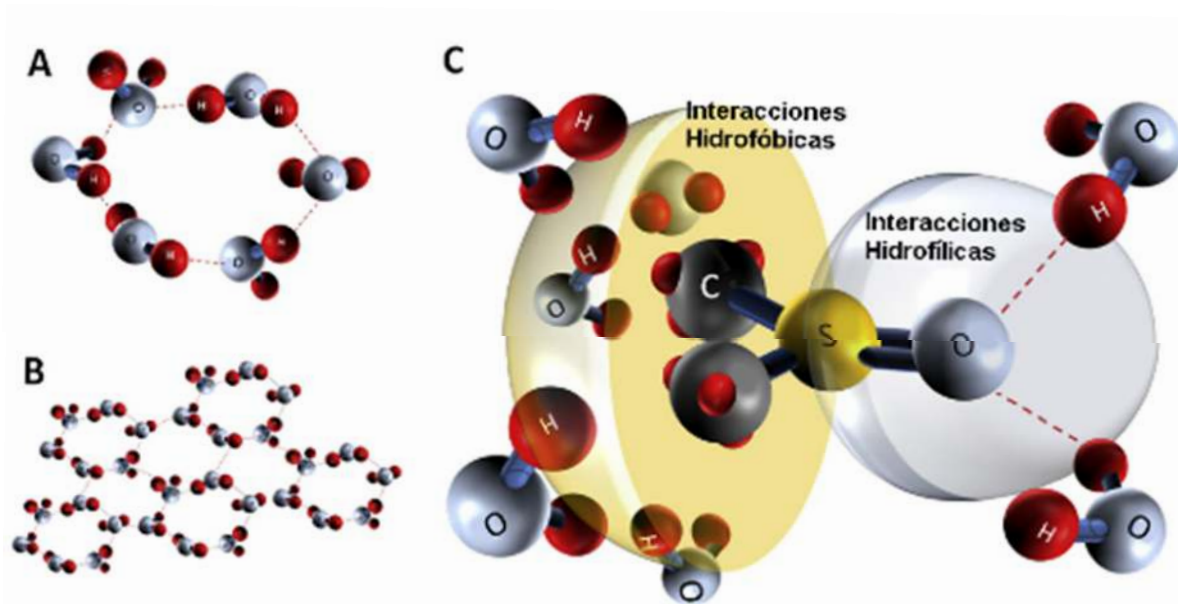


Figura 4. El efecto del DMSO en el comportamiento de las moléculas de agua. (A, B) Organización natural del agua. (C) La adición de moléculas de DMSO [36].

1.4. Planteamiento del problema.

Las nanopartículas fabricadas a partir de polímeros pueden imitar o modificar procesos biológicos y pueden brindar soluciones a viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional. Pero algunos materiales no son biodegradables como polimetilmetacrilato, poliestireno y poliamida.

2. MARCO CONTEXTUAL Y ESTADO DEL ARTE.

2.1. Marco de referencia.

En 1953, se publica La química de las carbodiimidas, dónde se plantea su preparación sus propiedades físicas y químicas, así como su uso en la formación de acilureas a partir de péptidos con grupos carboxilo terminales libres, dónde se han utilizado en un método para la identificación de aminoácidos terminales en péptidos [34]. Posteriormente el método utilizado para la formación de enlaces peptídicos mediante el uso de carbodiimida es planteado por primera vez en 1955 por John C. Sheenan y George P. Hess. Del departamento de Química del Instituto de Tecnología de Massachusetts [31]. Donde además se hace notar que el coproducto, N, N'-diciclohexilurea, tiene una solubilidad muy baja en la mayoría de los disolventes orgánicos o acuosos y, en todos los casos ensayados, se separa fácilmente.

2.2. Conceptos básicos.

Ácido oleico: El ácido oleico es un ácido graso con una cola alifática de 18 carbonos. Su fórmula química es $CH_3(CH_2)7CH=CH(CH_2)7COOH$ [35].

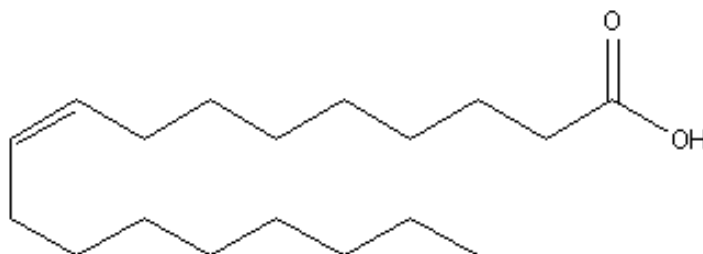


Figura 5. Molécula de ácido oleico. Fuente: Base de datos de Chem Draw.

Agente reticulante (Crosslinker): Son reactivos que contienen extremos reactivos para grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfhidrilos, etc.). Los reticulantes también se utilizan comúnmente para modificar ácidos nucleicos, fármacos y superficies sólidas. La misma química se aplica a la modificación y eliminación de la superficie de aminoácidos y ácidos nucleicos [26].

Bioconjugación: También llamada reticulación (Crosslinking) es el proceso de unir químicamente dos o más moléculas mediante un enlace covalente, utilizando un agente reticulador. La disponibilidad de varios grupos químicos en proteínas y péptidos los convierte en objetivos para la conjugación y para el estudio mediante métodos de reticulación [26].

L-cisteína: Es un aminoácido dispensable para el adulto humano, que en circunstancias fisiológicas lo puede sintetizar a partir de metionina y serina. No obstante, este aminoácido está presente en la dieta habitual. La cisteína desempeña un papel fundamental, no sólo como componente de las proteínas, sino como un

elemento esencial en la síntesis de glutatión y de taurina [36]. La cisteína es un aminoácido azufrado (al igual que la metionina) que contiene un grupo tiol (-SH).

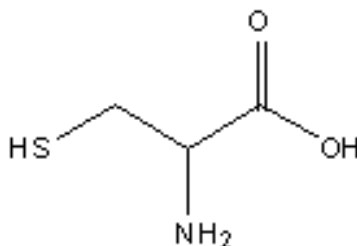


Figura 6. Molécula de L-cisteína. Fuente: Base de datos de Chem Draw.

Nanoencapsulante o nanoportador (nanocarrier): Son estructuras con propiedades únicas que funcionan como plataformas de liberación de fármacos más favorables que los enfoques de tratamiento convencionales [37]. Después de la carga, el destino del fármaco ya no depende de sus propiedades fisicoquímicas, sino de las del portador: se puede lograr una distribución específica a nivel celular e incluso subcelular mediante el diseño oportuno del nanoportador. Los nanoportadores incluyen: nanopartículas, micelas poliméricas y polimerosomas [38].

Poliaminoácidos: Los poli- α -aminoácidos son polímeros sintéticos compuestos por residuos de α -aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Se preparan por polimerización de los correspondientes monómeros y consisten, como otros polímeros sintéticos, en mezclas de macromoléculas homólogas de diferentes longitudes de cadena. Los términos poli- α -aminoácidos y polipéptidos se utilizan a menudo como sinónimos [39].

2.3 Modelos clásicos.

En medicina, el uso de herramientas nanométricas para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades se está volviendo cada vez más popular. En este contexto, el uso de materiales poliméricos es muy amplio y las formulaciones basadas en polímeros se encuentran entre las nanomedicinas de mayor éxito.

Uno de estos materiales utilizados es el Pluronic, el cual ha sido uno de los compuestos objeto de estudio en el campo de los hidrogeles termosensibles, debido a sus características, con el término "Pluronic" se identifica a un copolímero de bloque genérico constituido por dos unidades de PEG (Polietilenglicol), separadas por una unidad central de PPG (Polipropilenglicol) [40].

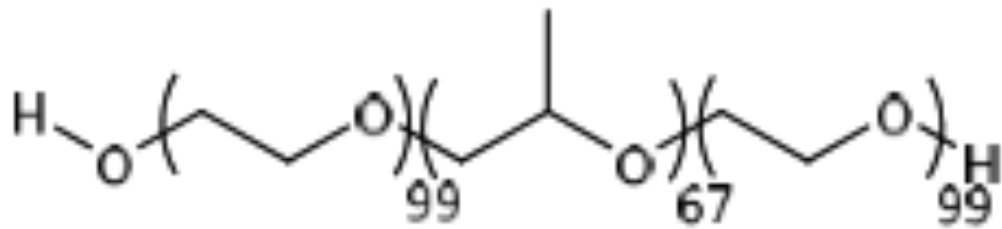


Figura 7. Estructura química de copolímero denominado Pluronic.

Dentro de las características de interés de este copolímero es su capacidad de autoorganizarse formando micelas en condiciones acuosas, esto debido a su parte hidrófoba de PPG y a su parte hidrófila de PEG.

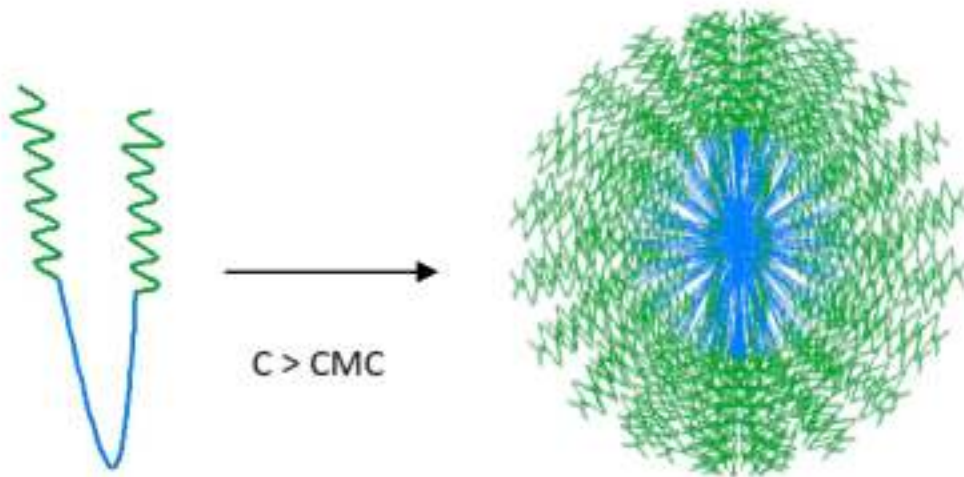


Figura 8. Esquema de la estructura micelar del Pluronic en agua. En azul la parte hidrófoba (PPG) y en verde la parte hidrófila (PEG)

Otro de los grandes avances y desarrollos en materia de encapsulado están los liposomas, cuyo origen lo podemos encontrar documentado desde 1956 y en donde encontramos un comportamiento de membrana, con características hidrofóbicas e hidrofílicas [41].

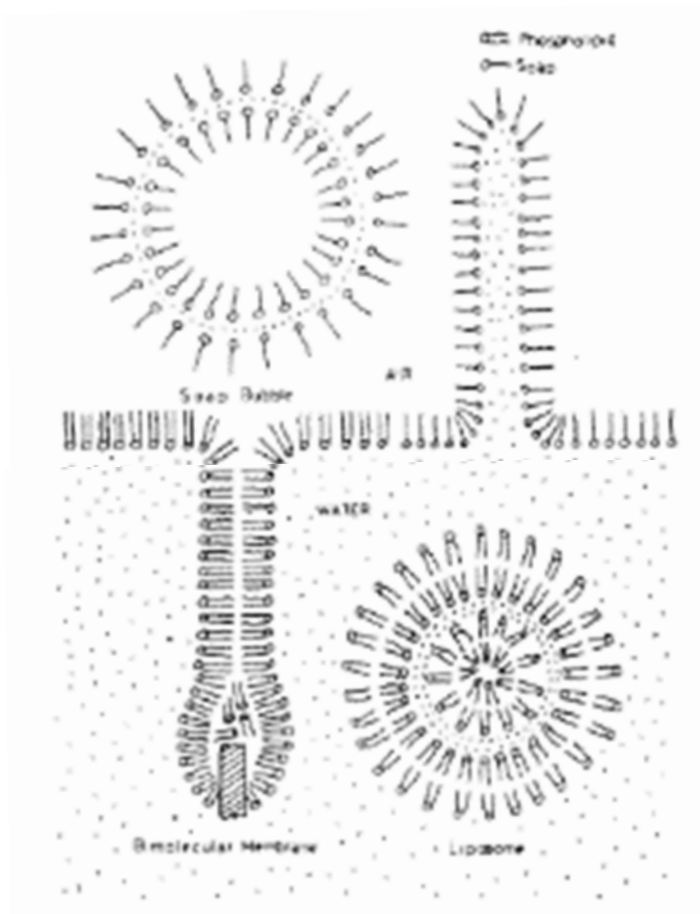


Figura 9. Orientación preferida de moléculas de jabón y fosfolípidos en una interfaz aire / aire, aire / agua y agua / agua según Karol Mysels. (Cortesía de Taylor and Francis Ltd., Publishers).

En la variedad de modelos de estructuras nanométricas auto ensamblables también encontramos las que son sensibles a los cambios en el pH, ejemplo de ellas son las reportadas por Juan Rodríguez-Hernández and Sebastien Lecommandoux* las cuales son vesículas reversibles y solubles en agua a base de copolímeros de polipéptidos dibloque.

Estas estructuras reportadas se les llama vesículas esquizofrénicas que pueden ensamblarse de manera reversible en soluciones acuosas ácidas o básicas moderadas, a partir de copolímeros dibloque polipeptídicos. Las estructuras de micelas y vesículas de copolímero dibloque de polibutadieno-b-poli (ácido L-glutámico) (PBB-PGA) y poliisopreno-b-poli (L-lisina) (PI-b-PLys) responden al pH o a la fuerza iónica con un cambio en el radio hidrodinámico. Las variaciones de tamaño observadas se han asignado a la neutralización del bloque polipeptídico que cambia de una conformación de espiral aleatoria (forma cargada) a una estructura helicoidal R neutra y compacta ("varilla") y se demostró que es reversible [42].

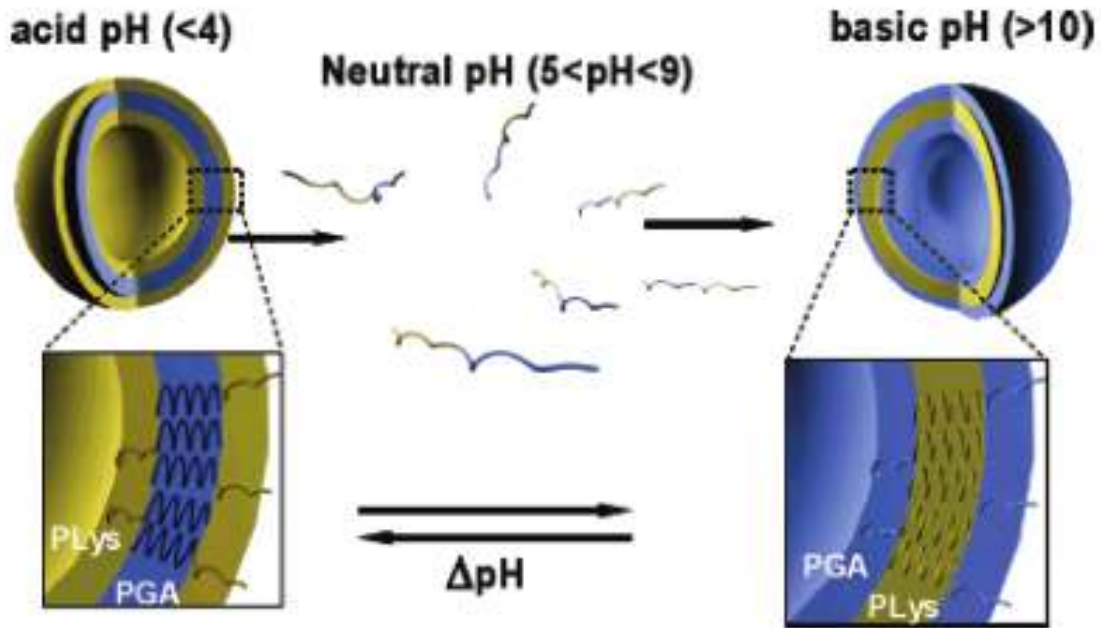


Figura 10. Representación esquemática del autoensamblaje en vesículas del copolímero dibloque PGA15-b-PLys15.

2.4 Revisión del estado del arte.

Suministro de nanomedicina y fármacos.

La aparición de la nanotecnología en la medicina llevó a la exploración de sistemas de administración de fármacos más específicos en las ciencias farmacéuticas. Actualmente, se ha establecido una mejor comprensión entre la nanomedicina y sus aplicaciones de administración de fármacos en las ciencias farmacéuticas para minimizar la toxicidad y los efectos secundarios de los fármacos. La exploración de dicho sistema de administración de fármacos hacia células y/o tejidos específicos evita los peligros para la salud que a veces se producen debido a los propios sistemas de transporte que pueden imponer riesgos al paciente. En los últimos años, varios informes han llegado a una conclusión sobre los riesgos para la salud asociados a las nanopartículas y sus medidas preventivas asociadas. Por lo tanto, actualmente se están examinando varias sustancias para la administración de fármacos [43].

De manera adicional se debe de considerar el tipo de riesgos para la salud que son causados por el uso de nanopartículas, Se requiere más comprensión para investigar la toxicidad de las nanopartículas y sus peligros potenciales, como en el caso de la toxicidad por inhalación.

Los riesgos asociados con los materiales nanoestructurados pueden variar de la toxicología de las sustancias, ya que las sustancias químicas que las componen pueden o no ser solubles en matrices biológicas. Por lo tanto, sus problemas de solubilidad influyen en gran medida en su potencial exposición contra varios órganos

internos. Teniendo en cuenta este aspecto, los sistemas de nanopartículas cuando se administran a través de la ruta más crítica, como los pulmones, obtienen una alta exposición en los pulmones y una baja exposición para otros sistemas de órganos después de la inhalación. Debido a que estas nanopartículas están diseñadas de manera específica para su inhalación, la acumulación o absorción en órganos no deseados puede ocasionar toxicidad. Consideremos que el pulmón es un órgano donde se produce el intercambio de oxígeno y la acumulación del fármaco o nano matriz puede influir en la generación de productos tóxicos.

Por el contrario, el hecho positivo de las nanopartículas es su tamaño, que puede ofrecer oportunidades para cruzar las diversas barreras biológicas dentro del cuerpo, por ejemplo, la barrera hematoencefálica puede abrir nuevas vías para la administración de fármacos al cerebro. Además, el pequeño tamaño de estas partículas permite su entrada en la célula y en varios compartimentos celulares como el núcleo. Se están investigando varias sustancias naturales y sintéticas [43].

Algunas ventajas de las nanopartículas para la medicina.

- Las nanopartículas utilizadas con fines terapéuticos cumplen con la definición general recién proyectada y aceptada actualmente de un tamaño ≤ 100 nm. Sin embargo, esto no influye esencialmente en su funcionalidad en aplicaciones terapéuticas [44].
- Las nanopartículas se consideran una terapia atractiva para varios propósitos medicinales, ya que estas nanopartículas tienen características importantes y exclusivas, como sus propiedades cuánticas y su capacidad de absorción, su relación superficie / masa es mucho mayor que la de otras partículas, y llevar otros compuestos.
- Las nanopartículas tienen una superficie comparativamente grande (funcional) que es capaz de unirse, adsorber y transportar otros compuestos como fármacos, proteínas y sondas.
- Estas partículas de nanoingeniería no sólo se utilizan para la administración de fármacos como portadores, sino que también el fármaco en sí puede formularse a nanoescala y luego funcionar como su propio “portador” [45].

Desafíos de las nanopartículas.

- Se requiere una mejor comprensión de la base fisiopatológica de la enfermedad, lo que brindará oportunidades de diagnóstico más sofisticadas y, sin duda, aumentará el costo total de la terapia.
- Las dimensiones significativas (por debajo de $0.1 \mu\text{m}$ o 100 nm) de las nanopartículas no permiten una carga suficiente del fármaco en las partículas.
- Algunos de los riesgos graves para la salud asociados con las nanopartículas deben resolverse, como la exposición de materiales biológicos con nanopartículas inhaladas como parte de la liberación involuntaria de nanopartículas ultrafinas derivadas de los procesos de la combustión, como las partículas de escape de diésel [46].

La exposición a estas nanopartículas / partículas ultrafinas derivadas de la combustión se asocia con una amplia variedad de efectos que incluyen inflamación pulmonar, efectos adyuvantes inmunes y efectos sistémicos, incluida la coagulación sanguínea y efectos cardiovasculares [43].

Vehículos de distribución de fármacos desde una perspectiva de nanoingeniería.

Los sistemas de administración de fármacos de nanoingeniería (nDDS) son aquellos sistemas en los que el sistema de nanopartículas o su entorno se modifica o manipula para evitar las limitaciones inducidas por las nanopartículas en general. Actualmente, el nDDS se utiliza como herramientas clínicas potenciales para la modulación del perfil de liberación de fármacos farmacológicos y para el direccionamiento específico de tejidos enfermos, especialmente tejido o células cancerosas [47].

Hasta la fecha, varios medicamentos contra el cáncer, como la doxorubicina, el paclitaxel y la vincristina, han sido el principal objetivo de la nDDS. Se sabe que los liposomas y los conjugados polímero-fármaco son el grupo más aceptado de nDDS utilizados para este propósito. El procedimiento de nanoingeniería requiere selección cuidadosa y optimización de los diferentes factores que afectan el perfil de liberación del fármaco (es decir, tipo de biomaterial, tamaño, arquitectura del sistema y mecanismos de biodegradabilidad) junto con la selección de una técnica de fabricación adecuada que no comprometa el perfil de liberación deseado, mientras también ofrece posibilidades de escalar para una futura industrialización [47].

La nanoingeniería o manipulación del sistema de administración de fármacos se puede lograr en varios niveles durante la formulación del fármaco, por ejemplo, dentro de un portador, con la modulación del entorno del fármaco a nivel molecular, alteración de las características fisicoquímicas del fármaco, control de la movilidad difusa y modificación de química de volumen y superficie del nanoportador.

Estos enfoques son lo suficientemente exitosos para establecer criterios de valoración terapéuticos favorables, tales como una mayor eficacia del fármaco durante un período prolongado, una reducción de la toxicidad del fármaco; reducir la dosis y la carga de costos, y mejorar el cumplimiento del tratamiento en el paciente [47].

2.5. Tipos de nanosistemas.

Estructuras a base de carbono.

Para hablar de estructuras a base de carbono, iniciaremos con la revisión de los nanotubos de carbono, que son estructuras tubulares basadas en carbono que fueron descubiertas por Sumio Iijima en 1991 [48]. Estas estructuras están dispuestas de manera similar a una hoja de grafito enrollada en un cilindro y cubierta en uno o ambos extremos por un fullereno (C_{60}). Se trata de redes hexagonales de átomos de carbono que tienen un diámetro de un nanómetro y una longitud de 1 a 100 nm. Estas redes de carbono son capas dispuestas de grafito enrolladas en un cilindro. Hay dos configuraciones basadas en carbono que han recibido mucha atención recientemente: nanotubos de pared simple (SWNT) y nanotubos de paredes múltiples (MWNT) Figura 11[49].

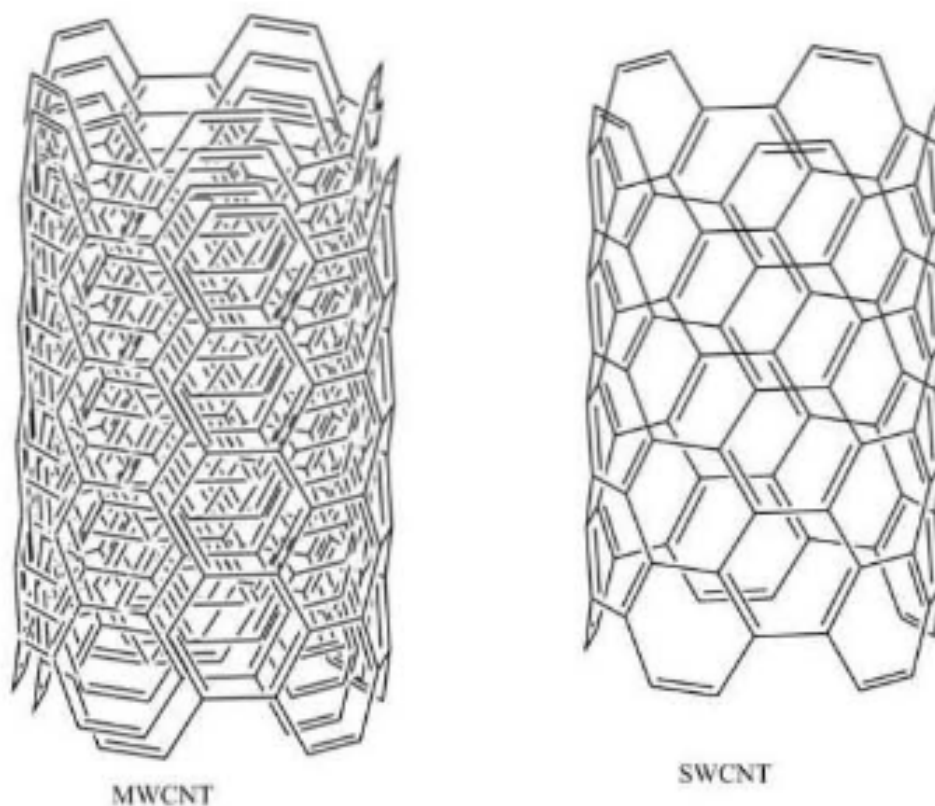


Figura 11. Dibujo de nanotubos de pared múltiple y pared simple. Fuente: Marlene Lariza Andrade Guel. Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. (2012)

Además de estos tipos, los fullerenos C_{60} también forman parte de las configuraciones habituales. Estas son arquitecturas huecas, a base de carbono, en forma de jaula (nanotubos y fullerenos), también conocidas como buckyballs, que se diferencian en la disposición de sus cilindros de grafito.

El tamaño, la geometría y las características de la superficie de estas macromoléculas las hacen atractivas para el uso de portadores de fármacos y tienen

propiedades físicas notables. Los SWNT y los fullerenos C₆₀ tienen un rango de diámetros internos de 1 a 2 nm. Esta dimensión es equivalente a aproximadamente la mitad del diámetro de la hélice de ADN promedio, mientras que los MWNT tienen diámetros que van desde varios nanómetros hasta decenas de nanómetros con una distancia de 0.36 nm entre capas de MWCNT, dependiendo del número de paredes en la estructura. El tamaño puede variar en longitud desde 1 µm hasta unos pocos micrómetros. En lo que respecta a su arquitectura, los fullerenos y los nanotubos de carbono se fabrican típicamente mediante ablación con láser, deposición de vapor químico, descarga de arco eléctrico o procesos de combustión. La caracterización de estas formas concéntricas se basa en su fuerza y estabilidad para que puedan usarse como portadores de fármacos estables. La entrada celular de nanotubos puede estar mediada por endocitosis o por inserción a través de la membrana celular. Los fullerenos también han mostrado capacidad para dirigirse a fármacos. Se ha demostrado que el direccionamiento selectivo de tejidos y el direccionamiento intracelular de las mitocondrias con el uso de estructuras de fullereno. Además, los experimentos con fullerenos también han demostrado que exhiben un comportamiento antioxidante y antimicrobiano. Los nanotubos de carbono y sus aplicaciones se destacan en la tabla de la Figura 12 [43].

Drug	Type of disease	Type of CNTs
	Breast cancer	MWCNTs
Amphotericin B	Leishmania donovani (parasite)	Not specified
Carboplatin	Bladder cancer	Not specified
Daunorubicin	Leukemia	SWCNTs
Doxorubicin	Lymphoma	SWCNTs
Gemcitabine	Ovarian cancer	SWCNTs
Methotrexate	Breast cancer	MWCNTs
Paclitaxel	Breast cancer	SWCNTs

Figura 12. Nanotubos de carbono y sus aplicaciones [43].

Algunas de las aplicaciones actuales para los nanotubos de carbono, se enlistan a continuación:

- Especificación celular: mejora de la especificidad celular mediante la conjugación de anticuerpos a nanotubos de carbono con marcaje fluorescente o radioactivo [43].
- Internalización: la internalización dentro de las células de mamíferos se puede lograr mediante nanotubos de carbono funcionalizados en la superficie [43].
- Entrega de vacunas: la conjugación con péptidos puede usarse como estructuras de administración de vacunas [43].
- Entrega de genes: con el avance en las simulaciones de dinámica molecular, el flujo de moléculas de agua a través de nanotubos de carbono

funcionalizados en la superficie, se ha modelado de tal manera que se puedan utilizar convenientemente como transportadores de moléculas pequeñas de ADN, lo que indica un uso potencial como herramienta de entrega de genes. La capacidad de los nanotubos para transportar ADN a través de la membrana celular se utiliza en estudios que involucran terapia génica [43].

- Transporte de péptidos, ácidos nucleicos y otras moléculas de fármacos: la incorporación de grupos carboxílicos o amonio a los nanotubos de carbono mejora su solubilidad, lo que los hace más adecuados para el transporte de péptidos, ácidos nucleicos y otras moléculas de fármacos. Además, también se informó que los nanotubos de carbono, excepto los acetilados, cuando se conjugan con péptidos producen reacciones inmunológicas más altas en comparación con los péptidos libres. Esta propiedad de inducir respuestas inmunológicas se puede utilizar en la producción de vacunas para mejorar la eficacia de las vacunas [43].
- Reduce la toxicidad y aumenta la eficacia: los nanotubos de carbono mejoran la administración de fármacos, la eficacia y reducen la toxicidad como se encuentra en el caso de los nanotubos de anfotericina B. Se ha encontrado que los nanotubos de anfotericina B han mostrado una mejor administración de fármacos al interior de las células, una mayor eficacia y una menor toxicidad para las células de mamíferos en comparación con la administración de anfotericina B sin nanotubos[43].
- Silenciamiento de genes: se requiere una terapia altamente selectiva para la terapia del cáncer donde las células tumorales se modularán selectivamente. En este caso, el silenciamiento génico se ha realizado con pequeños RNA (ácido ribonucleico por sus siglas en inglés) interferentes. Esto puede lograrse dirigiendo nanotubos de carbono de pared simple funcionalizados con RNA, para silenciar la expresión de genes específicos en la célula objetivo[43].
- En métodos de diagnóstico: se informó que los compuestos que están unidos a nanotubos mejoran la eficacia de los métodos de diagnóstico[43].

Otra estructura de interés en el área de los materiales a base de carbono, son los Fullerenos (C₆₀), los cuales también se conocen como buckyballs, estos son un alótropo descubierto en 1985, que tiene unas dimensiones cercanas a los 7 Å de diámetro y está compuesto por 60 átomos de carbono dispuestos en una forma conocida como icosaedros truncados. Su forma es bastante similar a una pelota de fútbol con 20 hexágonos y 12 pentágonos y es muy simétrica. Hay varios tipos de fullerenos como fullerenos dopados con álcali, fullerenos endoédricos, metalofullerenos endoédricos, fullerenos exoédricos y heterofullerenos[43].

Algunas de las aplicaciones actuales para los fullerenos, se enlistan a continuación:

- Diagnóstico: los metalofullerenos endoédricos se pueden utilizar con fines de diagnóstico como medio de contraste de radio en la resonancia magnética y

otros procedimientos de obtención de imágenes. Dado que el metal radiactivo está encerrado dentro de la estructura del fullereno, estos son menos tóxicos y más seguros [50].

- Transporte de fármacos: se están investigando los fullerenos para el transporte de fármacos antivirales, antibióticos y agentes anticancerosos [51] [52].
- Eliminadores de radicales libres: debido a la presencia de un gran número de dobles enlaces conjugados en la estructura del núcleo, los fullerenos también se pueden utilizar como eliminadores de radicales libres. También brindan protección a las mitocondrias contra las lesiones inducidas por los radicales libres [53], debido a esta propiedad pueden usarse en la terapia del cáncer.
- Fotosensibilizadores: Los fullerenos, especialmente los exoédricos, se pueden utilizar como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica contra varios tipos de neoplasias malignas. Estos fullerenos potencialmente generan especies reactivas de oxígeno cuando son estimulados por la luz y matan las células diana. En la actualidad, este método también se está investigando para determinar sus propiedades antimicrobianas, ya que provocan la rotura de la membrana celular, especialmente en bacterias Gram positivas y micobacterias [51] [52].
- Estimular la respuesta inmune del huésped y la producción de anticuerpos: los fullerenos son eficientes para estimular la respuesta inmune del huésped y la producción de anticuerpos específicos de fullereno [43].

Puntos cuánticos

Los puntos cuánticos (QD) son nano cristales de materiales semiconductores que miden alrededor de 2 a 10 nm, que constan de un núcleo inorgánico semiconductor por ejemplo seleniuro de cadmio (CdSe), una capa con revestimiento orgánico acuoso, por ejemplo, sulfuro de cinc (ZnS) para mejorar las propiedades ópticas, y pueden hacerse fluorescentes cuando se estimulan por la luz. Los puntos cuánticos tienen una tapa que les permite mejorar su solubilidad en buffers acuosos. No son semiconductores atómicos ni a granel. El núcleo de los puntos cuánticos determina el color emitido y la capa exterior acuosa está disponible para conjugarse con biomoléculas. La conjugación biomolecular de los puntos cuánticos se puede modificar de acuerdo con varios biomarcadores diana [54]. Los puntos cuánticos y sus aplicaciones terapéuticas se destacan en la tabla de la Figura 13.

Therapeutics	Target cells/ diseases	Type of QDs	Efficacy
5-Fluorouracil	Breast cancer	ZnS QDs	Targeting and controlled drug delivery to cancer cells.
Daunorubicin	Leukaemia	CdTe QDs	Enhanced drug uptake
Daunorubicin	Leukemia K562 cells	CdS QDs	Inhibit multidrug resistance
Doxorubicin	Ovarian cancer	Mucin1- aptamer QD	Higher accumulation on target
Saquinavir	HIV-1	Carboxyl-terminated QDs	High site-specificity and can cross BBB

Figura 13. Varios ejemplos de medicamentos que se administran a través de Quantum Dots [43].

Aplicaciones de los puntos cuánticos:

- Terapia del cáncer: en un informe se demostró que los puntos cuánticos se acumulan en el cáncer de próstata desarrollado en ratones desnudos mediante una mayor permeabilidad y retención [55].
- Bioconjugación con polímero: se informó que su conjugación con polietilenglicol (PEG) y anticuerpos y la orientación al antígeno de membrana específico de la próstata mejora su acumulación y retención en el tejido tumoral [55].

La utilización de QD en la práctica clínica es limitada ya que tiene serios problemas de eliminación que causan una toxicidad extrema. Después de la funcionalización de los QD, el tamaño aumenta. Este rango de tamaño es mayor que el tamaño de los poros del endotelio y los capilares renales, lo que reduce su eliminación y produce toxicidad. Además, hay muy pocos informes disponibles sobre el metabolismo y la excreción de puntos cuánticos, lo que hace que su utilización sea más difícil clínicamente [43].

Estructuras de nanocapas (Nanoshells).

Las nano capas son las nuevas formas modificadas de terapia dirigida, que tienen un núcleo de sílice y una capa exterior metálica [56]. Estas partículas de núcleo de diferentes materiales, finamente revestidas, han ganado una atención considerable en la actualidad. Las propiedades de las nanocapas se pueden alterar simplemente ajustando la proporción de núcleo a capa. Con el reciente avance en nuevas técnicas, ahora es posible sintetizar estas nanoestructuras en la forma, tamaño y morfología deseados. Las nanocapas se sintetizan para crear estructuras novedosas con diferentes morfologías, ya que no es posible sintetizar todos los materiales en las morfologías deseadas. Para obtener la morfología deseable, las

partículas del núcleo de diferentes morfologías, como varillas, alambres, tubos, anillos, cubos, etc., pueden revestirse con una capa delgada en estructuras núcleo-capas. Estas carcacas son económicas ya que los materiales preciosos se pueden depositar en núcleos económicos. Por lo tanto, mientras se sintetizan nanocapas, se requiere material costoso en una cantidad menor de lo habitual. La focalización de nanocapas se puede lograr mediante el uso de métodos inmunológicos. Las nanocapas ocupan una variedad de aplicaciones en diversas áreas, tales como proporcionar estabilidad química a coloides, mejorar las propiedades de luminiscencia, diseñar estructuras de bandas, biosensores, administración de fármacos, etc. La síntesis de nanocapas puede ser útil para la creación [43].

Aplicaciones de estructuras de nanocapas (Nanoshells).

- Terapia contra el cáncer: Como consecuencia de que las nanocapas están sintonizadas para absorber los rayos infrarrojos, cuando se exponen desde una fuente externa al cuerpo y se calientan, se causan la destrucción del tejido en tratamiento. Esto se ha estudiado tanto en experimentos in vitro como in vivo en varias líneas celulares [56].
- Para fines de diagnóstico: son útiles para fines de diagnóstico en inmunoensayos de sangre por ejemplo, en el acoplamiento de nanocapas de oro a anticuerpos para detectar inmunoglobulinas en plasma y sangre [43].
- Entrega de fármaco mediante hidrogel: las nanocapas se pueden incrustar fácilmente en el polímero de hidrogel que contiene el fármaco. Este tipo de sistema de administración puede usarse para dirigirse a células tumorales. El mecanismo de acción se basa en dirigir el gel al tejido tumoral mediante métodos inmunológicos y exponerlo a un rayo láser infrarrojo para calentar el polímero, lo que facilita la liberación del fármaco en el sitio deseado [43].
- Micro metástasis y diabetes: las partículas de nanocapas, se estudian actualmente para la micro metástasis de tumores y también para el tratamiento de la diabetes [57].

Nano burbujas (Nanobubbles).

Las nano burbujas (NBs) son estructuras similares a burbujas a nanoescala que se generan en la interfaz de superficies hidrófobas en líquidos. Estas nano burbujas permanecen estables a temperatura ambiente y cuando se calientan a una temperatura fisiológica dentro del cuerpo se fusionan para formar microburbujas. El mecanismo de formación de NBs se basa en la nucleación de gas en la superficie hidrófoba a partir de una solución sobresaturada, lo que lleva a atrapar los gases atmosféricos. Sin embargo, la formación de NBs está termodinámicamente prohibida, pero la vida útil de los NBs ha llegado al orden de horas. Hay cuatro tipos de nano burbujas: nano burbujas a granel, interfaciales, plasmónicas y oscilantes. Los fármacos terapéuticos contra el cáncer se pueden incorporar en estas estructuras a modo de burbujas a nanoescala. Las nano burbujas exhiben potencialmente ventajas al dirigirse al tejido tumoral y administrar el fármaco de forma selectiva bajo la influencia de la exposición al ultrasonido. Esto puede mejorar

la captación intracelular del fármaco por las células tumorales. Además, estas nano burbujas se pueden visualizar fácilmente en tumores mediante varios métodos de ultrasonido [43].

Las aplicaciones de las nano burbujas son:

- Administración de fármacos: los NBs pueden utilizarse potencialmente en la administración de fármacos como la doxorrubicina in vitro e in vivo. Estos NBs llegan al tumor y se acumulan, seguido de la formación de microburbujas mediante la fusión de nano burbujas. La interrupción de las microburbujas ocurre cuando el sitio se enfoca con ultrasonido enfocado de alta intensidad, lo que finalmente provoca la liberación del fármaco. Esto puede resultar en la acumulación de niveles más altos de fármaco en las células diana y una toxicidad reducida y una eficacia aumentada. Este método necesita una mayor exploración por su utilidad en el tratamiento de diversas neoplasias malignas.
- Terapia génica: las nano burbujas y microburbujas liposomales también se están estudiando como vectores no virales eficaces para la terapia génica. Las nano burbujas combinadas con la exposición al ultrasonido han demostrado una mejor transferencia de genes en estudios in vitro e in vivo [58] [59].
- Trombólisis: También se están investigando nano burbujas para eliminar el coágulo en el sistema vascular en combinación con ultrasonido. Este proceso se llama sonotrombólisis. Este método no es invasivo y causa menos daño al endotelio [60].

Toxicidad

Los NBs no son tan tóxicos ya que la interrupción de las microburbujas ocurre solo en el sitio objetivo cuando está expuesto a ondas ultrasónicas. Por lo tanto, el fármaco se libera en un sitio en particular [43].

Conjugado de fármaco polímero.

Estructura formada por la conjugación de fármacos de bajo peso molecular con un polímero. Esta interacción / conjugación provoca un cambio drástico en la disposición farmacocinética del fármaco en todo el cuerpo y a nivel celular. Están diseñados para aumentar el peso molecular general, lo que facilita su retención en las células cancerosas a través de un mayor efecto de permeación y retención mediante un enfoque de administración pasiva.

Nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas basadas en polímeros naturales suelen ser biocompatibles y no tóxicas, aunque a menudo sufren problemas de estabilidad cuando se administran

a través de las diversas membranas biológicas. Tal suministro expuso nanopartículas contra varios pH. Esta variación en el pH y algunos otros problemas limitan su uso en algún momento.

Las nanopartículas poliméricas consisten en un polímero biodegradable que es biocompatible y no tóxico. Se requiere una característica como la biocompatibilidad para una posible aplicación en la ingeniería de tejidos, la administración de fármacos y genes y las nuevas estrategias de vacunación. Investigaciones recientes exploran algunas modificaciones avanzadas de polímeros naturales que consisten en poliésteres sintéticos como poli (D, L-lactida) o poli (cianoacrilato) y polímeros relacionados como poli (lactida-co-glicólido) PLA o poli (ácido láctido). Entre los polímeros naturales, el polímero más utilizado hoy en día es el quitosano.

Las nanopartículas a base de polímeros naturales ofrecen una mejora significativa sobre los métodos tradicionales orales e intravenosos del sistema de administración de fármacos en términos de eficiencia y eficacia. Los diversos polímeros naturales como albúmina y alginato se utilizan para preparar las nanopartículas.

Sin embargo, tienen algunas desventajas inherentes, como una mala reproducibilidad de un lote a otro, propensos a la degradación y a la antigenicidad potencial.

Existen muchas ventajas de utilizar nanopartículas poliméricas en la administración de fármacos:

- Biocompatible y biodegradable.
- Aumentar la estabilidad de cualquier agente farmacéutico volátil.
- Menos tóxico
- Se fabrican fácilmente y de forma económica en grandes cantidades mediante varios métodos.
- Tienen especificación de ingeniería, lo que les permite ofrecer una mayor concentración de agente farmacéutico a una ubicación deseada.
- Baja o nula toxicidad.

Las nanopartículas poliméricas proporcionan una alternativa a los nanosistemas antes mencionados debido a algunas propiedades inherentes como biocompatibilidad, no inmunogenicidad, no toxicidad y biodegradabilidad.

Estos son portadores coloidales, de 10 nm –1µm de tamaño, que consisten en polímeros sintéticos o naturales. Las nanopartículas poliméricas son una amplia clase compuesta por sistemas vesiculares (nanocápsulas) y sistemas de matriz (nanoesferas).

Las nanocápsulas son sistemas en los que el fármaco está confinado a una cavidad rodeada por una membrana polimérica única, mientras que las nanoesferas son sistemas en los que el fármaco se dispersa por toda la matriz polimérica. Las nanopartículas poliméricas se consideran un sistema de matriz en el que la matriz se dispersa uniformemente. Cabe mencionar, que además de estos sistemas vesiculares esféricos también se conocen nanocápsulas, donde una membrana polimérica rodea al fármaco en un núcleo de matriz. El fármaco candidato se

disuelve, atrapa, une o encapsula a lo largo o dentro de la capa / matriz polimérica. La elección del polímero y la capacidad de modificar la liberación del fármaco a partir de nanopartículas poliméricas las han convertido en candidatos ideales para la terapia del cáncer, la administración de vacunas, anticonceptivos y la administración de antibióticos dirigidos. Además, las nanopartículas poliméricas se pueden incorporar fácilmente en otras actividades relacionadas con la administración de fármacos, como la ingeniería de tejidos, y en la administración de fármacos para especies distintas de los humanos. Dependiendo del método de preparación, se puede controlar la característica de liberación del fármaco incorporado. Los sistemas de nanopartículas poliméricas son módulos atractivos para la entrega intracelular y en sitios específicos [43].

Micelas y vesículas poliméricas.

Los anfífilos son compuestos que contienen residuos con diferentes solubilidades. Los anfífilos forman agregados en un disolvente selectivo a concentraciones superiores a un cierto nivel (es decir, concentración micelar crítica). Estos agregados se denominan micelas. Los anfífilos forman micelas con varios tipos de formas, incluida la esfera, el cilindro y el disco, según la estructura química y las condiciones ambientales Figura 14. Cuando una micela en forma de disco crece mostrando curvatura y se convierte en una esfera que posee el disolvente en su interior, este agregado se denomina vesícula. Las membranas celulares son un ejemplo típico de vesículas [61].

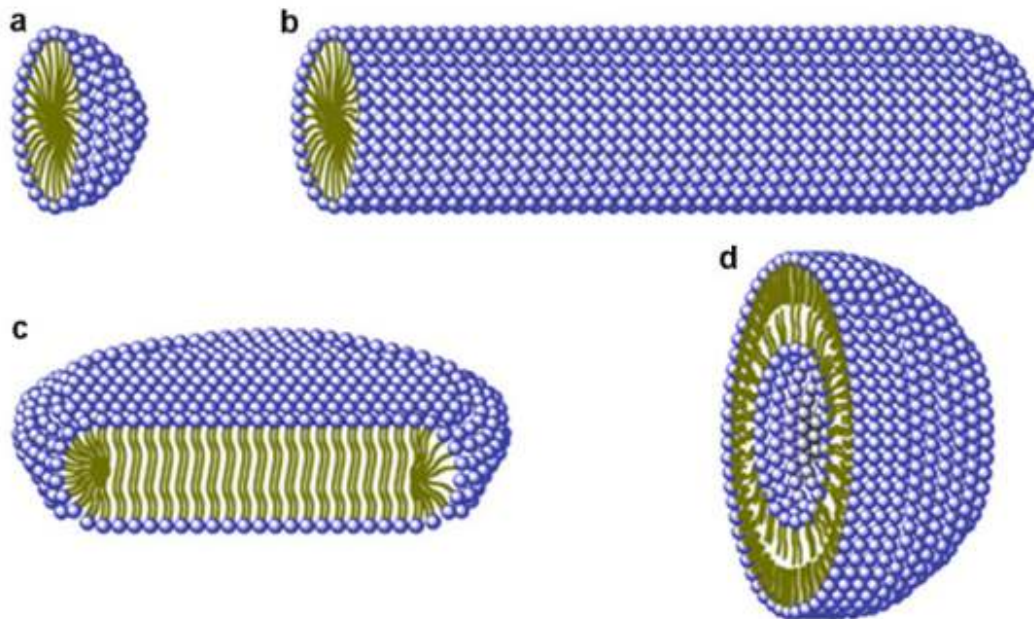


Figura 14. Ilustraciones conceptuales de micela esférica (a), micela cilíndrica (b), micela de disco (c) y vesícula (d) [61].

Las micelas y vesículas han sido de importancia tanto desde el punto de vista científico como aplicativo, no solo porque los materiales biológicos, por ejemplo, proteínas y membranas celulares, son ejemplos típicos de micelas y vesículas, sino también porque las micelas y vesículas se han utilizado ampliamente en la industria como solubilizantes, emulsionantes, dispersantes y tensioactivos. Esta entrada describe brevemente las micelas y vesículas formadas a partir de anfífilos y polímeros anfífilos de bajo peso molecular, centrándose en sistemas acuosos. Las micelas poliméricas contienen copolímeros de bloque anfífilos que se ensamblan para formar estructuras nanoscópicas supramoleculares de núcleo y capa denominadas "micelas poliméricas". Estas micelas se forman en solución como agregados en los que las moléculas componentes están generalmente dispuestas en una estructura esférica con núcleos hidrófobos protegidos del agua por un manto de grupos hidrófilos, véase Figura 15. Hay varios ejemplos de moléculas componentes como anfífilas tipo A-B o copolímeros de bloques de tipo A-B-A, donde A y B son componentes hidrófobos e hidrófilos, respectivamente. Estas micelas poliméricas suelen ser <100 nm y se utilizan para la administración sistémica de fármacos insolubles en agua. Su superficie hidrófila de estos sistemas dinámicos protege su captación inespecífica por el sistema reticuloendotelial. La micela polimérica tiene la ventaja de atrapar fármacos o agentes de contraste físicamente dentro de los núcleos hidrófobos o puede unirse covalentemente a las moléculas componentes de la micela. Además, han demostrado ser un excelente sistema de administración de fármacos novedosos debido a su alta estabilidad en condiciones fisiológicas, carga alta y versátil capacidad, alta acumulación de fármaco en el sitio diana, posibilidad de funcionalización del grupo terminal para la conjugación de ligandos diana y velocidad de disolución más lenta [43].

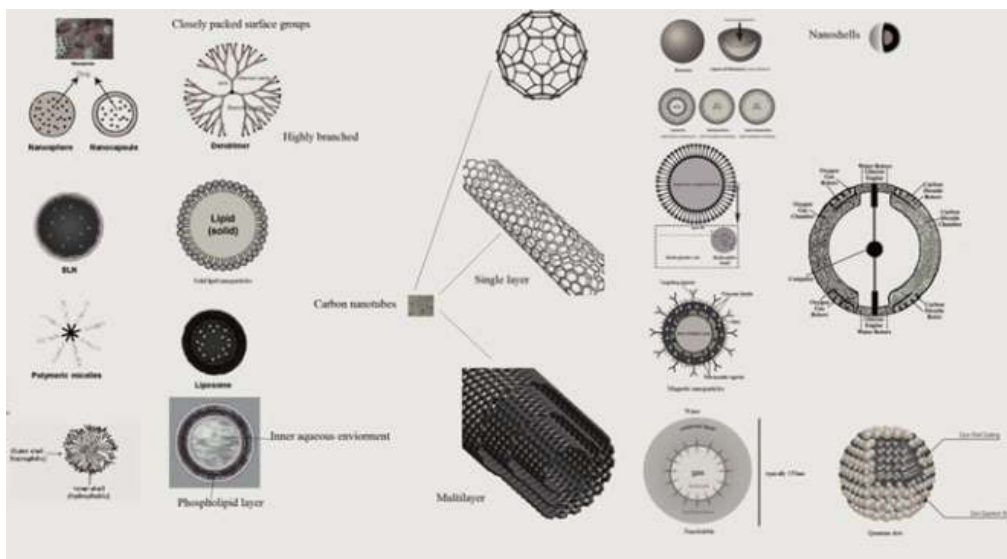


Figura 15. Varias nano formas y sus características morfológicas [43].

La producción de micelas con fines de encapsulado y liberación de fármacos es un área de investigación en constante crecimiento y desarrollo. Por un lado, el interés por mejorar los sistemas de entrega de fármacos en células diana y por otra parte el hacer más asequible el costo de los tratamientos médicos, impulsan el trabajo de investigación en este campo.

El uso de materiales biodegradables, biocompatibles y de baja o nula toxicidad, fue una de las razones por las cuales se inició este trabajo, el método elegido para la síntesis de nuestro material, el cual es capaz de ensamblarse en estructuras de forma micelar es el denominado bioconjugación.

La bioconjugación se basa en la modificación y conjugación de moléculas, estas técnicas dependen de dos químicas interrelacionadas: las funcionalidades reactivas presentes en los diversos reactivos de reticulación (Crosslinking) y los grupos funcionales presentes en las macromoléculas diana a modificar. Sin los dos tipos de grupos funcionales disponibles y químicamente compatibles, el proceso de reticulación sería imposible. Las funcionalidades reactivas en reactivos de reticulación, etiquetas y sondas proporcionan los medios para marcar específicamente ciertos grupos diana en ligandos, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, polímeros sintéticos, ácidos nucleicos y oligonucleótidos. El conocimiento de los mecanismos básicos por los cuales los grupos reactivos se acoplan a las funcionalidades objetivo proporciona los medios para diseñar inteligentemente una estrategia de modificación o conjugación. La elección de los sistemas de reactivos correctos que puedan reaccionar con los grupos químicos disponibles en las moléculas diana constituye la base para una modificación química exitosa.

Modificación de aminoácidos, péptidos y proteínas.

Las proteínas son quizás los objetivos más comunes para las técnicas de modificación o conjugación. Como mediadores de actividades y funciones específicas dentro de los organismos vivos, las proteínas pueden usarse in vitro e in vivo para realizar ciertas tareas. Las moléculas de proteína son quizás los objetivos más comunes para las técnicas de modificación o conjugación. Como mediadores de actividades y funciones específicas dentro de los organismos vivos, las proteínas pueden usarse in vitro e in vivo para realizar ciertas tareas. Tener suficiente proteína que pueda unirse a una molécula diana particular puede resultar en una forma de detectar o ensayar la diana siempre que la proteína se pueda seguir o medir [62].

Si dicha proteína no posee un componente fácilmente detectable, a menudo se puede modificar para que contenga un trazador químico o biológico que permita la detectabilidad. Este tipo del complejo proteico puede diseñarse para retener su capacidad de unirse a su objetivo natural, mientras que el trazador aparte puede proporcionar los medios para encontrar y medir la ubicación y la cantidad de moléculas diana.

Aminoácidos

Los péptidos y las proteínas se componen de aminoácidos polimerizados unidos mediante la formación de enlaces peptídicos (amida). El polímero unido a péptidos que forma la columna vertebral de la estructura polipeptídica se denomina cadena- α . Los enlaces peptídicos de la cadena- α son unidades planas rígidas formadas por la reacción del grupo amino de un aminoácido con el grupo carboxilo- α de otro véase Figura 16. El enlace peptídico no posee libertad de rotación debido al carácter de doble enlace parcial del enlace carbonilaminoamida. Sin embargo, los enlaces alrededor del átomo de carbono- α son verdaderos enlaces sencillos con una considerable libertad de movimiento [62].

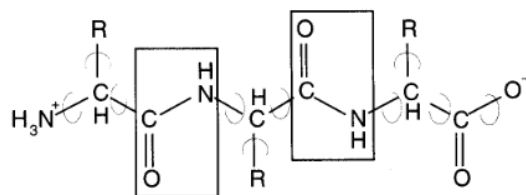


Figura 16. Ejemplo de un enlace peptídico entre aminoácidos [63].

La secuencia y las propiedades de los componentes de los aminoácidos determinan la estructura, reactividad y función de las proteínas. Cada aminoácido está compuesto por un grupo amino y un grupo carboxilo unido a un carbono central denominado carbono alfa. También unidos al carbono alfa hay un átomo de hidrógeno y una cadena lateral única para cada aminoácido. Hay 20 aminoácidos comunes que se encuentran en toda la naturaleza, cada uno de los cuales contiene una cadena lateral de identificación de una estructura química particular, carga, capacidad de enlace de hidrógeno, hidrofiliidad (o hidrofobicidad) y reactividad.

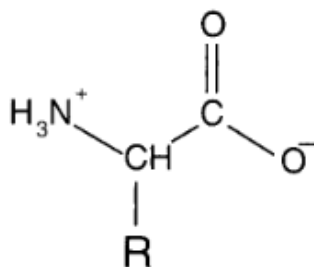


Figura 17. Los aminoácidos individuales consisten en una amina primaria (α), un grupo de ácido carboxílico y una estructura de cadena lateral única (R). A pH fisiológico, la amina está protonada y tiene carga positiva, mientras que el carboxilato está ionizado y posee carga negativa [63].

3. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN.

3.1. Hipótesis.

Es posible sintetizar materiales a partir de aminoácidos, sustancias con comportamiento hidrofílico, hidrofóbico y/o zwitteriónico, que a su vez lleven a la formación nanoestructuras que pueda autoensamblarse en micelas o vesículas, en condiciones acuosas dependiendo del pH y factor de empaquetamiento para su posible aplicación como encapsulante.

3.2. Objetivo general.

Sintetizar materiales a partir de aminoácidos, sustancias con comportamiento hidrofílico, hidrofóbico y/o zwitteriónico, que a su vez lleven a la formación nanoestructuras que pueda auto ensamblarse en micelas o vesículas, en condiciones acuosas dependiendo del pH y factor de empaquetamiento para su posible aplicación como encapsulante.

3.3 Objetivos particulares.

- Sintetizar materiales a partir de aminoácidos, sustancias con comportamiento hidrofílico, hidrofóbico y/o zwitteriónico.
- Caracterizar por espectroscopia de infrarrojo (FTIR) el material sintetizado.
- Caracterizar por espectroscopia Raman, el material sintetizado.
- Caracterizar por DLS (Dispersion Light Scattering)
- Obtener CMC, por medio de UV-Vis.
- Caracterizar por microscopia electrónica de transmisión (TEM)

3.4. Materiales y métodos.

Materiales.

El ácido oleico (natural, FCC), N-hidroxisuccinimida (98%) hidróxido de sodio (ACS), dimetilsulfóxido (ACS) y ácido clorhídrico (36.5-38%) se obtuvo de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri. Se obtuvo L-cisteína (grado de alta pureza) de Amresco, Pennsylvania, N, N'-díciclohexilcarbodiimida de Alfa Aesar, Tewksbury, Massachusetts,). Todos los materiales se utilizaron sin más modificaciones.

Métodos.

Como punto de partida iniciamos preparando diferentes soluciones a distintas relaciones molares de los diferentes materiales y solventes, hasta que encontramos una con la cual se obtenían soluciones en el mismo solvente y además eran viables para la síntesis. donde todas las disoluciones eran la cantidad necesaria para una

buena síntesis. Las cantidades molares preparadas en las soluciones fueron las siguientes; 0.002 M de ácido oleico, 0.002 M de dicitclohexilcarbodiimida, 0.004 M de N-hidroxisuccinimida y 0.0006 M de L-cisteína.

Preparación de moléculas anfifílicas: Para la formación del bioconjugado final, se llevó a cabo un sistema de síntesis de dos etapas mediado por N, N'-dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Este paso corresponde a la formación de un éster estable a partir del ácido oleico mediante el acoplamiento de carbodiimida con el grupo carboxilo del ácido, seguido de su sustitución por NHS. El siguiente paso corresponde al ataque nucleofílico de la amina primaria de L-cisteína. Los ésteres de N-hidroxisuccinimida formados durante la primera etapa tienen la estabilidad suficiente para permitir una reacción de dos pasos en la que las condiciones de la solución se pueden ajustar primero para favorecer la formación de ésteres y posteriormente ajustarse para favorecer la reacción de amidación [64]. El disolvente utilizado para la síntesis fue DMSO.

Esterificación del ácido oleico: Se prepararon 5 mL de una solución 0.002 M de ácido oleico, 5 mL de una solución 0.002 M de dicitclohexilcarbodiimida y 5 mL de una solución 0.004 M de N-hidroxisuccinimida usando un disolvente aprótico polar tal como dimetilsulfóxido como medio de reacción. Para el primer paso de la síntesis de lipoaminoácidos, las soluciones de N-hidroxisuccinimida y dicitclohexilcarbodiimida recién preparadas se mezclaron en 5 mL de disolvente. Debido a la inestabilidad de la O-acilisourea, se sugiere la disminución de la temperatura para aumentar la vida media de dicha molécula en solución [64]. Por esta razón, la solución se sometió a agitación magnética en un baño frío a 10 ° C para evitar la formación de N-oleilurea una vez agregado el ácido oleico. Durante este paso, la protonación del nitrógeno carbodiimida facilita la formación de la O-acilisourea debido a que dicha protonación reduce la densidad electrónica en el carbono central de la carbodiimida, favoreciendo el ataque nucleofílico del grupo carbonilo como se muestra en la literatura [65]. Teniendo en cuenta lo anterior y considerando que el ácido oleico tiene un pKa de 5.02, se añadió la solución de ácido oleico y se bajó el pH a 4 utilizando una solución de ácido clorhídrico 0.1M para promover la protonación necesaria para la formación del Éster NHS. En este paso, la precipitación de dicitclohexilurea ocurre cuando N-hidroxisuccinimida reemplaza el acoplamiento de carbodiimida, como se informa en la literatura. Amidación con L-cisteína. La reacción del éster de N-hidroxisuccinimida con una amina es un ejemplo de ataque nucleofílico, para el cual la amina debe permanecer desprotonada. Después de 15 minutos de agitación, la solución se ajustó a pH 9 usando una solución de hidróxido de sodio 1 M y se añadieron directamente 0.0006 moles de L-cisteína. La reacción se dejó en agitación durante 3 horas y posteriormente se almacenó en un tubo cónico para precipitar completamente el subproducto correspondiente a dicitclohexilurea y N-hidroxisuccinimida [66]

Figura 18.

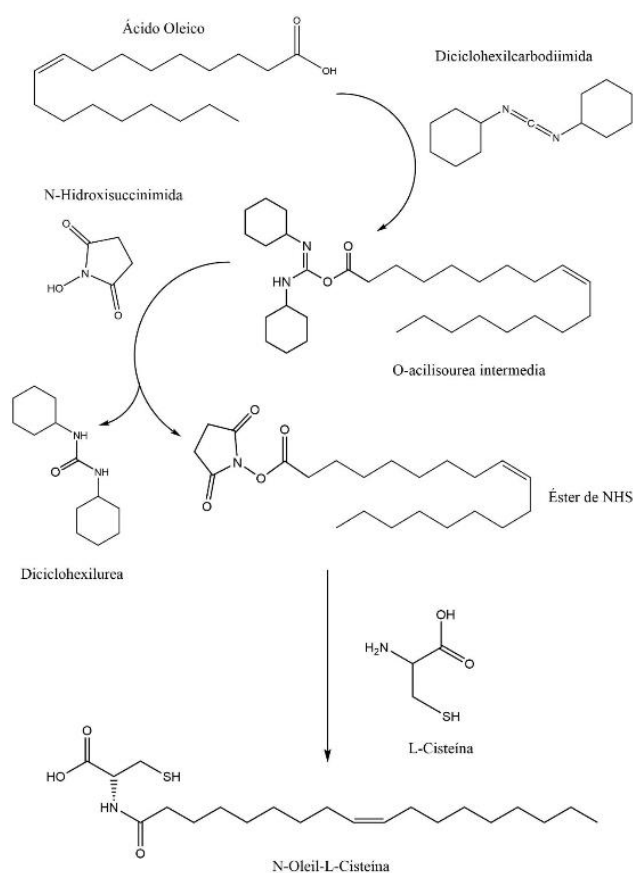


Figura 18. Esquema general de la reacción de conjugación [67].

Separación de productos de reacción: La mezcla se dejó reposar durante 24 horas, con el fin de inducir la separación de los residuos no deseados no solubles (en su mayoría subproductos de urea) por gravedad.

El sobrenadante se extrajo usando una micropipeta y se almacenó para su purificación adicional. Se tomó una muestra de 4 mL de la solución homogénea a la que se añadió 1 mL de una solución de hidróxido de sodio 0.3 M hasta alcanzar un pH de 10, para inducir la formación de un gel; característica de los tensioactivos a base de aminoácidos [21].

La muestra se dejó reposar durante 24 horas hasta su completa gelificación, luego se procedió a su separación del resto del reactivo y los residuos se dejaron en forma líquida. La ruta consistió en la extracción directa del gel mediante pinzas, seguida de dos lavados con agua desionizada, su liofilización y trituración del producto con mortero de ágata [66] Figura 19. La síntesis se realizó 5 veces en total.

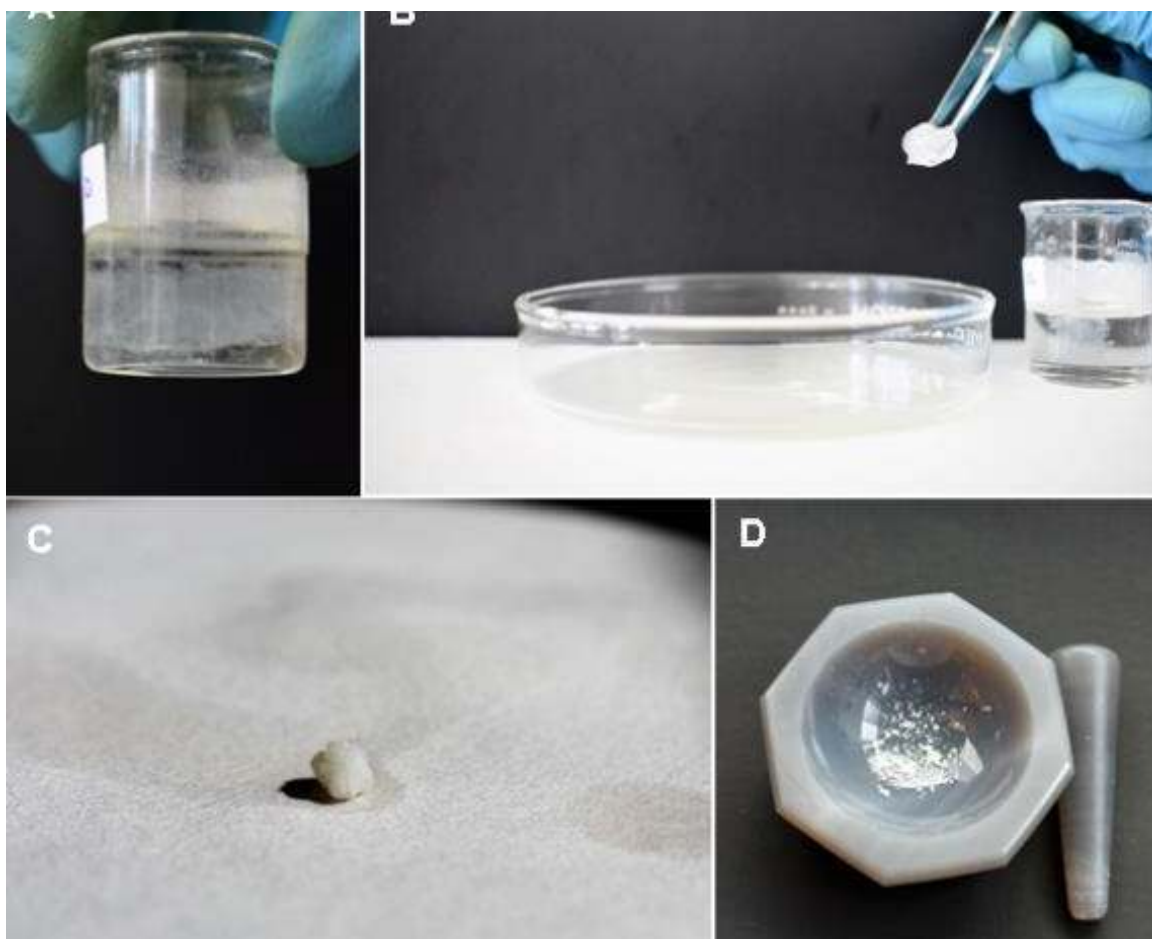


Figura 19. Proceso I de separación del bioconjugado de Ácido Oleico y L-Cisteína: (A) Formación de gel a pH 12, (B) extracción física del gel, (C) secado y (D) trituración de la muestra.

4. TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN.

4.1. Tratamiento de la muestra.

La forma seca obtenida por gelificación se utilizó para las técnicas de caracterización aquí descritas. La espectroscopia de $^1\text{H-NMR}$ de alta resolución se registró en un espectrómetro Bruker Avance 400 que funcionaba a 400 MHz. La muestra se solubilizó en DMSO- d_6 (99,9% en átomos de D) usando TMS como referencia interna, las muestras se secaron y colocaron directamente en la ventana de diamante del modo ATR (reflectancia total atenuada) y el espectro se midió en un rango entre 4000 y 500 cm^{-1} (64 exploraciones por muestra). Para la espectroscopía Raman, los experimentos se realizaron a temperatura ambiente utilizando un láser de diodo de 473 nm (Excelsion One 473, Spectra-Physics) con una potencia incidente de aproximadamente 5,0 mW. La luz fue enfocada y recolectada con un objetivo de 100x. La luz emitida se detectó con un espectrómetro de 0.55 m (iHR550, Horiba) y un CCD enfriado (CCD-1024x256-BD-SYN, Horiba). El componente elástico de la luz recogida se eliminó mediante un filtro Notch. Los experimentos de DLS se realizaron utilizando un sistema de goniómetro de investigación Brookhaven BI-200SM con un láser He-Ne de 637 nm y una potencia de 15 mW. La función de correlación de intensidad se midió en un ángulo fijo de 90 grados. La espectrofotometría UV-visible se realizó con el espectrofotómetro de doble haz de la marca VWR; modelo UV-6300PC con escaneo UV-Visible. Esta técnica se utilizó para determinar aproximadamente el valor de concentración micelar crítica (CMC). Mientras que una solución micelar actúa como una suspensión coloidal, en relación con la longitud de onda de la luz [68]. Este método se basa en el cambio en el comportamiento de absorción después de la agregación [69]. Para microscopía electrónica de transmisión (TEM) se usó un aparato de emisión de campo JEOL JEM-2010F (Akishima-shi, Japón) que funcionaba a 200 keV en un carbón de malla 200 en una rejilla de cobre (Ted Pella) seguido de una caída de fosfotúngstico al 3% ácido como agente colorante. Se tomaron y analizaron micrografías utilizando el software Gatan (Gatan Inc, EE. UU.).

4.2. Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).

La espectroscopia infrarroja es sin duda una de las técnicas analíticas más importantes de que disponen los científicos de hoy. Una de las grandes ventajas de la espectroscopia infrarroja es que se puede estudiar prácticamente cualquier muestra en prácticamente cualquier estado. Los líquidos, soluciones, pastas, polvos, películas, fibras, gases y superficies pueden examinarse con una elección acertada de la técnica de muestreo. Como consecuencia de la instrumentación

mejorada, ahora se han desarrollado una variedad de nuevas técnicas sensibles para examinar muestras que antes eran intratables.

La espectroscopia infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro de infrarrojos se obtiene normalmente pasando radiación infrarroja a través de una muestra y determinando qué fracción de la radiación incidente se absorbe en una energía particular. La energía a la que aparece cualquier pico en un espectro de absorción corresponde a la frecuencia de vibración de una parte de una molécula de muestra [70]. Los equipos muestran los resultados de las vibraciones de las moléculas después de ser procesadas mediante la transformada de Fourier, de ahí que en la actualidad la técnica se especifica como FTIR, por sus siglas en inglés (Fourier transform infrared)

En este trabajo de investigación, para la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) los datos espectrales se obtuvieron utilizando un espectrómetro de la marca Thermo Scientific modelo Nicolet iS50. Figura 20.



Figura 20. Espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet iS50.

4.3. Espectroscopia Raman.

El efecto de dispersión Raman surge a partir de la interacción de la luz incidente con los electrones de una molécula iluminada. En la dispersión Raman la energía de la luz incidente no es suficiente para excitar la molécula a un nivel electrónico de mayor energía. Así el resultado de la dispersión raman es cambiar el estado vibracional de la molécula[71].

Diagrama de los procesos de dispersión de Rayleigh y Raman. El estado de vibración de energía más baja m se muestra en el pie con estados de energía creciente por encima de él. Tanto la energía baja (flechas hacia arriba) como la energía dispersa (flechas hacia abajo) tienen energías mucho más grandes que la energía de vibración. véase Figura 21.

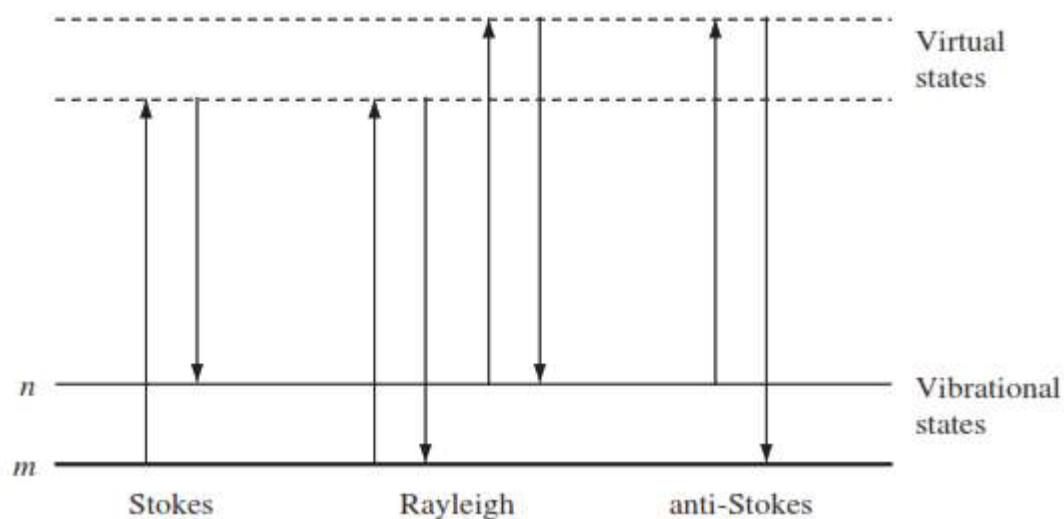


Figura 21. Diagrama de los procesos de dispersión de Rayleigh y Raman.

4.4. Resonancia magnética nuclear.

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las herramientas más poderosas que existen en la actualidad para dilucidar estructuras de moléculas, principalmente moléculas orgánicas. Para ello, y como su nombre lo indica, esta técnica se basa en una característica intrínseca de los núcleos: sus propiedades magnéticas[72].

Los núcleos de los átomos tienen carga eléctrica, pero a su vez se comportan como imanes, debido a que tienen momento magnético intrínseco, a este momento magnético se le conoce como spin nuclear.

EL significado de la palabra “spin” es girar y hace referencia a una propiedad macroscópica de las cargas eléctricas: cualquier cuerpo macroscópico cargado en

rotación genera un campo magnético perpendicular al plano de giro. Se les atribuyó inicialmente a los núcleos la propiedad de ser cargas que giran y, por eso, se le dio a su momento magnético el nombre de spin nuclear. Sin embargo, esta idea clásica aplicada a las partículas subatómicas (regidas por la mecánica cuántica) puede generar problemas conceptuales. De forma que en este contexto nos limitaremos a comentar que los núcleos están dotados de un momento magnético que apunta en alguna dirección, sin preocuparnos por las causas que lo generan [72].

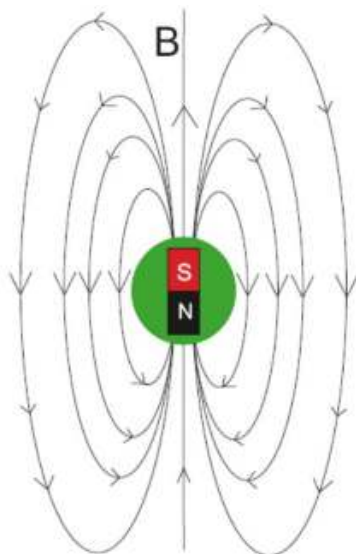


Figura 22. Representación del campo magnético generado por un núcleo atómico [72].

En presencia de un campo magnético, cada spin nuclear puede adoptar diferentes orientaciones. Cada orientación tiene asociada una componente J_z a lo largo del eje del campo aplicado. Dicha componente J_z estará dada por:

$$J_z = \frac{mh}{2\pi} = m\hbar$$

Donde:

Donde m es un número de la serie $l, l-1, \dots, -l+1, -l$. Dicho en otras palabras, todos los números entre $+l$ y $-l$ saltando de uno en uno.

- En el caso de los núcleos con spin $l=1/2$, m puede tomar los valores $-1/2$ y $+1/2$. Este es el caso de los protones (1H) y ^{13}C .
- Si, en cambio, el núcleo tiene spin $l=1$, m puede tomar valores $-1, 0$ o 1 . Este es el caso del deuterio (2H).

- Para núcleos con spin $l=3/2$, m puede tomar valores desde $-3/2$, $-1/2$, $+1/2$ ó $+3/2$.

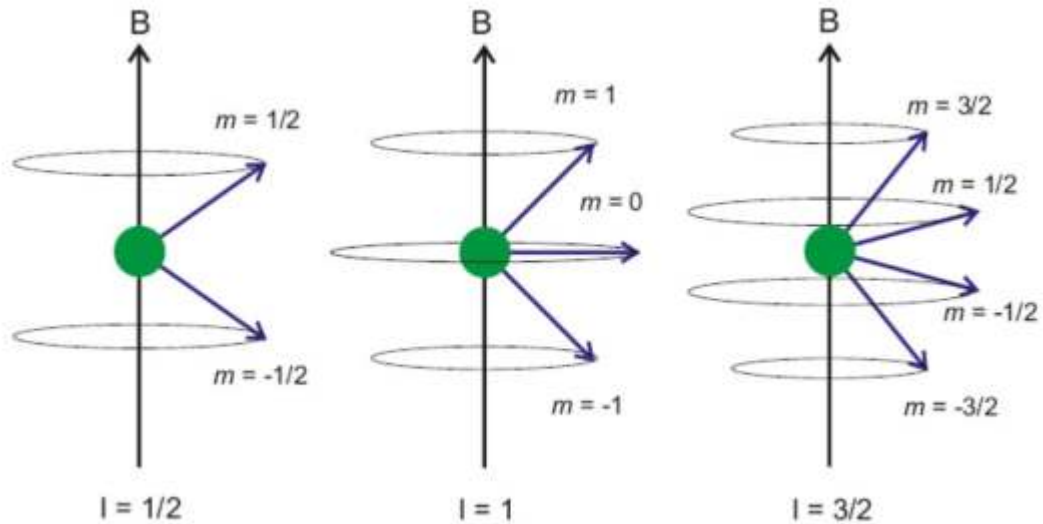


Figura 23. Posibles orientaciones del spin nuclear en presencia de campo magnético externo como función de "l" [72].

Debido a que el spin nuclear no se alinea paralelamente al campo externo aplicado, el mismo recibe un torque y comienza a efectuar un movimiento de precesión, del mismo modo lo hace un trompo.

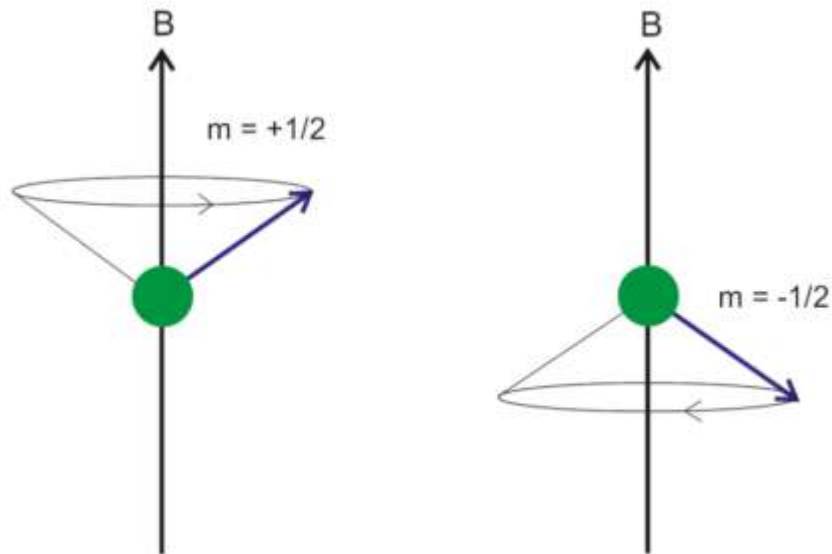


Figura 24. Precisión del spin nuclear en presencia de campo magnético externo para $l=1/2$ [72].

La frecuencia del giro depende del campo magnético aplicado (B_0) y del núcleo del cual se trate, la misma frecuencia viene expresada por la siguiente ecuación:

$$V_L = \left(\frac{\gamma}{2\pi}\right) \cdot B_0$$

A esta frecuencia se le conoce como de Larmor del núcleo. La magnitud se le conoce como constante giromagnética y es una constante para cada núcleo [72].

Si tenemos una muestra en ausencia de campo magnético, los spines de todos los núcleos se orientarán aleatoriamente. Pero ¿qué ocurre al aplicar un campo magnético externo? En ese momento, la población de núcleos se dividirá según cómo alineen sus spines respecto al campo magnético. Supongamos el ejemplo sencillo de núcleos con spin $l=1/2$ y que, por lo tanto, pueden adoptar sólo dos orientaciones posibles (correspondientes a $m +1/2$ y $m -1/2$): a favor del campo magnético externo o en contra de él. En este momento la situación cambió notablemente: aquellos núcleos que orienten su spin a favor del campo estarán en un nivel energético ligeramente inferior a aquellos que lo orienten en contra. Y la diferencia de energía entre ambos estados (ΔE) viene dada por la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \left(\frac{\gamma h}{2\pi}\right) \cdot B_0$$

Donde B_0 es el campo magnético aplicado, “ γ ” es la constante giromagnética del núcleo que estemos considerando y “ h ” es la constante de Planck.

Sin embargo, esta diferencia energética es muy pequeña: si suponemos que un equipo de RMN que aplique un campo magnético de 7,05T, para el caso de los núcleos de $[^1H]$ el valor de ΔE sería de aproximadamente 0,12 J/mol. Esta energía extremadamente baja corresponde al rango de las radiofrecuencias (ondas de radio) y es la que separa a las dos poblaciones de núcleos de $[^1H]$ en estas condiciones.

Si calculamos cuál es la frecuencia correspondiente a esta diferencia de energía, veremos que corresponde aproximadamente a 300MHz. Si se irradia con esa frecuencia, entonces spines de los núcleos comenzarán a interactuar con la radiofrecuencia (más precisamente, con su componente magnética) y la muestra absorberá radiación. Esta condición se llama condición de resonancia y se da cuando la frecuencia de la radiación emitida coincide con la frecuencia de Larmor de los núcleos. En estas condiciones, dicha absorción se mide de manera indirecta y el equipo la percibirá como una señal.

4.5. Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-vis).

La Espectroscopia de Ultravioleta-Visible es la más antigua de las técnicas espectroscópicas y en alguna ocasión fue ampliamente utilizada para la determinación de estructuras. Sin embargo, las nuevas técnicas instrumentales son más reveladoras de la estructura de un compuesto y más fáciles de interpretar. Aunque ya no es muy usada para el análisis estructural, si es muy utilizada en el análisis cuantitativo ya que detecta concentraciones extraordinariamente pequeñas de los compuestos que absorben energía ultravioleta y/o visible y, por lo tanto, es posible tener alta precisión y exactitud al medir concentraciones.

La Espectroscopia de Ultravioleta-Visible (UV-VIS) es un ejemplo de espectroscopia de absorción. Un espectro de absorción se obtiene colocando la sustancia entre el detector del espectrofotómetro y una fuente de energía que proporciona radiación electromagnética en el intervalo de frecuencia a estudiarse. El espectrofotómetro analiza, para una determinada frecuencia, la energía transmitida con referencia a la energía incidente.

Una molécula puede absorber un cuanto de radiación en varias de las regiones del espectro electromagnético. Sin embargo, el efecto que se produce con la radiación de las distintas regiones del espectro es diferente. Por ejemplo, la absorción de un cuanto de radiación de microondas (alrededor de una caloría/mol) provoca un cambio en la molécula de un estado rotacional a otro.

Cuando luz ultravioleta y/o visible es absorbida por una molécula produce cambios en los estados electrónicos, es decir, la absorción de energía luminosa por

compuestos orgánicos en la región UV-VIS implica la transferencia de los electrones desde el estado fundamental a estados de mayor energía.

Ahora bien, ¿cuáles son esos estados de energía? Tanto los estados fundamentales como los estados de mayor energía son descritos como orbitales moleculares. Estos son formados por la combinación lineal de dos orbitales atómicos y dicha combinación forma no uno, sino dos orbitales moleculares: uno enlazante, que es más estable que los orbitales atómicos que lo formaron, y uno anti enlazante, que es menos estable que los que lo originaron.

4.6. Dispersión dinámica de la luz (DLS).

Dispersión dinámica de la luz (DLS). Para determinar la relación hidrodinámica de la partícula, se realizaron experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS). Un experimento de dispersión de luz dinámica consiste en hacer que un rayo láser afecte una muestra y recoger la luz dispersa en ángulo θ con un fotomultiplicador. Las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersa permiten obtener la función de correlación normalizada.

$$g_2(\tau) - 1 = B|g_1(\tau)|^2$$

Siendo τ el tiempo característico del decaimiento de la correlación y B un parámetro que depende de la geometría experimental. En el caso de una solución mono-dispersa, la función de correlación de campo decae como $g_1(\tau) = \exp(-\Gamma t)$ con una decadencia dada por $\Gamma = Dq^2$ donde D es el coeficiente de difusión mutua y $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$ es la magnitud del vector de dispersión, n el índice de refracción, λ la longitud de onda y θ el ángulo de dispersión.

4.7. Microscopía electrónica de transmisión.

Cuando creamos materiales a nanoescala, vienen con límites dimensionales específicos en 1D, 2D o 3D y el Microscopio de transmisión electrónica (TEM) por sus siglas en inglés, está preparado para observarlos, precisamente debido a estos límites.

Los electrones son un tipo de radiación ionizante, que es el término general que se le da a la radiación que es capaz de eliminar los electrones estrechamente unidos de la capa interna del campo de atracción del núcleo mediante la transferencia de parte de su energía a los átomos individuales de la muestra. Una de las ventajas de usar radiación ionizante es que produce una amplia gama de señales secundarias de la muestra y algunas de ellas se resumen en la Figura 25.

Muchas de estas señales se utilizan en microscopía electrónica analítica (AEM), lo que nos brinda información química y muchos otros detalles sobre nuestras muestras. AEM utiliza espectrometría de dispersión de energía de rayos X (XEDS) y espectrometría de pérdida de energía de electrones (EELS).

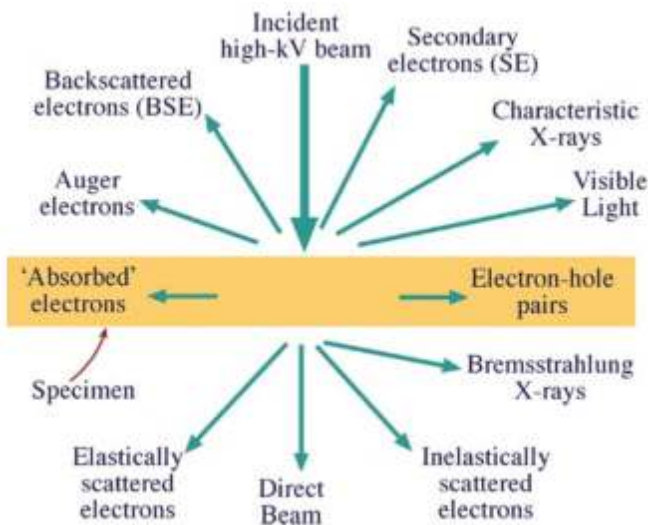


Figura 25. Señales que se generan cuando un haz de electrones de alta energía interactúa con una muestra delgada [73].

La mayoría de estas señales se pueden detectar en diferentes tipos de TEM. Las direcciones que se muestran para cada señal no siempre representan la dirección física de la señal, sino que indican, de manera relativa, dónde la señal es más fuerte o dónde se detecta [73].

4.8. Limitaciones de la microscopía electrónica de transmisión.

En primer lugar, el precio a pagar por cualquier técnica de imagen de alta resolución es que solo se observa una pequeña parte de la muestra en un momento dado.

Otro problema es que el TEM nos presenta imágenes 2D de especímenes 3D, vistos en transmisión. Nuestros ojos y nuestro cerebro entienden rutinariamente las imágenes de luz reflejada, pero están mal equipados para interpretar imágenes TEM, por lo que debemos ser cautelosos.

Un efecto perjudicial de la radiación ionizante es que puede dañar su espécimen, particularmente los polímeros (y la mayoría orgánicos) o ciertos minerales y cerámicas.

Preparación de especímenes Sus especímenes deben ser delgados si va a obtener información usando electrones transmitidos en el TEM. "Delgado" es un término relativo, pero en este contexto significa transparente a los electrones.

Es decir que los equipos de TEM comprenden una gama de diferentes instrumentos que hacen uso de las propiedades de los electrones, tanto como partículas como

ondas. El TEM genera una gran variedad de señales para que podamos obtener imágenes, y varios tipos diferentes de espectros de la misma región pequeña de la muestra [73].

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Interpretación y discusión de RMN.

Caracterización por resonancia magnética nuclear. El espectro de ^1H -RMN del bioconjugado de N-oleil-L-cisteína (MAT) se presenta en la figura 3. La señal correspondiente al terminal CH_3 del grupo metilo se encontró en $\delta\text{H} = 0.85$ (H-19), seguida de las señales correspondientes a los protones de alquilo CH_2 de la cadena de ácido oleico $\delta\text{H} = 1.29-1.20$ (H5-8, H13-18). Los protones del grupo metileno se encontraron en $\delta\text{H} = 5.32$ (H-2 y H-3), y los protones de carbono más inmediatos a esto se encontraron en $\delta\text{H} = 1.97$ (H-1 y H-4). Debido a que se usó DMSO deuterado como disolvente para este experimento, no se observó una sustitución representativa de los protones del grupo hidroxilo y del grupo amida. Por tanto, la señal del protón del grupo hidroxilo se encontró en $\delta\text{H} = 11.95$ (H-37) y $\delta\text{H} = 6.96-7.22$ (H-24, H-30, H-36) las señales de los protones correspondientes a los tres grupos amida encontrados en la molécula sintetizada. Las señales e integrales características de los protones sugerían la formación de bioconjugados, y la estructura propuesta se muestra en el interior, Figura 26.

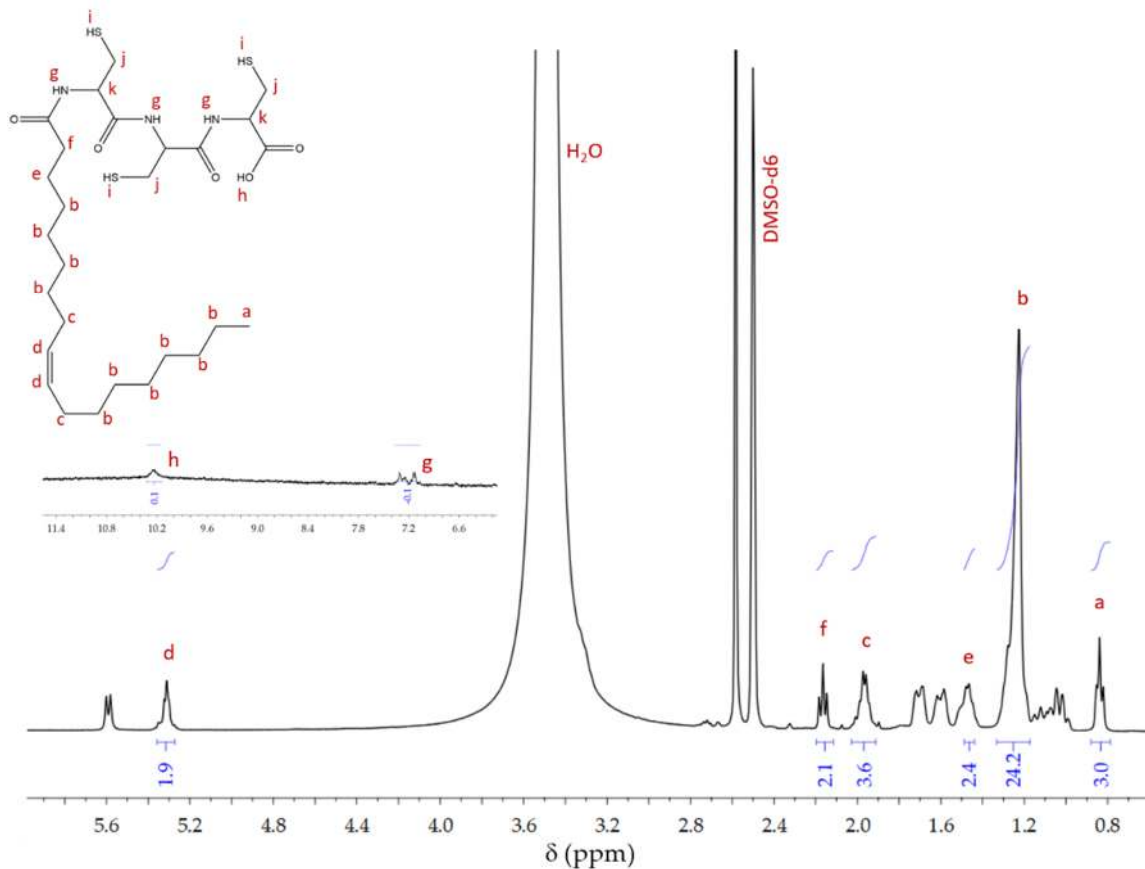


Figura 26. Espectro de resonancia magnética nuclear de bioconjugado. Disuelto en DMSO deuterado [67].

El espectro presentado en la Figura 26, corresponde al bioconjugado purificado, pero se observaron las señales de algunas impurezas de reacción. En este sentido, las señales en $\delta H = 1,58-1,73$ están asociadas con los protones de alquilo de los anillos ciclohexilo de la N-acil urea, que es un producto de reacción secundario. De manera similar, se identifica en $\delta H = 5.59$, el protón de nitrógeno en el grupo urea [74].

5.2. Interpretación y discusión de espectroscopia infrarroja.

Espectroscopia infrarroja. En el espectro correspondiente al ácido oleico (OA). Podemos observar en 3005 cm^{-1} la señal correspondiente al estiramiento del enlace C-H adyacente a su insaturación. También encontramos dos bandas muy marcadas en 2921 y 2852 cm^{-1} , correspondientes a los tramos asimétricos y simétricos respectivamente de C-H de la cadena de alquilo. En 1707 cm^{-1} , se encontró la banda característica del grupo carbonilo presente en dicho ácido graso correspondiente al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del carbonilo, Figura 27.

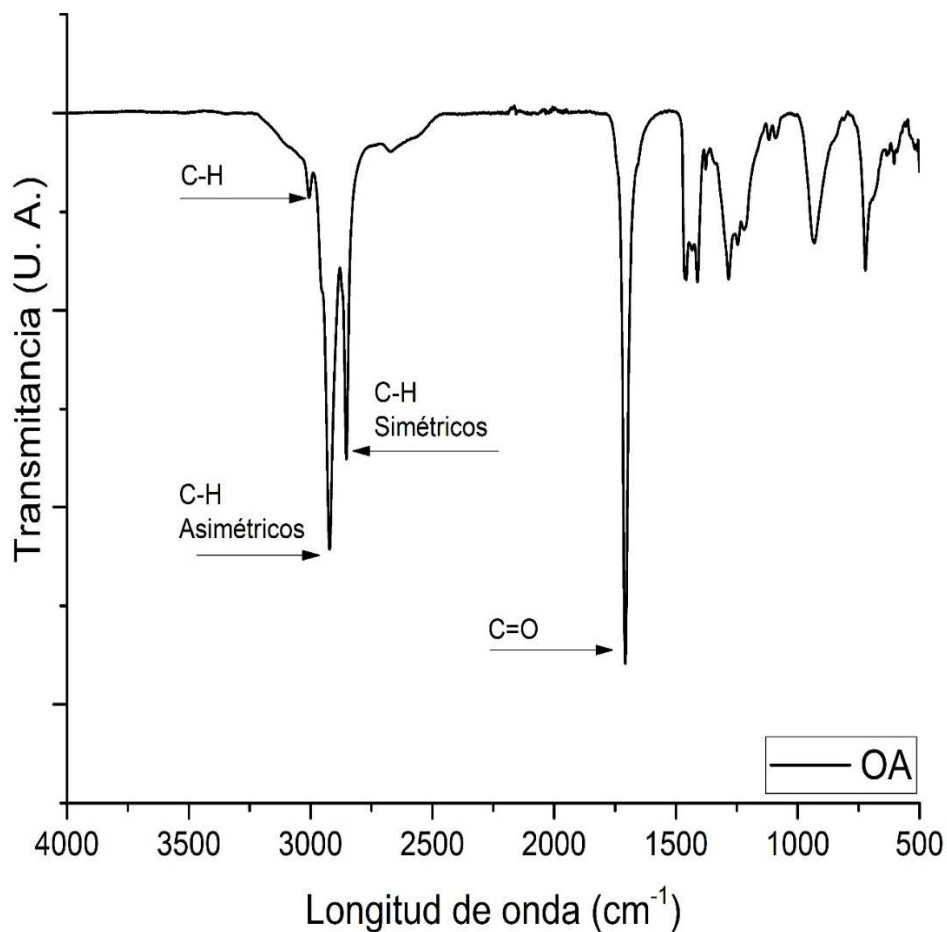


Figura 27. Espectro de FTIR de ácido oleico. Técnica ATR.

Asimismo, en el espectro para L-cisteína (CYS), observamos en 3163 cm⁻¹ la banda representativa del tramo NH del grupo amino, las vibraciones características del grupo tiol SH se pueden observar en 2550 cm⁻¹, y por último tenemos el enlace CS que se observa en 635 cm⁻¹[29] [75] [70] Figura 28.

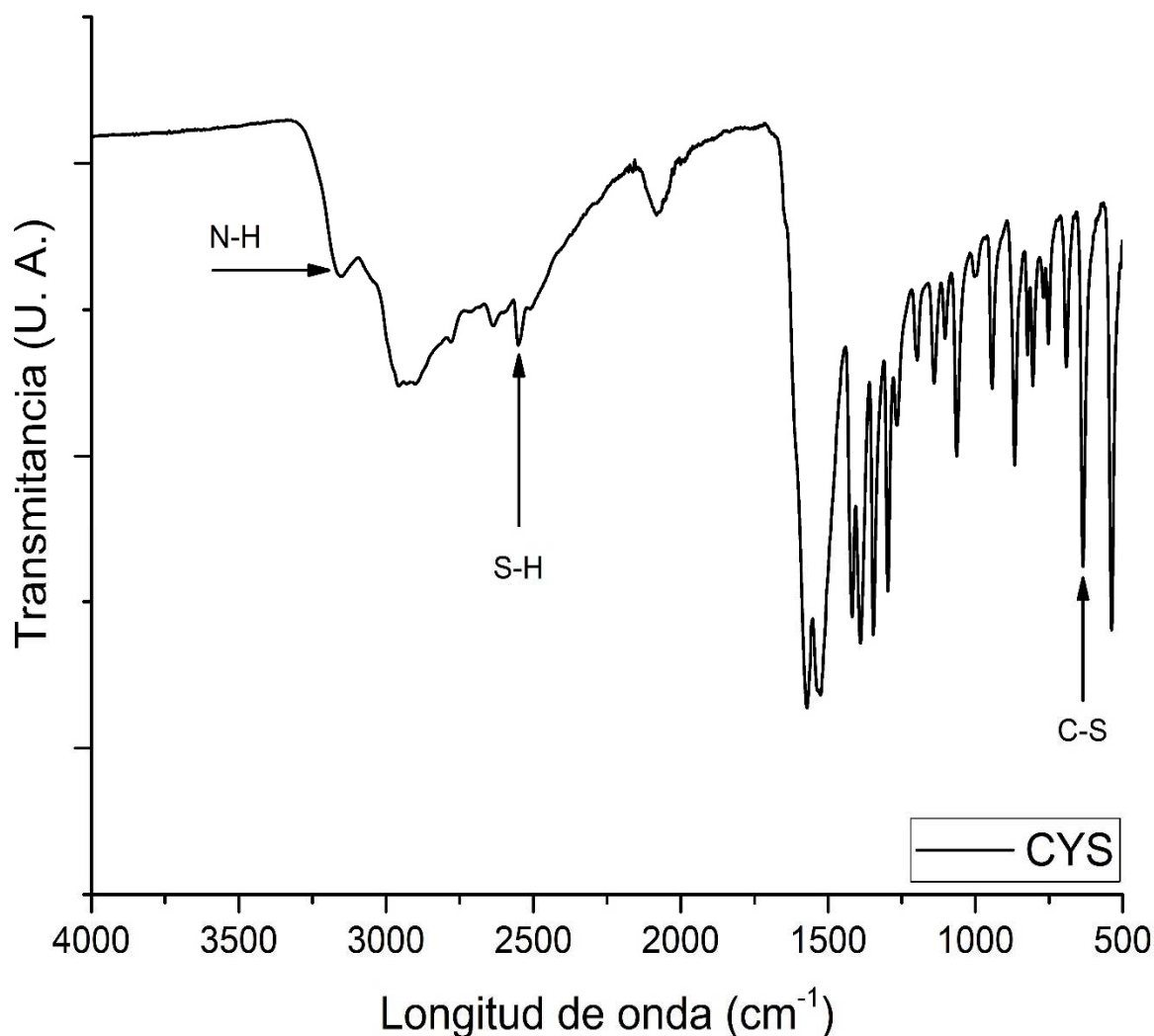


Figura 28. Espectro de FTIR de L-cisteína. Técnica ATR.

Finalmente, se obtuvo el espectro para el bioconjugado de ácido oleico y de L-cisteína (MAT) a partir de una muestra en estado sólido. Comparando el espectro del bioconjugado con los materiales precursores, se encontraron las siguientes bandas. Primero a 3320 cm⁻¹ la primera diferencia para el espectro en comparación con el espectro de L-cisteína, que corresponde a la vibración de estiramiento N-H del grupo amida. A 2580 cm⁻¹, la banda asociada del S-H del grupo tiol se encontró desplazada de la banda anterior a 2543 cm⁻¹ presente en la molécula.

Se observa en 1705 cm⁻¹ el grupo carbonilo C = O. En 1624 cm⁻¹ aparece una nueva banda correspondiente a la vibración del conjunto de grupos carbonilo denominada amida, seguida de los tramos asimétricos y simétricos del COO-carboxilato en 1562 cm⁻¹, 1425 cm⁻¹ y 1401 cm⁻¹ re específicamente. Además, la banda correspondiente al enlace C-S se pronuncia en 643 cm⁻¹, lo que indica una fuerte presencia de este enlace en el producto formado [8] [76] [77] [78] Figura 29.

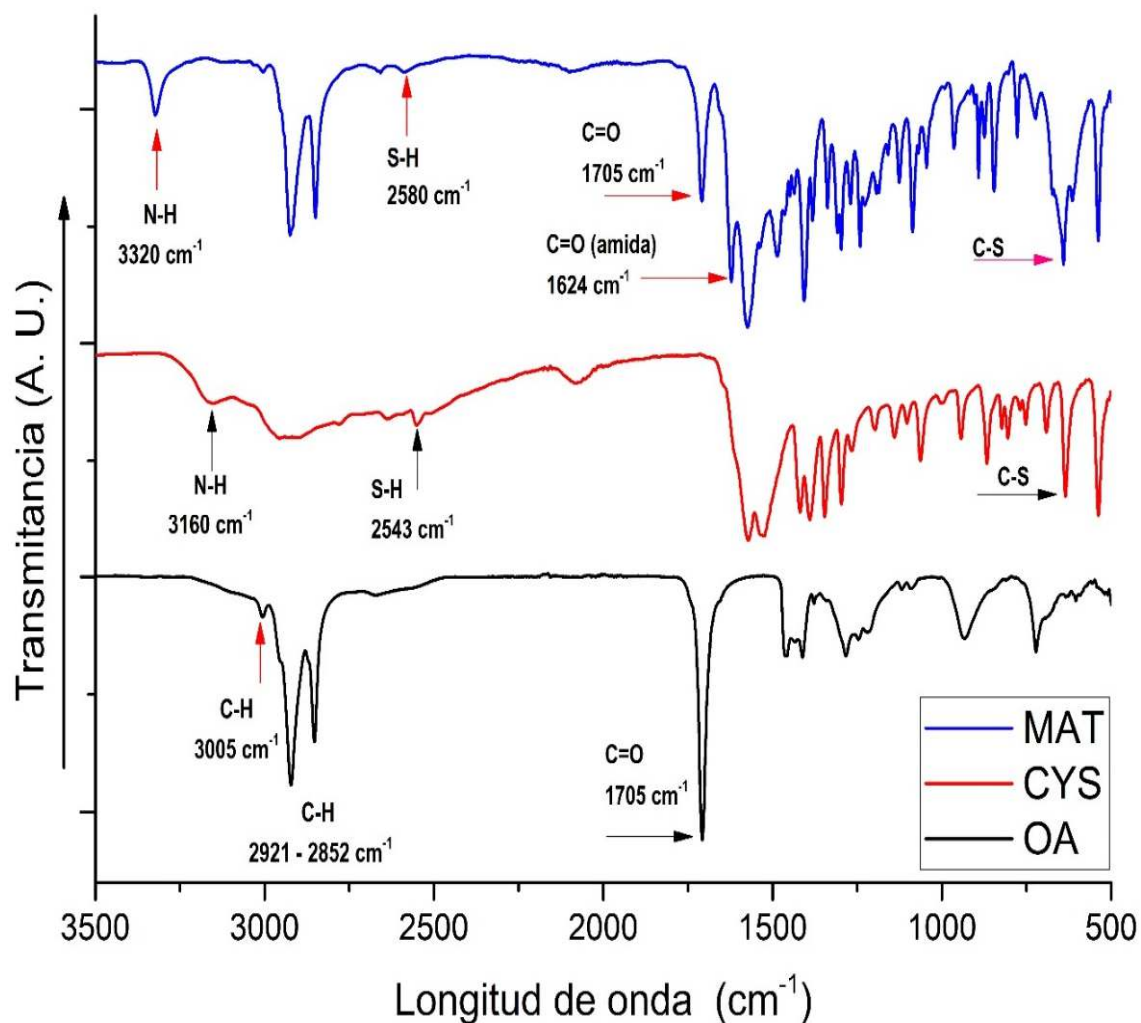


Figura 29. Espectros de FTIR, comparativo entre materiales precursores y el bioconjugado (MAT). Técnica ATR.

5.3. Interpretación y discusión de espectroscopia raman.

El espectro de la L-cisteína (CYS) muestra señales asociadas a su estructura química, en la región de 200 a 500 cm^{-1} las asociadas a las vibraciones de bending CCC, rocking CCC, bending CCN y bending CCS [79]. Además, la señal a 640 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento del enlace CS. El pico observado en 2544 cm^{-1} corresponde al enlace HS del mercaptano [80]. Véase Figura 30.

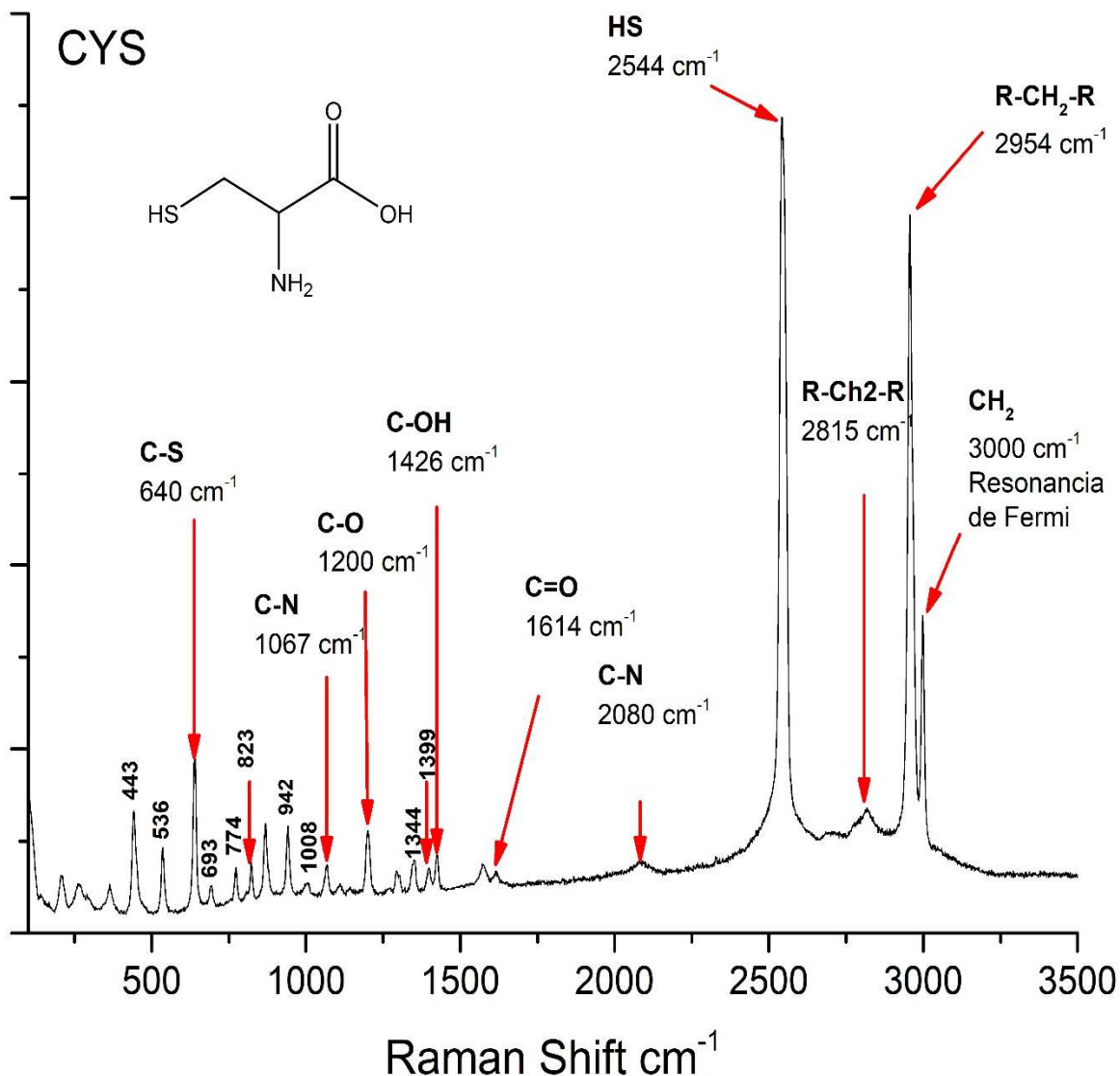


Figura 30. Espectro de raman de L-cisteína. Sobre estrato de silicio.

En cuanto al espectro de ácido oleico (OA), la literatura establece picos de 1000-1200 y 2800-3000 cm^{-1} , que son indicadores de la señal de torsión y empaquetamiento respectivamente de la cadena. Así como señales en la región de 2850 y 2930 cm^{-1} correspondientes a los modos vibracionales de CH₂ asimétrico y CH₃ simétrico, respectivamente, y sensibles a interacciones hidrofóbicas entre cadenas de hidrocarburos e indican empaquetamiento de cadena [80]. Véase Figura 31.

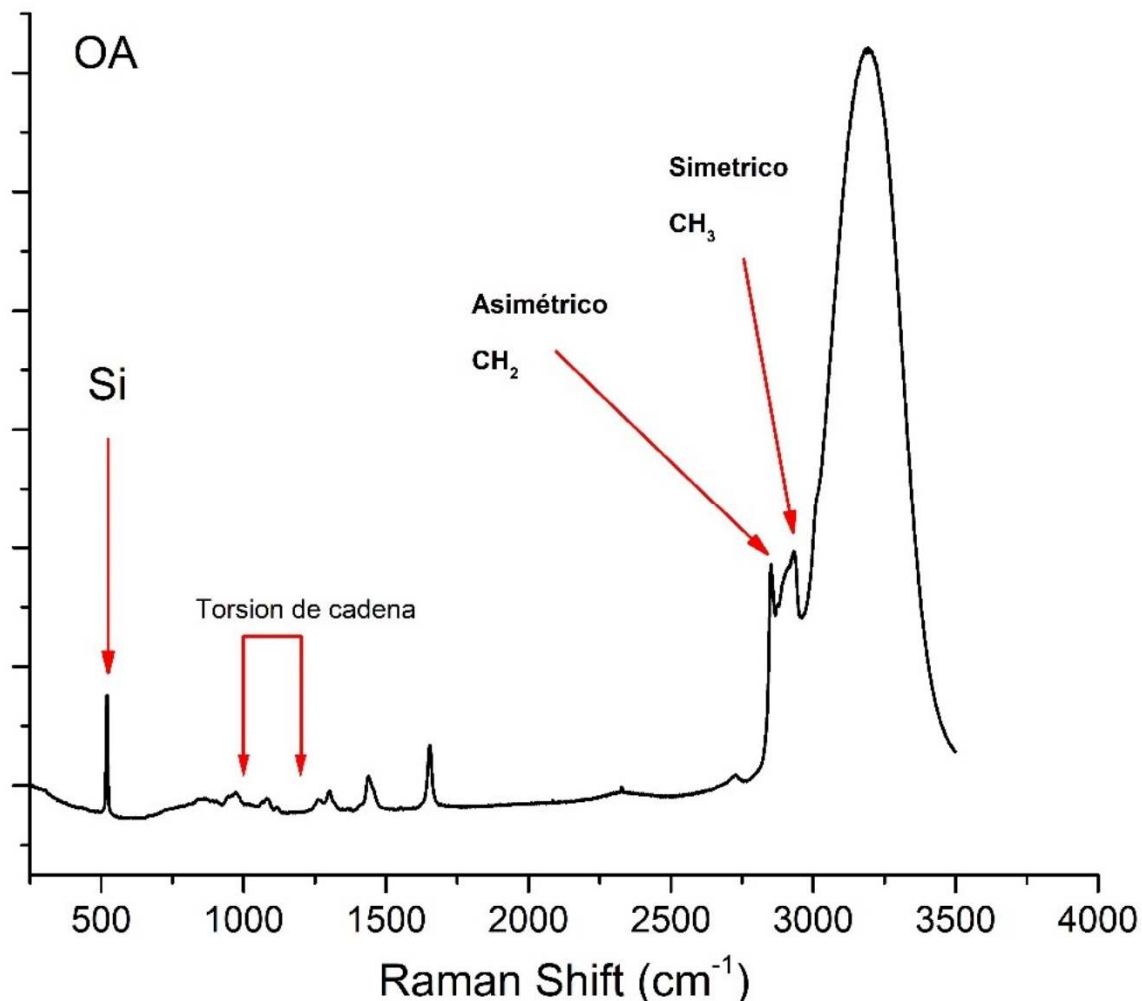


Figura 31. Espectro de raman de ácido oleico. Sobre estrato de silicio.

EL espectro del bioconjugado (MAT), encontramos en 720 cm^{-1} la señal del grupo tiol SH, correspondiente a un tramo en fase, posteriormente observamos la señal del grupo CH₂ correspondiente a la cadena alifática del ácido oleico en 731 cm^{-1} del movimiento de la rocking en fase; en 1417 cm^{-1} aparece la señal CH, el enlace C-NH de estiramiento y flexión aparece en 1551 cm^{-1} , el doble enlace de Carbono-Carbono lo vemos en 1660 cm^{-1} asignado a estiramiento, el grupo carbonilo aparece en 1751 cm^{-1} asignados a estiramiento en fase. La señal del grupo NH de la amida se observa a 2327 cm^{-1} , lo que confirma la presencia del enlace peptídico. Posteriormente aparece la banda ancha, en la que se combinan algunas señales como la fermi-resonancia de CH₂ en 2890 cm^{-1} , el sobretono del enlace C-NH en 2943 cm^{-1} , y la señal de un CH₃, de la cadena de ácido oleico. Además, una banda de estiramiento O-H alrededor de 3428 cm^{-1} en el espectro raman de (MAT) es indicativa de grupos de ácido carboxílico en L-cisteína [81]. Véase Figura 32. Este material fue caracterizado sin diluir, y las estructuras que se aprecian son de tamaños grandes pero muy bien definidos. Véase Figura 33.

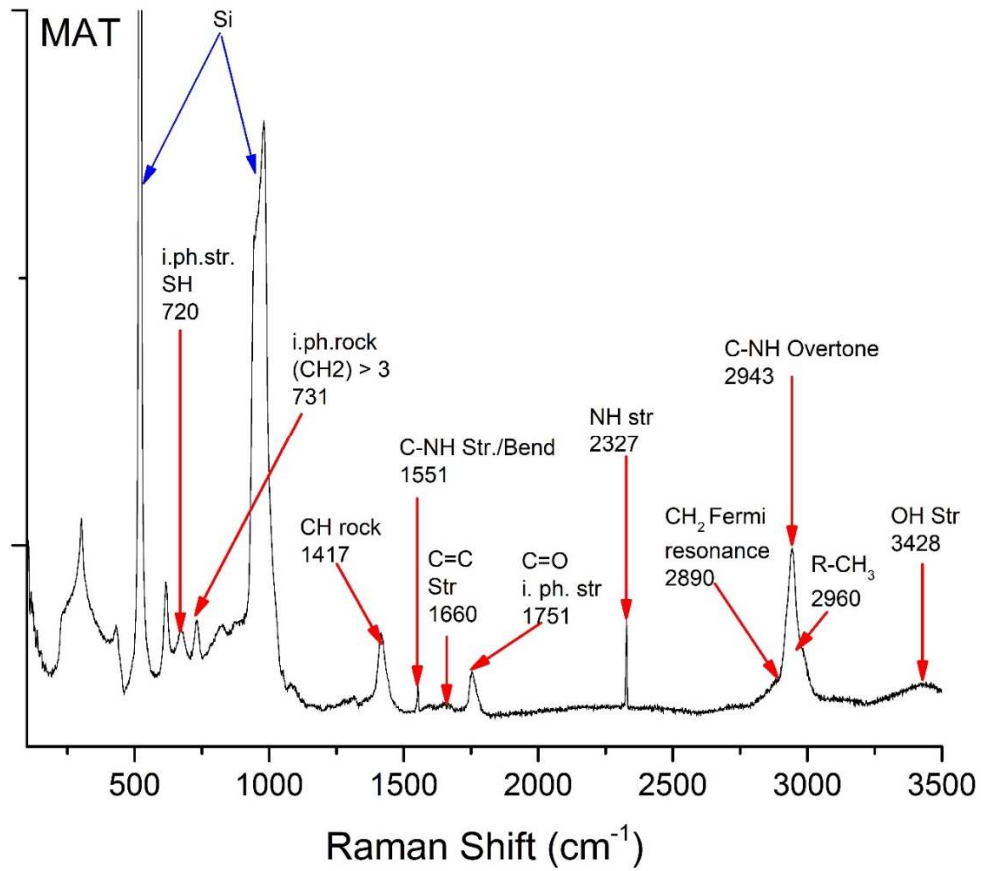


Figura 32. Espectro de raman de bioconjugado (MAT). Sobre estrato de silicio.

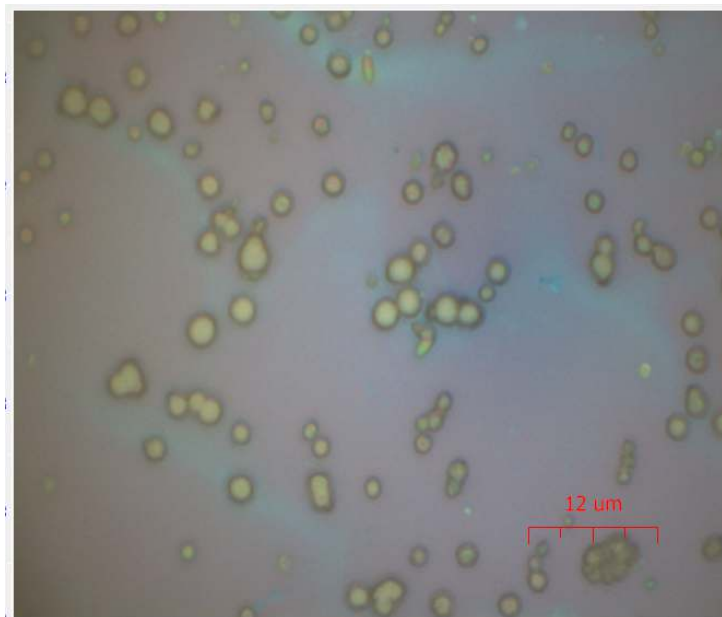


Figura 33. Imagen del bioconjugado (MAT) sin diluir a 100 X. En equipo de raman.

5.4. Obtención de concentración micelar crítica (CMC) por UV-Vis.

La concentración micelar crítica de una solución de surfactante se puede determinar fácilmente trazando la absorbancia en función de la concentración de surfactante. La intersección transversal entre las dos pendientes se toma como la CMC de esa solución. La interacción entre las moléculas de soluto-soluto y las moléculas de soluto-solvente puede proporcionar información útil sobre las propiedades interfaciales y termodinámicas. Estos comportamientos se atribuyen al delicado equilibrio entre la interacción hidrofóbica e hidrofílica de la solución tensioactiva [68]. Las diferentes concentraciones del tensioactivo se analizaron utilizando una cubeta de cuarzo a diferentes concentraciones de MAT en agua desionizada.

Mediante la aplicación de la técnica UV-Vis se determinó la CMC del nuevo material, se preparó una solución con 0.0012 gramos de MAT en estado sólido y se disolvió en 0.002 litros de agua desionizada, lo que equivale a una concentración de 0.600 g / L. Esta concentración marcó el comienzo de las mediciones de UV-Vis. La longitud de onda utilizada es 204 nm, que corresponde a la longitud a la que se absorbe la cisteína. Véase Figura 34.

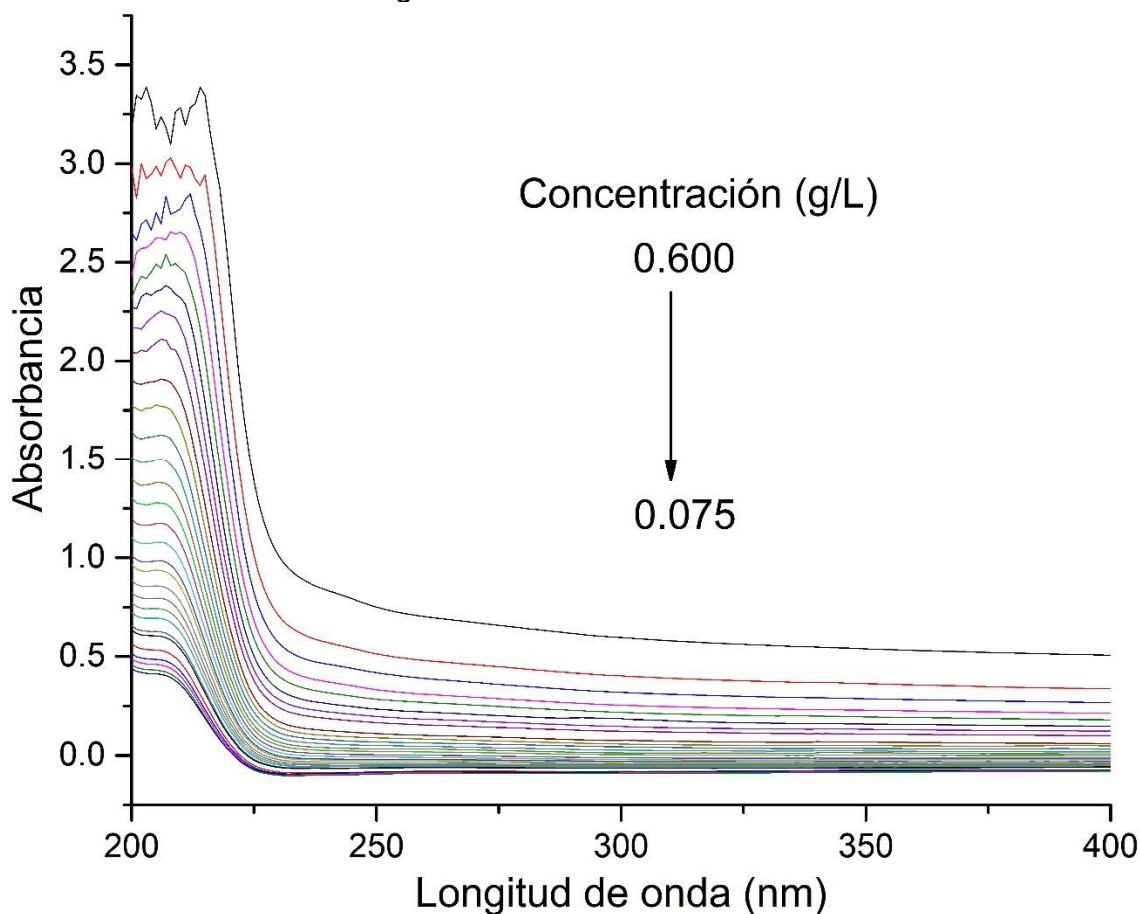


Figura 34. Espectro UV-Vis del bioconjugado de ácido oleico y L-Cisteína (MAT).

El valor determinado para CMC = 0.226 g / L. Este valor se considera aproximado al valor real de CMC.

La CMC se determinó representando gráficamente la absorbancia frente a la concentración. El gráfico presenta dos partes con diferentes pendientes y la CMC se evaluó desde su punto de intersección. Los valores de CMC obtenidos de los datos UV-Visibles dados se muestran en la Figura 35.

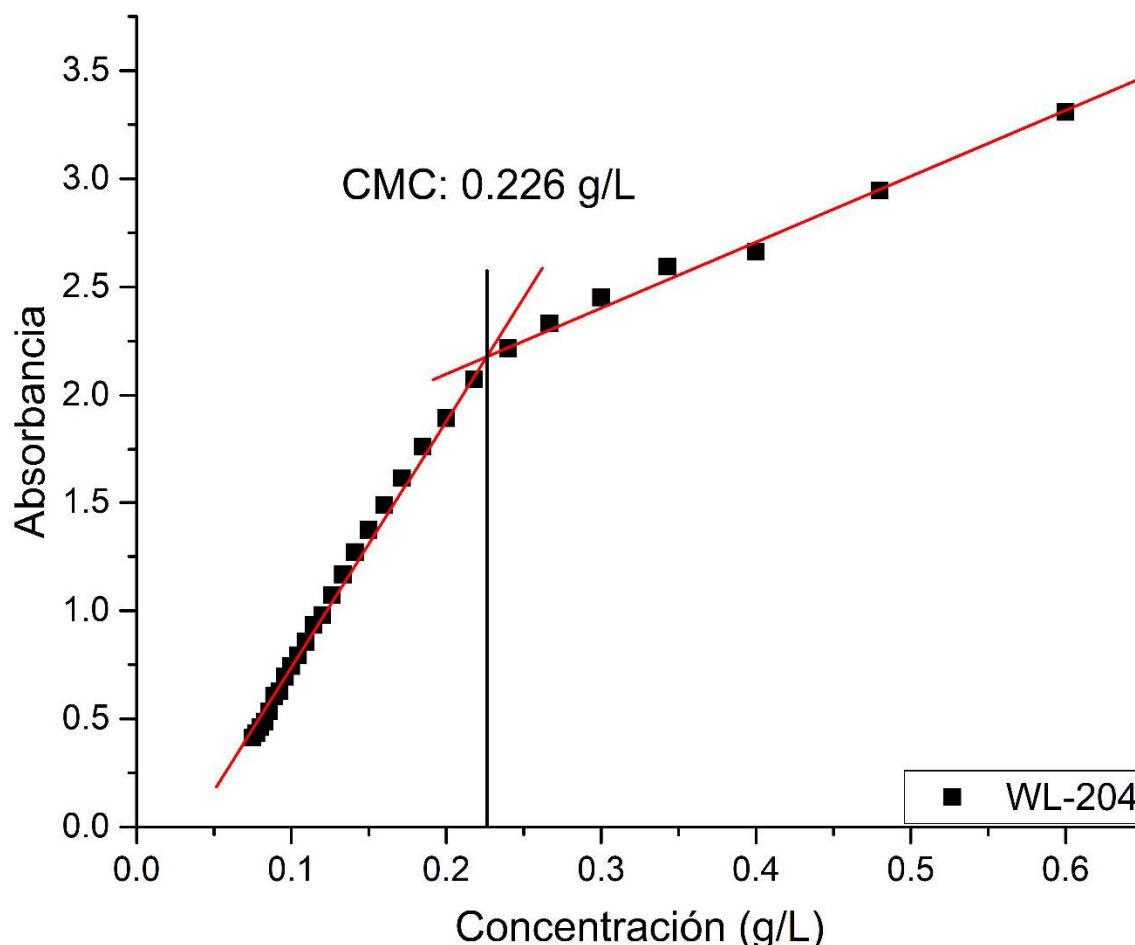


Figura 35. Gráficas de absorbancia versus concentración de bioconjugado de ácido oleico y L-cisteína (MAT). Longitud de onda 204 nm.

5.5. Obtención de radio hidrodinámico por dispersión dinámica de luz (DLS).

Se midieron dos muestras, la primera a una concentración de CMC obtenida por UV-Vis (0.226 g / L) como se muestra en la Figura 35; se detectó únicamente ruido y no se pudo establecer un radio hidrodinámico.

La segunda muestra se utilizó a una concentración superior a la CMC calculada a 0.3 g / L. Las celdas de muestra eran ampollas cilíndricas de 2 mL sumergidas en un baño de disminución de índice de igualación, termostato a 25 ° C. La muestra se filtró y se sonicó durante 10 minutos, antes de las mediciones. Γ se obtuvo ajustando

la función de correlación para un exponencial decreciente y se utilizó en la ecuación de Stock-Einstein.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$$

Donde R es el radio hidrodinámico, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y η es la viscosidad del solvente. El valor obtenido para el radio hidrodinámico es 50.57 nm. Y el índice de polidispersidad (PDI) es 0.1602. Véase Figura 36 e Figura 37.

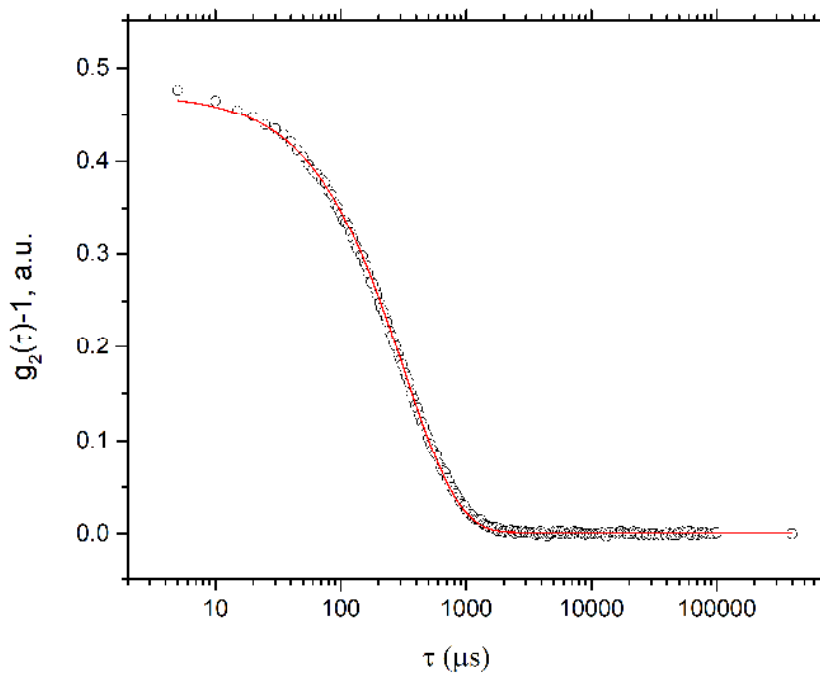


Figura 36. Curva de correlación obtenida por DLS de la muestra MAT a 0.3 g / L a 25 ° C.

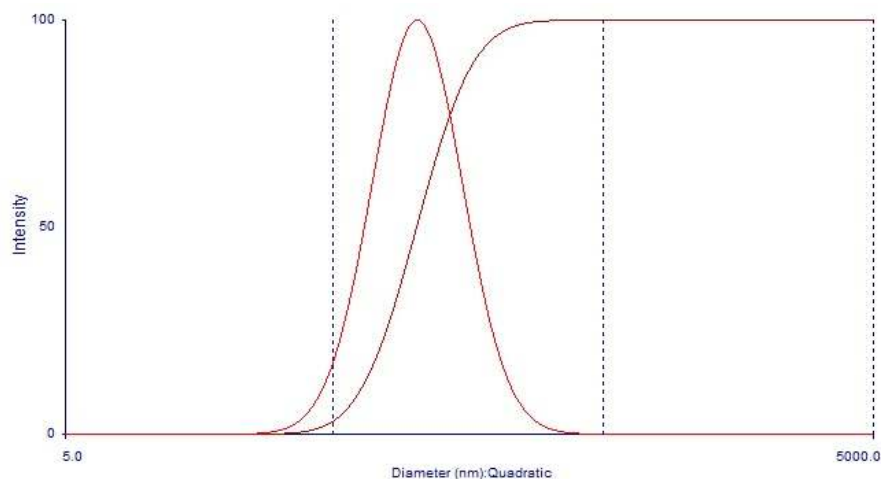


Figura 37. Distribución del diámetro hidrodinámico de 101.14 nm de la muestra de MAT a 0.3 g / L por DLS.

5.6. Caracterización por microscopía de transmisión electrónica.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM). La morfología observada en las micrografías muestra formas esféricas y cilíndricas Figura 38. El valor medio del radio de partícula encontrado es de 31.81 nm obtenido con el software ImageJ 1.51m9 de Wayne Rasband, Instituto Nacional de Salud (500 partículas analizadas), que se presenta en la Figura 39.

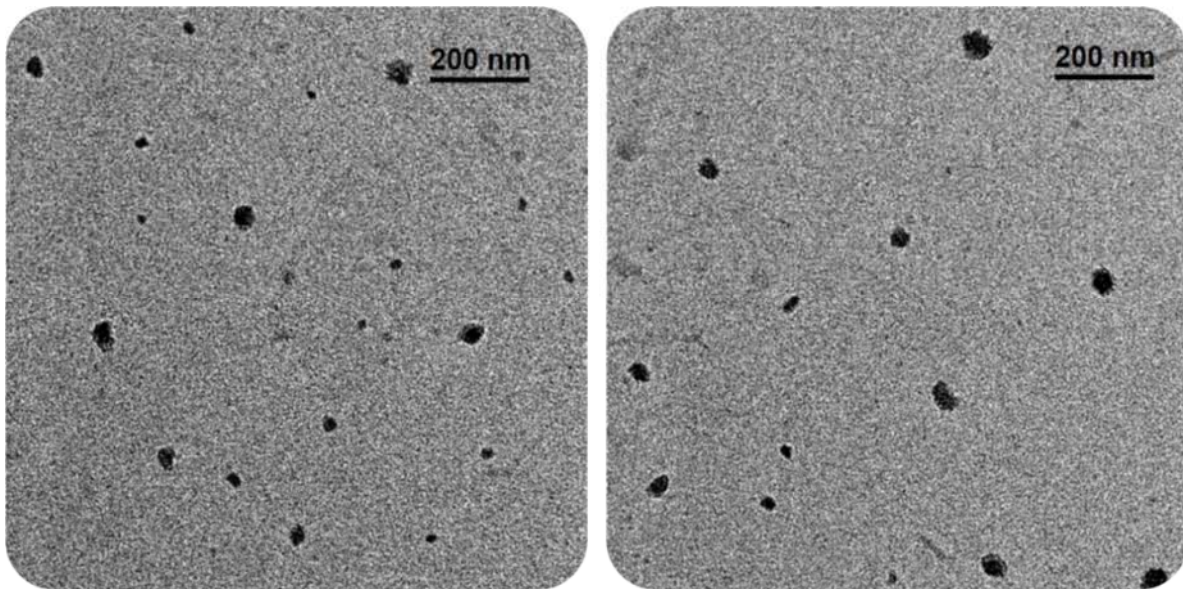


Figura 38. Las imágenes TEM muestran partículas esféricas y cilíndricas con tamaños inferiores a 100 nm.

A partir de la revisión de las imágenes obtenidas en el equipo TEM, se construyó un histograma, el cual podemos observar en la Figura 39.

Los valores TEM usando un aparato de emisión de campo JEOL JEM-2010F (Akishima-shi, Japón) operando a 200keV en un carbón de malla 200 en una rejilla de cobre (Ted Pella) seguido de una gota de agente de tinción de ácido fosfotúngstico al 3%. Se tomaron y analizaron micrografías utilizando el software Gatan (Gatan Inc, EE. UU.).

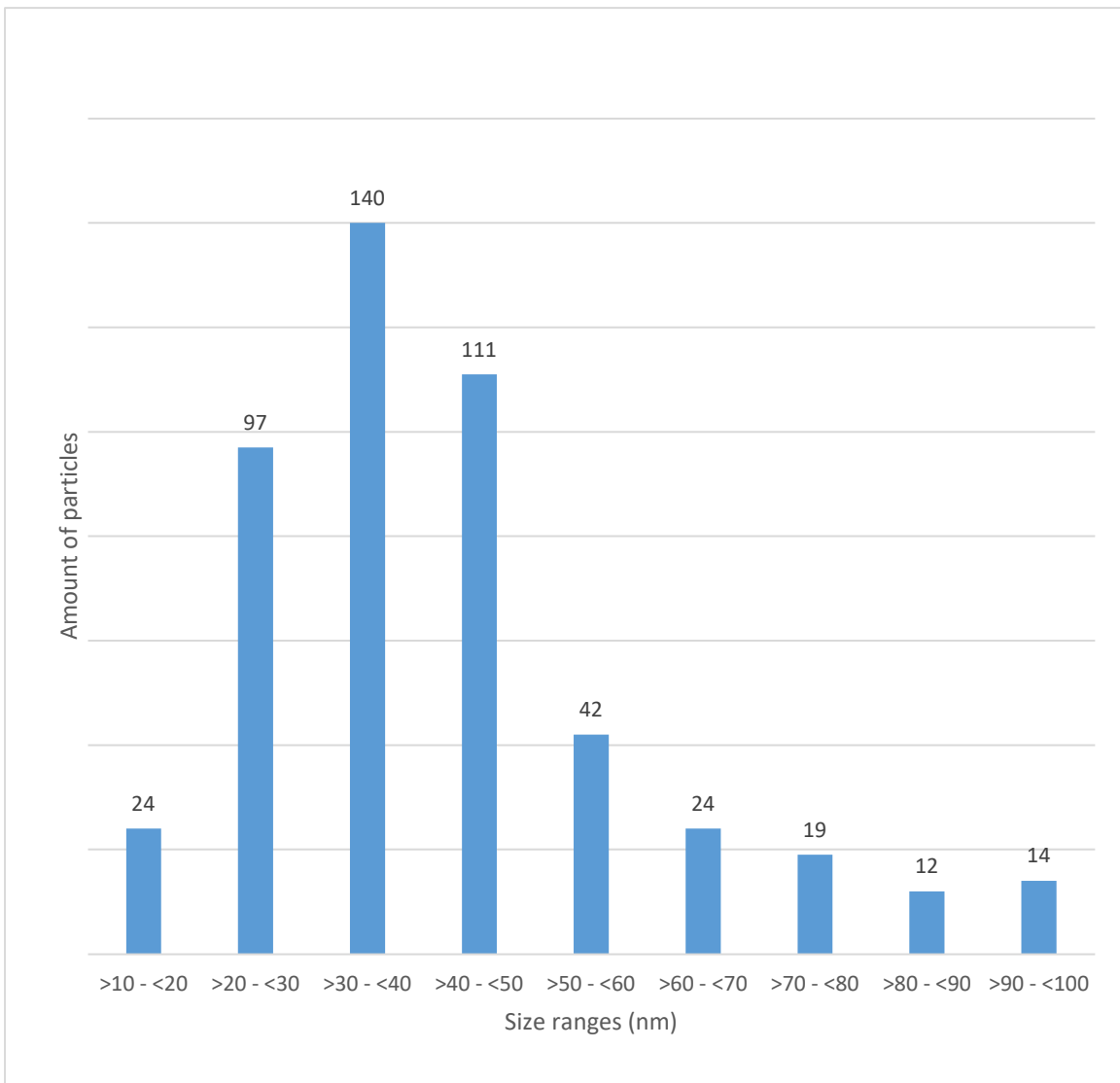


Figura 39. Histograma de tamaños obtenidos en TEM. En el eje X tenemos rangos de tamaño (nm) y en el eje Y tenemos el número de partículas.

6. CONCLUSIONES.

Como conclusión principal podemos decir que nuestra hipótesis planteada no se cumple en su totalidad, es decir que, si es posible sintetizar materiales a partir de aminoácidos, sustancias con comportamiento hidrofílico, hidrofóbico, pero falta confirmar que estos materiales nos lleven a la formación nanoestructuras que pueda autoensamblarse en micelas o vesículas, en condiciones acuosas dependiendo del pH y factor de empaquetamiento para su posible aplicación como encapsulante.

Por lo anterior considero pertinente establecer dentro del trabajo futuro el realizar trabajos para demostrar o desechar por completo la hipótesis planteada al inicio de nuestro trabajo de investigación.

Hasta este momento podemos confirmar que tenemos un material surfactante, las señales y características integrales de los protones sugirieron la formación de un material compuesto de una molécula de ácido oleico y tres moléculas de cisteína, gracias a ella pudimos dilucidar una molécula del material bioconjugado.

La espectroscopia infrarroja confirmó la formación de un grupo amida que resultó de la reacción de acoplamiento y sugirió que, para las condiciones de síntesis utilizadas, no había puentes disulfuro, por lo tanto, no encontramos cistina.

Se obtuvo un valor aproximado de la concentración crítica micelar (CMC) utilizando UV-Vis y TEM confirma estructuras de autoensamblaje de formas esféricas y cilíndricas con un radio de tamaño medio de 31,81 nm; comparable a los 50.57 nm de radio hidrodinámico obtenido por DLS. La diferencia de tamaño observadas entre DLS y TEM, se debe principalmente a las condiciones en las que se hace la medición, puesto que las dediciones en el DLS se hacen en condiciones acuosas las de TEM, se hacen con el material en seco.

Gracias a esta investigación, se solicitó una patente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), bajo el número de expediente MX/a/2018/016047, a favor de la Universidad de Sonora.

Se publicó un artículo en la revista Polymers, con factor de impacto hasta el 2020, de 4.329.

Durante el proceso de mi investigación y como parte de mis actividades de difusión, participe en diferentes eventos académicos, los cuales enlisto a continuación.

Congreso organizado por la Sociedad Mexicana de Materiales A. C. (International Materials Research Congress) 2018. Constancias en Anexos.

Además, se encuentra en marcha el estudio para explorar las posibles aplicaciones, dentro de las cuales podríamos incluir la de encapsulante de moléculas bioactivas con propiedades hidrófobas o como modificación superficial de oro, plata o cualquier otro metal reactivo a nanopartículas de grupos tiol.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Rubio, A. Aplicaciones de la nanociencia: motores moleculares y dispositivos. **2005**.
2. Guadalupe Mendoza, Rodriguez - López, J.L. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. *Rev. Perfiles Latinoam.* **2007**, *14*, 161–186.
3. Ramsden, J. *Essentials of Nanotechnology*; Jeremy Ramsden & Ventus Publishing ApS, Ed.; 2009; ISBN 9788776814182.
4. Leite, E.R. *Nanostructured Materials for Electrochemical Energy Production and Storage*; Lockwood, D.J., Ed.; Nanostructure Science and Technology; Springer US: Boston, MA, 2009; ISBN 978-0-387-49322-0.
5. Woldu, M.; Lenjisa, J. Nanoparticles and the new era in diabetes management. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.* **2014**, *3*, 277, doi:10.5455/2319-2003.ijbcp20140405.
6. Smart, T.; Lomas, H.; Massignani, M.; Flores-Merino, M. V.; Perez, L.R.; Battaglia, G. Block copolymer nanostructures. *Nano Today* **2008**, *3*, 38–46, doi:10.1016/S1748-0132(08)70043-4.
7. Padilla-Vaca, F.; Mendoza-Macías, C.L.; Franco, B.; Anaya-Velázquez, F.; Ponce-Noyola, P.; Flores-Martínez, A. El mundo micro en el mundo nano: importancia y desarrollo de nanomateriales para el combate de las enfermedades causadas por bacterias, protozoarios y hongos. *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencia y Nanotecnología* **2018**, *11*, 15, doi:10.22201/ceiich.24485691e.2018.21.62591.
8. López-Millán, A.; Zavala-Rivera, P.; Esquivel, R.; Carrillo, R.; Alvarez-Ramos, E.; Moreno-Corral, R.; Guzmán-Zamudio, R.; Lucero-Acuña, A. Aqueous-Organic Phase Transfer of Gold and Silver Nanoparticles Using Thiol-Modified Oleic Acid. *Appl. Sci.* **2017**, *7*, 273, doi:10.3390/app7030273.
9. Numata, K. Poly(amino acid)s/polypeptides as potential functional and structural materials. *Polym. J.* **2015**, *47*, 537–545, doi:10.1038/pj.2015.35.
10. Franz, S.; Rammelt, S.; Scharnweber, D.; Simon, J.C. Immune responses to implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6692–6709, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.078.
11. Zheng, L.; Sundaram, H.S.; Wei, Z.; Li, C.; Yuan, Z. Applications of zwitterionic polymers. *React. Funct. Polym.* **2017**, *118*, 51–61, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2017.07.006.

12. Morán, M.C.; Pinazo, A.; Pérez, L.; Clapés, P.; Angelet, M.; García, M.T.; Vinardell, M.P.; Infante, M.R. "Green" amino acid-based surfactants. *Green Chem.* **2004**, *6*, 233–240, doi:10.1039/b400293h.
13. Bordes, R.; Holmberg, K. Amino acid-based surfactants - Do they deserve more attention? *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 79–91, doi:10.1016/j.cis.2014.10.013.
14. Myers, D. *Surfactant Science and Technology*; 3rd.; Wiley, 2005; ISBN 13 978-0-471-68024-6.
15. Lombardo, D.; Kiselev, M.A.; Magazù, S.; Calandra, P. Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, *2015*.
16. Macián, M.; Seguer, J.; Infante, M.R.; Selve, C.; Vinardell, M.P. Preliminary studies of the toxic effects of non-ionic surfactants derived from lysine. *Toxicology* **1996**, *106*, 1–9, doi:10.1016/0300-483X(95)03131-X.
17. Manohar, C.; Narayanan, J. Average packing factor approach for designing micelles, vesicles and gel phases in mixed surfactant systems. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2012**, *403*, 129–132, doi:10.1016/j.colsurfa.2012.03.066.
18. Méndez Pérez, M. Agregados coloidales, autoasociación en presencia de ciclodextrina e influencia sobre la reactividad. **2010**, 244.
19. Rondel, C.; Alric, I.; Mouloungui, Z.; Blanco, J.F.; Silvestre, F. Synthesis and properties of lipoamino acid-fatty acid mixtures: Influence of the amphiphilic structure. *J. Surfactants Deterg.* **2009**, *12*, 269–275, doi:10.1007/s11743-009-1121-y.
20. Rosen, M.J.; Kunjappu, J.T. *Surfactants and Interfacial Phenomena*; 2012; ISBN 9780470541944.
21. Bajani, D.; Gharai, D.; Dey, J. A comparison of the self-assembly behaviour of sodium N-lauroyl sarcosinate and sodium N-lauroyl glycinate surfactants in aqueous and aqueo-organic media. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *529*, 314–324, doi:10.1016/j.jcis.2018.06.026.
22. Sakamoto, K.; Lochhead, R.Y.; Maibach, H.I.; Yamashita, Y. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2017; ISBN 9780128020548.
23. Macfarlane, M.G. *Phosphatidylglycerols and lipoamino acids.*; ACADEMIC PRESS INC.: London, England, 1964; Vol. 2;.
24. Nnanna, I.A.J.X. *Protein-Based Surfactants*; Marcel Dekker. Inc.: New York,

NY, 2001; ISBN 082470004X.

25. Cartwright, N.J. Serratamic acid, a derivative of L-serine produced by organisms of the Serratia group. *Biochem. J.* **1955**, *60*, 238–242, doi:10.1042/bj0600238.
26. Thermo Scientific *Crosslinking technology handbook*; Thermo Fisher Scientific Inc., 2012;
27. Hell, R. Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta* **1997**, *202*, 138–148, doi:10.1007/s004250050112.
28. Bulaj, G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnol. Adv.* **2005**, *23*, 87–92, doi:10.1016/j.biotechadv.2004.09.002.
29. Komarov, P.; Ovchinnikov, M.; Khizhnyak, S.; Alekseev, V.; Mikhailov, I.; Pakhomov, P. On Molecular Gelation Mechanism of L-Cysteine Based Hydrogel. *Nanosci. Nanoeng.* **2013**, *1*, 23–35, doi:10.13189/NN.2013.010104.
30. Dunetz, J.R.; Magano, J.; Weisenburger, G.A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 140–177, doi:10.1021/op500305s.
31. Sheehan, J.C.; Hess, G.P. A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068, doi:10.1021/ja01609a099.
32. Kharasch, N.; Thyagarajan, B.S. Structural Basis for Biological Activities of Dimethyl Sulfoxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1983**, *411*, 391–402, doi:10.1111/j.1749-6632.1983.tb47334.x.
33. Mehtälä, P.; Pashley, D.H.; Tjäderhane, L. Effect of dimethyl sulfoxide on dentin collagen. *Dent. Mater.* **2017**, *33*, 915–922, doi:10.1016/j.dental.2017.04.018.
34. Khorana, H.G. The chemistry of carbodiimides. *Chem. Rev.* **1953**, *53*, 145–166, doi:10.1021/cr60165a001.
35. Escobar, C. Interacción fisicoquímica del ácido oleico con iones en el proceso de flotación de Espodumeno, 2019.
36. Fontana, L.; Sáez, M.; Bailón, S.; Hernández, G.-. Compuestos nitrogenados de interés en nutrición clínica. *Nutr. Hosp.* **2006**, *21*, 15–29.
37. Makvandi, P.; Josic, U.; Delfi, M.; Pinelli, F.; Jahed, V.; Kaya, E.; Ashrafzadeh, M.; Zarepour, A.; Rossi, F.; Zarrabi, A.; et al. Drug Delivery (Nano)Platforms for Oral and Dental Applications: Tissue Regeneration, Infection Control, and Cancer Management. *Adv. Sci.* **2021**, *8*,

doi:10.1002/advs.202004014.

38. Shoji, S.; Masui, K. *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*; 2015; ISBN 9783642296482.
39. Ta-shun, R. *The Proteins Composition, Structure, and Function.*; Washington, U. of, Ed.; Academic Press: Seattle, Washington, 1964; Vol. II; ISBN 0120218119.
40. Pardo, I.J. Hidrogeles termosensibles y fotopolimerizables derivados de Pluronic para aplicaciones biomédicas., Universidad de Zaragoza, 2014.
41. Bangham, A.D. Liposomes: the Babraham connection. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 275–285, doi:10.1016/0009-3084(93)90071-A.
42. Rodríguez-Hernández, J.; Lecommandoux, S. Reversible inside-out micellization of pH-responsive and water-soluble vesicles based on polypeptide diblock copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2026–2027, doi:10.1021/ja043920g.
43. Bhatia, S. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*; 2016; ISBN 9783319411293.
44. Dowling, a; Clift, R.; Grobert, N.; Hutton, D.; Oliver, R.; O’neill, O.; Pethica, J.; Pidgeon, N.; Porritt, J.; Ryan, J.; et al. Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties. *London R. Soc. R. Acad. Eng. Rep.* **2004**, *46*, 618–618, doi:10.1007/s00234-004-1255-6.
45. Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347–360, doi:10.1038/nrd1088.
46. Oberdörster, Gü. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose response relationships of inhaled particles. *Part. Sci. Technol.* **1996**, *14*, 135–151, doi:10.1080/02726359608906690.
47. Felice, B.; Prabhakaran, M.P.; Rodríguez, A.P.; Ramakrishna, S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *41*, 178–195, doi:10.1016/j.msec.2014.04.049.
48. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354*, 737–740, doi:10.1038/354056a0.
49. Químicas, F.D.C.; Autónoma, U.; Blvd, D.C.; Carranza, V.; José, I. Carbon nanotubes: Functionalization and biological applications. *Int. J. Pharm. Res.* **2020**, *12*, 9–18, doi:10.31838/ijpr/2020.sp2.569.
50. Komatsu, K.; Murata, M.; Murata, Y. Encapsulation of molecular hydrogen in fullerene C60 by organic synthesis. *Science (80-.).* **2005**, *307*, 238–240,

doi:10.1126/science.1106185.

51. Mroz, P.; Pawlak, A.; Satti, M.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Sarna, T.; Hamblin, M.R. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 711–719, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.005.
52. Ji, H.; Yang, Z.; Jiang, W.; Geng, C.; Gong, M.; Xiao, H.; Wang, Z.; Cheng, L. Antiviral activity of nano carbon fullerene lipidosome against influenza virus in vitro. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.* **2008**, *28*, 243–246, doi:10.1007/s11596-008-0303-6.
53. Cai, X.; Jia, H.; Liu, Z.; Hou, B.; Luo, C.; Feng, Z.; Li, W.; Liu, J. Polyhydroxylated fullerene derivative C60(OH)₂₄ prevents mitochondrial dysfunction and oxidative damage in an MPP⁺-induced cellular model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*, 3622–3634, doi:10.1002/jnr.21805.
54. Iga, A.M.; Robertson, J.H.P.; Winslet, M.C.; Seifalian, A.M. Clinical potential of quantum dots. *J. Biomed. Biotechnol.* **2007**, *2007*, doi:10.1155/2007/76087.
55. Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R.M.; Chung, L.W.K.; Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 969–976, doi:10.1038/nbt994.
56. West, J.L.; Halas, N.J. Applications of nanotechnology to biotechnology. *Elsevier Sci. Ltd* **2000**, *Volume 11*, 215–217.
57. Kherlopian, A.R.; Song, T.; Duan, Q.; Neimark, M.A.; Po, M.J.; Gohagan, J.K.; Laine, A.F. A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Syst. Biol.* **2008**, *2*, 1–18, doi:10.1186/1752-0509-2-74.
58. Negishi, Y.; Endo, Y.; Fukuyama, T.; Suzuki, R.; Takizawa, T.; Omata, D.; Maruyama, K.; Aramaki, Y. Delivery of siRNA into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound. *J. Control. Release* **2008**, *132*, 124–130, doi:10.1016/j.jconrel.2008.08.019.
59. Suzuki, R.; Takizawa, T.; Negishi, Y.; Utoguchi, N.; Maruyama, K. Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology. *Int. J. Pharm.* **2008**, *354*, 49–55, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.034.
60. Iverson, N.; Plourde, N.; Chnari, E.; Nackman, G.B.; Moghe, P. V. Convergence of nanotechnology and cardiovascular medicine: Progress and emerging prospects. *BioDrugs* **2008**, *22*, 1–10, doi:10.2165/00063030-200822010-00001.

61. Adachi, K.; Tsukahara, Y. *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*; 2015; ISBN 9783642296482.
62. Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: Rockford, Illinois, USA, 2008; ISBN 9780123705013.
63. Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques I*; 2nd. Editi.; Elsevier: Rockford, Illinois, USA, 2008; ISBN 9780123705013.
64. Madison, S.A.; Carnali, J.O. PH optimization of amidation via carbodiimides. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52*, 13547–13555, doi:10.1021/ie401724m.
65. Smith, M.B. *March's Advanced Organic Chemeistry*; 7th.; Wiley, 2013; ISBN 9780470462591.
66. Ley, M. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS BASADAS EN L-CISTEÍNA, Universidad de Sonora, 2009.
67. Vizcarra-Pacheco, M.; Ley-Flores, M.; Matrecitos-Burrueal, A.M.; López-Esparza, R.; Fernández-Quiroz, D.; Lucero-Acuña, A.; Zavala-Rivera, P. Synthesis and characterization of a bioconjugate based on oleic acid and l-cysteine. *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*, doi:10.3390/polym13111791.
68. Ullah, I.; Ahmad, K.; Shah, A.; Badshah, A.; Ali Rana, U.; Shakir, I.; Zia-Ur-Rehman, Z.; Khan, S.Z. Synthesis, characterization and effect of a solvent mixture on the CMC of a Thio-based novel cationic surfactant using a uv-visible spectroscopic technique. *J. Surfactants Deterg.* **2014**, *17*, 501–507, doi:10.1007/s11743-013-1554-1.
69. Rather, M.A.; Rather, G.M.; Pandit, S.A.; Bhat, S.A.; Bhat, M.A. Determination of cmc of imidazolium based surface active ionic liquids through probe-less UV-vis spectrophotometry. *Talanta* **2015**, *131*, 55–58, doi:10.1016/j.talanta.2014.07.046.
70. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons, 2004; ISBN 0-470-85427-8.
71. Chase, T.; Hirschfeld, T. FT-Raman Spectroscopy_ Development and Justification. *Appl. Spectrosc.* **1986**, *40*, 133–137.
72. Laurella, S.L. *Resonancia magnética nuclear*, Primera Ed.; Universidad Nacional de La Plata: Buenos Aires, 2017;
73. Williams, D. *Transmission electron microscopy*; Springer, 2009; ISBN 9781439839201.
74. Reich, H.J. Proton Chemical Shifts Database Available online: <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/h-data/hdata.htm>.

75. Kogelheide, F.; Kartaschew, K.; Strack, M.; Baldus, S.; Metzler-Nolte, N.; Havenith, M.; Awakowicz, P.; Stapelmann, K.; Lackmann, J.W. FTIR spectroscopy of cysteine as a ready-to-use method for the investigation of plasma-induced chemical modifications of macromolecules. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2016**, *49*, 84004, doi:10.1088/0022-3727/49/8/084004.
76. Cameron, D.G.; Umemura, J.; Wong, P.T.T.; Mantsch, H.H. A fourier transform infrared study of the coagel to micelle transitions of sodium laurate and sodium oleate. *Colloids and Surfaces* **1982**, *4*, 131–145, doi:10.1016/0166-6622(82)80003-6.
77. Yea, D.N.; Lee, S.M.; Jo, S.H.; Yu, H.P.; Lim, J.C. Preparation of Environmentally Friendly Amino Acid-Based Anionic Surfactants and Characterization of Their Interfacial Properties for Detergent Products Formulation. *J. Surfactants Deterg.* **2018**, *21*, 541–552, doi:10.1002/jsde.12051.
78. Bellamy, L.J. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*; Second Edi.; Chapman and Hall, 1980; Vol. 53; ISBN 9788578110796.
79. Cebi, N.; Dogan, C.E.; Develioglu, A.; Yayla, M.E.A.; Sagdic, O. Detection of L-Cysteine in wheat flour by Raman microspectroscopy combined chemometrics of HCA and PCA. *Food Chem.* **2017**, *228*, 116–124, doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.132.
80. Suga, K.; Kondo, D.; Otsuka, Y.; Okamoto, Y.; Umakoshi, H. Characterization of Aqueous Oleic Acid/Oleate Dispersions by Fluorescent Probes and Raman Spectroscopy. *Langmuir* **2016**, *32*, 7606–7612, doi:10.1021/acs.langmuir.6b02257.
81. Peter, L. *IR and Raman Spectroscopy*.; Elsevier Inc.: San Diego California, USA., 2011; Vol. 53; ISBN 9780123869845.

8. ANEXOS.

8.1 Solicitud de patente:

gob.mx

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Solicitud de Patente de Invención o de Registro de Modelo de Utilidad o de Registro de Diseño Industrial

Homoclave del formato: IMPI-00-009

Fecha de publicación del formato en el DOF: 24 / 05 / 2018

Folio y Fecha de Recepción: 12 DIC. 2018 11:30

01849

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisinal de Patentes
OFICINA REGIONAL DE OCCIDENTE

Solicitud Expediente: MX/a/2018/016047
Fecha: 12/010/2018 Hora: 11:30:00
Folio: MX/E/2018/095078 975483

Datos generales de la solicitud

Marcar con una X la(s) opción(es):

- Solicitud de Patente de Invención
- Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
- Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique:
 - Modelo Industrial
 - Dibujo Industrial

Datos generales del o de los solicitante(s)

Personas físicas	Personas morales
CURP (obligado):	RFC (obligado):
Nombre(s):	Denominación o razón social: Universidad de Sonora
Primer apellido:	Nacionalidad: Mexicana
Segundo apellido:	Teléfono (lada, número, extensión): (662) 259 21 36
Nacionalidad:	Correo electrónico (obligado): pedro.sabori@unison.mx
Teléfono (lada, número, extensión):	
Correo electrónico (obligado):	
<input type="radio"/> Continúa en anexo	<input type="radio"/> Continúa en anexo

8.2 Certificado de publicación de artículo.



8.3 Participación en XXVII International Materials Research Congress, 2018.



Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

August 2018

TO WHOM IT MAY CONCERN
P r e s e n t

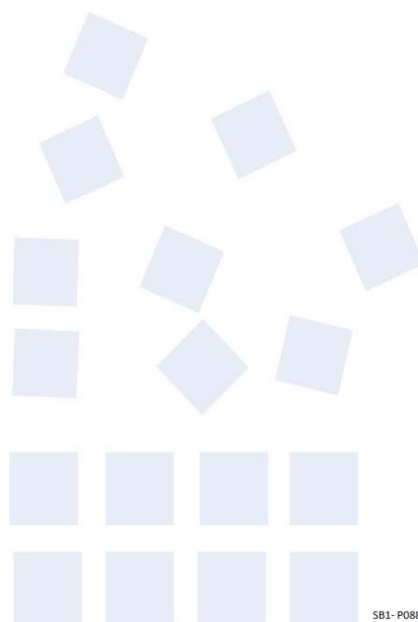
This is to certify that *Han Noé Umaña Kossio, María del Carmen Ley Flores, Marco Vizcarra, Armando Lucero Acuña, Paul Zavala Rivera* presented the contribution: **SYNTHESIS OF POLY(AMINO ACIDS) BASED ON L-CYSTEINE BY CARBODIIMIDE BIOCONJUGATION** as **Poster** modality, in the New Trends in Polymer Chemistry and Characterization Symposium at the XXVII International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 19th to 24th, 2018.

Sincerely,



Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

Claudia Gutiérrez-Wing
President



SB1-P088



August 2018

TO WHOM IT MAY CONCERN

P r e s e n t

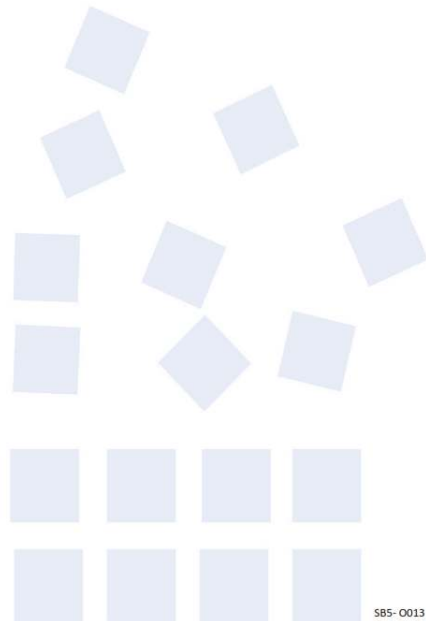
This is to certify that *María del Carmen Ley Flores, Han Noé Umaña Kossio, Marco Vizcarra, Armando Lucero Acuña, Paul Zavala Rivera, Anya Argüelles* presented the contribution: **LIPOAMINO ACID: TWO-STEP SYNTHESIS OF THIOL-FUNCTIONALIZED OLEIC ACID** as **Oral** modality, in the Functional Surfaces and Their Interactions with Biological Systems Symposium at the XXVII International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 19th to 24th, 2018.

Sincerely,



Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

Claudia Gutiérrez-Wing
President



SBS-0013

8.4 Participación en el 2do. Congreso internacional de Nano Bioingeniería.



Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Otorgan el presente reconocimiento a:
MARCO ANTONIO PACHECO VIZCARRA

Por su participación con la PRESENTACIÓN DEL POSTER titulado
Synthesis of a surfactant based on oleic acid and L-cysteine.

en el 2do Congreso Internacional
de NanoBioingeniería, realizado en el Foro Virtual del Centro
de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología del 24 al 30
de Octubre 2020.



Dr. José Rubén Morones Ramírez
Coordinador Centro de Investigación
en Biotecnología y Nanotecnología



Dra. Argelia Vargas Moreno
Directora Facultad
de Ciencias Químicas

Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología a 30 de Octubre, 2020



UANL



FCQ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



CIBYN IFCQ
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA Y NANOTECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UANL



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



**VISION
UANL
2030**
Estrategia de Desarrollo Científico, Tecnológico
e Innovación en Materia de la Universidad



Aniversario - UANL