

Tesis de Maestría

Nanomateriales híbridos obtenidos en
medios inocuos para su aplicación
como plataformas de liberación
controlada de fármacos

Ing. Diego Fernando Cadena Castro

Octubre: 2018



Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba

Departamento de Química Orgánica

Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Córdoba

*Tesis presentada para acceder al grado de Magíster en
Ciencias Químicas*

Directora de tesis:

.....
Dra. Paula Uberman

Co-directora de tesis:

.....
Dra. Mónica C. García

Comisión evaluadora:

.....
Dr. Eduardo Coronado

.....
Dra. Marcela Rodríguez

.....
Dra. Ana Cukierman
Universidad de Buenos Aires
(Evaluador externo)

*A toda mi familia
que sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible*

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi esposa Yadira y a mi hija Amelia por toda la paciencia y fuerza que me brindan para seguir adelante. Además, a mi familia la cual siempre estuvo siempre presente y atenta ante cualquier necesidad.

A mi directora Dra. Paula Uberman, a mi co-directora Dra. Mónica García y al Dr Eduardo Coronado por haberme guiado en las actividades de investigación, que condujeron a la realización de la presente tesis.

A la Dra. Sandra Martin y al Dr. Roberto Rossi quienes lideran el grupo de Química Orgánica ámbito en el cual se desarrolló este trabajo y a todos los miembros de este grupo por su amistad y ayuda incondicional durante esta investigación.

A la Dra. Carla Giacomelli y al Dr. Ricardo Rojas del grupo de Fisicoquímica, por el apoyo y la comprensión al colaborar con el uso de los equipos.

Al Dr. Gerardo Gatti y la Dra. Paula Bercoff por la colaboración en los estudios realizados.

A todas las personas que me brindaron gratos momentos y me compartieron su amistad la cual la llevare siempre conmigo.

Índice

Resumen	1
Capítulo I.....	2
1. Introducción general	2
1.1. La nanomedicina	3
1.2. Sistemas nanoparticulados usados en nanomedicina.....	5
1.2.1. NPs inorgánicas.....	6
1.2.1.1. Síntesis de MNPs de Fe ₃ O ₄	7
1.2.1.2. Tipos de magnetización de las MNPs.....	8
1.3. Nanomateriales híbridos magnéticos (NHM).....	10
1.3.1. NHM como sistemas de liberación modificada de fármacos	11
1.3.2. NHM usados en terapia de hipertemia	12
1.3.3. NHM obtenidos a partir de Fe ₃ O ₄ y <i>L-Cis</i>	13
1.3.4. NHM obtenidos a partir de Fe ₃ O ₄ y AH.....	13
1.4. El AH y su rol en la terapia anticancérgena	14
1.5. Fármacos antineoplásicos en el tratamiento del cáncer de mama	15
1.6. Objetivo general.....	17
1.7. Bibliografía	18
Capítulo II	23
2. Síntesis de nanopartículas magnéticas híbridas conjugadas <i>L-Cis</i> y sus derivados.....	23
2.1. Introducción.....	24
2.1.1. Síntesis de MNPs de Fe ₃ O ₄	26
2.1.2. Interacción de MNPs de Fe ₃ O ₄ con <i>L-Cis</i>	26
2.2. Objetivos.....	28
2.3. Resultados y Discusión.....	29
2.3.1. Obtención de nanopartículas de MNPs (Fe ₃ O ₄)	29
2.3.2. MNPs funcionalizadas con <i>L-Cis</i> y sus derivados	34
2.3.3. Obtención de derivados de <i>L-Cis</i>	39
2.4. Conclusiones parciales	52
2.5. Bibliografía	53
Capítulo III.....	54
3. Síntesis de nanopartículas magnéticas híbridas conjugadas con <i>L-Cis</i> - ácido hialurónico	54
3.1. Introducción.....	58
3.1.1. Interacción <i>L-Cis</i> con AH.....	59

3.1.2.	Interacción de las MNPs con AH.....	60
3.2.	Objetivos.....	61
3.3.	Resultados y discusión.....	61
3.3.1.	Interacción <i>L-Cis</i> y AH.....	61
3.3.2.	MNPs funcionalizadas con <i>L-Cis</i> y AH.....	64
3.3.3.	MNPs funcionalizadas con AH.....	69
3.4.	Conclusiones parciales.....	72
3.5.	Bibliografía.....	73
Capítulo IV.....		71
4.	Nanopartículas magnéticas híbridas como portadoras de tamoxifeno.....	71
4.1.	Introducción.....	77
4.1.1.	Nuevos tratamientos para el cáncer.....	78
4.1.1.1.	NHM como portadores de fármacos antitumorales.....	80
4.2.	Objetivos.....	82
4.3.	Resultados y Discusión.....	82
4.3.1.	Cargado y caracterización de las NHM-TMX.....	82
4.3.1.1.	Interacción de TMX con los NHM.....	83
4.3.2.	Caracterización físicoquímica de los NHM-TMX.....	84
4.3.2.1.	Evaluación de las características hidrofóbicas e hidrofílicas de los NHM-TMX.....	89
4.3.3.	Evaluación de la sedimentación de los NHM-TMX en dispersión acuosa.....	90
4.3.4.	Desplazamiento de TMX desde los NHM-TMX.....	92
4.3.5.	Liberación in vitro de TMX desde NHM-TMX.....	94
4.3.6.	Estudios de eficacia antitumoral y potencial hemolítico de los NHM-TMX.....	100
4.4.	Conclusiones.....	104
4.5.	Bibliografía.....	105
Capítulo V.....		102
5.	Conclusiones generales y proyecciones.....	102
5.1	Conclusiones Generales.....	110
5.2	Proyecciones.....	112
Capítulo VI.....		103
6.	Materiales y métodos.....	103
6.1.	Materiales.....	114
6.1.1.	Reactivos generales empleados en el Capítulo II.....	114
6.1.1.1.	Reactivos para la síntesis de las MNPs.....	114
6.1.1.2.	Interacción de las MNPs con derivados de <i>L-Cis</i>	114
6.1.1.3.	Reactivos generales empleados en el Capítulo III.....	115

6.1.1.4.	Reactivos generales empleados en el Capítulo IV.....	115
6.2.	Instrumentación.....	115
6.2.1.	Espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis).....	115
6.2.2.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	116
6.2.3.	Difracción de rayos X de polvos (PDRX).....	116
6.2.4.	Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	117
6.2.5.	Espectroscopia de correlación fotónica (dynamic light scattering, DLS).....	117
6.2.6.	Potencial electrocinético (potencia Zeta ζ).....	117
6.2.7.	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	117
6.2.8.	Magnetometría de muestra vibrante (VSM).....	118
6.2.9.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	118
6.3.	Metodologías.....	118
6.3.1.	Metodologías del Capítulo II.....	118
6.3.1.1.	Obtención de MNPs de Fe ₃ O ₄	118
6.3.1.2.	Obtención de derivados de <i>L</i> -Cis.....	120
6.3.1.2.1.	Obtención de <i>L</i> -Cistina metil éster (2).....	120
6.3.1.2.2.	Obtención de <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cistina metil éster (4).....	121
6.3.1.2.3.	Obtención de <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cis metil éster (3).....	122
6.3.1.2.4.	Interacción de las MNPs con derivados de <i>L</i> -Cis.....	123
6.3.2.	Metodologías del Capítulo III.....	124
6.3.2.1.	Modificación del AH por conjugación con <i>L</i> -Cis.....	124
6.3.2.2.	MNPs- <i>L</i> -Cis funcionalizadas con AH.....	125
6.3.2.3.	MNPs funcionalizadas con AH.....	126
6.3.2.4.	Cuantificación de los grupos tiol (SH) en las NHM con <i>L</i> -Cis.....	127
6.3.3.	Metodologías del Capítulo IV.....	128
6.3.3.1.	Incorporación de TMX en los NHM con y sin <i>L</i> -Cis.....	128
6.3.3.2.	Dispersabilidad de los NHM-TMX en dispersión acuosa.....	130
6.3.3.3.	Evaluación del desplazamiento iónico de TMX desde las NMH-TMX.....	131
6.3.3.4.	Evaluación de la afinidad hidrofílica-hidrofóbica de los NHM-TMX.....	131
6.3.3.5.	Estudios de liberación in vitro de TMX desde los NHM-TMX.....	132
6.3.3.6.	Estudio del potencial hemolítico de las MNPs híbridas.....	136
6.3.3.7.	Evaluación de la eficacia de NHM-TMX en células tumorales de cáncer de mama (línea MCF-7).....	137
6.3.3.8.	Análisis estadístico.....	138
6.4.	Bibliografía.....	138
7.	Anexos.....	134

Índice de Tablas

Tabla 2-1: Obtención de MNPs de Fe ₃ O ₄ por el método de coprecipitación.	30
Tabla 2-2: Diámetro hidrodinámico (d_H), índice de polidispersidad (PDI) y ζ de las MNPs dispersas en buffer de carbonatos bajo diferentes condiciones de pH.	37
Tabla 4-1: Eficiencia de cargado de TMX en los NHM	84
Tabla 4-2: d_H , PDI y ζ de las dispersiones de NHM-TMX en ACS 5, PBS 7,4 y medio de cultivo (MC) al día 0 y luego de 16 días de contacto de las partículas con estos medios.....	88
Tabla 4-3 : Datos de cinética de liberación a 37°C obtenidos mediante el análisis de los perfiles de liberación de TMX desde los NHM-TMX utilizando las ecuaciones de orden cero, Higuchi y Korsmeyer- Peppas.....	96
Tabla 4-4 : Datos de cinética de liberación a 43°C obtenidos mediante el análisis de los perfiles de liberación de TMX desde los NHM-TMX utilizando las ecuaciones de orden cero, Higuchi y Korsmeyer- Peppas.....	100

Índice de figuras

Figura 1-1: Escala comparativa entre diferentes compuestos aplicados en la nanomedicina y sistemas o componentes comunes de la naturaleza.....	3
Figura 1-2: a) Estructura formada por el acuocomplejo de $\text{Fe}^{3+}\text{-H}_2\text{O}$ ³³ b) Estructura cristalina de la magnetita, átomos de Fe^{2+} verdes, Fe^{3+} cafés y Oxígenos blancos ³⁴	8
Figura 1-3: Estructura química del TMX	17
Figura 2-1: a) Estructura química de la <i>L</i> -Cis y <i>L</i> -Cistina, b) Interacciones de las moléculas de <i>L</i> -Cis y <i>L</i> -Cistina con MNPs	27
Figura 2-2: Análisis a) FT-IR realizado para: Fe_3O_4 (negro), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PVP}$ (verde), PVP (rojo), b) Ensayo TEM para MNPs b1) sin estabilizante y b2) con PVP, respectivamente.	32
Figura 2-3: Caracterización de MNPs a) magnetometría de muestra vibrante (VSM) para Fe_3O_4 . b) difractogramas de MNPs con PVP (verde) y MNPs sin PVP (negro).	33
Figura 2-4 : Análisis DRX para evaluar la estabilidad de las MNPs sintetizadas en ausencia de PVP, entre 0 meses y 3 meses.	34
Figura 2-5: Esquema de síntesis de MNPs funcionalizadas con <i>L</i> -Cis bajo las condiciones óptimas de síntesis.	35
Figura 2-6: Análisis de FT-IR de MNPs- <i>L</i> -Cis obtenidas mediante intercambio de ligando a diferentes pHs: 8 (naranja), pH 8,8 (celeste), pH 9,7 (rosa), <i>L</i> -Cis (mostaza), PVP (rojo).....	37
Figura 2-7: Análisis de dispersión dinámica de luz DLS a MNPs con: pH de 6 (naranja), pH 8,8 (celeste) y pH 11 (rojo). Todos los tamaños de partícula se expresan $\times 10^2$	38
Figura 2-8: Potencial electrocinético para Fe_3O_4 para valores de pH menores 8 y mayores de 11	38
Figura 2-9: Análisis de distribución de tamaños mediante micrografía TEM para $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-L-Cis}$	39
Figura 2-10: Estudio de interacción entre las MNPs y los derivados de <i>L</i> -Cis	40
Figura 2-11: Estrategia sintética para la obtención de los derivados 2 y 3 de <i>L</i> -Cis.....	41
Figura 2-12: Análisis ^1H -RMN para el compuesto de <i>L</i> -Cistina metil éster (2) en comparación con <i>L</i> -Cistina (1).....	41
Figura 2-13: Análisis ^1H -RMN para el compuesto de <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cistina metil éster (4)	42
Figura 2-14: a) Análisis ^1H -RMN para el compuesto <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cisteína metil éster (3). b) Espectros FT-IR de <i>L</i> -Cis (mostaza), <i>L</i> -Cistina 1 y <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cisteína metil éster (3) (lila).....	44
Figura 2-15: Comparación de los difractogramas obtenidos para las MNPs (negro) <i>L</i> -Cis (mostaza) con: a) MNPs - <i>L</i> -Cis (amarillo oscuro), b) MNPs- <i>L</i> -Cistina (azul marino) y c) MNPs- <i>L</i> -Cistina metil éster (2) (naranja oscuro), MNPs- <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cisteína metil éster (3) (rosa)	45
Figura 2-15: Imágenes de TEM de: a) MNPs- <i>L</i> -Cis, b) MNPs- <i>L</i> -Cistina, c) MNPs- <i>L</i> -Cistina metil éster, d) MNPs- <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cisteína metil éster	46
Figura 2-17: Espectros FT-IR y TGA para: MNPs - <i>L</i> -Cis (amarillo oscuro), MNPs - <i>L</i> -Cistina (1) (azul marino), MNPs- <i>L</i> -Cistina metil éster (2) (naranja oscuro), MNPs- <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cisteína metil éster (3) (rosa)	50
Figura 2-18 a) Curvas de TGA para: MNPs- <i>L</i> -Cis con lavado normal (CLN) y MNPs- <i>L</i> -Cis con lavado exhaustivo (- - - CLE), b) Posibles formaciones de enlaces entre moléculas de <i>L</i> -Cis	51
Figura 2-19: ζ para Fe_3O_4 y para MNPs- <i>L</i> -Cis en valores de pH < 8 e igual a 8,8 respectivamente	52
Figura 3-1: Interacción entre <i>L</i> -Cis y AH para dar lugar a la formación de un enlace amida.....	59
Figura 3-2: Secuencia sintética para la obtención de <i>L</i> -Cis-AH mediante la activación del grupo -COOH del AH por reacción con EDAC/HOBt	62

Figura 3-3: espectros FT-IR de: <i>L</i> -Cis (mostaza), AH (azul), <i>L</i> -Cis-AH (bordó).....	62
Figura 3-4: Interacción del compuesto <i>L</i> -Cis-AH con el reactivo de Ellman's para cuantificar los grupos -SH.	63
Figura 3-5: Análisis TGA: <i>L</i> -Cis (mostaza), <i>L</i> -Cis-AH (bordó), AH (azul).....	64
Figura 3-6: Diagrama de obtención de las MNPs- <i>L</i> -Cis-AH	65
Figura 3-7: Espectros FT-IR de MNPs- <i>L</i> -Cis con relación de masas AH:Fe ₃ O ₄ al 0,3 (5) y 0,6 (6).66	
Figura 3-8: a) Difractogramas MNPs- <i>L</i> -Cis (mostaza), MNPs (negro) y AH (azul) con: MNPs- <i>L</i> -Cis-AH (5) y (- - - (6) (verde), b) Análisis TGA para los compuestos conjugados con AH 5 y 6, Fe ₃ O ₄ y Fe ₃ O ₄ - <i>L</i> -Cis.....	68
Figura 3-9: a) Distribución de partículas por DLS: MNPs- <i>L</i> -Cis -AH (5) y (6) b) imágenes TEM: b-1) (5) b-2) (6)	69
Figura 3-10: a) Espectros FTIR, b) Difractogramas c) Curvas de TGA, para AH (azul), MNPs-AH (gris), MNPs (negro),	71
Figura 3-11: Distribución de las poblaciones de partículas del sistema MNPs-AH obtenidos por a) DLS y b) TEM, con su respectivo histograma de distribución de tamaños	72
Figura 4-1: Estructura química del TMX y representación esquemática de su interacción con los NHM con y sin <i>L</i> -Cis.	83
Figura 4-2: Espectros FT-IR de los sistemas NHM-TMX con y sin <i>L</i> -Cis	85
Figura 4-3: Difractogramas para TMX y los NHM-TMX con y sin <i>L</i> -Cis.	85
Figura 4-4: Curvas de TGA para los NHM-TMX con y sin <i>L</i> -Cis.	86
Figura 4-5: Imágenes de TEM e histogramas de los NHM-TMX a) sin <i>L</i> -Cis y b) con <i>L</i> -Cis.....	87
Figura 4-6: a) Estudio de afinidad de los NHM-TMX por fases acuosas y orgánicas. b) MHN-TMX atraídas magnéticamente luego de que partitionaron a la fase acuosa.	90
Figura 4-7: Volumen de sedimentación (Vs) de las dispersiones de a) NHM-TMX con <i>L</i> -Cis y b) NHM-TMX sin <i>L</i> -Cis en PBS 7,4; glicerina; 2:1 v/v en función del tiempo.....	92
Figura 4-8: Cambios de pH de las dispersiones acuosas de a) Fe ₃ O ₄ - <i>L</i> -Cis-AH-TMX, b) Fe ₃ O ₄ -AH-TMX frente al agregado de NaCl 0,9% y glucosa 5% como agentes titulantes.....	93
Figura 4-9: Perfiles de liberación de TMX desde a) Fe ₃ O ₄ -AH-TMX , b) Fe ₃ O ₄ - <i>L</i> -Cis-AH-TMX y c1) muestra de referencia TMX, c2) Acercamiento del perfil de liberación del TMX a 100 min..	95
Figura 4-10 Perfiles de liberación de TMX desde Fe ₃ O ₄ -AH-TAM y Fe ₃ O ₄ - <i>L</i> Cis-AH-TAM hacia los medios a) ACS 5 y b) PBS 7,4 a 43 °C. Se presentan también los perfiles de liberación a 37°C a los fines comparativos.	99
Figura 4-11: Viabilidad celular de células MCF 7, luego de 48 h de incubación con los tratamientos: TMX, NHM-TMX con y sin <i>L</i> -Cis. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos comparados (**** <i>y</i> *** <i>p</i> <0,0001, ** <i>p</i> <0,01 y * <i>p</i> <0,05) y las letras minúsculas también representan diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones comparadas (<i>p</i> <0,05).	102
Figura 4-12: Potencial hemolítico de: TMX, NHM-TMX y NHM, con y sin <i>L</i> -Cis en muestras conteniendo 5% de sangre humana, luego de 2 h de incubación. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos comparados (**** <i>y</i> *** <i>p</i> <0,0001, ** <i>p</i> <0,01 y * <i>p</i> <0,05) y las letras minúsculas también representan diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones comparadas (<i>p</i> <0,05).....	103
Figura 6-1: Esquema de síntesis de las MNPs de Fe ₃ O ₄	119
Figura 6-2: Estructura desarrollada de los compuestos <i>L</i> -Cis y <i>L</i> -Cistina.....	120
Figura 6-3: Esquema de síntesis de <i>L</i> -Cistina metil éster	121
Figura 6-4: Esquema de síntesis de <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cistina metil éster	122
Figura 6-5: Esquema de síntesis de <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cis metil éster (3) por ruptura del puente S-S.....	123
Figura 6-6: Esquema de síntesis de las MNPs con <i>L</i> -Cis y sus derivados	124

Figura 6-7: Esquema de funcionalización de AH con <i>L</i> -Cis para obtener el conjugado <i>L</i> -Cis-AH	125
Figura 6-8: Esquema de síntesis de las MNPs <i>L</i> -Cis-AH	126
Figura 6-9: Esquema de síntesis de las MNPs- AH.....	127
Figura 6-10: Esquema de interacción entre los NHM y TMX 1) cargado del fármaco y 2) lavados y representación para determinar la eficiencia de cargado del fármaco (%ECF).....	129
Figura 6-11: Esquema del diseño experimental utilizado para la medición de la sedimentación de los NHM (MNPs-AH-TMX y MNPs - <i>L</i> -Cis-AH-TMX)	130
Figura 6-12: Esquema del diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de la adición de un electrolito y un no electrolito sobre la dispersión de NHM- TMX.....	131
Figura 6-13: Esquema del diseño experimental utilizado para evaluar la afinidad de las NHM-TMX con y sin <i>L</i> -Cis por un medio orgánico o acuoso.....	132
Figura 6-14: Esquema de las celdas bicompartimentales utilizadas para evaluar la liberación de TMX desde las NHM-TMX con y sin <i>L</i> -Cis y representación de las diferentes etapas involucradas en el análisis de las muestras.....	133
Figura 6-15: Representación esquemática de la metodología empleada en el estudio de hemólisis de los NHM-TMX con y sin <i>L</i> -Cis.	137

Abreviaturas y Acrónimos

ACS 5	<i>buffer de acetato pH 5</i>
AH	<i>Ácido hialurónico</i>
Boc	<i>tert-butoxicarbamato</i>
d_H	<i>Diámetro hidrodinámico</i>
DLS	<i>Espectroscopia de correlación fotónica</i>
% EFC	<i>Eficiencia de cargado de farmaco</i>
FT-IR	<i>Espectroscopia infrarroja</i>
L-Cis	<i>L-Cisteína</i>
MC	<i>Medio de cultivo</i>
MCF 7	<i>Linea celular tumoral de cáncer de mama</i>
MNPs	<i>Nanomateriales magnéticos</i>
NH	<i>Nanomateriales híbridos</i>
NM	<i>Nanomateriales</i>
NHM	<i>Nanomateriales híbridos magnéticos</i>
NPs	<i>Nanopartículas</i>
PBS 7,4	<i>buffer de fosfato pH 7,4</i>
PDRX	<i>Difracción de rayos X de polvos</i>
PDI	<i>Índice de polidispersidad</i>
PVP	<i>Polivinilpirrolidona</i>
TEM	<i>Microscopia electrónica de transmisión</i>
TGA	<i>Análisis termogravimétrico</i>
TMX	<i>Tamoxifeno</i>
UV-vis	<i>Espectroscopia Ultravioleta-Visible</i>
VSM	<i>Magnetometría de muestra vibrante</i>
ζ	<i>Potencial electrocinético</i>

Resumen

La aplicación de la nanotecnología en la terapia contra el cáncer ha despertado gran interés en los últimos años. Por esta razón, dentro del área de la nanomedicina, el desarrollo de materiales en escala nanométrica para la vehiculización de fármacos antitumorales resulta prometedor, ya que permitiría brindar seguridad en la terapia y mayor especificidad en el transporte de los fármacos a su sitio de acción específico.

En el presente trabajo de tesis, se obtuvieron nanomateriales híbridos magnéticos (NMH) compuestos de un núcleo de magnetita (Fe_3O_4) conjugado con ácido hialurónico (AH) o con un polímero modificado de *L*-Cisteína (*L*-Cis)-AH para ser utilizados como sistemas portadores de tamoxifeno (TMX), seleccionado como un fármaco modelo para el tratamiento del cáncer de mama. La interacción de las nanopartículas magnéticas (MNPs) con los biopolímeros permitió aumentar la afinidad y dispersabilidad acuosa de los NMH, y les confirió grupos funcionales capaces de interactuar con el TMX. Para la síntesis de los NMH se desarrollaron métodos sencillos, económicos y amigables con el ambiente. Los sistemas presentaron tamaños inferiores a 20 nm y el núcleo de Fe_3O_4 exhibió comportamiento superparamagnético, lo que permitiría el direccionamiento del sistema por acción de un campo magnético externo, característica de gran utilidad en la vehiculización de fármacos antitumorales. El TMX se incorporó eficientemente a los NMH, con eficiencias de cargado superiores al 60% y se evidenció una interacción electrostática con los grupos COOH de los NMH. Las plataformas presentaron hemocompatibilidad y los sistemas NMH-TMX con y sin *L*-Cis permitieron reducir el potencial hemolítico del TMX al estar vehiculizado en las plataformas. Los NMH-TMX presentaron mayor eficacia antitumoral contra células de cáncer de mama en comparación con el TMX puro a la misma concentración.

Las plataformas híbridas obtenidas son materiales seguros y biocompatibles, y permiten mejorar la acción del TMX, mostrando propiedades alentadoras para la optimización de la farmacoterapia del cáncer de mama.



Capítulo I

Introducción general

1.1. La nanomedicina

En las últimas décadas se han observado avances importantes en diversas áreas tanto de la ciencia como de la tecnología, impulsados por las investigaciones desarrolladas en el área de los nanomateriales (NM). Al tratarse de un campo interdisciplinario, los NM combinan conocimientos de química, biología, ingeniería, entre otras disciplinas, con la finalidad de desarrollar nuevos sistemas o dispositivos ¹. El uso de estos NM ha dado lugar a innovaciones importantes en diversas áreas como son la catálisis, remediación ambiental, fluidos magnéticos, medicina, entre otros ². Los NM fueron definidos por la Comisión Europea para la Nanociencia y la Nanotecnología ³, como todos aquellos materiales cuyos principales constituyentes tienen al menos una dimensión y propiedades morfológicas en escala de tamaño comprendida entre 1 y 100 nm (Figura 1.1). Pero este intervalo depende muchas veces del área de aplicación, pudiendo, en ciertos casos, sobrepasar estas dimensiones ⁴.

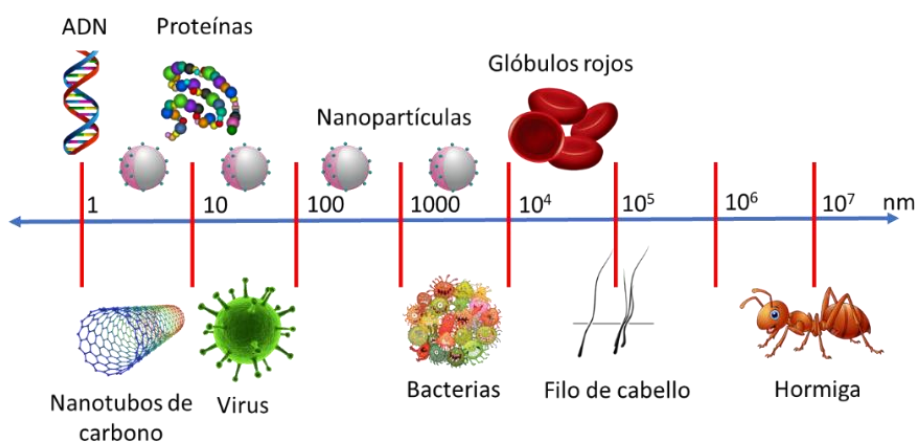


Figura 1-1: Escala comparativa entre diferentes compuestos aplicados en la nanomedicina y sistemas o componentes comunes de la naturaleza.

El tamaño de los NM y la distribución de tamaños que estos presenten son características muy importantes para establecer las posibles aplicaciones en bionanomedicina. Aparte de definir propiedades físicas o químicas del material, la distribución de tamaños puede determinar, también, el destino biológico, la toxicidad y la distribución *in vivo* del NM aplicado. Estos parámetros pueden tener influencia, además, en la eficiencia de cargado y liberación de fármacos,

como así también en su estabilidad y biodisponibilidad ⁵. Otra característica importante aparte del tamaño de los NM, es su carácter hidrofóbico o hidrofílico ya que estas determinan, por ejemplo, los componentes de la sangre que podrían unirse a su superficie. En este sentido algunos sistemas, al entrar en el torrente sanguíneo, son rápidamente reconocidos por el sistema inmune del huésped y posteriormente eliminados a través del hígado o el bazo ⁶. Para evitar esta problemática es necesaria una modificación superficial, para lo cual se pueden usar por ejemplo polímeros biocompatibles como el ácido hialúronico (AH), que podría aportar al silenciamiento del NM, recubriéndolo para disminuir su detección y así evadir el sistema reticuloendotelial ^{7,8}. Así, la combinación de compuestos puede llevar a obtener NM capaces de ser utilizados tanto para diagnóstico de una patología como para vehiculización de fármacos para un dado tratamiento, aspectos que combinados se conocen como *teragnosis* o *theranostics* (*therapy and diagnosis*, por su denominación en inglés).

Los NM usados en la administración de fármacos para terapia o diagnóstico suelen ser, generalmente, sistemas coloidales que presentan tamaños que varían de 1 a 1000 nm (Figura 1.1) ⁹. Sin embargo, existen limitaciones con respecto al tamaño de los NM a emplear, ya que partículas mayores a 200 nm pueden activar el reconocimiento por parte del sistema inmunológico y ser eliminadas del organismo mediante los mecanismos de defensa del huésped ¹⁰.

Gracias al desarrollo de este tipo de NM se ha logrado ofrecer posibles soluciones a viejas problemáticas relacionadas con los fármacos como: la baja biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y baja solubilidad, así como la alta citotoxicidad que muchos de estos presentan ¹¹.

Una lista muy breve, con mayor o menor impacto en nanomedicina, incluye a las nanopartículas (NPs) de óxido de hierro, de oro, de plata, de dióxido de silicio, puntos cuánticos (*quantum dots*), NPs poliméricas, liposomas y nanotubos de carbono. De esta lista, las NPs de óxido de hierro son, sin duda,

unas de las más empleadas con fines biomédicos debido a sus propiedades fisicoquímicas y las posibilidades de bio-funcionalización, haciéndolas aptas para varias técnicas de diagnóstico por imagen, así como para el tratamiento de distintas patologías ¹². Por esta razón, el uso de NM en la nanomedicina presenta diversas aplicaciones, las cuales se dividen de forma general en tres grupos principales: diagnóstico, medicina regenerativa y liberación controlada de fármacos. En este último campo de aplicación los NM se han utilizado, principalmente, para optimizar los efectos terapéuticos de los fármacos de reconocida utilidad, ya sea por mejoras en los perfiles farmacocinéticos, incluyendo tiempo de retención, biodistribución y aclaramiento (*clearance*), aumento de la estabilidad química y enzimática, de la solubilidad aparente y por incremento en la especificidad para lograr eficacia del fármaco y reducción de sus efectos adversos ⁶. Además, otras ventajas de los NM utilizados como sistemas portadores de fármacos son su alta eficiencia de cargado y la posibilidad de incorporar fármacos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos para modular sus propiedades de liberación ¹³. En lo que respecta a la administración de fármacos se observa que las propiedades alcanzadas por los NM están dadas, principalmente, por su pequeño tamaño y su capacidad de funcionalización superficial, que puede conferirle características tanto hidrofílicas como hidrofóbicas ¹⁴, elevando así, su capacidad de atravesar membranas celulares, sitios de inflamación del endotelio, el epitelio, tumores y penetrar microcapilares ¹¹. De esta forma, las aplicaciones de los NM en el transporte y liberación controlada de fármacos tienen un gran potencial dentro de la nanomedicina, ya que pueden ofrecer ventajas farmacoterapéuticas específicas, en términos de eficacia y seguridad, en comparación con los sistemas convencionales ¹⁰.

1.2. Sistemas nanoparticulados usados en nanomedicina

Dada la extensa cantidad de las investigaciones en el área de la nanomedicina, existe una gran diversidad de NM que han sido empleados con

fines terapéuticos. Sin embargo, con la finalidad de mejorar aún más las propiedades de los NM, se han desarrollado sistemas que combinan más de un componente, y son conocidos como nanomateriales híbridos NH, entre los cuales la combinación de NPs inorgánicas con materiales orgánicos ha cobrado gran relevancia ¹⁵. En particular, los sistemas híbridos representan una de las estrategias con mayores perspectivas de desarrollo, ya que combinan la estabilidad mecánica y térmica de los componentes inorgánicos, con la fácil procesabilidad de los componentes orgánicos. A continuación, se detallan los sistemas con base en NPs inorgánicas y (NH) más comúnmente empleados como sistemas portadores de fármacos.

1.2.1. NPs inorgánicas

Actualmente, las NPs inorgánicas, que involucran ya sea metales de transición como Au o Ag, así como óxidos de elementos como Fe o Si, entre otras, están siendo ampliamente investigadas tanto en estudios preclínicos como clínicos para el tratamiento, diagnóstico y detección de diversas enfermedades ^{16,17,18}. Dentro de estos NM, es importante destacar las nanopartículas magnéticas (MNPs) de óxidos de Fe, Co, Mn, entre otras, como potenciales candidatas para aplicaciones biomédicas. Las MNPs además de ser materiales de fácil obtención, presentan como ventajas adicionales una gran área y elevada reactividad superficial, las cuales las hacen apropiadas para la obtención de NH mediante la incorporación de nuevos ligandos o para el transporte de fármacos ¹⁹. Otra característica de las MNPs es su fácil manipulación bajo la influencia de un campo magnético externo debido a la propiedad de superparamagnetismo ²⁰.

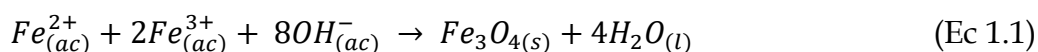
En particular las MNPs de óxidos metálicos como Fe, por ejemplo la magnetita (Fe_3O_4), presentan una gran biocompatibilidad y una baja toxicidad ^{4,21}. Si bien las primeras MNPs preparadas como fluidos magnéticos estables se obtuvieron a inicios de la década de 1960 ²², posteriormente, se

observó que diferentes organismos eran capaces de sintetizar MNPs de forma natural. En 1962, Lowenstan encontró la presencia de este tipo de partículas en moluscos marinos clase *Polyplacophora*²³. Luego, en 1975, Blakemore describió la bacteria magnetotáctica, la cual es una bacteria Gram-negativa capaz de sintetizar intracelularmente MNPs de Fe₃O₄ y greigita (Fe₃S₄) recubiertas de fosfolípidos que forman una estructura denominada magnetosomas²⁴. Recién en 1981, Massart *et. al.* describió un método de síntesis para la obtención de MNPs mediante coprecipitación de dos sales de Fe en medio acuoso²⁵. A partir de ese momento, se ha continuado el estudio de diferentes métodos de obtención para este tipo de NM, así como de sus características físico-químicas y propiedades magnéticas, algunas de las cuales se detallan en las siguientes secciones.

1.2.1.1. Síntesis de MNPs de Fe₃O₄

Existen diferentes técnicas para la preparación de MNPs de Fe₃O₄. Por un lado, se encuentran las técnicas físicas como la evaporación por objetivo láser²⁶. Éstas generan MNPs con un buen grado de cristalinidad, pero poseen la desventaja de ser muy costosas y tener un bajo rendimiento en la producción. Adicionalmente, se han desarrollado métodos químicos como por ejemplo la descomposición térmica, microemulsión, síntesis hidrotermal a partir de extractos de plantas, coprecipitación química, entre otras^{27,28,29,30}, las cuales permiten obtener MNPs dispersas en un medio líquido y no sobre un sustrato sólido como en los métodos físicos.

Dentro de los métodos químicos, uno de los más empleados para la obtención de MNPs de óxidos de Fe es el de co-precipitación (Ec 1.1).³¹ Con esta metodología se obtienen coloides magnéticos constituidos por MNPs de Fe₃O₄ de tamaños inferiores a 20 nm, a través de la coprecipitación de iones de Fe²⁺ y Fe³⁺ en relación molar de 2:1, empleando soluciones básicas como por ejemplo, de hidróxido de amonio (NH₄OH)³²



El mecanismo de formación de la Fe_3O_4 se basa en que los cationes de Fe (Fe^{2+} y Fe^{3+}), al disolverlos en un medio acuoso, forman acuocomplejos ³³. Como el Fe^{3+} posee una alta relación carga-tamaño hidroliza las moléculas de agua dando lugar a los acuohidroxo-complejos $Fe(H_2O)_x(OH)_{6-x}$ ($x = 1-6$) (Figura 1.2). Además, al ser el Fe^{3+} capaz de formar acuocomplejos más básicos que el Fe^{2+} , la hidroxilación ocurre en un rango de pH muy amplio. Para el cation Fe^{2+} la hidrólisis ocurre a valores de pH entre 4 y 5, mientras que para el Fe^{3+} sucede a partir de un pH igual a 7. Estos acuohidroxo-complejos son especies muy inestables y tienden a reaccionar entre sí, a través de un mecanismo de condensación, formando estructuras cristalinas en las cuales se incorporan los cationes de Fe^{2+} a la estructura del óxido de Fe^{3+} . Esta mezcla de cationes conduce a la formación de una estructura cristalina denominada de espinela inversa ³⁴.

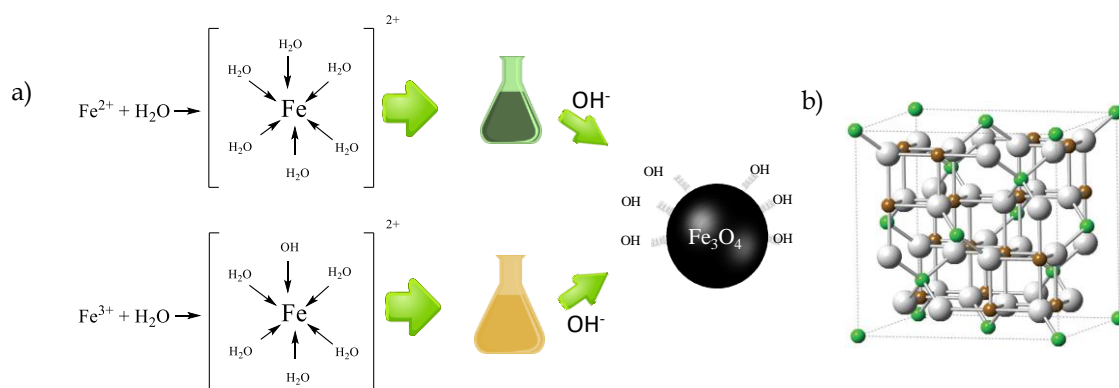


Figura 1-2: a) Estructura formada por el acuocomplejo de Fe^{3+} - H_2O ³³ b) Estructura cristalina de la magnetita, átomos de Fe^{2+} verdes, Fe^{3+} naranjas y Oxígenos blancos ³⁴

1.2.1.2. Tipos de magnetización de las MNPs

Con respecto a su comportamiento magnético, éste es causado por los movimientos de partículas que poseen carga eléctrica y una determinada masa. Cuando se produce un giro, la partícula cargada eléctricamente crea un dipolo magnético, también conocido como magnetrón. Al aplicar un campo magnético externo, los dipolos magnéticos se ordenan con el campo dando lugar a un momento magnético. Un electrón presenta dos tipos de movimientos angulares conocidos como el movimiento de espín y el movimiento de orbital. Ambos

pueden interactuar como cualquier par de dipolos y producir un acoplamiento espín-orbital. De las características de este acoplamiento surgen las propiedades magnéticas de los átomos y moléculas. Sobre la base de esto, se puede clasificar al material en cinco formas básicas de magnetismo: diamagnético, paramagnético, ^aferromagnético, antiferromagnético y ^bferrimagnético ^{35,36}.

Los materiales ferri-ferromagnéticos presentan un comportamiento magnético cooperativo, con el fin de disminuir la energía magnetostática, que es la energía potencial producida por campo magnético externo ³⁵. Este comportamiento lleva a un alineamiento paralelo de los spines atómicos en secciones denominadas “dominios magnéticos” que están separados por regiones llamadas paredes de Bloch ³⁶. Dentro de cada dominio los spines están orientados paralelamente, pero el sentido de los spines es diferente al de los dominios, de tal forma que todos ellos se compensan, y el resultado de toda la masa del material es una magnetización nula ³⁵.

Los dominios tienen tamaños concretos, entre uno y cientos de micrómetros, si se reduce el tamaño del dominio de un material ferri-ferromagnético hasta alcanzar un tamaño crítico menor al dominio se genera un sistema monodominio. Este cambio es fundamental ya que aparece un nuevo comportamiento magnético, el superparamagnetismo ³⁶. El comportamiento superparamagnético tiene una susceptibilidad magnética^c elevada, pero con la característica que presenta coercitividad nula, es decir que el campo magnético que habrá que aplicar para lograr desmagnetizar es cero. La consecuencia es que una vez que se retira el campo aplicado, no presentan ninguna magnetización ³⁶. Este hecho es fundamental ya que implica que las MNPs no van a presentar actividad una vez

^a Ferromagnetismo: Momentos magnéticos en donde estos están en direcciones paralelas.

^b Ferrimagnetismo: Momentos magnéticos están en direcciones opuestas.

^c Susceptibilidad magnética: Propiedad que mide el grado de magnetización ante un campo magnético externo aplicado

introducidas *in vivo*, hasta el momento que se aplique un campo magnético, y adicionalmente, su actividad magnética se eliminara cuando lo haga el campo. De esta forma, de acuerdo con los diferentes comportamientos magnéticos, los materiales paramagnéticos y superparamagnéticos son los más utilizados en el campo de la nanomedicina.

1.3. Nanomateriales híbridos magnéticos (NHM)

Como ya fue mencionado, los sistemas híbridos compuestos por NPs inorgánicas y materiales orgánicos han permitido obtener nanomateriales híbridos (NHM) con propiedades únicas. Uno de los beneficios de la preparación de NHM, radica en la posibilidad de realizar modificaciones superficiales de las NPs inorgánicas, mediante la adición de un ligando, el cual puede aportar al material la capacidad de reconocimiento celular o facilitar la detección del material mediante técnicas ópticas. Es también importante mencionar que la modificación superficial puede aumentar la probabilidad de éxito de un NHM en un organismo *in vivo*, ya que puede prolongar la circulación de NPs en el organismo del huésped.³⁷

Se han utilizado diferentes tipos de compuestos biocompatibles y de baja citotoxicidad para modificar la superficie de las NPs⁸, ya que esta funcionalización puede realizarse *in situ* durante el proceso de síntesis, por citar el de las MNPs³⁸. Entre los diferentes compuestos que se pueden usar para funcionalizar las MNPs, se encuentran los polímeros sintéticos y naturales, entre ellos polietilenglicol (PEG), ácido hialurónico (AH) o L-Cisteína (L-Cis), el cual es un aminoácido natural altamente hidrofílico^{39,40}.

A medida que se acumulan las interacciones sobre un material, más compleja se convierte su química superficial. Por lo que, para evaluar este tipo de materiales es necesario tomar en cuenta parámetros como: interacciones fisicoquímicas, dinámicas, intercambios cinéticos y termodinámicos,

propiedades superficiales a partir de la composición química, funcionalizaciones superficiales, cristalinidad de la superficie, heterogeneidad, hidrofobicidad o hidrofiliidad, estructura química del ligando, carga superficial efectiva (potencial electrocinético, ζ), agregación de las partículas (tiempo de sedimentación), estado de dispersión, estabilidad y biodegradabilidad ⁴¹. En consecuencia, dado el nivel de complejidad de estos sistemas, para llegar a obtener NHM multifuncionalizados estables y útiles en el campo de la nanomedicina se requiere ajustar este amplio conjunto de parámetros.

1.3.1. NHM como sistemas de liberación modificada de fármacos

Dentro de las nuevas estrategias de formulación, para la optimización de la acción de fármacos antitumorales de reconocida utilidad terapéutica, se pueden mencionar a los sistemas de liberación modificada de fármacos. En este contexto la principal característica de un NHM es dirigir y concentrar el fármaco en el sitio de acción y minimizar su biodistribución en otras partes del organismo ^{1,42}.

El estudio de los diferentes sistemas empleados para liberación modificada de fármacos ha evolucionado con el pasar de los años. Entre ellos se destacan los NHM, los cuales son considerados como uno de los NM más eficaces para las terapias ⁹. Para algunos tipos de sistemas, la liberación modificada, puede darse por diferentes estímulos tanto internos como externos, como, por ejemplo, el cambio de pH, presencia de enzimas o un cambio del potencial redox, luz, temperatura, campo magnético o cambios en las concentraciones iónicas. Estos estímulos dan respuestas inmediatas para la liberación de la carga del nanosistema hacia un órgano, tejido, célula o un compartimento celular ^{1,43}.

En temas generales, la Farmacopea Argentina ⁴⁴ define a los sistemas de “liberación prolongada” como aquellos en los que la liberación del fármaco se produce durante un período de tiempo prolongado después de su administración. Las expresiones como “extendida”, “prolongada”, “repetida” y

“sostenida” también se emplean para describir tales sistemas. Por su parte, la Farmacopea de Estados Unidos ⁴⁵ utiliza el término “liberación modificada” (*modified release*) para referirse a los sistemas en los que sus características de liberación son moduladas, en el tiempo o en el espacio, a los fines de cumplir con objetivos terapéuticos específicos o de conveniencia, que no son alcanzados con los sistemas convencionales. Dentro de este término se incluyen los sistemas de liberación retardada (*delayed release*) y de liberación extendida (*extended release*).

En el desarrollo de esta tesis se hará referencia al término “liberación modificada”, descrito en la farmacopea estadounidense, ya que se lo considera más amplio e inclusivo con respecto a todas las aplicaciones descriptas.

1.3.2. NHM usados en terapia de hipertemia

La hipertermia es un proceso térmico que altera la estructura y la función de las proteínas, así como de las enzimas celulares, terminando en una alteración en el crecimiento y diferenciación e induciendo finalmente a la apoptosis ⁴⁶. Por otro lado, también causa deterioro en la integridad de las estructuras celulares, tales como la membrana plasmática, el citoesqueleto y la mitocondria. Adicionalmente, la hipertermia puede desencadenar la muerte celular dependiendo de la forma en que se incrementa la temperatura. Por ejemplo, se ha determinado que en mastocitos de ratón hay un marcado aumento de la apoptosis para incrementos de la temperatura de 42 a 45 °C, pero para una temperatura igual 47 °C se ha observado un aumento significativo de necrosis ⁴⁷. Generalmente, se consigue la muerte de las células cuando se las expone a temperaturas por encima de 43 °C ⁴⁸, pero este incremento de temperatura depende del tipo de células ⁴⁷.

Otro ejemplo presenta el estudio de MNPs frente a células de hepatocarcinoma humano (SMHC-7721). Las partículas mostraron que hay un control de la proliferación celular y un aumento de la condensación de la

cromatina de las células luego de someterlas a una terapia de hipertermia ⁴¹. Este tratamiento generó un efecto apoptótico dependiente de la concentración de MNPs. Una limitación de los tratamientos de hipertermia con MNPs, está relacionada con la baja eficiencia de calentamiento de la mayoría de las MNPs, las cuales se necesitan en grandes cantidades en el tumor para que produzca el efecto terapéutico ⁴¹.

1.3.3. NHM obtenidos a partir de Fe₃O₄ y L-Cis

Los aminoácidos naturales representan una referencia útil para mejorar la comprensión de las interacciones que se producen entre las biomoléculas y las MNPs ⁴⁹. A estos compuestos se los considera como los pilares de los péptidos y proteínas y, por tanto, de la vida misma ⁵⁰. Por lo que, el estudio de las interacciones de aminoácidos con NPs y su aplicabilidad abarca desde procesos industriales, como la síntesis de péptidos en fase sólida, hasta la producción de compuestos farmacéuticos, útiles para aplicaciones en biosensores y funcionalización con compuestos que tengan como finalidad una aplicación biomédica ^{51 52}. En particular, el recubrimiento de MNPs con L-Cis como ligando se considera como un caso especial con respecto a otros aminoácidos ya que presenta numerosos grupos funcionales disponibles para interaccionar con el núcleo metálico ⁵³. Estudios de recubrimiento de las MNPs con L-Cis han demostrado que se mejoran diferentes propiedades de las MNPs, como por ejemplo: aumenta la hidrofiliidad y se modifica la carga superficial neta de la partícula debido a la presencia de los grupos ionizables con dependencia del pH ⁵⁴.

1.3.4. NHM obtenidos a partir de Fe₃O₄ y AH

El AH es un heteropolisacárido compuesto por ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina con uniones beta (1-4) ⁵⁵. Este polímero pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos, la cual incluye también al heparán-sulfato, condroitín-sulfato, dermatán-sulfato y heparina ⁵⁶. El AH tiene una estructura

que exhibe una amplia gama de efectos biológicos, debido a su capacidad hidratante, acción antiinflamatoria, cicatrizante, entre otros ⁵⁷.

El AH es un polisacárido extracelular con una estructura química simple. Dada la presencia de los grupos funcionales ácido carboxílico (-COOH) e hidroxilo (-OH), es posible realizar modificaciones químicas sobre su estructura incorporando diferentes tipos de compuestos mediante uniones covalentes, como fluoróforos que permiten realizar su detección mediante técnicas espectroscópicas ⁵⁸ o compuestos que produzcan cambios en sus propiedades biológicas ⁵⁹. La presencia de (-COOH) en el AH le confiere a este polímero una carga neta negativa en condiciones de pH fisiológico ⁶⁰. De esta manera, el AH puede ser empleado para incorporar moléculas cargadas positivamente mediante interacciones electrostáticas ^{61,40}. Así, el AH puede ser utilizado para la preparación de NHM con aplicabilidad en el diagnóstico y tratamiento del cáncer ^{40,55,58}.

1.4. El AH y su rol en la terapia anticancérgica

Durante la última década se ha demostrado que el AH participa en un grupo de procesos que contribuyen en el comportamiento y fisiología de las células tales como movimiento, crecimiento, división y diferenciación, remodelación del tejido, inflamación y tumorigénesis ⁶². Asimismo, se determinó que AH no forma enlaces covalentes con las proteínas; sin embargo, las células responden directamente al AH por medio de proteínas de la superficie celular que se unen a éste: las hialineras, el receptor *Cluster Differentiation 44* (CD44) y el receptor para la motilidad mediada por AH (RMMAH) ⁶³. En particular el receptor CD44, de gran especificidad hacia AH, es una proteína integral de la membrana. Este receptor, está implicado en la regulación del desarrollo de tumores y con el potencial metastásico celular, lo cual ha despertado interés científico debido a que se encuentra sobre expresado en las células tumorales. Esta actividad ha alentado el diseño de sistemas de administración parenteral de fármacos utilizando AH para direccionar el

tratamiento hacia la diana farmacoterapéutica debido a la selectividad y especificidad del AH por su receptor ⁶⁴. Complementariamente, se ha señalado que la interacción AH-CD44, además de ser útil para el direccionamiento de la farmacoterapia antineoplásica hacia la masa tumoral, podría utilizarse para promover la penetración del fármaco antitumoral hacia el interior de las células. Por ejemplo, se ha demostrado que liposomas que contienen AH generan un aumento de la captación celular del sistema portador a través de los receptores CD44 mediante un mecanismo complejo de señalizaciones intracelulares que culminan con la endocitosis del complejo AH-CD44 ^{65,66}. Tomando esto como base, el AH se presenta como un potencial candidato para modificar la superficie de las MNPs con el fin de proveer mayor reconocimiento celular hacia las células tumorales ⁵⁶.

1.5. Fármacos antineoplásicos en el tratamiento del cáncer de mama

Los agentes antineoplásicos, conocidos como antitumorales, se clasifican, comúnmente, por su mecanismo de acción o su origen, en: alquilantes (compuestos que ejercen sus efectos sobre el ADN y la síntesis de proteínas mediante la unión al ADN, evitando que ésta desenrolle su replicación), antimetabolitos (compuestos que se asimilan a bases nucleotídicas, que intervienen los procesos de crecimiento y división, o a su vez provocan que se inhiban enzimas implicadas en la síntesis de ADN y proteínas) o antibióticos antitumorales citotóxicos (compuestos naturales o sintéticos que pueden alterar múltiples fases del ciclo celular) ⁶⁷.

Cada célula apta y sana atraviesa un proceso secuencial de crecimiento y diferenciación con las siguientes fases: fase G1: reposo pre-síntesis, fase S: síntesis de ADN, fase G2: periodo post-síntesis de ADN y fase M: mitosis ⁶⁷. Una vez terminada la división celular, la célula puede entrar en un estado de reposo completo y permanente (fase G0), entrar en el período de reposo relativo post-mitótico (G1) o perder totalmente su capacidad reproductora y sufrir un proceso de diferenciación para ser excluida y posteriormente eliminada ⁶⁸. En este

contexto, el cáncer es conocido por ser una enfermedad que se caracteriza por la existencia de células que han sufrido una alteración en el control de la replicación celular, por lo que se ven afectados los mecanismos que regulan su capacidad de diferenciación y proliferación, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos. En particular, a las células tumorales en fase G0 se las considera resistentes a la terapia farmacológica y, al no estar diferenciadas, perduran en el tiempo mientras las condiciones nutritivas se lo permitan ⁶⁷.

Existen actualmente alrededor de 200 tipos diferentes de cáncer ⁶⁹, por lo que encontrar un tratamiento personalizado y eficaz para combatirlo es una tarea compleja. Si bien los fármacos antineoplásicos pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular, la respuesta al tratamiento se encuentra condicionada directamente por la capacidad proliferativa de las células, que está determinada, a su vez, por el tiempo de duplicación. Así, se ha propuesto que a mayor proliferación, existirá una mayor respuesta al tratamiento farmacológico ⁷⁰.

En particular, para el tratamiento del cáncer de mama se usan los fármacos antineoplásicos tamoxifeno (TMX) (Figura 1.3), doxorubicina, y raloxifeno, entre otros ^{71 72}. El TMX es un fármaco que se sintetizó en 1960 cuando se reconoció su efecto anti-proliferativo sobre el tejido mamario. El uso de este fármaco permitió entender cómo se puede modificar la expresión genética de acuerdo con un tejido en particular, por medio de moduladores selectivos de los receptores estrogénicos, entre los cuales el TMX es el prototipo ⁷³. Estos moduladores son agentes que se unen al receptor estrogénico donde simulan la actividad de los estrógenos en ciertos tejidos, mientras inhiben la acción en otros.

El TMX es un modulador selectivo de los receptores de estrógeno derivado del trifeniletileno y compite con los estrógenos por la unión al receptor, aunque la afinidad de éstos por los receptores es entre 100 y 1000 veces mayor en comparación con el TMX. Por lo tanto, el fármaco debe coexistir en los tejidos en concentraciones superiores a los estrógenos ⁷⁴. El TMX bloquea la actividad del

dominio de activación del receptor estrogénico (RE) AF-2 y, por consiguiente, se comporta como un antagonista de los estrógenos en todos los ambientes celulares sobre genes que requieran solo al AF-2. No obstante, en los entornos donde el AF-1 es el activador dominante, el TMX exhibe su habilidad como agonista parcial ⁷⁵. Tomando esto como base, el TMX presenta una respuesta mejor en los tumores con predominio de los receptores estrogénicos beta positivos (RE β +); mientras que, cuando se presentan receptores estrogénicos negativos (RE -), la eficacia de TMX se ve reducida notablemente ⁷⁴. Si bien el TMX sigue siendo el “caballo de Troya” para el tratamiento del cáncer de mama, el tratamiento con este fármaco involucra la administración oral de su sal citrato durante varios años (hasta 5 años). Además, este fármaco presenta hidrofobicidad, baja biodisponibilidad y alta variabilidad inter-sujetos, además de efectos adversos considerables, entre ellos: propensión a desarrollar cáncer de endometrio, hepatotoxicidad, anemia hemolítica, entre otros. ⁷⁶. En consecuencia, incluso cuando el TMX es el tratamiento de primera línea para el cáncer de mama de receptor de estrógeno positivo, su acción farmacoterapéutica podría ser optimizada mediante su vehiculización en NHM, ya que se podrían lograr reducir sus efectos adversos y mejorar, en última instancia, la aceptación del tratamiento por parte de los pacientes.

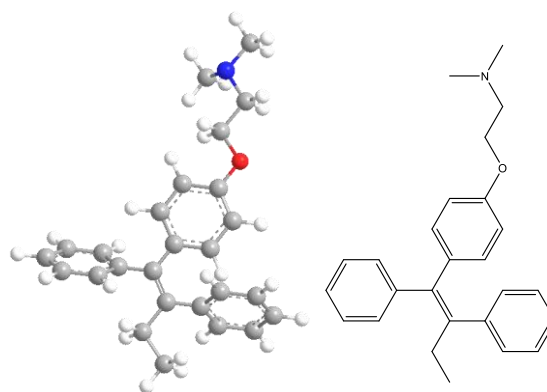


Figura 1-3: Estructura química del TMX

1.6. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis fue diseñar metodologías amigables con el ambiente que permitan obtener NHM, a partir de reactivos

biocompatibles, para su aplicación como sistemas portadores de fármacos. En este sentido se planteó el uso de diversas estrategias de síntesis, basadas en metodologías sencillas y en el empleo de medios acuosos y reactivos de baja toxicidad.

Como objetivos específicos se propuso: a) sintetizar y caracterizar NHM basados en MNPs conjugadas con el biopolímero AH y el aminoácido *L*-Cis; b) incorporar el TMX (seleccionado como modelo de fármaco antitumoral) en las NHM con y sin *L*-Cis; c) caracterizar los sistemas obtenidos mediante técnicas espectroscópicas, calorimétricas, difractométricas y microscópicas; d) estudiar la capacidad de las NHM-TMX para modular la liberación del TMX en fluidos biorrelevantes y en condiciones de hipertermia simulada a 43°C; e) evaluar la eficacia de las NHM-TMX en cultivos celulares tumorales de cáncer de mama y su seguridad mediante estudios de potencial hemolítico.

En los siguientes capítulos de esta tesis se detallarán las actividades realizadas y los resultados más relevantes obtenidos para el cumplimiento de los objetivos propuestos.

1.7. Bibliografía

1. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951 (2015).
2. Murty, B. S., Shankar, P., Raj, B., Rath, B. B. & Murday, J. Applications of Nanomaterials. in *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology* 107–148 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
3. European Commission. Commission recommendation on the definition of nanomaterial. *Off. J. Eur. Union* **L**, 38–40 (2011).
4. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
5. Rabinow, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 785–796 (2004).
6. García, M. C., Aloisio, C., Onnainty, R. & Ullio-Gamboa, G. *Self-assembled nanomaterials. Nanobiomaterials* (Elsevier Ltd., 2018)
7. Grislain, L. *et al.* Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier. *Int. J. Pharm.* **15**, 335–345 (1983).

8. Kairdolf, B. A., Qian, X. & Nie, S. Bioconjugated nanoparticles for biosensing, in vivo imaging, and medical diagnostics. *Anal. Chem.* **89**, 1015–1031 (2017).
9. Lin, W. Introduction: Nanoparticles in Medicine. *Chem. Rev.* **115**, 10407–10409 (2015).
10. Bawarski, W. E., Chidlow, E., Bharali, D. J. & Mousa, S. A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **4**, 273–282 (2008).
11. Panyam, J. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 61–71 (2012).
12. Laurent, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).
13. Irache, J. M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M. & Espuelas, S. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Vet. Parasitol.* **180**, 47–71 (2011).
14. Karakoti, A. S., Shukla, R., Shanker, R. & Singh, S. Surface functionalization of quantum dots for biological applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **215**, 28–45 (2015).
15. Cai, Z., Zhang, H., Wei, Y. & Cong, F. Hyaluronan-Inorganic Nanohybrid Materials for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **18**, 1677–1696 (2017).
16. Huang, H. C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K. & Rege, K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *J. Control. Release* **155**, 344–357 (2011).
17. Li, Z., Barnes, J. C., Bosoy, A., Stoddart, J. F. & Zink, J. I. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2590–2605 (2012).
18. Giljohann, D. A. *et al.* Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 3280–3294 (2010).
19. Lee, N. *et al.* Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magneto-responsive Therapy. *Chem. Rev.* **115**, 10637–10689 (2015).
20. Kumar, C. S. S. R. & Mohammad, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 789–808 (2011).
21. Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P. & Möller, L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* **188**, 112–118 (2009).
22. Neuringer, J. L. & Rosensweig, R. E. Ferrohydrodynamics. *Phys. Fluids* **7**, 1927–1937 (1964).
23. LOWENSTAM, H. A. Magnetite in Denticle Capping in Recent Chitons (Polyplacophora). *GSA Bull.* **73**, 435–438 (1962).
24. Blakemore, R. Magnetotactic bacteria. *Science (80-.)*. **190**, 377–379 (1975).
25. Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
26. Safronov, A. P. *et al.* Spherical magnetic nanoparticles fabricated by laser target evaporation. *AIP Adv.* **3**, 0–18 (2013).
27. Salas, G. *et al.* Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **22**, 21065–21075 (2012).

28. Liu, Z. L. & Wang, X. Synthesis of magnetite nanoparticles in W / O microemulsion. *J. Mater. Sci.* **9**, 2633–2636 (2004).
29. Mohanpuria, P., Rana, N. K. & Yadav, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *J. Nanoparticle Res.* **10**, 507–517 (2008).
30. Shen, L. *et al.* Facile co-precipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles. *Ceram. Int.* **40**, 1519–1524 (2014).
31. Roth, H. C., Schwaminger, S. P., Schindler, M., Wagner, F. E. & Berensmeier, S. Influencing factors in the CO-precipitation process of superparamagnetic iron oxide nano particles: A model based study. *J. Magn. Magn. Mater.* **377**, 81–89 (2015).
32. Khalil, M. I. Co-precipitation in aqueous solution synthesis of magnetite nanoparticles using iron(III) salts as precursors. *Arab. J. Chem.* **8**, 279–284 (2015).
33. Cotton, F. A., Wilkinson, G., Murillo, C. A. & Bochmann, M. *Advanced Inorganic Chemistry: Sixth Edition.* 1145 (1999).
34. Yang, C., Wu, J. & Hou, Y. Fe₃O₄ nanostructures: synthesis, growth mechanism, properties and applications. *Chem. Commun.* **47**, 5130 (2011).
35. Cullity, B. D. & Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials.* (Wiley, 2011).
36. Kip, A. F. & Sebastián, J. L. L. *Fundamentos de electricidad y magnetismo.* (Ediciones del Castillo, 1977).
37. Svenson, S. & Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 102–115 (2012).
38. Vallet-Regi M, A. N. D. Magnetic Nanoceramics for Biomedical Applications. in *Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications (2)* 275–312 (The Royal Society of Chemistry, 2016).
39. Hadinoto, K., Sundaresan, A. & Cheow, W. S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85**, 427–443 (2013).
40. Kumar, A. *et al.* Development of hyaluronic acid-Fe₂O₃ hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of peptides. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **3**, 132–137 (2007).
41. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* **112**, 5818–5878 (2012).
42. Maity, A. R. & Stepensky, D. Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: Analysis of research trends and targeting efficiencies. *Int. J. Pharm.* **496**, 268–274 (2015).
43. Makhoulouf, A. S. H. & Abu-Thabit, N. Y. *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications: Volume 1: Types and triggers.* (Elsevier Science, 2018).
44. ANMAT. Farmacopea Argentina. Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de la salud de la Nación. in (2013).
45. The United States Pharmacopeia Convention. The national formulary and dispensing information USP38-NF33. in 1884 (2015).

46. Hildebrandt, B. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **43**, 33–56 (2002).
47. Harmon, B. V *et al.* Cell death induced in a murine mastocytoma by 42–47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**, 845–858 (1990).
48. Horsman, M. R. & Overgaard, J. Hyperthermia: a Potent Enhancer of Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **19**, 418–426 (2007).
49. Mudunkotuwa, I. A. & Grassian, V. H. Histidine adsorption on TiO₂ nanoparticles: An integrated spectroscopic, thermodynamic, and molecular-based approach toward understanding nano-bio interactions. *Langmuir* **30**, 8751–8760 (2014).
50. Churchill, H., Teng, H. & Hazen, R. M. Correlation of pH-dependent surface interaction forces to amino acid adsorption: Implications for the origin of life. *Am. Mineral.* **89**, 1048–1055 (2004).
51. Gao, Q. *et al.* Amino Acid Adsorption on Mesoporous Materials: Influence of Types of Amino Acids, Modification of Mesoporous Materials, and Solution Conditions. *J. Phys. Chem* **112**, 2261–2267 (2008).
52. Milani, P., Demasi, M., de Rezende, L., Amaral, A. T. -d. & Andrade, L. H. Synthesis of <sc>I</sc>-cysteine-based boron compounds and their evaluation as proteasome inhibitors. *New J. Chem.* **38**, 4859–4871 (2014).
53. Viota, J. L., Arroyo, F. J., Delgado, A. V. & Horno, J. Electrokinetic characterization of magnetite nanoparticles functionalized with amino acids. *J. Colloid Interface Sci.* **344**, 144–149 (2010).
54. Jiang, Z. W., Dai, F. Q., Huang, C. Z. & Li, Y. F. Facile synthesis of a Fe₃O₄/MIL-101(Fe) composite with enhanced catalytic performance. *RSC Adv.* **6**, 86443–86446 (2016).
55. Mattheolabakis, G., Milane, L., Singh, A. & Amiji, M. M. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *J. Drug Target.* **23**, 605–618 (2015).
56. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. & Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**, 1303–1313 (1990).
57. Huang, Z., Zhao, C. & Radi, A. Characterization of hyaluronan, hyaluronidase PH20, and HA synthase HAS2 in inflammation and cancer. *Inflamm. Cell Signal.* 1–6 (2014). doi:10.14800/ics.306
58. Wu, H. *et al.* Hyaluronic acid conjugated graphene oxide for targeted drug delivery. *Carbon N. Y.* **69**, 379–389 (2014).
59. Luo, Y. & Prestwich, G. D. Hyaluronic Acid- N-hydroxysuccinimide: A Useful Intermediate for Bioconjugation. *Bioconjug. Chem.* **12**, 1085–1088 (2001).
60. Lemarchand, C., Gref, R. & Couvreur, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 327–341 (2004).
61. Battistini, F. D., Flores-Martin, J., Olivera, M. E., Genti-Raimondi, S. & Manzo, R. H. Hyaluronan as drug carrier. the in vitro efficacy and selectivity of Hyaluronan-Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **65**, 122–129 (2014).

62. Dicker, K. T. *et al.* Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater.* **10**, 1558–1570 (2014).
63. García-Posadas, L. *et al.* CD44 and RHAMM hyaluronan receptors in human ocular surface inflammation. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **252**, 1289–1295 (2014).
64. Song, S. *et al.* Hyaluronan-based nanocarriers with CD44-overexpressed cancer cell targeting. *Pharm. Res.* **31**, 2988–3005 (2014).
65. Skandalis, S. S., Gialeli, C., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. *Advances and advantages of nanomedicine in the pharmacological targeting of hyaluronan-CD44 interactions and signaling in cancer. Advances in Cancer Research* **123**, (Elsevier Inc., 2014).
66. Bourguignon, L. Y. W., Shiina, M. & Li, J. J. *Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. Advances in Cancer Research* **123**, (Elsevier Inc., 2014).
67. Dalerba, P. & Clarke, M. F. Cancer Stem Cells and Tumor Metastasis: First Steps into Uncharted Territory. *Cell Stem Cell* **1**, 241–242 (2007).
68. Bardelli, A. *et al.* PRL-3 Expression in Metastatic Cancers. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5607–5615 (2003).
69. M. Ángeles Gómez del río y Benedí, J. Fármacos antineoplásicos (II). **20**, 5 (2006).
70. Oskarsson, T., Batlle, E. & Massagué, J. Metastatic stem cells: Sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* **14**, 306–321 (2014).
71. Wong, H. L. *et al.* A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharm. Res.* **23**, 1574–1585 (2006).
72. Terán Dávila, J. & Teppa Garrán, A. D. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs): Bioquímica, farmacología y aplicación clínica en ginecología. *Ginecol. Obstet. Mex.* **73**, 424–435 (2005).
73. Top, S. *et al.* Selective estrogen-receptor modulators (SERMs) in the cyclopentadienylrhenium tricarbonyl series: Synthesis and biological behaviour. *ChemBioChem* **5**, 1104–1113 (2004).
74. Yilmaz, S., Gönenç, I. M. & Yilmaz, E. Genotoxicity of the some selective estrogen receptor modulators: A review. *Cytotechnology* **66**, 533–541 (2014).
75. Hall, J. M. & McDonnell, D. P. The estrogen receptor b-isoform (ERb) of the human estrogen receptor modulates ERa transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* **140**, 5566–78. (1999).
76. Cruz Silva, M. M., Madeira, V. M. C., Almeida, L. M. & Custódio, J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1464**, 49–61 (2000).

Capítulo II

*Síntesis de nanopartículas
magnéticas híbridas conjugadas
L-Cis y sus derivados*

2.1. Introducción

En la actualidad, la síntesis de materiales en la escala nanométrica está en un continuo crecimiento y es de gran importancia en el ámbito académico e industrial. Como se mencionó en el Capítulo I *Introducción general*, el campo que estudia las aplicaciones biomédicas de sistemas nanométricos experimentó grandes avances en las últimas décadas. Como ejemplos de estos sistemas se pueden mencionar aquellos que combinan MNPs, con tamaño menor a 100 nm, con moléculas o matrices no tóxicas y biocompatibles, las cuales brindan propiedades particulares, tales como: mayor estabilidad en medios acuosos, capacidad de incorporación de nuevas moléculas, reconocimiento celular, entre otras ^{1,2,3}.

Entre las MNPs para aplicaciones biomédicas se encuentran los de óxidos metálicos como son los de Fe, Zn, Ga o Mn ^{4,5,6,7}. La elección de estos óxidos radica en sus propiedades, entre ellas: alta estabilidad térmica y mecánica, buena estabilidad coloidal, baja toxicidad y alta biocompatibilidad ⁴. Retomando lo presentado en el Capítulo I *Introducción general*, entre los diferentes tipos de óxidos que se pueden emplear con fines biomédicos, las NPs de óxidos de Fe (Fe_3O_4) han cautivado gran interés. Estos óxidos de Fe presentan bajo costo, son fáciles de preparar y pueden ser funcionalizados superficialmente mediante métodos simples ⁸. Además, la característica más relevante para posibles aplicaciones en el área de la nanomedicina, radica en el superparamagnetismo ¹, ya que a través de esta propiedad se podría lograr una liberación controlada de un fármaco en un sitio de acción específico bajo la influencia de un campo magnético externo ⁹.

Como se mencionó en el capítulo precedente, uno de los factores más relevantes que afecta a las NPs en un medio biológico es su tamaño, ya que NM menores a 50 nm y superiores a 200 nm pueden ser detectados por el sistema inmune y, posteriormente, eliminados por los mecanismos de defensa del

huésped, e incluso en algunos casos se puede generar respuesta tóxica ^{10,11}. Esta es la razón por la cual el método de síntesis para la obtención de MNPs y su posterior funcionalización son claves para adecuar las propiedades de un dado NM ².

En muchos casos, estos deben ser preparados e inmediatamente estabilizados o funcionalizados para poder resolver diversas problemáticas, como por ejemplo la agregación del material ¹². En el caso de las MNPs constituidas por óxidos de Fe, éstas presentan un alto grado de aglomeración cuando no están funcionalizadas ¹³. Sin embargo, ya que son consideradas altamente reactivas en su superficie, son capaces de adherir otros metales, ligandos orgánicos y compuestos que pueden conferirle propiedades específicas como, por ejemplo, mayor estabilidad ^{14,15}.

Estos sistemas, pueden ser clasificados como NHM, al estar compuestos por la combinación de materiales orgánicos e inorgánicos. Diferentes tipos de aminoácidos se han utilizado para conjugar los núcleos magnéticos. Entre éstos se encuentran el ácido *L*-glutámico, *L*-serina, glicina y *L*-cisteína (*L*-Cis) ¹⁶. Además, como se mencionó en el Capítulo I *Introducción general*, diversos polímeros sintéticos o naturales también han sido conjugados con MNPs, entre ellos: polivinilpirrolidona (PVP), AH, polietilenglicol y polivinil alcohol, entre otros ¹⁷.

Este tipo de moléculas orgánicas demostraron ser capaces de modificar eficientemente las propiedades superficiales de las MNPs, mejorando su afinidad a medios acuosos. Adicionalmente, algunas de ellas tienen la capacidad de conferirles cierta especificidad para interactuar con algunos receptores sobre expresados en células tumorales, como es el caso del AH ¹⁸. Es así que se pueden encontrar estudios previos referidos a sistemas Fe₃O₄-PVP, Fe₃O₄-AH o Fe₃O₄-*L*-Cis ^{19,1,20}. En este sentido, el potencial que exhiben los NHM

en el área de la nanomedicina hacen de estos materiales de gran interés para ser estudiados.

2.1.1. Síntesis de MNPs de Fe₃O₄

Las MNPs magnéticas, específicamente las que involucran un núcleo de Fe, pueden ser obtenidas mediante una gran cantidad de metodologías como ya fue mencionado en la sección 1.2.1.1. Muchas de estas metodologías implican el uso de reactivos costosos o condiciones especiales de reacción en equipos específicos ²¹, además de presentar desventajas como una alta polidispersidad de las partículas obtenidas, alta toxicidad por los reactivos empleados, entre otros aspectos ²². El método de coprecipitación es una técnica conveniente para obtener MNPs a temperatura ambiente y mediante protocolos sencillos ². Esta metodología involucra el uso de sales económicas, así como de reactivos comerciales fácilmente disponibles como NaOH o NH₄OH ²³. La forma y el tamaño de las MNPs pueden ser manipulados mediante el ajuste de variables experimentales tales como: pH de la mezcla de reacción, temperatura, fuerza iónica o concentraciones de las sales inorgánicas empleadas. De esta forma, bajo condiciones específicas, se pueden obtener de manera reproducible, MNPs con un porcentaje de rendimiento superior al 85% ²⁴.

2.1.2. Interacción de MNPs de Fe₃O₄ con L-Cis

El α -aminoácido L-Cis presenta en su estructura una cadena alifática y tres grupos funcionales: amonio (-NH₃⁺), carboxilato (-COO⁻) y tiol (-SH). Además, es posible encontrar L-Cistina, el cual es un dímero de la L-Cis y presenta una unión disulfuro entre cada L-Cis, tal como se muestra en la (Figura 2.1a). Ambos compuestos presentan estructura de zwitterion y, comercialmente, se los puede encontrar como clorhidrato.

Estos compuestos presentan una elevada solubilidad en medios acuosos. La interacción de aminoácidos con MNPs, podría conferirle a los NMH

formados un mayor carácter hidrofílico, lo cual es una propiedad muy buscada para posibles aplicaciones en nanomedicina (Figura 2.1b). La *L*-Cis, es un aminoácido no esencial, sintetizado por humanos y es un candidato adecuado para la obtención de NHM biocompatibles ¹⁶. La interacción entre MNPs y α -aminoácidos como *L*-Cis ya ha sido objeto de estudio en trabajos previos, dado que este tipo de moléculas han sido utilizadas como modelos para estudiar la adsorción y condensación de péptidos y proteínas con minerales, interacciones que pueden haber jugado un papel decisivo en el origen de la vida ^{25,26}

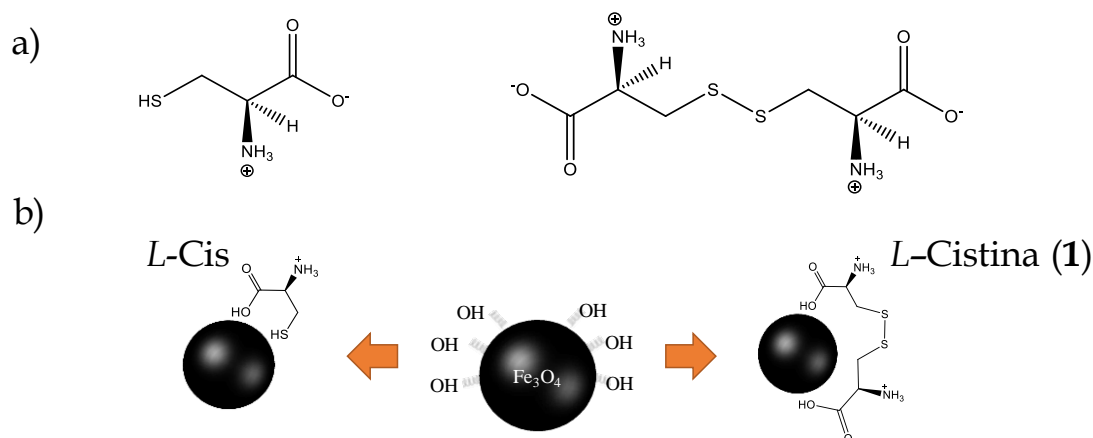


Figura 2-1: a) Estructura química de la *L*-Cis y *L*-Cistina, b) Interacciones de las moléculas de *L*-Cis y *L*-Cistina con MNPs

Diversos estudios demostraron que los α -aminoácidos son ligandos apropiados para modificar superficialmente NPs de óxido de Fe ²⁷. En general, éstos poseen una fuerte tendencia a enlazarse a la superficie hidroxilada de las MNPs, modificando notablemente sus propiedades electrostáticas.

En estos estudios, la presencia de la cadena lateral de la *L*-Cis, con un grupo sulfhidrilo le confieren comportamiento diferenciado comparado con el resto de la serie de α -aminoácidos, tal como fue mencionado en la sección 1.3.3 del Capítulo I.

Los diferentes estudios de funcionalización de MNPs con *L*-Cis sugieren que este ligando puede enlazarse fuertemente por medio de uno o varios de sus grupos funcionales, por ejemplo por el grupo $-\text{COO}^-$, dejando expuestos tanto al grupo $-\text{NH}_3^+$ como al grupo $-\text{SH}$ ²⁸. Independientemente, el grupo $-\text{SH}$ puede experimentar un proceso de oxidación en la superficie de la MNPs para dar lugar a la formación del dímero *L*-Cistina ¹⁶. Por lo tanto, la presencia de α -aminoácidos tiene un gran impacto sobre la síntesis, distribución del tamaño de partícula y estabilidad coloidal de dispersiones acuosas de MNPs ²⁸.

2.2. Objetivos

En virtud de la aplicación de los NMH, tanto para la detección temprana de enfermedades como para el transporte de fármacos hacia un sitio de acción diana; se planteó el objetivo específico de este capítulo de tesis, el cual consiste en adaptar y combinar diversas metodologías de síntesis en medios inocuos, con la finalidad de obtener NMH altamente biocompatibles para ser utilizados como sistemas portadores fármacos. Para esto se seleccionaron como ligandos de las MNPs a la *L*-Cis y el AH.

En este marco, se planteó el desarrollo de métodos de síntesis para la obtención de MNPs conjugadas con *L*-Cis y sus derivados. Asimismo, se analizó el comportamiento fisicoquímico de los sistemas obtenidos y su interacción, a fin de racionalizar las propiedades obtenidas con la estructura de los NMH. Todos los sistemas obtenidos fueron caracterizados mediante diversas técnicas microscópicas, espectroscópicas, difractométricas y calorimétricas, tales como: microscopia electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía de correlación fotónica (DLS), potencial electrocinético (ζ), difracción de rayos X de polvos (PDRX), análisis termogravimétrico (TGA), espectrofotometría ultravioleta (*UV-vis*) y magnetometría de muestra vibrante (VSM).

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Obtención de nanopartículas de MNPs (Fe_3O_4)

Para la obtención de los núcleos magnéticos de Fe_3O_4 , se seleccionó el método de coprecipitación, ya que evita el uso de solventes orgánicos (Ec 1.1) ²⁹. Dado que este tipo de metodología de síntesis puede generar MNPs con una alta polidispersabilidad y baja reproducibilidad, se debe tener un estricto control en las características de reacción, con el fin de obtener MNPs con características definidas.

Por tal motivo, se evaluaron diversos factores, como concentración de reactivos, velocidad de agitación y la necesidad de incorporación de un polímero estabilizante de baja toxicidad como el PVP ³⁰.

Inicialmente, se partió de una mezcla de soluciones de sales provenientes de cloruros de Fe^{2+} y Fe^{3+} , a las cuales se las hizo reaccionar con un exceso de base fuerte (NaOH) como débil (NH_4OH), ya que de esta manera se aseguraba un proceso rápido de nucleación y crecimiento de las MNPs ³¹. Una vez finalizado el proceso de síntesis de las MNPs, lo cual dio lugar a una dispersión oscura, se procedió a una etapa de lavado que se realizó con una mezcla de solventes (H_2O :etanol 1:1 v/v) y, finalmente, se separaron las MNPs mediante la aplicación de un campo magnético externo, empleando un imán de neodimio comercial.

Sobre la base de las diferentes condiciones experimentales estudiadas, se analizó el efecto de la naturaleza y concentración de la base seleccionada, la relación Fe:base y la presencia del polímero estabilizante PVP sobre el tamaño y composición de las MNPs obtenidas. Los resultados más relevantes se muestran condensados en la Tabla 2.1.

Tabla 2-1: Obtención de MNPs de Fe₃O₄ por el método de coprecipitación. ^a

Muestra	Relación Fe: base	Base	Estabilizante ^a	Rendimiento (%) ^b	Tamaño MNPs (nm) ^c
1	3:8	NaOH (0,7 M)	--	N.F ^d	N.D. ^e
2	3:8	NH ₄ OH (0,7 M)	--	N.F ^e	N.D. ^e
3	3:22		--	85 %	7 ± 2
4			PVP (16 mg/mL)	36 %	5 ± 1

Condiciones de reacción: Agitación mecánica por 30 minutos, temperatura ambiente, y atmósfera de N₂ y. a- Adicionado en función del rendimiento teórico de Fe₃O₄. b- Calculado en función del rendimiento teórico de la Fe₃O₄ y las masas aditivas de los estabilizantes utilizados. c- Determinado por TEM. d-N.F: no ocurrió la formación de MNPs. e- N.D.: no determinado.

Como se puede observar, cuando se empleó una relación estequiométrica entre Fe:base, siendo la base NaOH o NH₄OH, no tuvo lugar la formación de las MNPs (muestras 1 y 2). Mientras que, las condiciones de reacción que dieron lugar a la formación de MNPs de tamaño nanométrico y elevado rendimiento, fueron NH₄OH 0,7 M y una relación Fe:base 3:22 (muestras 3 y 4). Con respecto a la caracterización del nanomaterial obtenido, con y sin PVP, se estudió la morfología, tamaño y distribución de tamaños mediante análisis TEM (Figura 2.2 b y c). Este análisis permitió establecer que el tamaño obtenido para las MNPs estabilizadas con PVP fue de (5±1) nm; mientras que para las MNPs en ausencia de estabilizante fue (7±2) nm. Esto mostró que, independientemente de la presencia o no ausencia de estabilizante, esta metodología permitió obtener MNPs uniformes y de tamaños nanométricos.

En la Figura 2.2a se presentan, además, los espectros FT-IR para los dos sistemas con y sin PVP, como del ligando PVP. En los espectros con y sin PVP se observaron bandas de absorción alrededor de 580 cm⁻¹, correspondientes a la tensión del enlace Fe-O características de la estructura de espinela de Fe₃O₄, junto con la banda a 3420 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento simétrico de los

grupos -OH presentes en la superficie de las MNPs ³⁰. Por otro lado, las MNPs-PVP presentaron bandas a 2915 y 1664 cm^{-1} , características de los grupos funcionales presentes en la estructura del PVP, correspondientes a los estiramientos de los enlaces -CH alifático y del grupo -C=O, respectivamente. Antecedentes bibliográficos indican que la interacción entre las MNPs y el PVP se da mediante una coordinación entre los grupos -C=O y los -OH superficiales de las MNPs. ³²Adicionalmente, los grupos -OH de las MNPs junto con presencia de agua en el material (región entre los 3500 a los 2700 cm^{-1}) se da un solapamiento de la banda alrededor de los 2900 cm^{-1} correspondiente a los estiramiento -CH del PVP, lo cual se ve reflejada en una aparente disminución de la banda. Estos resultados indican que la incorporación del estabilizante PVP al núcleo magnético se dio de manera exitosa ³⁰.

Se determinó la magnetización del núcleo de Fe_3O_4 obtenido sin adición de PVP (Figura 2.3a) mediante el uso de la técnica VSM. Esta técnica permite caracterizar el comportamiento magnético de un material, así como también otros parámetros útiles como son la magnetización de saturación, histéresis, imanación remanente y coercitividad intrínseca ³³. Los materiales de tamaños nanométricos presentan un comportamiento superparamagnético el cual se caracteriza por presentar una imanación remanente y coercitividad intrínseca cercana a cero, viéndose reflejado en un ciclo de histéresis cuya área encerrada es nula a temperatura ambiente.

Mediante el análisis por VSM, la saturación medida para las MNPs fue de 60 emu/g, valor que está en concordancia con informes previos para esta fase ³⁴. Este valor de saturación, junto con coercitividades y remanencias nulas a temperatura ambiente dan cuenta de un comportamiento característico para MNPs superparamagnéticas. Sin embargo, para corroborar esta propiedad sería necesaria la determinación de la magnetización a bajas temperaturas (cerca de 5 K - 50 K) ³⁵. Cabe mencionar que, MNPs que presentan este comportamiento son fácilmente magnetizadas con bajos campos coercitivos y alta saturación ³⁶.

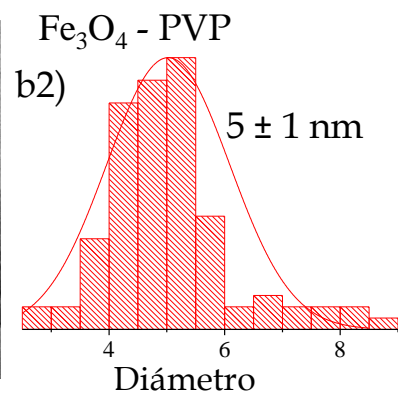
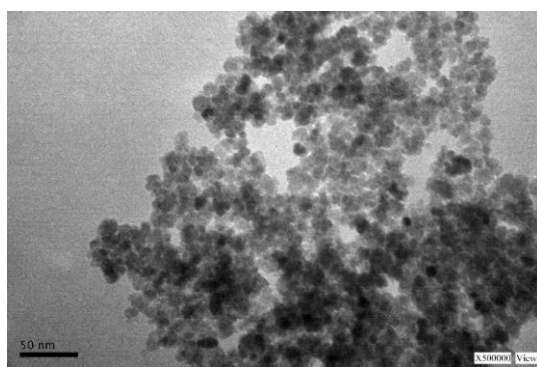
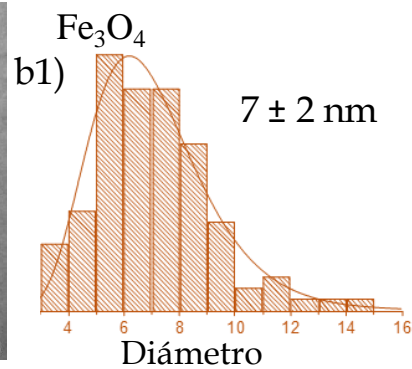
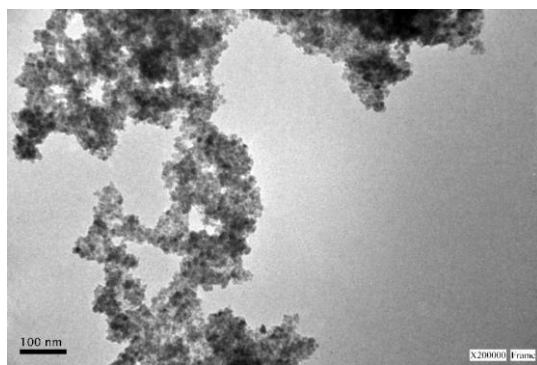
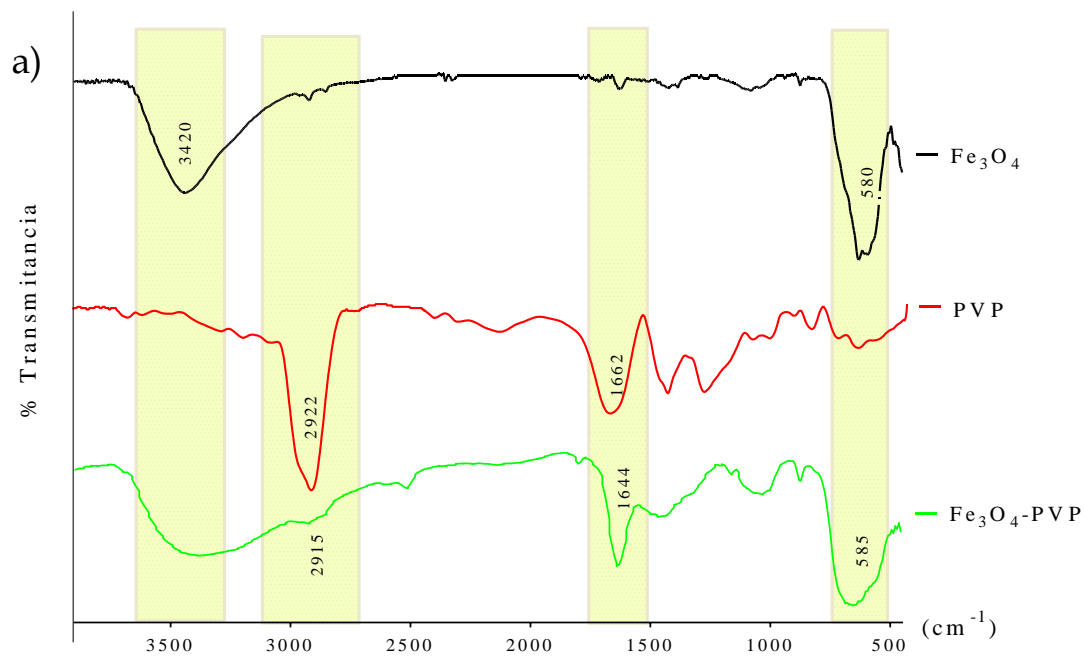


Figura 2-2: Análisis a) FT-IR realizado para: Fe_3O_4 (negro), Fe_3O_4 -PVP (verde), PVP (rojo), b) Ensayo TEM para MNPs b1) sin estabilizante y b2) con PVP, respectivamente.

Adicionalmente, se estudió el comportamiento cristalino de las MNPs con y sin PVP mediante la técnica de PXRD (Figura 2.3b). A partir de este análisis se observó, en ambas partículas, la formación de una fase cristalina de Fe_3O_4 , la cual presentan una estructura cúbica centrada en las caras (FCC),

grupo espacial $Fd3m$, una dimensión de celda unidad a igual 0,8396 y picos característicos para ángulos 2θ iguales a: $30,5^\circ$, $35,9^\circ$, $43,5^\circ$, $54,0^\circ$, $57,5^\circ$, y $63,1^\circ$ correspondientes a los índices de Miller (220), (311), (400), (422), (511) y (440), respectivamente ²¹. Estos valores se corresponden a los informados de acuerdo con la tarjeta No. 19-0629 indexada por el Centro internacional para datos de difracción (JCPDS, por sus siglas en inglés).

La comparación de los espectros obtenidos indicó que las MNPs con y sin PVP presentan patrones de difracción coincidentes (Figura 2.3b), lo que demostró la formación de la fase cristalina de Fe_3O_4 ⁴⁴, aun en presencia del estabilizante.

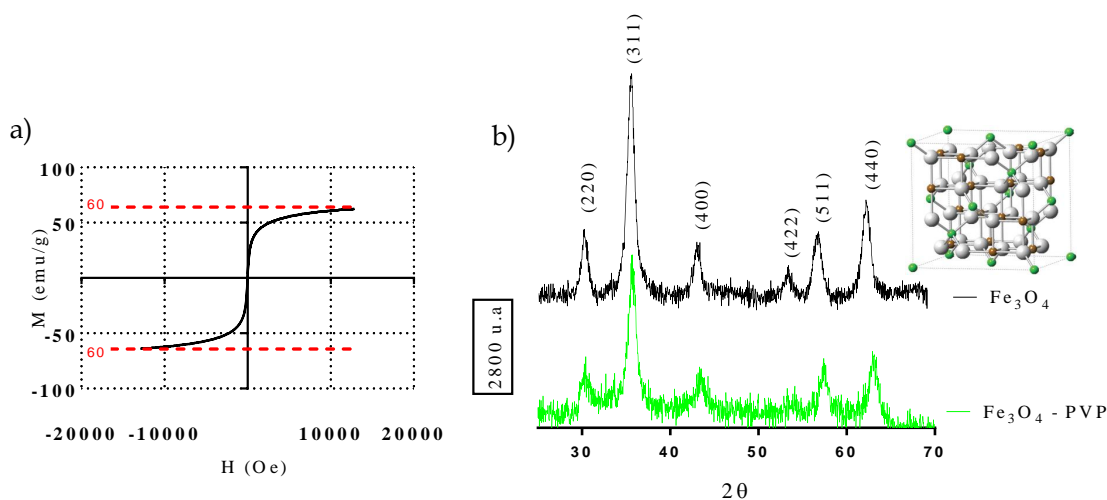


Figura 2-3: Caracterización de MNPs a) magnetometría de muestra vibrante (VSM) para Fe_3O_4 . b) difractogramas de MNPs con PVP (verde) y MNPs sin PVP (negro).

Además de los estudios mencionados en el párrafo anterior, mediante PDRX, se evaluó la estabilidad de las MNPs sin PVP, con la finalidad de observar si eran susceptibles de experimentar un proceso de oxidación con el paso del tiempo y cambiar a una fase de Fe_2O_3 (maghemita) ³⁷. Para corroborar estos aspectos, una dispersión de las MNPs se dejó reposar durante 3 meses luego de ser preparada y, posteriormente, las partículas se analizaron con esta técnica (Figura 2.4). Este estudio reveló que las MNPs obtenidas, aún en ausencia de estabilizante, son lo suficientemente estables para ser almacenadas al menos durante 3 meses sin mostrar cambios significativos en su estructura

crystalina. Sin embargo, se observa una disminución en la intensidad de los picos, lo cual indicaría que el material podría estar sufriendo un leve de pérdida de cristalinidad.

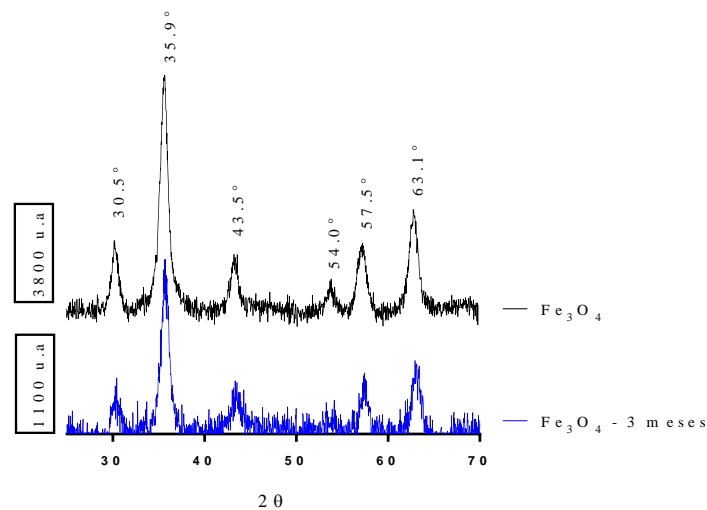


Figura 2-4 : Análisis DRX para evaluar la estabilidad de las MNPs sintetizadas en ausencia de PVP, entre 0 meses y 3 meses.

2.3.2. MNPs funcionalizadas con *L*-Cis y sus derivados

Con el propósito de evaluar la funcionalización superficial de las MNPs con *L*-Cis, así como también para estudiar las interacciones que tienen lugar entre la MNPs y este ligando orgánico, se sintetizaron una serie de derivados de la *L*-Cis, los cuales fueron empleados como modificadores superficiales de las MNPs. Además, con estos estudios se evaluó cómo la presencia de *L*-Cis afecta la estabilidad y dispersabilidad coloidal de las MNPs en medio acuoso. De esta forma, se sintetizaron MNPs-*L*-Cis siguiendo la estrategia previamente detallada en la sección 2.3.1, mediante el método de coprecipitación. Una vez obtenidos los núcleos magnéticos, se incorporó el ligando *L*-Cis (Figura 2.5). En el experimento no se incorporó la *L*-Cis durante el proceso de síntesis de las MNPs, dado que este aminoácido puede participar en reacciones de oxidación en medio básico ³⁸.

Para efectuar la modificación superficial de las MNPs preformadas, se las dispersó en medio etanólico. Seguidamente, se incorporó en el medio de

reacción una solución acuosa de *L*-Cis. Teniendo en cuenta que la *L*-Cis en solución acuosa presenta diversos equilibrios ácido-base, que pueden involucrar diferentes especies, entre ellas una estructura zwitteriónica (Ec. 2.1), la *L*-Cis fue agregada al medio de reacción disuelta en buffer carbonato, evaluando diferentes valores de pH.

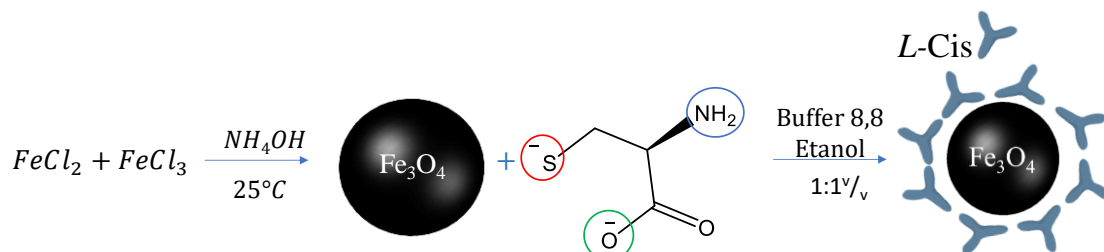
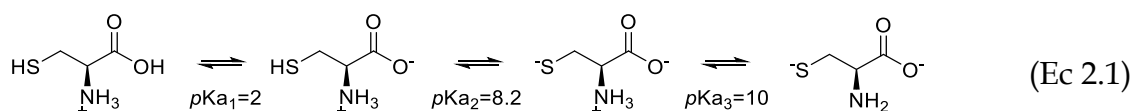


Figura 2-5: Esquema de síntesis de MNPs funcionalizadas con *L*-Cis bajo las condiciones óptimas de síntesis.



Se evaluaron diferentes condiciones de pH a saber 7, 8, 8,8 y 9,7 para la modificación superficial de las MNPs con *L*-Cis; con la finalidad de establecer la condición de síntesis óptima para la obtención de las MNPs-*L*-Cis. Cabe destacar que a pH 7 se obtuvieron partículas con un alto grado de aglomeración junto con un tamaño superior a 10 nm, por lo cual esta condición de síntesis fue descartada.

En primer lugar, se analizaron las MNPs funcionalizadas a pH 8, 8,8 y 9,7. La incorporación de *L*-Cis en las MNPs preparadas en presencia de PVP (MNPs-PVP) se analizó por FT-IR. En la Figura 2.6 se detallan los resultados obtenidos para cada una de las muestras bajo las diferentes condiciones de pH evaluadas. Las MNPs-PVP se sometió a un proceso de intercambio de ligando con la *L*-Cis, tal como se evidenció en los espectros de FT-IR, al analizar la zona entre 500 a 2000 cm^{-1} , se observó la aparición de bandas características de la *L*-Cis y de la Fe_3O_4 . En estos casos se observó la tensión Fe-O en la región del espectro entre 580 a 614 cm^{-1} . Para las muestras MNPs-*L*-Cis preparadas a

los diferentes pH, se observó que la banda característica del grupo -COOH de *L*-Cis a 1743 cm^{-1} se desplazó por debajo de 1650 cm^{-1} cuando interaccionó con las MNPs. Este corrimiento de la banda está asociado a la deprotonación y subsecuente interacción de los grupos -COO⁻ de *L*-Cis con las MNPs (Figura 2.6) ^{16,39}.

De esta forma, por espectroscopia FT-IR el sistema obtenido no mostró grandes diferencias con respecto al cambio de pH en el proceso de funcionalización para obtener las MNPs-*L*-Cis. Adicionalmente, en ningún caso fue posible asegurar que tuvo lugar la remoción completa del PVP de la superficie de la MNPs.

Al analizar comparativamente los resultados de PDRX correspondientes a los núcleos magnéticos obtenidos a día 0 y luego de 3 meses, se evidenció que las MNPs sin funcionalizar eran lo suficientemente estables en el tiempo. Teniendo en consideración los resultados de FT-IR, en donde no fue posible asegurar si se produjo o no un proceso de intercambio de ligando completo, se decidió descartar el uso de PVP como estabilizante adicional en la síntesis de las MNPs, con el fin de disminuir la complejidad química del sistema final. En consecuencia, se prefirió partir de MNPs sin PVP para continuar con las posteriores etapas de funcionalización.

Con la finalidad de definir el pH de trabajo para la modificación superficial de las MNPs se analizó si el pH en el medio producía algún cambio significativo sobre la estructura de las MNPs. Para ello, se determinó el diámetro hidrodinámico (d_H) junto con su (ζ). Los resultados obtenidos se muestran condensados en la Tabla 2.2 y se utilizaron para inferir posibles agregaciones de las partículas en dispersión.

A partir de estos resultados, se observó que todos los sistemas presentaron un alto grado de índice de polidispersidad de tamaño (PDI)

encontrándose valores entre 0,41 y 0,56, lo que indicó que se encontraron poblaciones de las MNPs de diferentes tamaños.

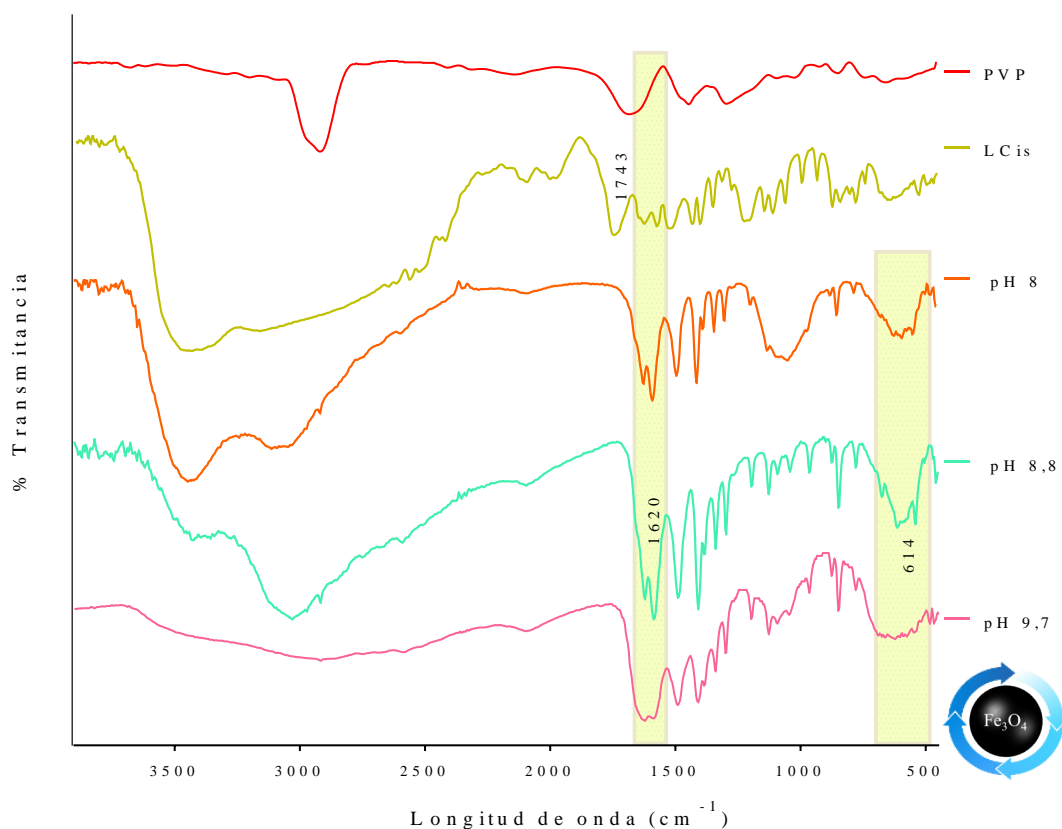


Figura 2-6: Análisis de FT-IR de MNPs-L-Cis obtenidas mediante intercambio de ligando a diferentes pHs: 8 (naranja), pH 8,8 (celeste), pH 9,7 (rosa), L-Cis (mostaza), PVP (rojo)

Tabla 2-2: Diámetro hidrodinámico (d_H), índice de polidispersidad (PDI) y ζ de las MNPs dispersas en buffer de carbonatos bajo diferentes condiciones de pH.

MNPs	Buffer de carbonatos	d_H (nm) $\times 10^2$	PDI	ζ (mV)
Fe ₃ O ₄	pH 6	9 ± 2	0,56	21,92
	pH 8,8	$2,5 \pm 0,6$	0,49	26,07
	pH 11	7 ± 2	0,41	-25,46

Sin embargo, a pesar de observar una PDI de 0,49 para un pH de 8,8, bajo estas condiciones se evidenció que el d_H de las MNPs era el menor comparado con las partículas obtenidas en las otras condiciones. La Figura 2.7 muestra la distribución de tamaños para las MNPs obtenidas en las diferentes condiciones de síntesis.

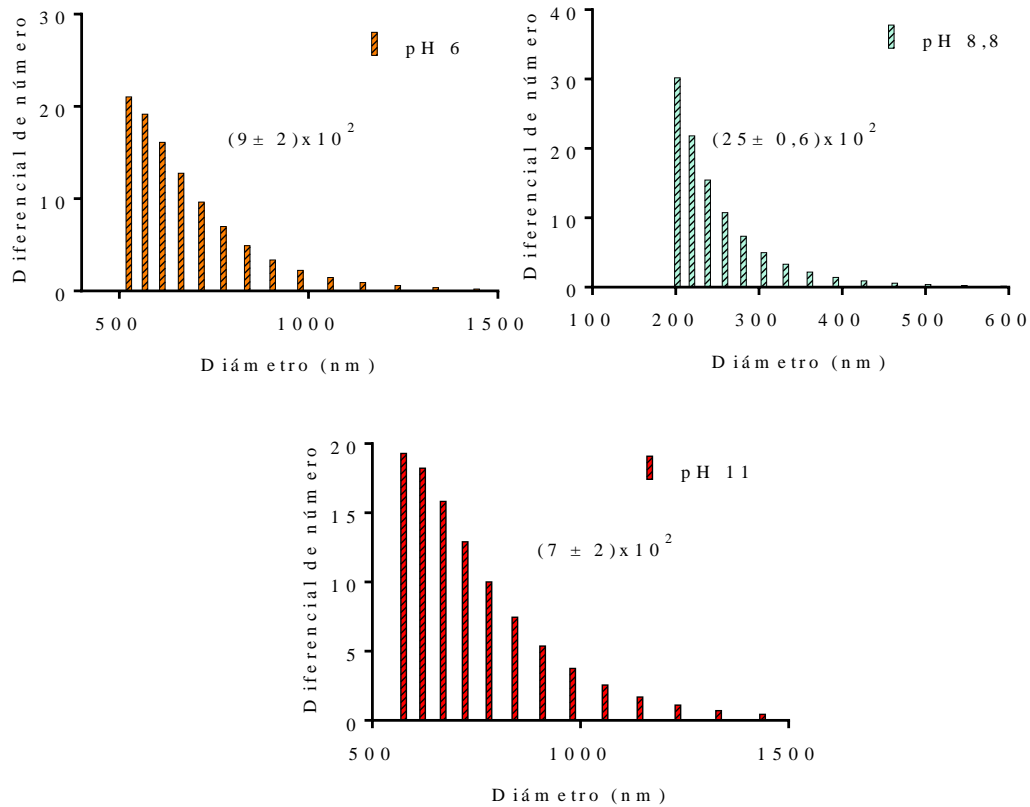


Figura 2-7: Análisis de dispersión dinámica de luz DLS a MNPs con: pH de 6 (naranja), pH 8,8 (celeste) y pH 11 (rojo). Todos los tamaños de partícula se expresan $\times 10^2$

Por otro lado, el ζ se mantuvo con una carga neta superficial positiva para las condiciones de pH 6 y 8,8; sin embargo, a pH de 11 se observó inversión de la carga superficial. Estos resultados indicaron que las MNPs presentaban su punto isoeléctrico en un intervalo de pH entre 8,8 y 11 ⁴⁰.



Figura 2-8: Potencial electrocinético para Fe_3O_4 para valores de pH menores 8 y mayores de 11

De acuerdo con los resultados obtenidos, se definió un pH de trabajo de 8,8, ya que las partículas presentaban una carga superficial positiva y el menor d_H , lo que podría indicar una menor agregación del sistema.

Dado que, a este pH de trabajo, la especie que predomina en el equilibrio corresponde a la especie monoaniónica de *L*-Cis, con sus grupos funcionales -SH y -COOH totalmente desprotonados (Ec 2.2), las partículas de MNPs-*L*-Cis fueron obtenidas en estas condiciones, con una morfología cercana a la esférica y con tamaños de partículas de (8 ± 2) nm determinados por TEM (Figura 2.9); además de presentar el 79% de rendimiento en el proceso de obtención.

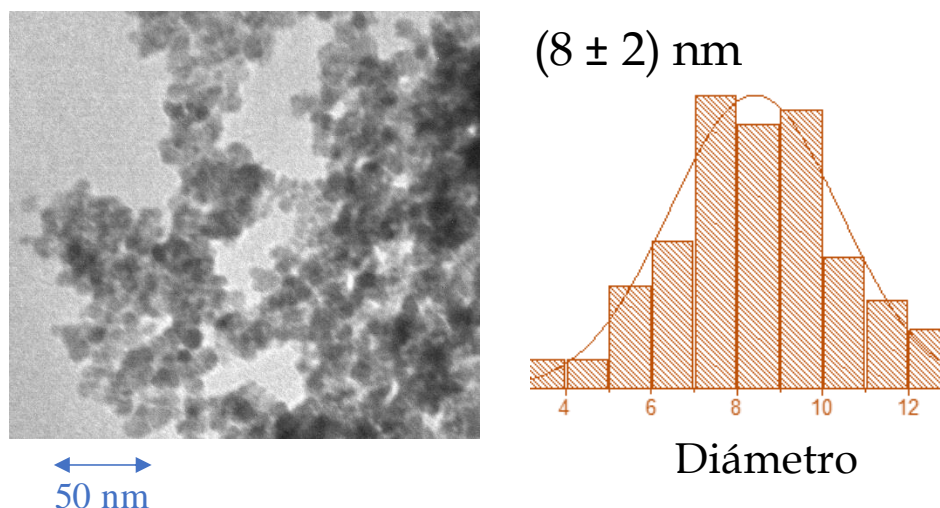
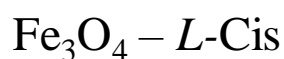


Figura 2-9: Análisis de distribución de tamaños mediante micrografía TEM para Fe_3O_4 -*L*-Cis

Con el fin de evaluar qué grupos funcionales de la *L*-Cis presentaban mayor afinidad por la superficie de las MNPs, se sintetizaron derivados de *L*-Cis, tal como se discute en la siguiente sección.

2.3.3. Obtención de derivados de *L*-Cis

De acuerdo con la estructura química de la *L*-Cis, ésta puede dar lugar a interacciones de tipo electrostáticas, enlaces de tipo puente de hidrógeno o

enlaces covalentes, de acuerdo con la afinidad y disponibilidad de sus grupos funcionales: $-\text{NH}_3^+$, $-\text{COO}^-$ y $-\text{SH}$ ⁴¹.

Al considerar sus equilibrios ácido-base (Ec 2.2) y el pH de trabajo de 8,8, la especie predominante será aquella que tenga los grupos funcionales $-\text{COO}^-$ y $-\text{S}^-$ ¹⁶. Para determinar que grupos funcionales de *L*-Cis tenía más afinidad por las MNPs, mediante diferentes estrategias de protección química se realizó una restricción progresiva de los grupos funcionales $-\text{NH}_3^+$, $-\text{COO}^-$ y $-\text{SH}$. Para ello, se dispuso de tres derivados (D) de *L*-Cis (*L*-Cis-D): *L*-Cistina (1), *L*-Cistina metil éster (2) y *N*-Boc-*L*-Cisteína metil éster (3), para ser estudiados como ligandos de las MNPs (Figura 2.10). Si bien el compuesto 1 es comercial, los compuestos 2 y 3 fueron sintetizados para su evaluación.

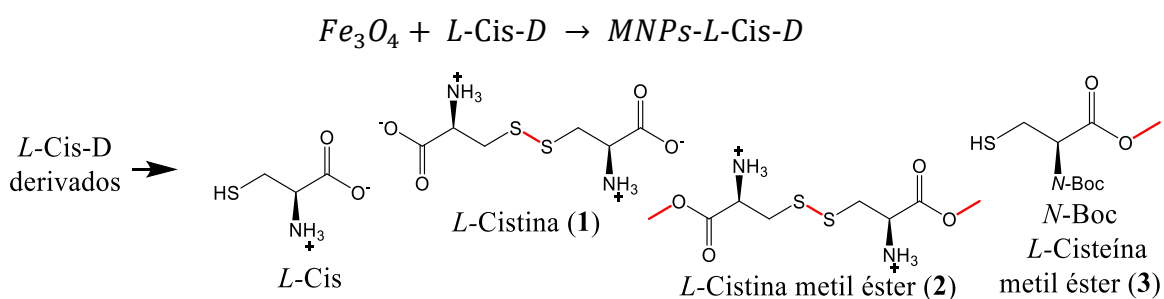


Figura 2-10: Estudio de interacción entre las MNPs y los derivados de *L*-Cis

Para la obtención de los derivados 2 y 3 de *L*-Cis, se propuso como estrategia sintética partir del derivado comercial *L*-Cistina (1), el cual, al ser un dímero de la *L*-Cis trae por defecto la protección del grupo S-H, por medio de un enlace disulfuro (S-S), mientras que tiene expuestos tanto al grupo COOH como al NH_3^+ . La estrategia propuesta consistió en una adaptación de una metodología previamente informada, la cual se presenta en la Figura 2.11 ^{42,43}.

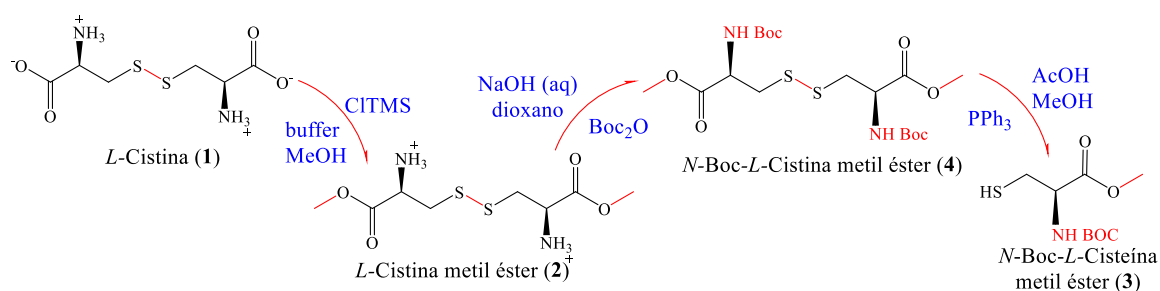


Figura 2-11: Estrategia sintética para la obtención de los derivados **2** y **3** de *L*-Cis

Como primera etapa se obtuvo el derivado *L*-Cistina metil éster (**2**), mediante una reacción de esterificación de los dos grupos $-\text{COO}^-$. La protección del grupo ácido carboxílico se llevó a cabo mediante el uso del cloruro de tetrametilsilano como agente metilante ⁴². El producto obtenido en la reacción fue analizado mediante ¹H-RMN (Figura 2.12). Este análisis confirmó la obtención del compuesto **2**, ya que en el espectro de ¹H-RMN se observó la presencia del grupo $-\text{COO}-\text{CH}_3$, por la aparición de un pico a 3,88 ppm el cual integró 6 protones, señal que no se observó para el reactivo **2** de partida. Además, se observaron picos característicos correspondientes al resto de la molécula del compuesto **4**: a 4,58 ppm (1H, t, $(-\text{CH}-\text{NH}-)$) y 3,45-3,33 ppm (2H, m, $(-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_3)$). De esta forma, se obtuvo un derivado en el cual solo el grupo $-\text{NH}_3^+$ está disponible para interactuar con las MNPs, mientras que los grupos S-S y $-\text{COO}-\text{CH}_3$ se encuentran bloqueados.

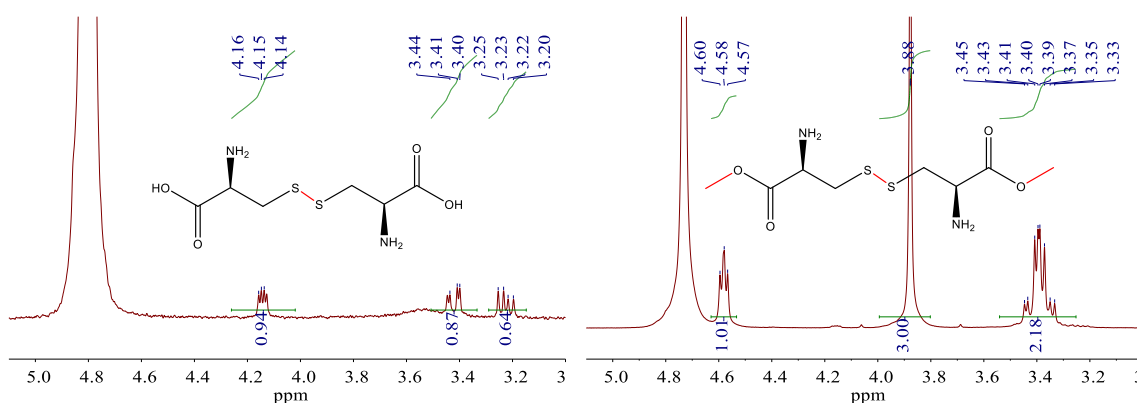


Figura 2-12: Análisis ¹H-RMN para el compuesto de *L*-Cistina metil éster (**2**) en comparación con *L*-Cistina (**1**)

En una etapa siguiente se continuó con la protección del grupo NH_3^+ del compuesto **2**. Para ello, se empleó el reactivo di-*tert*-butil dicarbonato (Boc_2O), (Figura 2.10), conocido por proteger grupos amino en aminoácidos y péptidos.

La formación de un grupo *tert*-butoxicarbamato (-Boc) tuvo lugar por reacción con el grupo $-\text{NH}_3^+$, bloqueándolo para futuras reacciones (Figura 2.11). Por lo que, de esta manera, se obtuvo el compuesto **4**. Similarmente, el producto de esta reacción, fue analizado por ^1H -RMN (Figura 2.13). Este análisis confirmó la protección del grupo amino, ya que un pico importante a 1,42 ppm integró para 18 protones y mostró la presencia de los tres grupos $-\text{CH}_3$ pertenecientes al grupo *tert*-butilo del protector (-Boc) unido al grupo amino. También, el espectro exhibió un pico en 3,77 ppm, el cual integró para 6 protones correspondientes al grupo $-\text{COOCH}_3$, lo que evidenció que la metilación del grupo $-\text{COOH}$ se mantuvo durante la reacción. Adicionalmente, se observaron picos característicos de los protones pertenecientes al resto de la molécula del compuesto **4**: a 5,38 ppm ($-\text{NH}-\text{CO}$); 4,62 ppm ($-\text{CH}-\text{NH}-$) y 3,17 ppm ($-\text{CH}_2-\text{COOCH}_3$). Con la protección del grupo NH_3^+ del compuesto *L*-Cistina metil éster **2**, se bloqueó toda posibilidad de la molécula para unirse mediante un enlace con otros compuestos, ya que la molécula **4** presenta impedimentos en todos los posibles sitios de unión.

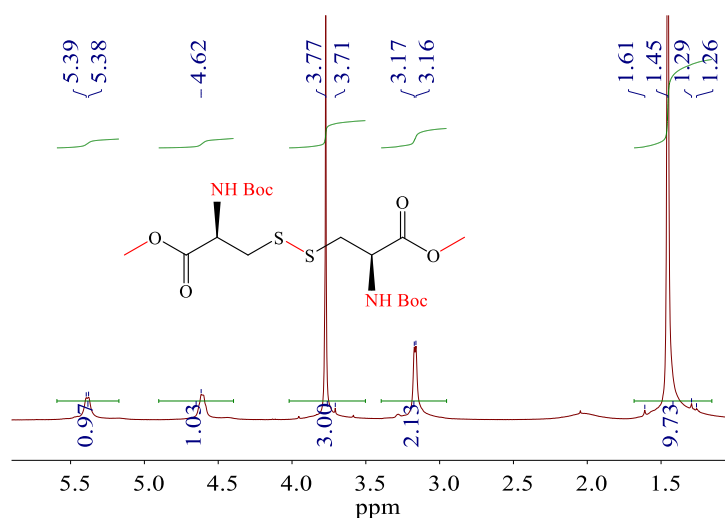


Figura 2-13: Análisis ^1H -RMN para el compuesto de N-Boc- *L*-Cistina metil éster (**4**)

Finalmente, se realizó la ruptura del enlace disulfuro (S-S), partiendo del compuesto **4**, con la finalidad de obtener el derivado *N*-Boc-*L*-Cisteína metil éster (**3**), el cual deja expuesto únicamente el grupo -SH. La metodología propuesta involucró la reducción del puente disulfuro por reacción con trifenilfosfina (Figura 2.11) y el producto que se obtuvo, luego de ser purificado por cromatografía en columna, fue analizado por ¹H-RMN (Figura 2.14a). El espectro mostró un pico en 3,79 ppm que integró para 3 protones del grupo -COOCH₃. Mientras que, el pico a 1,46 ppm integró para 10 protones correspondientes al grupo (-OCOC(CH₃)₃) de la protección del grupo amino, junto con el protón del grupo -SH ⁴⁴. La diferencia más evidente con el compuesto **4**, se observó con el corrimiento de la señal correspondiente al grupo -CH₂COO- de 3,17 ppm en **4** a 2,98 ppm en **3**. Dado que no fue posible observar un pico intensamente definido correspondiente al -SH mediante esta metodología, ya que esta señal se encuentra solapada con los grupos -CH₃ del -Boc, se realizó el análisis por FT-IR mediante una comparación entre el espectro de la *L*-Cis y la *N*-Boc-*L*-Cisteína metil éster (**3**), en donde se demostró la presencia del grupo -SH debido al estiramiento simétrico del enlace -SH observado alrededor de 2500 cm⁻¹ (Figura 2.14b) ³⁹.

Para evaluar la interacción de las MNPs con *L*-Cis y sus derivados, se realizó la funcionalización de los núcleos magnéticos mediante dos etapas, siguiendo el mismo protocolo utilizado para la incorporación de *L*-Cis (Figura 2.5). En la primera etapa se prepararon las MNPs sin estabilizante y, posteriormente, se preparó una dispersión etanólica de las MNPs, a la cual se le adicionó el ligando orgánico (**1**, **2**, o **3**) disuelto en buffer carbonato pH 8,8. Los NHM obtenidos fueron separados magnéticamente, lavados con una solución etanólica al 50% v/v y secados con exposición al aire a temperatura ambiente.

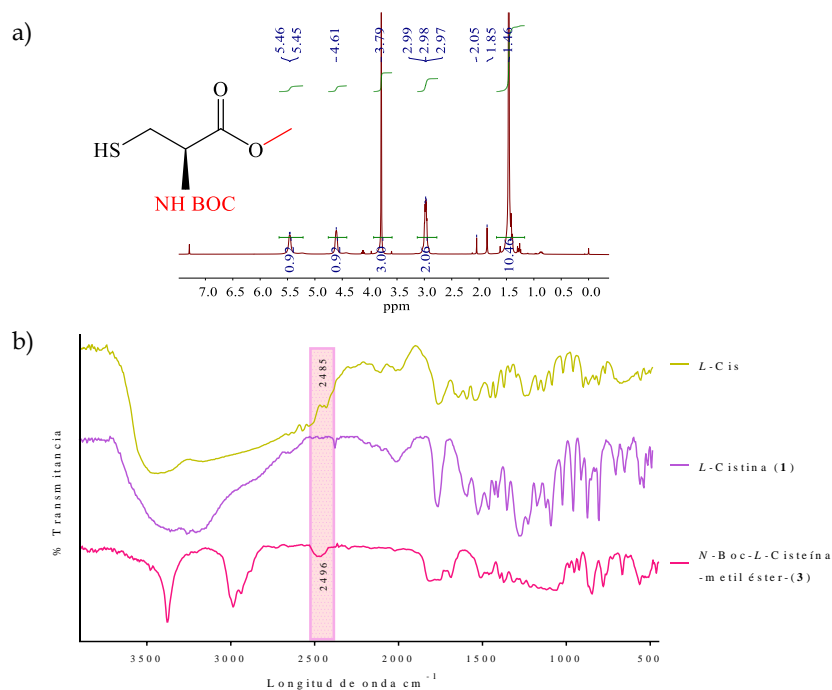


Figura 2-14: a) Análisis ¹H-RMN para el compuesto N-Boc- *L*-Cisteína metil éster (3). b) Espectros FT-IR de *L*-Cis (mostaza), *L*-Cistina 1 y N-Boc-*L*-Cisteína metil éster (3) (lila). Estos productos fueron analizados mediante PDRX, FT-IR, TEM y TGA.

El análisis de PDRX para todas las muestras evidenció los picos característicos para una estructura centrada en las caras (FCC) correspondiente a la estructura de espinela de Fe₃O₄. Mientras que, para las MNPs-*L*-Cis se observó una fase adicional, la cual, por un análisis de comparación de difractogramas mediante el uso de la herramienta computacional X'Pert HighScore, se correlacionó con *L*-Cis (Figura 2.15a). Estos resultados presentaron concordancia con los difractogramas ya informados para este tipo de materiales conjugados ⁴⁵. Por ejemplo, se identificaron picos característicos de *L*-Cis dentro del difractograma MNPs-*L*-Cis para ángulos 2θ de 18,9, 28,6, 30,3, 39,2°, entre otros ^{17,45}. Resultados similares se observaron para la MNPs-*L*-Cistina (1), que también presentaba dos fases, una correspondiente a la fase de Fe₃O₄ y otra a la *L*-Cistina (1) (Figura 2.15b). De esta forma, en ambos casos se pudo determinar que la modificación superficial de las MNPs no alteró la naturaleza del núcleo magnético ³⁹, ya que sus características permanecieron inalteradas incluso luego de la incorporación de *L*-Cis o *L*-Cistina (1).

Por el contrario, en el difractograma para las MNPs preparadas con los ligandos **2** y **3**, no se evidenció la incorporación de dichos ligandos, ya que solo se observaron los picos característicos para la fase de Fe_3O_4 (Figura 2.15c).

De esta manera las MNPs funcionalizadas con los derivados de *L*-Cis demostraron que a medida que los ligandos empleados disponían de menos grupos funcionales libres, el difractograma se asemejaba más al de las MNPs sin funcionalizar, lo que indicaría la imposibilidad de los grupos $-\text{NH}_3$ y $-\text{SH}$ de los derivados (**2** y **3**) de *L*-Cis para interactuar con el núcleo magnético (Figura 2.15c).

Adicionalmente, se analizó el tamaño de las partículas obtenidas mediante TEM (Figura 2.16). Los tamaños observados fueron de (8 ± 2) nm para MNPs-*L*-Cis, (11 ± 2) nm, (9 ± 2) nm y (9 ± 2) nm para las MNPs en interacción con los ligandos **1**, **2** y **3**, respectivamente.

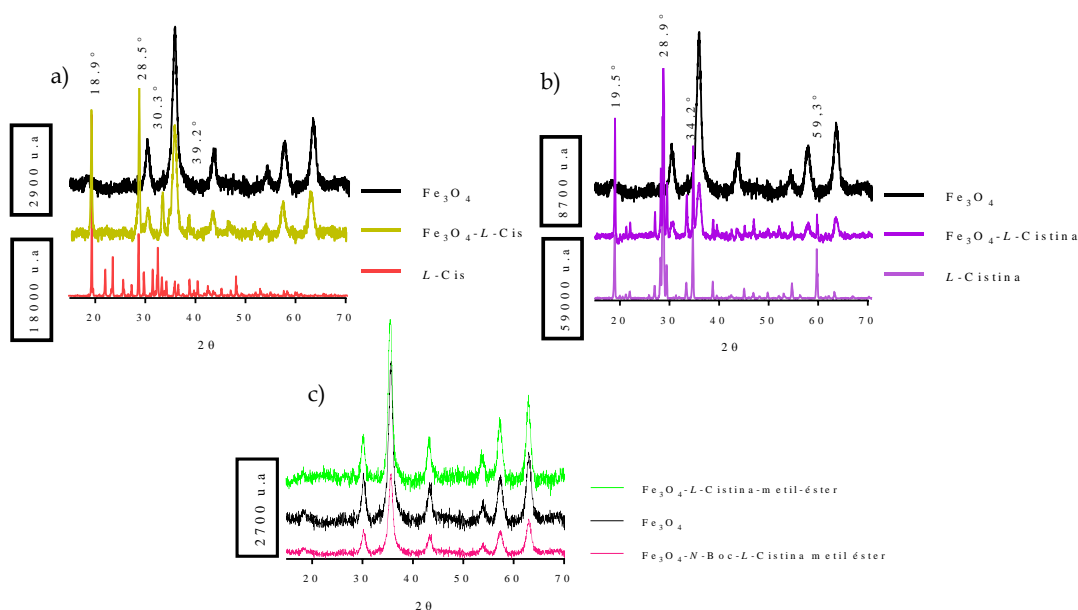


Figura 2-15: Comparación de los difractogramas obtenidos para las MNPs (negro) *L*-Cis (mostaza) con: a) MNPs -*L*-Cis (amarillo oscuro), b) MNPs-*L*-Cistina (azul marino) y c) MNPs-*L*-Cistina metil éster (**2**) (naranja oscuro), MNPs-*N*-Boc-*L*-Cisteína metil éster (**3**) (rosa)

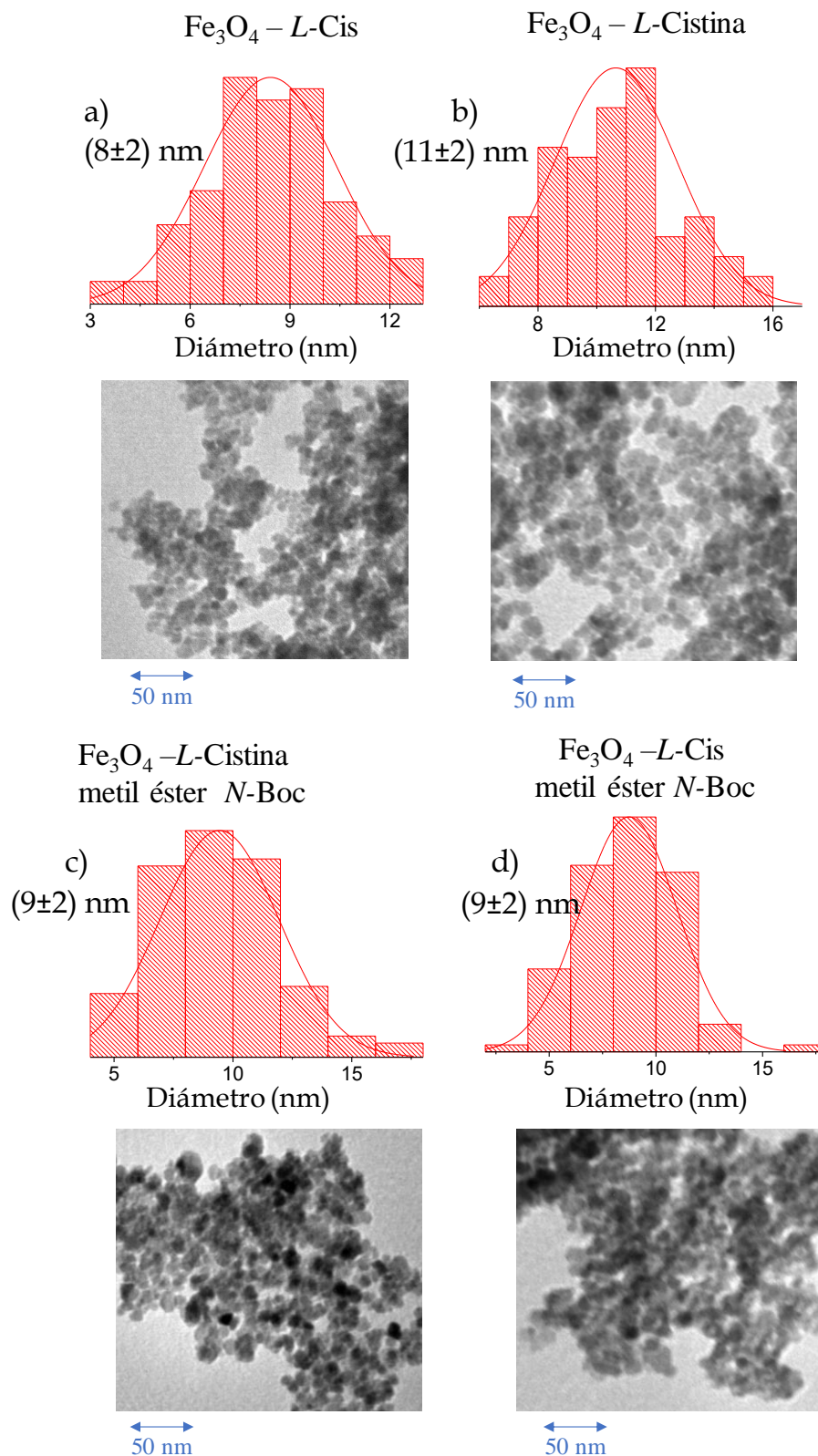


Figura 2-16: Imágenes de TEM de: a) MNPs-*L*-Cis, b) MNPs- *L*-Cistina, c) MNPs-*L*-Cistina metil éster, d) MNPs-*N*-Boc- *L*-Cisteína metil éster

Esta clase de NHM también fue analizado mediante espectroscopia FT-IR y TGA con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos por PDRX y TEM. Para todos los sistemas NHM fue posible detectar mediante FT-IR (Figura 2.17a) la banda característica alrededor de 614 cm^{-1} correspondiente a las tensiones Fe-O en la estructura de Fe_3O_4 . Al evaluar las bandas en la *L-Cis* como en el dímero **1** y compararlas con las bandas de los NHM (MNPs-*L-Cis* y MNPs -*L-1*) obtenidos, se observó un ensanchamiento y corrimiento de la banda correspondiente al estiramiento del grupo -COOH desde 1743 cm^{-1} y 1742 cm^{-1} a 1628 cm^{-1} y 1620 cm^{-1} , respectivamente, correspondiente a la formación del grupo -COO⁻. La banda correspondiente a la deformación del grupo -NH₃⁺ experimentó un leve corrimiento desde 1520 cm^{-1} a 1488 cm^{-1} y 1567 cm^{-1} a 1475 cm^{-1} ¹⁶. Finalmente, dado que se observó una disminución de la banda a 2562 cm^{-1} presente en el espectro de la *L-Cis* y correspondiente al estiramiento del grupo -SH, se planteó que las MNPs pudieron interactuar con este grupo dando lugar a la formación del enlace Fe-S, como ya fue observado anteriormente ³⁹.

De acuerdo con el análisis de los espectros FT-IR para los sistemas MNPs-*L-Cis* y MNPs-dímero **1**, el corrimiento de los estiramientos asimétrico y simétrico del grupo COO⁻ a 1620 y 1628 cm^{-1} dieron cuenta de una fuerte coordinación con las MNPs ^{39,16,45}. Estos resultados sugieren que el grupo COO⁻ tanto en *L-Cis* como en **1** poseen un rol importante en la coordinación con la superficie de la MNPs ¹⁶. El grupo -SH, de acuerdo con estos estudios, también participa de esta unión con las MNPs dado que su banda de absorción también se ve disminuida ¹⁶. Sin embargo, el grupo NH₃⁺ presenta una interacción débil en su coordinación con la MNPs ⁴⁶.

El análisis comparativo de estos resultados evidenció que los derivados **2** y **3** presentaron un comportamiento diferente, dado que estos sistemas solo mostraron las bandas correspondientes al núcleo magnético a 614 cm^{-1} . La banda correspondiente al estiramiento del grupo -NH₃⁺ cercano 1520 cm^{-1} no

fue detectada en el espectro de las MNPs funcionalizadas con **2** y **3**. De igual forma, en el espectro no se observó la banda a aproximadamente 2500 cm^{-1} correspondiente a los estiramientos del grupo -SH del ligando **3**. Estos resultados indicaron que al bloquear el grupo -COO⁻ en los ligandos, por formación de un derivado éster metílico (tanto en **2** y **3**), se logró inhibir la interacción de los ligandos con la superficie de la MNPs. Por lo tanto, las MNPs presentan una débil coordinación con los grupos -NH₃⁺ o -SH, en comparación con las interacciones del grupo -COO⁻.

En resumen, los resultados obtenidos mediante FT-IR demostraron que las moléculas de *L*-Cis y el dímero **1** presentaron una mayor afinidad para interaccionar con las MNPs (Figura 2.16a), mientras que los derivados **2** y **3** exhibieron una disminución en su interacción con las MNPs.

De acuerdo con los resultados de TGA (Figura 2.17b), se observó que los sistemas MNPs-*L*-Cis y MNPs-*L*-**1** presentaron un porcentaje de incorporación de ligando orgánico del 60 % y 66 %, respectivamente. Por otra parte, los derivados **2** y **3** mostraron una incorporación de 7 % y de 5 %, respectivamente. La degradación tanto para la *L*-Cis como para *L*-**1** ocurre en dos pasos. En todos los casos, la primera pérdida observada fue la desorción del agua tanto coordinada como no coordinada hasta un rango de temperatura de 156°C . Para el sistema MNPs-*L*-Cis, la degradación del ligando orgánico ocurrió en dos etapas, la primera a 212°C y la segunda a 280°C . Este comportamiento ya fue observado previamente para MNPs conjugadas con *L*-Cis ¹⁶, en donde atribuyeron la fuerte adsorción del ligando a la superficie de la MNPs, por la formación de un fuerte complejo entre el grupo -COO⁻ y la superficie. Además, en el mismo trabajo informan una importante cantidad de *L*-Cis incorporada al nanomaterial. Un comportamiento similar se observó para el compuesto de MNPs *L*-Cistina (**1**), en donde la degradación de *L*-**1** inicio en una primera etapa a un valor de 202°C y una segunda a 326°C .

Adicionalmente, se realizó el estudio de TGA para los ligandos *L-Cis* y *L-Cistina* (**1**). Para el caso de *L-Cis* se evidenció que la degradación tuvo lugar también en dos etapas, en rangos de temperaturas de 160°C a 224°C y de 224°C a 600°C, alcanzando a esta última temperatura su descomposición total. Cabe recalcar, que el ligando al estar coordinado con la superficie de la MNPs comenzó su degradación 52°C después que al estar en su forma pura.

Para el caso del ligando de *L-Cistina* (**1**) se observó una primera degradación entre 206°C a 291°C y una segunda entre 291°C a 600°C. Al comparar estos valores con los obtenidos para el MNPs *L-Cistina* (**1**), se comprobó que la primera degradación tiene lugar a una temperatura similar; mientras que, el segundo proceso ocurre 35°C después que su ligando puro. Esta mayor estabilidad térmica puede ser explicada producto de la adsorción de los grupos -COO- a la superficie.

El comportamiento con respecto a la incorporación de ligandos orgánicos *L-Cis* y *L-1*, ya fue observado en estudios previos, en los cuales se estudió la interacción de diversos aminoácidos con MNPs ^{16,39} Schwaminger *et. al.* encontraron que la *L-Cis* presenta un comportamiento especial comparado con el resto de los aminoácidos estudiados ya que, al interaccionar con las MNPs, da como resultado un alto grado de incorporación de *L-Cis* sobre la superficie de las MNPs.

Esto fue asociado con la posibilidad de que la *L-Cis* forme *in situ* el dímero **1**, por reducción de los átomos de Fe³⁺ superficiales o, también puede explicarse por tener lugar la formación de una estructura multicapas alrededor del núcleo magnético, formada por una red de puentes de hidrógeno entre las moléculas de *L-Cis* o *L-1* (Figura 2.18b) ¹⁶.

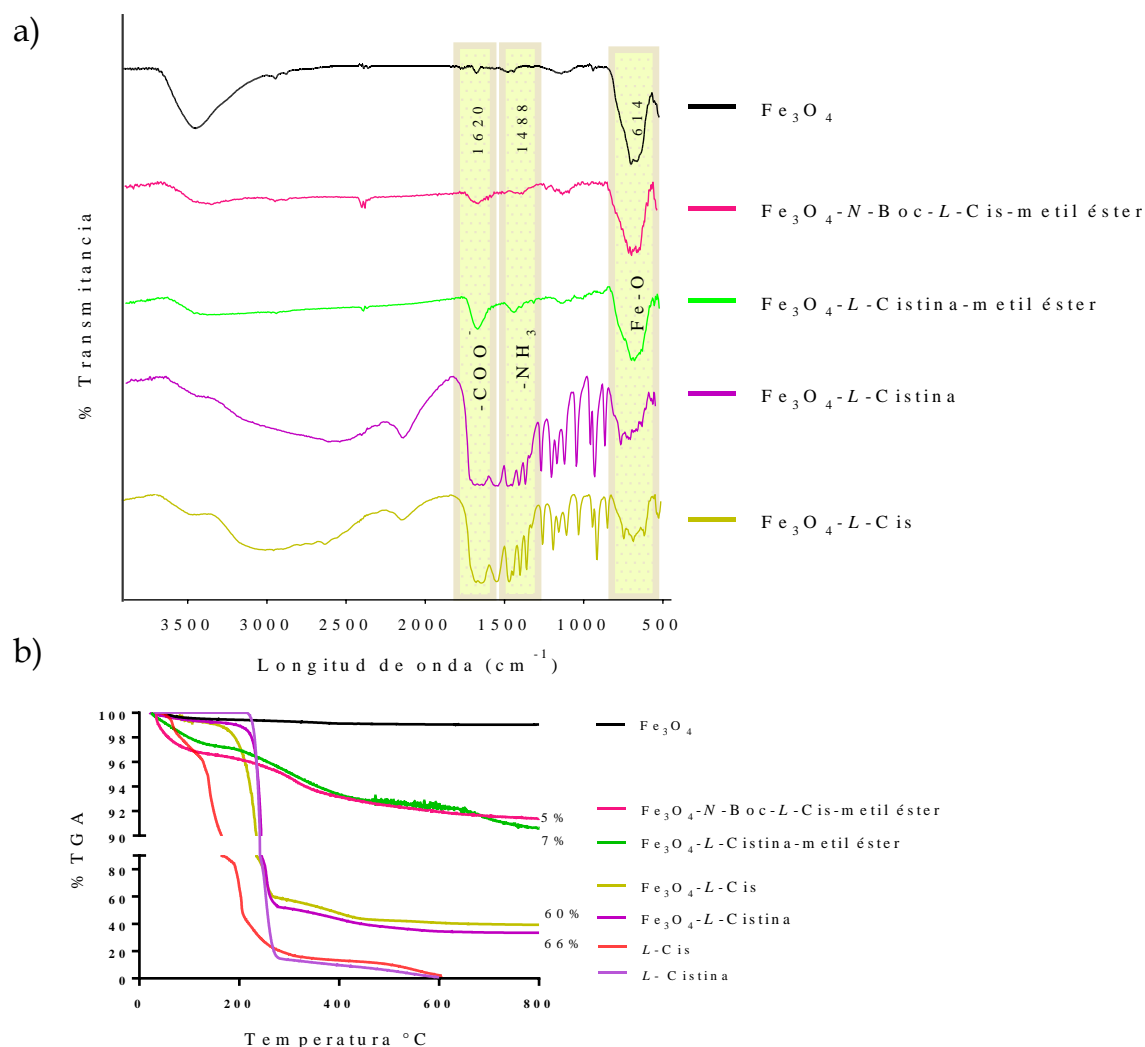


Figura 2-17: Espectros FT-IR y TGA para: MNPs *-L-Cis* (amarillo oscuro), MNPs *-L-Cistina* (1) (azul marino), MNPs *-L-Cistina* metil éster (2) (naranja oscuro), MNPs *-N-Boc-L-Cisteína* metil éster (3) (rosa)

En comparación con los datos de la literatura previa ¹⁶, en el presente trabajo se logró incorporar cerca de 3 veces más *L-Cis* sobre las MNPs. Para corroborar la interacción de este ligando con las MNPs, el material obtenido fue sometido a lavados exhaustivos con agua Milli-Q, con la finalidad de evaluar si parte del ligando incorporado podría ser removido. Posterior al lavado exhaustivo, las MNPs se analizaron por TGA (Figura 2.18a). El termograma mostró una primera etapa de desorción de agua hasta 150°, seguida de la descomposición de *L-Cis* que comenzó a los 156°C y se extendió hasta los 800°C. Resultados similares fueron obtenidos por Schwaminger *et al.*, quienes reportaron los procesos de degradación que sufre el ligando *L-Cis* a las

diferentes temperaturas. En estas se puede destacar la pérdida de CO₂ en un rango de 700-800°C y la posible ruptura de un enlace Fe-S¹⁶.

Además, cabe recalcar que posterior al lavado exhaustivo, la pérdida de masa orgánica en las MNPs fue del 19% (Figura 2.17a). Este valor fue inferior al determinado previo al lavado (60%), lo cual indica la remoción parcial del *L*-Cis de las MNPs. En base a estos resultados, es posible postular la formación de estructura multicapas formada por una red de puentes de hidrógeno entre las *L*-Cis, sin descartarse la formación de enlaces disulfuro entre éstas alrededor del núcleo magnético¹⁶, producto del exceso de ligando (Figura 2.18b).

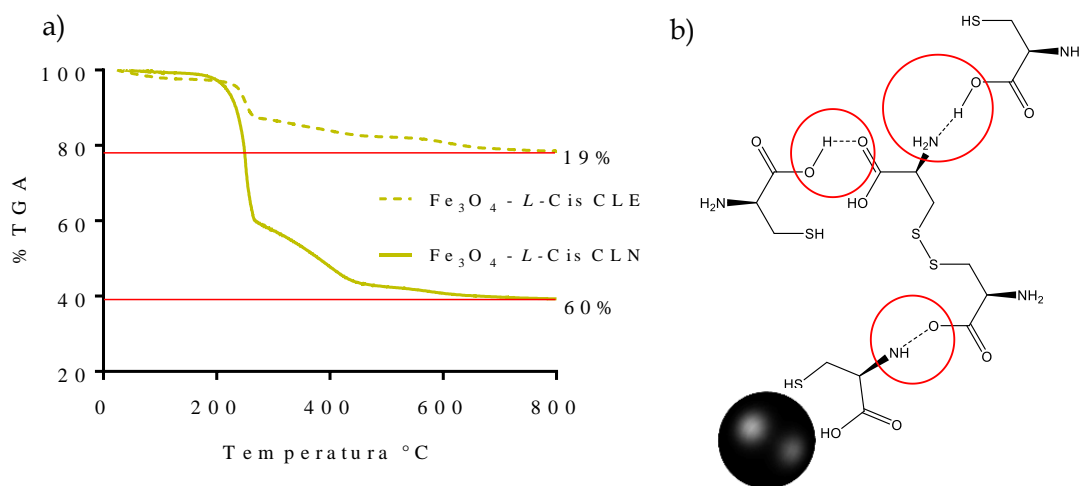


Figura 2-18 a) Curvas de TGA para: MNPs-*L*-Cis con lavado normal (CLN) y MNPs-*L*-Cis con lavado exhaustivo (- - - CLE), b) Posibles formaciones de enlaces entre moléculas de *L*-Cis

La remoción de las diferentes capas de *L*-Cis sobre las MNPs fue corroborada, también mediante análisis de DLS y ζ . Previo al lavado exhaustivo, las MNPs-*L*-Cis presentaron un d_H de $(5 \pm 1) \times 10^2$ nm, con un ζ de -22,88 mV, mientras que, posterior a este proceso de lavado, se redujo su d_H a $(2,4 \pm 0,6) \times 10^2$ nm, pero se logró mantener la carga superficial negativa con un valor de ζ igual a -18,64 mV. La comparación de carga superficial de las MNPs-*L*-Cis con respecto a la carga superficial de las MNPs sin funcionalización (26,07 mV, sección 2.3.2) indicó que *L*-Cis se funcionalizó de manera eficiente y está modificando las propiedades electrostáticas de las MNPs (Figura 2-19).

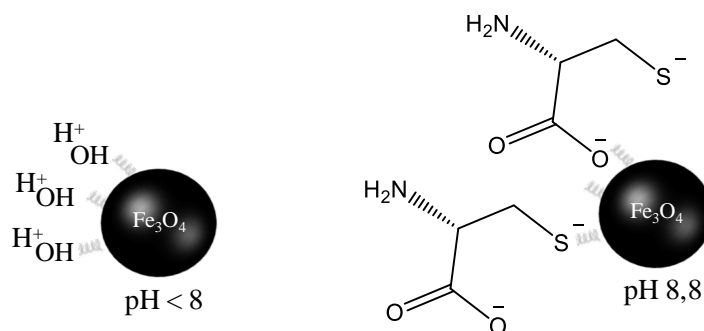


Figura 2-19: ζ para Fe_3O_4 y para MNPs-L-Cis en valores de pH < 8 e igual a 8,8 respectivamente

2.4. Conclusiones parciales

Se evaluaron diversas condiciones de síntesis para la obtención de las MNPs, en las cuales se emplearon medios acuosos, temperatura ambiente y cortos tiempos de reacción. Se buscó, en todos los casos, que los NMH preparados presentaran tamaños en el intervalo de 10 a 200 nm y una buena dispersión en medios acuosos. Se encontró que las MNPs sin el estabilizante PVP alcanzaron estas condiciones y permiten modificaciones superficiales posteriores, evitando la necesidad de intercambio de ligando y disminuyendo la complejidad estructural.

Las MNPs fueron exhaustivamente caracterizadas, encontrando por PDRX que la fase cristalina del núcleo correspondió a la estructura de espinela de Fe_3O_4 . Además, el VSM realizado a las MNPs demostró que las partículas obtenidas se encontraban en un tamaño nanométrico, ya que exhibieron como propiedad física un comportamiento superparamagnético.

Se estudiaron diversas funcionalizaciones superficiales sobre las MNPs, y, por lo general, la cristalinidad del núcleo magnético se mantuvo luego de cada reacción efectuada. Se estudió la interacción con L-Cis y sus derivados, los cuales pueden agruparse en dos conjuntos. Uno de estos conformado por los compuestos que presentaban grupos -COOH disponibles para interactuar con las MNPs (como son la L-Cis y su dímero L-Cistina (L-1)). El segundo conjunto

conformado por los derivados con funcionalidad éster en la molécula (*L*-Cistina metil éster (*L-2*) y *N*-Boc-*L*-Cis metil éster (*L-3*)). Se concluyó que el grupo con mayor afinidad por las MNPs es el grupo COOH, el cual también mostró una fuerte coordinación con la superficie de la MNPs. Adicionalmente, se encontró que a un pH de 8,8 fue la condición óptima de funcionalización para las MNPs, ya que éstas presentaron el menor d_H , lo que indicaría un menor grado de agregación y una carga superficial positiva, mientras que en estas condiciones la *L*-Cis se encontraba, mayoritariamente, como especie aniónica, favoreciendo la interacción con la superficie de las MNPs.

El ligando *L*-Cis mostró un comportamiento especial en comparación con los otros ligandos orgánicos estudiados. Esto fue posible observarlo por análisis de TGA, en donde se evidenció un alto porcentaje de incorporación del compuesto orgánico en el NMH obtenido, ya sea por las interacciones puente hidrógeno entre moléculas de *L*-Cis, así como también no puede descartarse la formación de dímeros de *L*-Cistina (**1**) *in situ*. El exceso de *L*-Cis sobre la MNPs pudo ser removido mediante lavados exhaustivos de la MNPs-*L*-Cis. Finalmente, la incorporación de *L*-Cis sobre las MNPs produjo un cambio en el tamaño y carga superficial de las partículas obtenidas.

2.5. Bibliografía

1. Zhao, X., Zhao, H., Chen, Z. & Lan, M. Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **14**, 210–220 (2014).
2. Laurent, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).
3. Maity, A. R. & Stepensky, D. Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: Analysis of research trends and targeting efficiencies. *Int. J. Pharm.* **496**, 268–274 (2015).
4. Wan, J. *et al.* Stable and Biocompatible Colloidal Dispersions of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Minimum Aggregation for Biomedical Applications. *J. Phys. Chem. C* **120**, 23799–23806 (2016).

5. Liu, Y. *et al.* Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1193–1201 (2009).
6. Fortin, M. A. *et al.* Polyethylene glycol-covered ultra-small Gd₂O₃ nanoparticles for positive contrast at 1.5 T magnetic resonance clinical scanning. *Nanotechnology* **18**, (2007).
7. Shin, J. *et al.* Hollow manganese oxide nanoparticles as multifunctional agents for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 321–324 (2009).
8. Sharma, R. K. *et al.* Fe₃O₄ (iron oxide)-supported nanocatalysts: synthesis, characterization and applications in coupling reactions. *Green Chem.* **18**, 3184–3209 (2016).
9. Kumar, C. S. S. R. & Mohammad, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 789–808 (2011).
10. Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P. & Möller, L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* **188**, 112–118 (2009).
11. Colombo, M. *et al.* Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4306 (2012).
12. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951 (2015).
13. Thanh, N. T. K., Maclean, N. & Mahiddine, S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chem. Rev.* **114**, 7610–7630 (2014).
14. Lara, N. *et al.* Redalyc. Magnetita (Fe₃O₄): Una estructura inorgánica con múltiples aplicaciones en catálisis heterogénea. *Rev. Colomb. Química* **46**, 42–59 (2017).
15. Lee, Y. *et al.* Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer imaging. *Adv. Mater.* **20**, 4154–4157 (2008).
16. Schwaminger, S. P. *et al.* Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **119**, 23032–23041 (2015).
17. Nguyen, V. Du *et al.* Nanohybrid magnetic liposome functionalized with hyaluronic acid for enhanced cellular uptake and near-infrared-triggered drug release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **154**, 104–114 (2017).
18. Lee, T. *et al.* Minimum hyaluronic acid (HA) modified magnetic nanocrystals with less facilitated cancer migration and drug resistance for targeting CD44 abundant cancer cells by MR imaging. *J. Mater. Chem. B* **5**, 1400–1407 (2017).
19. Li, J. *et al.* Hyaluronic acid-modified Fe₃O₄ at Au core/shell nanostars for multimodal imaging and photothermal therapy of tumors. *Biomaterials* **38**, 10–21 (2015).
20. Ahmadi, R., Ranjbarnodeh, E. & Gu, N. Synthesizing cysteine-coated magnetite nanoparticles as MRI contrast agent: Effect of pH and cysteine addition on particles size distribution. *Mater. Sci.* **30**, 382–389 (2012).
21. Cornell, R. M. & Schwertmann, U. Crystal Structure. in *The Iron Oxides* 9–38 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003).

22. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* **112**, 5818–5878 (2012).
23. Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
24. Alvear, D., Galeas, S., Guerrero, V. H. & Debut, A. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles. *Rev. Politécnica* **39**, 2–7 (2017).
25. Lambert, J. F. Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: A review. *Orig. Life Evol. Biosph.* **38**, 211–242 (2008).
26. Lambert, J.-F., Jaber, M., Georgelin, T. & Stievano, L. A comparative study of the catalysis of peptide bond formation by oxide surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 13371 (2013).
27. Patel, D., Chang, Y. & Ho, G. Amino acid functionalized magnetite nanoparticles in saline solution. *Curr. Appl. Phys.* **9**, S32–S34 (2009).
28. Cohen, H., Gedanken, A. & Zhong, Z. One-Step Synthesis and Characterization of Ultrastable and Amorphous Fe O Colloids Capped with Cysteine Molecules One-Step Synthesis and Characterization of Ultrastable and Amorphous Fe₃O₄ Colloids Capped with Cysteine Molecules. *Chem. Eng.* 15429–15438 (2008).
29. Mehta, R. V. Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 901–916 (2017).
30. Arsalani, N., Fattahi, H. & Nazarpour, M. Synthesis and characterization of PVP-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as an MRI contrast agent. *Express Polym. Lett.* **4**, 329–338 (2010).
31. Yang, C., Wu, J. & Hou, Y. Fe₃O₄ nanostructures: synthesis, growth mechanism, properties and applications. *Chem. Commun.* **47**, 5130 (2011).
32. Lu, X., Niu, M., Qiao, R. & Gao, M. Superdispersible PVP-Coated Fe₃O₄ Nanocrystals Prepared by a “One-Pot” Reaction. *J. Phys. Chem. B* **112**, 14390–14394 (2008).
33. Lopez-Dominguez, V. *et al.* A simple vibrating sample magnetometer for macroscopic samples. *Rev. Sci. Instrum.* **89**, 034707 (2018).
34. Venosta, L., Bracamonte, M. V., Rodríguez, M. C., Jacobo, S. E. & Bercoff, P. G. Comparative studies of hybrid functional materials based on different carbon structures decorated with nano-magnetite. Suitable application as platforms for enzyme-free electrochemical sensing of hydrogen peroxide. *Sensors Actuators, B Chem.* **248**, 460–469 (2017).
35. Suber, L. *et al.* Tuning hard and soft magnetic FePt nanocomposites. *J. Alloys Compd.* **663**, 601–609 (2016).
36. Betancourt, R. G., Sald, R. & Rodr, O. Preparacion de latices magneticos. *Rev. Mex. FISICA* **1**, 33–36 (2004).
37. Sun, Y. K., Ma, M., Zhang, Y. & Gu, N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **245**, 15–19 (2004).
38. Joshi, A. V., Bhusare, S., Baidossi, M., Qafisheh, N. & Sasson, Y. Oxidative coupling of thiols to disulfides using a solid anhydrous potassium phosphate catalyst. *Tetrahedron Lett.* **46**, 3583–3585 (2005).

39. Vieira, A. P. *et al.* Adsorption of cysteine on hematite, magnetite and ferrihydrite: FT-IR, Mössbauer, EPR spectroscopy and X-ray diffractometry studies. *Amino Acids* **40**, 205–214 (2011).
40. Jiang, W., Chen, X., Niu, Y. & Pan, B. Spherical polystyrene-supported nano-Fe₃O₄ of high capacity and low-field separation for arsenate removal from water. *J. Hazard. Mater.* **243**, 319–325 (2012).
41. Ahmadi, R. *et al.* Ultrasonic-assisted synthesis of magnetite based MRI contrast agent using cysteine as the biocapping coating. *Mater. Chem. Phys.* **131**, 170–177 (2011).
42. Li, J. & Sha, Y. A convenient synthesis of amino acid methyl esters. *Molecules* **13**, 1111–1119 (2008).
43. Rakauskaitė, R. *et al.* Biosynthetic selenoproteins with genetically-encoded photocaged selenocysteines. *Chem. Commun.* **51**, 8245–8248 (2015).
44. Busnel, O. *et al.* Synthesis and evaluation of new ω-borono-α-amino acids as rat liver arginase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **13**, 2373–2379 (2005).
45. Gawande, M. B. *et al.* A facile synthesis of cysteine-ferrite magnetic nanoparticles for application in multicomponent reactions - A sustainable protocol. *RSC Adv.* **2**, 6144–6149 (2012).
46. Sun, C. G., Hu, B. C., Zhou, W. Y., Xu, S. C. & Liu, Z. L. Synthesis of disulfide-derivatised metallodeuteroporphyrins as novel catalysts to imitate cytochrome P 450 in the selective oxidation of cyclohexane. *J. Chem. Res.* **35**, 681–685 (2011).

Capítulo III

*Síntesis de nanopartículas
magnéticas híbridas conjugadas
con L-Cis - ácido hialurónico*

3.1. Introducción

El mejoramiento de la estabilización, dispersabilidad acuosa, capacidad de reciclado y aumento de la reactividad superficial de los NM es de interés en diferentes investigaciones en la actualidad. Para cumplir con lo formulado, diferentes moléculas, como por ejemplo los polímeros, son empleados para modificar los NM, ya que ofrecen una amplia gama de propiedades en función de sus combinaciones estructurales ¹, lo cual da lugar a la obtención de NH, que por su alta versatilidad pueden ser utilizados para diversos fines ². Si bien existen numerosos polímeros que cumplen el requisito de biocompatibilidad, la tendencia actual es el empleo de polímeros que, además, sean biodegradables ¹. Es decir, polímeros que tanto ellos mismos como sus posibles subproductos, puedan ser eliminados a través de una vía natural, después de haber concluido su función. De esta manera, un organismo puede metabolizarlos o eliminarlos sin producir efectos tóxicos ³.

Dadas las importantes aplicaciones que presentan las MNPs de Fe₃O₄ en el área de la nanomedicina, éstas han sido objeto de diversos estudios con la finalidad de incorporar moléculas que les permitan mejorar sus propiedades, por ejemplo su hidrofiliidad ⁴. Un estudio realizado por Lee *et al.* demostró que esto se puede lograr mediante el recubrimiento de los núcleos magnéticos usando una combinación de un polímero natural como es el AH conjugado como por ejemplo con dopamina ⁵. Esta metodología dio como resultado un sistema simple, robusto, bioactivo y bioinerte, además de ser un candidato útil en el campo la nanomedicina. La dopamina, al igual que la *L*-Cis por citar un caso adicional, presenta una importante atracción con el núcleo magnético, además de presentar grupos capaces de interactuar con la superficie de la MNPs ⁶. Asimismo, éste deja expuestos grupos aminos (NH₂), los cuales pueden usarse como sitios para futuras funcionalizaciones ⁷.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y las propiedades peculiares del AH en el tratamiento del cáncer, se propuso la incorporación de este polímero en la superficie de las MNPs obtenidas previamente.

3.1.1. Interacción *L*-Cis con AH

En las últimas décadas, los compuestos capaces de prologar el tiempo de residencia de los fármacos dentro de sus sistemas han captado la atención de los investigadores. Como se mencionó en el Capítulo I *Introducción general*, una macromolécula ampliamente usada para aplicaciones biomédicas es el AH, debido a su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad ^{8,9}. Este polímero presenta grupos funcionales -COOH y -OH capaces de conjugarse con otros compuestos para formar enlaces de tipo amida o éster.

Al conjugar AH con moléculas de *L*-Cis se obtienen polímeros tiolados conocidos como tíómeros ¹⁰. La formación de estos tíómeros tiene lugar mediante la formación de un enlace amida entre el -COOH del AH y el grupo amonio de la *L*-Cis (Figura 3.1). Se ha propuesto que este tipo de polímeros son capaces de interactuar con glicoproteínas ricas en *L*-Cis presentes en las mucosas, mediante la formación de enlaces disulfuro, lo cual incrementa considerablemente la adhesión. Estas propiedades conducen a la formación de polímeros con características mejoradas de mucoadherencia, además de ser estables, biocompatibles, biodegradables y altamente solubles en medios acuosos ¹¹.

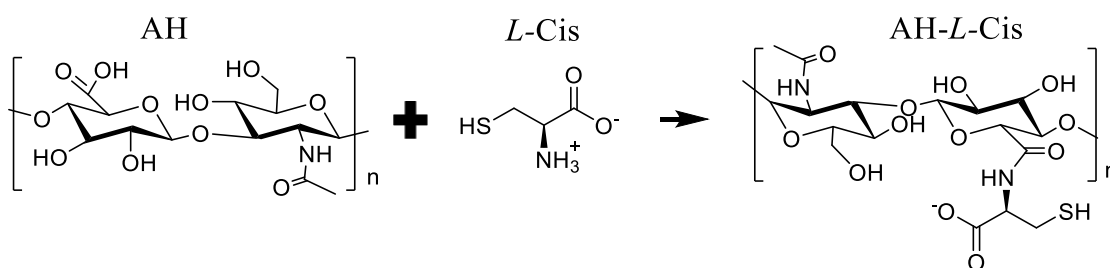


Figura 3-1: Interacción entre *L*-Cis y AH para dar lugar a la formación de un enlace amida.

3.1.2. Interacción de las MNPs con AH

Como se mencionó en la sección 1.5, el cáncer presenta una alta prevalencia y es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En consecuencia, la búsqueda de nuevos mecanismos para combatir dicha enfermedad está en continuo desarrollo. Un posible enfoque se encuentra en el desarrollo de sistemas de portadores de fármacos para promover que las terapias sean más confiables, eficaces y seguras para los pacientes ¹². En este sentido, se ha propuesto el empleo de sistemas para la vehiculización de fármacos hacia sitios de acción farmacodinámicos, de manera de mejorar la focalización de la terapia, con la consecuente reducción de los efectos adversos. Además, el control en la liberación de los fármacos que transportan resulta prometedor en vistas a una posible reducción de la frecuencia de administración. Según lo antes mencionado, el AH es una alternativa viable para mejorar las terapias basadas en MNPs ya que es capaz de aumentar la capacidad de reconocimiento hacia receptores CD44 que se encuentran sobre expresados en diversas células tumorales ^{13,14}. El AH presenta como ventaja adicional, la presencia de -COOH en su estructura, los cuales, en condiciones fisiológicas, se encuentran ionizados (-COO⁻), proporcionando al polímero una carga neta negativa plausible de ser utilizada para interactuar iónicamente con un fármaco ionizable de carga opuesta ^{15,16}.

Tanto el AH como las MNPs son considerados altamente biocompatibles. La simple combinación de AH con MNPs presenta un amplio campo para ser explorado ^{5,17}. En trabajos previos se ha efectuado la preparación de NHM para detección de células tumorales, constituidos en parte por estos componentes ^{18,5,17}. La interacción entre MNPs y AH puede corresponder a la formación de un enlace entre los -OH presentes en la superficie de la MNPs y los -COOH del HA o resultado de interacciones electrostáticas en una estructura tipo envolvente entre el polímero y las MNPs ^{17,19}.

3.2. Objetivos

El objetivo de esta etapa del trabajo de tesis se basó en desarrollar metodologías para la síntesis de NHM biocompatibles constituidos por Fe_3O_4 , *L*-Cis y AH. Para este propósito, se usaron las MNPs de Fe_3O_4 y *L*-Cis desarrolladas en el capítulo 2, junto con estudios para efectuar la interacción entre la *L*-Cis y el AH. Alternativamente, se evaluó la preparación de un NMH de MNPs-AH. Estas combinaciones se prepararon con la finalidad de estudiar el comportamiento de NMH biocompatibles para ser usadas como sistemas portadores de fármacos antitumorales. Los sistemas obtenidos fueron caracterizados mediante diversas técnicas microscópicas, espectroscópicas, difractométricas y calorimétricas, tales como: TEM, FT-IR, DLS, ζ , UV-*vis*, PDRX y TGA.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Interacción *L*-Cis y AH

Al considerar la funcionalización de las MNPs con *L*-Cis y AH, fue de interés evaluar bajo qué condiciones de reacción era posible realizar la modificación del polímero AH con la *L*-Cis. Para ello, se propuso una reacción entre las moléculas de AH con *L*-Cis, tal como se mencionó en la sección 3.1.1, para dar paso a la formación de un enlace amida. En general, la formación de este tipo de enlaces involucra la química de las carbodiimidas⁵, que requiere la activación previa del grupo -COOH. Para esto, se hizo reaccionar en primer lugar el AH con los reactivos *N*-(3-Di-metilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDAC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT). Seguidamente, se adicionó la *L*-Cis necesaria (Figura 3.2). Transcurrido el tiempo de reacción, el polímero conjugado resultante fue purificado por diálisis con la finalidad de eliminar reactivos de síntesis que no hubieran reaccionado durante el proceso.

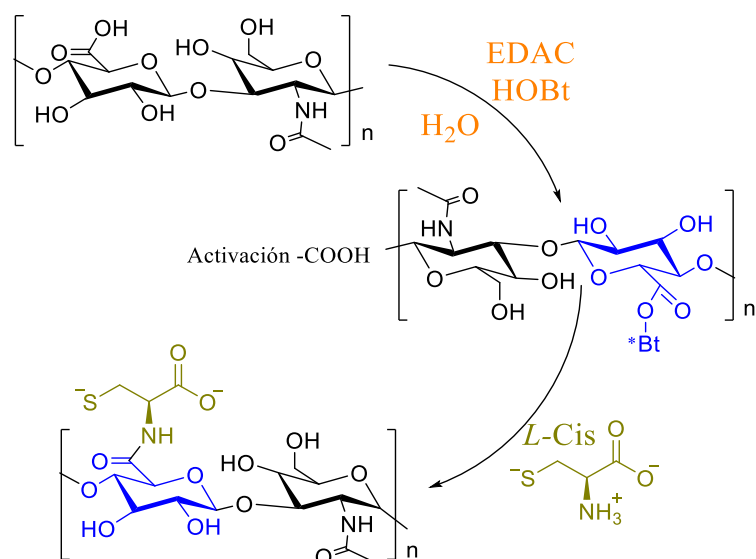


Figura 3-2: Secuencia sintética para la obtención de *L*-Cis-AH mediante la activación del grupo -COOH del AH por reacción con EDAC/HOBt

Dado que el tipo de unión entre ambos compuestos se formó mediante un enlace tipo amida, entre el grupo -COOH del AH y -NH₃⁺ de la *L*-Cis, dicho enlace se evidenció en el espectro FT-IR de la Figura 3.3 en las bandas de absorción a 1649 y 1556 cm⁻¹ características de los estiramientos simétricos y asimétricos del grupo -CONHR²⁰. Además, se observaron bandas a 3400 y 2929 cm⁻¹ correspondientes a los estiramientos de los enlaces O-H y C-H del AH, la banda a 1743 cm⁻¹ asociada al estiramiento del enlace C=O de los grupos libres COOH del AH y la tensión de los enlaces C-O a 1080 cm⁻¹.

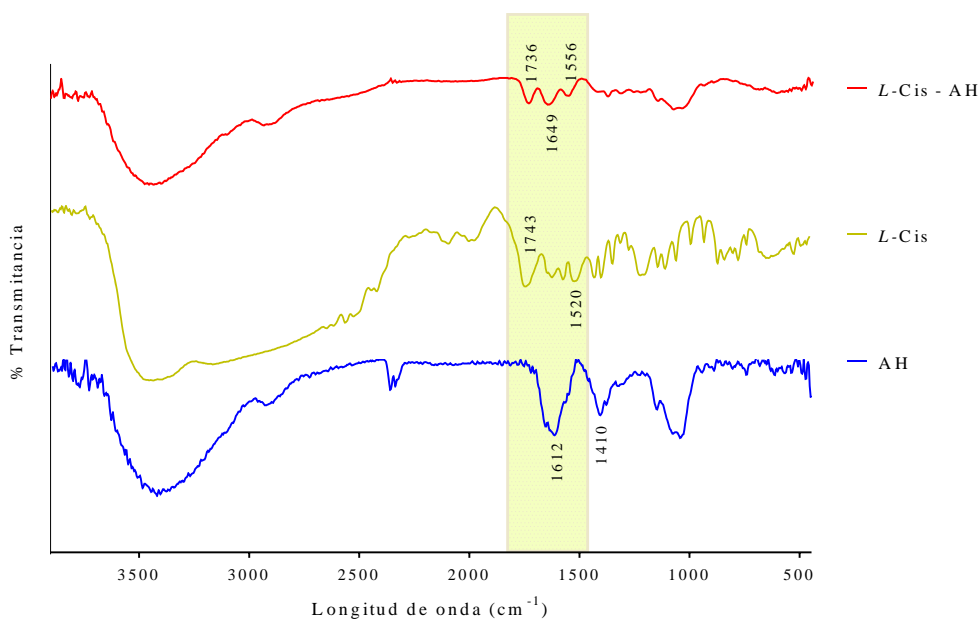


Figura 3-3: espectros FT-IR de: *L*-Cis (mostaza), AH (azul), *L*-Cis-AH (bordó).

Complementariamente, se analizó la incorporación de *L*-Cis empleando el reactivo de Ellman's (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)) (Figura 3.4).^{21 22}. Este ensayo se emplea habitualmente para cuantificar el porcentaje de grupos sulfhidrilos libres presentes en polímeros o proteínas. El análisis se basa en la detección mediante espectrofotometría UV-*vis* del producto coloreado formado por reacción del grupo S-H libre con el reactivo de Ellman's (Figura 3.4). De acuerdo con este ensayo, el conjugado presentó un 32 % p/p de *L*-Cis incorporada luego de la conjugación.

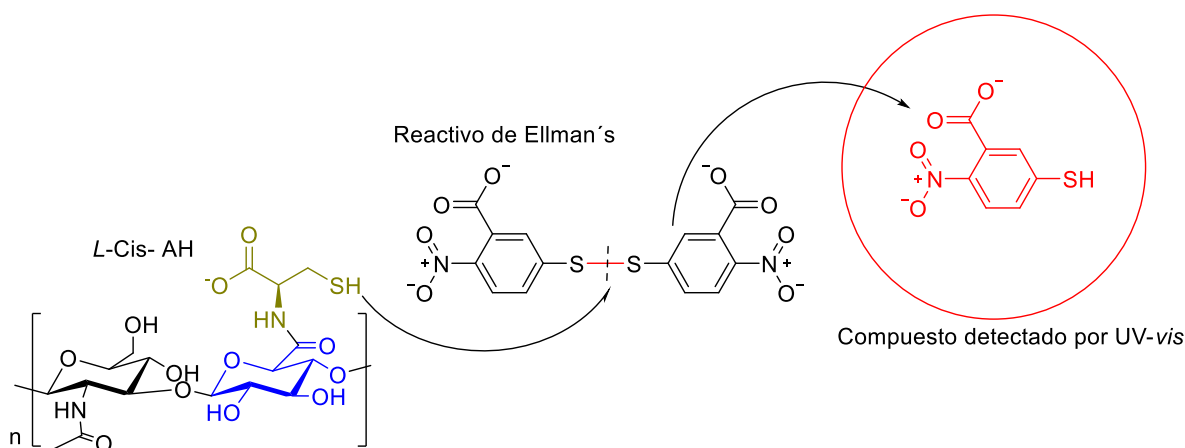


Figura 3-4: Interacción del compuesto *L*-Cis-AH con el reactivo de Ellman's para cuantificar los grupos -SH.

Se realizó el análisis de TGA para el conjugado *L*-Cis-AH y sus precursores, cuyos resultados se presentan en la Figura 3.5. Para el caso del ligando *L*-Cis su descomposición térmica se produjo en dos etapas (160°C y 224°C), tal como se detalló en la sección 2.3.3 del Capítulo II. Para el caso del ligando AH, se observó en una primera etapa la desorción de agua hasta una temperatura de 180 °C y, posteriormente, dos etapas de descomposición las cuales corresponden a la degradación del polisacárido a temperaturas de 233°C y 411°C²³. Finalmente, se observó que el conjugado *L*-Cis-AH presentó mayor estabilidad térmica que sus precursores. La descomposición del polímero conjugado comenzó a una temperatura superior (224 °C) comparado con la *L*-Cis pura (193 °C), y también se observó un aumento de la temperatura final de descomposición (932 °C) en comparación con la del AH (816 °C) y *L*-Cis (605 °C) (Figura 3.5).

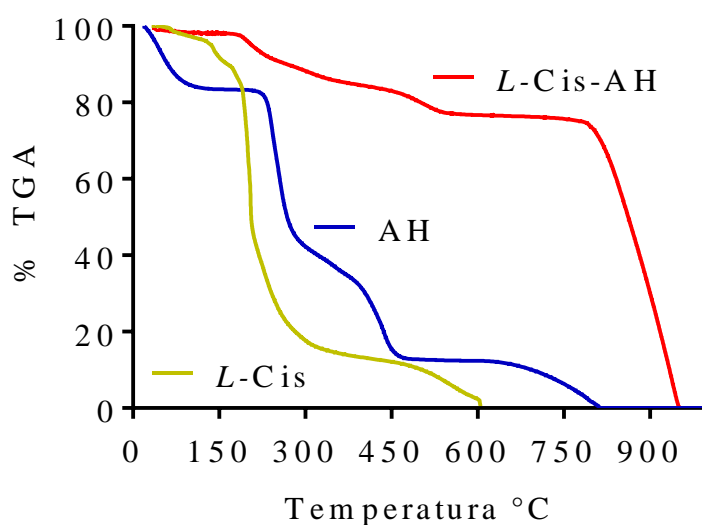


Figura 3-5: Análisis TGA: *L-Cis* (mostaza), *L-Cis-AH* (bordó), AH (azul)

3.3.2. MNPs funcionalizadas con *L-Cis* y AH

La primera funcionalización de las MNPs con *L-Cis* permitió mejorar la dispersabilidad en medios acuosos ya que el aminoácido aportó sus propiedades hidrofílicas al núcleo magnético. Además, producto de esta interacción, las MNPs fueron conferidas con nuevos grupos funcionales, como son los grupos amonio $-NH_3^+$ y $-SH$ de la *L-Cis* que presentaron poca participación en la coordinación con las MNPs, resultados que fueron presentados en el capítulo 2 de esta tesis.

La presencia de estos grupos brindó la capacidad de poder realizar una segunda funcionalización sobre las MNPs empleando estos grupos. De esta manera, y como fue estudiado en la sección 3.3.1, pudo llevarse a cabo la conjugación del grupo $-NH_3^+$ de la *L-Cis* presente en las MNPs-*L-Cis* con los grupos $-COOH$ del AH para formar un enlace tipo amida. La síntesis de los NHM basados en MNPs-*L-Cis-AH* se llevó a cabo con un procedimiento que constó de tres etapas: 1°) obtención de los núcleos de MNPs, 2°) incorporación de la *L-Cis* y 3°) activación del AH y su incorporación a las MNPs-*L-Cis* (Figura 3.6). Cabe mencionar que, en la tercera etapa, para la funcionalización de las

MNPs-*L*-Cis con AH se emplearon dos relaciones en masa de AH:Fe₃O₄ 0,3 y 0,6, denominados MNPs-*L*-Cis-AH (5) y (6), respectivamente.

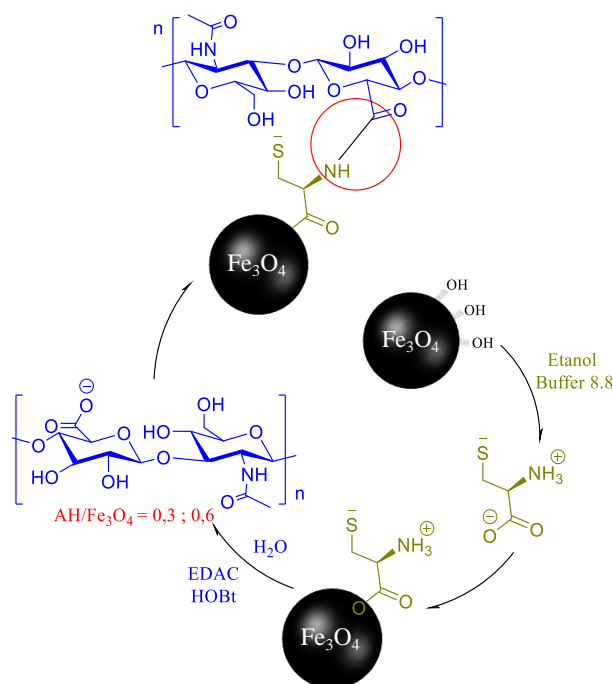


Figura 3-6: Diagrama de obtención de las MNPs-*L*-Cis-AH

Los espectros FT-IR de los sistemas **5** y **6**, mostraron bandas de intensidad fuerte a los 1621 cm⁻¹ para **5** y 1623 cm⁻¹ para **6** correspondientes a las vibraciones del enlace C=O de los grupos amida presentes tanto en el AH como los formados por la interacción *L*-Cis-AH (Figura 3.7). Además, se observaron las tensiones simétricas y asimétricas correspondientes al grupo -COO⁻ del AH, en bandas de 1585 cm⁻¹ y 1407 cm⁻¹ en **5** y 1415 cm⁻¹ en **6**, ya que su activación con EDAC/HOBt para la interacción con el compuesto de *L*-Cis no fue completa, dejando de esta manera grupos -COO⁻ libres. Adicionalmente, las tensiones de enlace C-N se presentaron en bandas a 1382 cm⁻¹ y 1371 cm⁻¹ corroborando la presencia de los compuestos de *L*-Cis y AH. Finalmente, las bandas a 587 y 582 cm⁻¹ evidenciaron las tensiones Fe-O características del núcleo magnético.

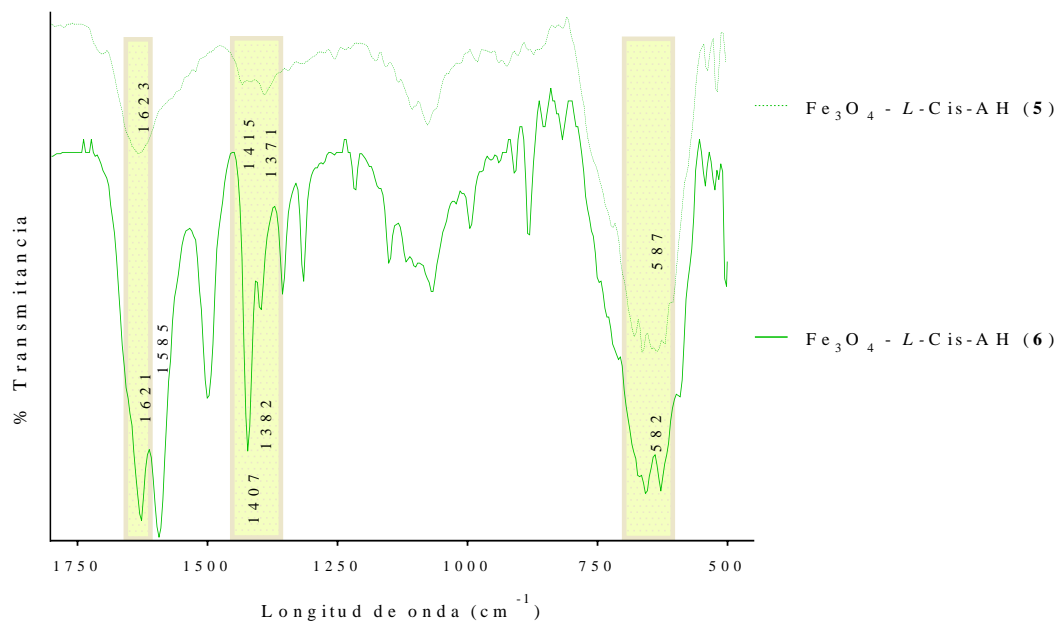


Figura 3-7: Espectros FT-IR de MNPs-*L*-Cis con relación de masas AH:Fe₃O₄ al 0,3 (5) y 0,6 (6).

El análisis de PDRX para los NHM mostró la presencia predominante de los picos correspondientes al núcleo magnético a ángulos 2θ : 30,3°, 35,6°, 43,3°, 53,7°, 57,2° y 62,8° (Figura 3.8a). Además, dado que no se observó la fase del AH en el patrón de difracción, los NHM exhibieron difractogramas similares. La mayor diferencia entre ellos fue la aparición de un pico a 28,3° correspondiente a *L*-Cis en 5. Cabe señalar, que para el compuesto 6 se observó este pico (Figura 3.8a); sin embargo, el difractograma presentó una baja relación señal:ruido dada la alta fluorescencia de la muestra y debido a que no se utilizó monocromador para obtener el difractograma.

Adicionalmente, se analizaron las muestras por TGA (Figura 3.8b). Y, a partir de estos resultados, se determinó una cantidad de compuesto orgánico de 6% y 21% para 5 y 6, respectivamente, los cuales son valores inferiores a los obtenidos para las partículas interaccionadas solo con *L*-Cis (Figura 3.8b). Estos resultados demostraron que el proceso de funcionalización con AH sobre las MNPs-*L*-Cis llevó también, a que parte de la *L*-Cis sea removida de las partículas, como fue determinado en la sección 2.3.3 del Capítulo II.

Por medio de DLS se determinaron los d_H , para los NHM basados en MNPs-*L*-Cis-AH, mostrando un valor de $(20 \pm 5) \times 10^1$ y $(16 \pm 4) \times 10^1$ nm para los sistemas **5** y **6**, respectivamente. Adicionalmente, se obtuvieron sus PDI con valores de 0,25 y 0,29, lo cual da cuenta de una moderada polidispersidad en las muestras evaluadas. Estos resultados indicaron que la presencia de AH, así como de *L*-Cis, estabilizaron y separaron eficientemente los núcleos magnéticos de las MNPs, resultando en partículas con un menor d_H , en comparación con las Fe_3O_4 *L*-Cis (ver resultado sección 2.3.2). Igualmente, cabe mencionar que la carga superficial de estos NMH demostró ζ similares a los observados al momento de realizar la primera funcionalización con *L*-Cis, ya que la carga resultante de los sistemas fue negativa con valores de -23,47 y -21,61 mV para los sistemas **5** y **6**, respectivamente. Esto puede atribuirse a la carga negativa intrínseca que posee el AH a pH 5 (sección 6.3.2.2).

El análisis del tamaño de partícula se completó mediante TEM, el cual reveló que los sistemas **5** y **6** presentaban tamaños de (11 ± 5) nm y (15 ± 3) nm, respectivamente (Figura 3.9), los cuales fueron inferiores a los obtenidos por DLS. El mayor tamaño aparente obtenido por análisis de DLS puede explicarse considerando la hidratación de las cadenas poliméricas lo que puede influir en el coeficiente de difusión de las partículas en dispersión ²⁴. Los resultados de TEM indican que la cantidad de AH usada en la obtención de los NHM no influyó significativamente en su tamaño. Sin embargo, la cubierta polimérica de las NMH permitió separar eficientemente los núcleos magnéticos, como se puede observar en las imágenes de TEM de la Figura 3.9, en comparación con la de las MNPs con y sin *L*-Cis (sección 2.3.1 y 2.3.2).

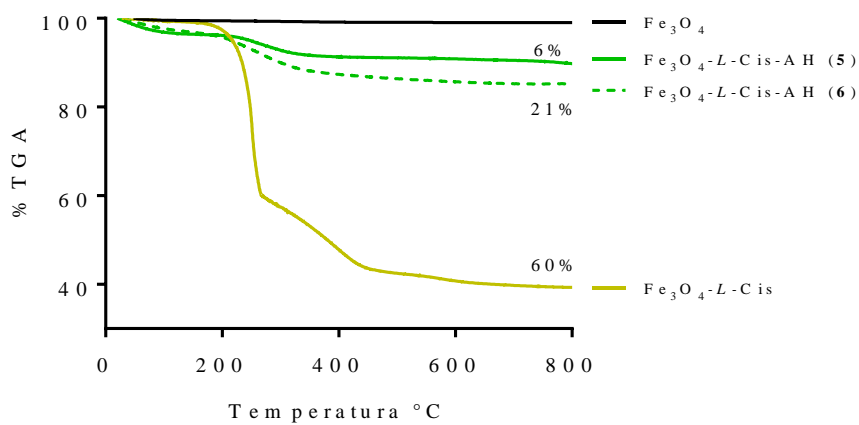
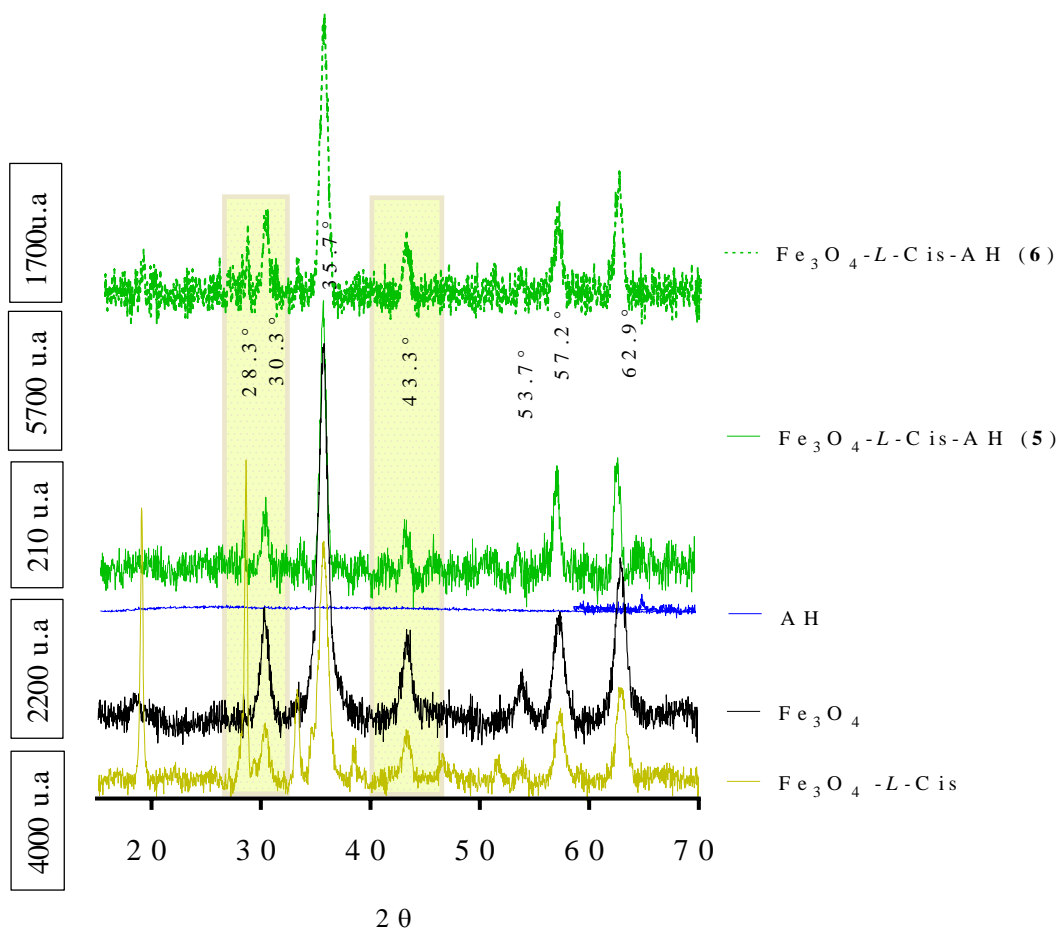


Figura 3-8: a) Difractogramas MNPs-*L*-Cis (mostaza), MNPs (negro) y AH (azul) con: MNPs-*L*-Cis-AH (5) y (--- 6) (verde), b) Análisis TGA para los compuestos conjugados con AH 5 y 6, Fe_3O_4 y Fe_3O_4 -*L*-Cis

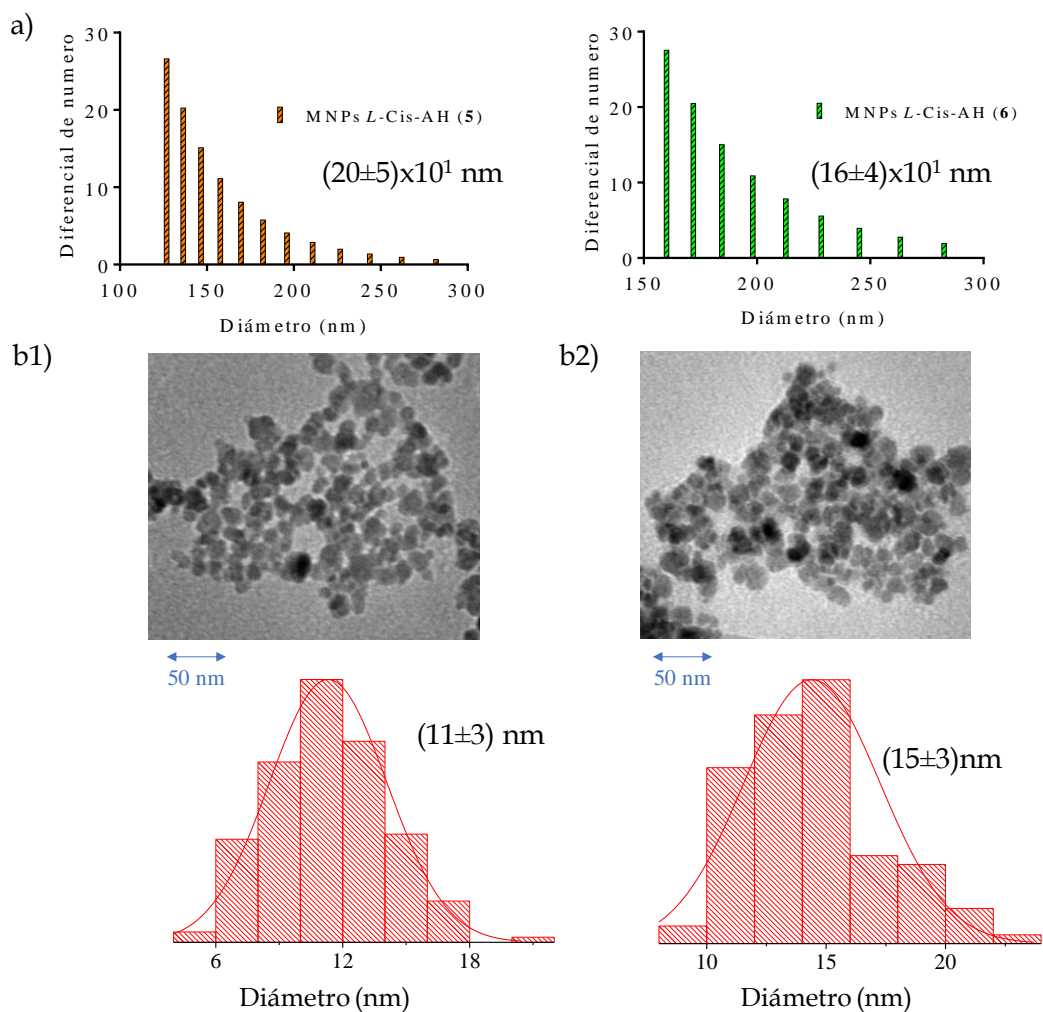


Figura 3-9: a) Distribución de partículas por DLS: MNPs- L-Cis -AH (5) y (6) b) imágenes TEM: b-1) (5) b-2) (6)

3.3.3. MNPs funcionalizadas con AH

Con el fin de evaluar el efecto general de la incorporación de *L*-Cis en la NHM, adicionalmente, se preparó una plataforma combinando MNPs con AH, en ausencia de *L*-Cis, dado que las MNPs demostraron una alta afinidad para interactuar con grupos $-\text{COO}^-$. Dado que en los sistemas MNPs-*L*-Cis-AH no se observaron marcadas diferencias entre los NMH obtenidos empleando diferentes proporciones de AH, se seleccionó la menor relación AH:Fe₃O₄ (sección 3.3.2). Cabe destacar que para esta selección se consideraron estudios previos realizados por otros investigadores, en los cuales se demostró que al aumentar la proporción de AH en un sistema NMH, se puede incrementar la

migración celular e incluso generar una mayor resistencia a los fármacos. Estos aspectos son de gran relevancia al considerar el objetivo terapéutico de los NHM que involucran el tratamiento del cáncer ²⁵.

La síntesis de las MNPs-AH se llevó a cabo incorporando AH previo a la síntesis del núcleo magnético, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.3.1. Dicha plataforma mostró, en su espectro FT-IR, que las bandas características del AH, como las tensiones asimétricas y simétricas de los grupos -COO- a 1617 y 1409 cm^{-1} se encontraban presentes en el NHM, así como una banda alrededor de 1370 cm^{-1} producto de una tensión simétrica y asimétrica del enlace C-O, proveniente de la formación de un posible enlace tipo éster (Figura 3.10a). Asimismo, se observó la tensión Fe-O a 614 cm^{-1} indicando la presencia de los núcleos magnéticos. Por otro lado, el ζ de las plataformas evidenció que la carga superficial de las MNPs posterior a la incorporación de AH fue de $-22,77\text{ mV}$. Nuevamente, al compararlo con la carga superficial de $26,07\text{ mV}$ obtenido para las MNPs sin funcionalizar (sección 2.3.2, Capítulo II), se puede inferir que la presencia del compuesto de AH, con sus grupos -COO- , afectan la carga superficial de las plataformas.

El NHM $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AH}$ también se analizó por PDRX y TGA (Figura 3.10b-c). Respecto del análisis de PDRX (Figura 3.10b), se compararon los difractogramas de NHM, el núcleo magnético y el polímero. Este estudio demostró que el sistema $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-AH}$ presenta la misma fase que el núcleo de Fe_3O_4 sin funcionalizar. Por lo tanto, la presencia de AH en el NHM no afectó a la cristalinidad de dicho núcleo magnético.

Finalmente, las curvas de TGA obtenidas para el NHM, el núcleo magnético y el polímero se muestran en la Figura 3.10c. Como se mencionó en la sección 3.3.2 del Capítulo III, el AH presenta dos etapas de degradación a 233°C y 411°C . Por su parte, la magnetita muestra una gran estabilidad térmica hasta 800°C ²⁶. Para el caso del NHM se observó una desorción de agua hasta

los 160 °C y, posteriormente, se observaron dos procesos de degradación térmica correspondientes al AH incorporado en la plataforma. El proceso inicial ocurrió a 234°C y el segundo a 357°C, los cuales corresponden a la descomposición del polisacárido. Adicionalmente, se observó una mayor estabilidad térmica del AH al estar conjugado con las MNPs, dado que la pendiente de degradación del NHM fue menor que la de AH puro. Por último, se evidenció una pérdida de masa del 10%, correspondiente a la incorporación de AH en el sistema MNPs-AH.

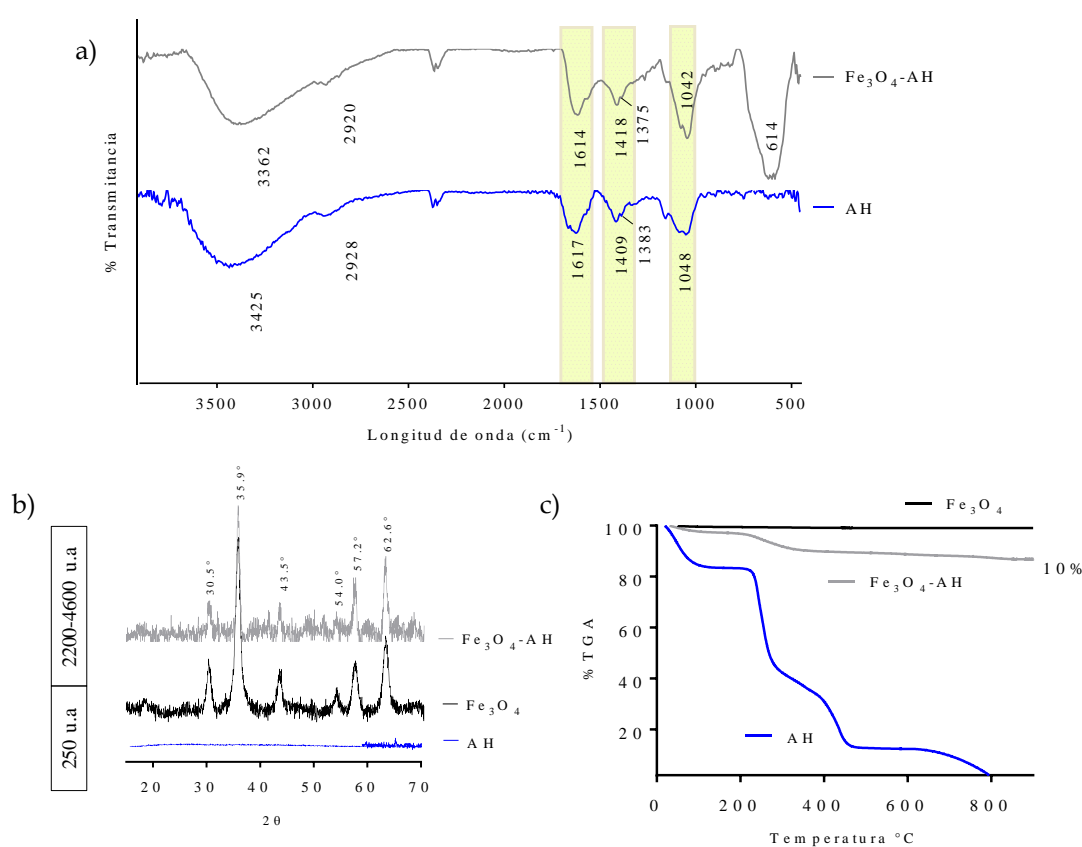


Figura 3-10: a) Espectros FTIR, b) Difractogramas c) Curvas de TGA, para AH (azul), MNPs-AH (gris), MNPs (negro),

De acuerdo con los resultados de DLS para el sistema MNPs-AH el d_H presentó un valor de $(35 \pm 8) \times 10^1$ nm junto con una PDI de 0,33 (Figura 3.11). Este aumento de tamaño, al compararlo con el sistema que contiene *L*-Cis y AH, podría estar relacionado con una mayor relajación de las cadenas poliméricas en el sistema MNPs-AH²⁴. Por el contrario, en el caso de la plataforma NHM

con *L*-Cis, dado que puede tener lugar una mayor interacción intramolecular entre la *L*-Cis y el AH, ya sea por interacciones puente hidrógeno o hidrofóbicas, las cadenas poliméricas logran una mayor compactación, lo cual se ve reflejado en un menor tamaño aparente. Además, la presencia de *L*-Cis en el NHM podría conferirle mayor estabilidad al sistema disperso, evitando aglomeraciones entre las partículas, lo que también reduciría el tamaño de los NHM.

Por otro lado, el análisis TEM reveló un tamaño de partícula de (14 ± 4) nm. Este resultado se puede explicar considerando que, durante la nucleación y crecimiento de las partículas, el AH tuvo una adhesión parcial sobre los núcleos magnéticos, dando como resultado una mayor atracción magnética de las partículas y llevando a la agregación del sistema.

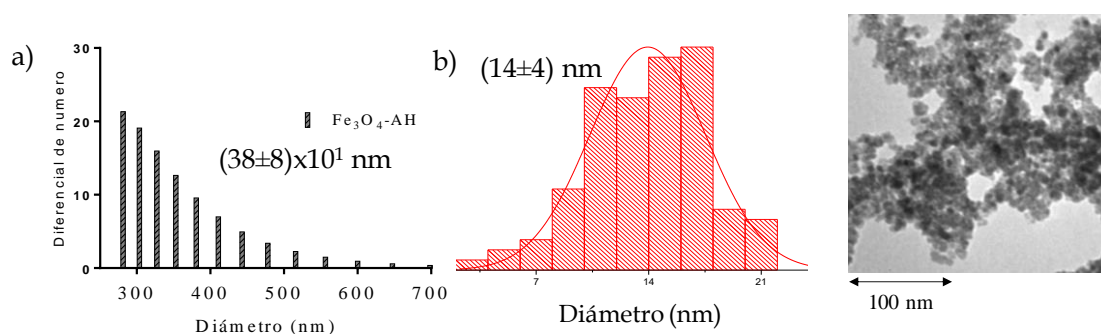


Figura 3-11: Distribución de las poblaciones de partículas del sistema MNPs-AH obtenidos por a) DLS y b) TEM, con su respectivo histograma de distribución de tamaños

3.4. Conclusiones parciales

Los sistemas de NHM fueron obtenidos mediante la conjugación de las MNPs de Fe_3O_4 con compuestos como AH, así como con el conjugado *L*-Cis-AH. Estas funcionalizaciones se realizaron con la finalidad brindarle al NHM la capacidad de adquirir nuevas propiedades, como también nuevos grupos funcionales, los cuales son idóneos para facilitar una posterior funcionalización.

Se obtuvieron dos sistemas que incluían MNPs-*L*-Cis-AH en relaciones en masa (AH:Fe₃O₄) 0,3 y 0,6; sin embargo, se descartó el sistema MNPs-LCis-AH 0,6 para posteriores aplicaciones, ya que no mostró diferencias significativas con el sistema que empleó una menor cantidad de AH y, además, se consideró más aceptable un menor uso de AH en vistas a una aplicación terapéutica en el tratamiento del cáncer.

El estudio de la interacción directa entre las MNPs y AH mostró diferencias con respecto a las MNPs-*L*-Cis-AH como producto de la no restricción del grupo -COO⁻ presente en el AH. Asimismo, la presencia de *L*-Cis en el NMH mejoró las características del sistema al disminuir el grado de aglomeración, tal como se observó mediante TEM y DLS, al compararlo solo con la funcionalización del núcleo magnético con AH.

La caracterización realizada a cada uno de los componentes, así como a los compuestos finales indicó NMH son compuestos que exhiben fuertes interacciones entre los grupos constituyentes del sistema conjugado.

3.5. Bibliografía

1. Kim, K. Y. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine* **3**, 103–110 (2007).
2. Kim, S., Kim, J. H., Jeon, O., Kwon, I. C. & Park, K. Engineered polymers for advanced drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**, 420–430 (2009).
3. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
4. Yang, P. F. & Lee, C. K. Hyaluronic acid interaction with chitosan-conjugated magnetite particles and its purification. *Biochem. Eng. J.* **33**, 284–289 (2007).
5. Lee, Y. *et al.* Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer imaging. *Adv. Mater.* **20**, 4154–4157 (2008).
6. Ahmadi, R., Gu, N., Reza, H. & Hosseini, M. Characterization of Cysteine Coated Magnetite Nanoparticles as MRI Contrast Agent. *Nano-Micro Lett.* **4**, 180–183 (2012).
7. Schwaminger, S. P. *et al.* Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **119**, 23032–23041 (2015).

8. Entwistle, J., Hall, C. L. & Turley, E. A. HA receptors: Regulators of signalling to the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.* **61**, 569–577 (1996).
9. Luo, Y. & Prestwich, G. D. Hyaluronic Acid- N-hydroxysuccinimide: A Useful Intermediate for Bioconjugation. *Bioconjug. Chem.* **12**, 1085–1088 (2001).
10. Bonengel, S. & Bernkop-Schnürch, A. Thiomers - From bench to market. *J. Control. Release* **195**, 120–129 (2014).
11. Andreas Bernkop-Schnurch. Preactivated Thiomers: A New Generation of Mucoadhesive Polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **5**, 1–3 (2013).
12. Fuhrman, Lc. *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. American Journal of Pharmaceutical Education* **70**, (2006).
13. Mattheolabakis, G., Milane, L., Singh, A. & Amiji, M. M. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *J. Drug Target.* **23**, 605–618 (2015).
14. Nguyen, V. Du *et al.* Nanohybrid magnetic liposome functionalized with hyaluronic acid for enhanced cellular uptake and near-infrared-triggered drug release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **154**, 104–114 (2017).
15. Heidari Majd, M. *et al.* Tamoxifen loaded folic acid armed PEGylated magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy of cancer. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **106**, 117–125 (2013).
16. Battistini, F. D., Flores-Martin, J., Olivera, M. E., Genti-Raimondi, S. & Manzo, R. H. Hyaluronan as drug carrier. the in vitro efficacy and selectivity of Hyaluronan-Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **65**, 122–129 (2014).
17. Zhu, Z., Li, Y., Yang, X., Pan, W. & Pan, H. The reversion of anti-cancer drug antagonism of tamoxifen and docetaxel by the hyaluronic acid-decorated polymeric nanoparticles. *Pharmacol. Res.* **126**, 84–96 (2017).
18. Prabha, G. & Raj, V. Synthesis and characterization of chitosan–polyvinylpyrrolidone–bovine serum albumin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as potential carrier for delivery of tamoxifen. *J. Iran. Chem. Soc.* **15**, 871–884 (2018).
19. Zhou, Y. & Xie, Q. Sensors and Actuators B: Chemical Hyaluronic acid-coated magnetic nanoparticles-based selective collection and detection of leukemia cells with quartz crystal microbalance. *Sensors Actuators B. Chem.* **223**, 9–14 (2016).
20. Li, X., Yu, G., Jin, K. & Yin, Z. Hyaluronic acid L-cysteine conjugate exhibits controlled-release potential for mucoadhesive drug delivery. *Pharmazie* **67**, 224–228 (2012).
21. Instruccions. Ellman ' s Reagent. *Thermo Scientific* **22582**, 0311.3
22. Badyal, J. P. *et al.* A simple method for the quantitative analysis of resin bound thiol groups. *Tetrahedron Lett.* **42**, 8531–8533 (2001).
23. Lapcik, L. *et al.* Physicochemical Analysis of Hyaluronic Acid Powder for Cosmetic and Pharmaceutical Processing. *Hyaluronic Acid Biomed. Pharm. Appl.* 89–101 (2014).
24. Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P. & Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med. (Praha).* **53**, 397–411 (2008).

25. Lee, T. *et al.* Minimum hyaluronic acid (HA) modified magnetic nanocrystals with less facilitated cancer migration and drug resistance for targeting CD44 abundant cancer cells by MR imaging. *J. Mater. Chem. B* **5**, 1400–1407 (2017).
26. Goya, G. F., Berquó, T. S., Fonseca, F. C. & Morales, M. P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **94**, 3520–3528 (2003).

Capítulo IV

*Nanopartículas magnéticas
híbridas como portadoras de
tamoxifeno*

4.1. Introducción

Una de las aplicaciones de los NHM con mayores perspectivas de desarrollo es su empleo como sistemas portadores de fármacos. Sin embargo, para que los NHM se consideren vehículos adecuados, deben cumplir los siguientes requisitos ¹:

- Ser capaces de unirse o contener el fármaco o fármacos que vehiculizan.
- Permanecer unidos al fármaco de forma estable en la sangre para evitar la biodistribución del fármaco en órganos que no son diana terapéutica.

Y en particular, para el tratamiento del cáncer:

- Acumularse en las células tumorales, reduciendo los efectos adversos.
- Ser capaces de liberar el fármaco una vez localizados en el tumor.
- Estar compuestos por un material biocompatible y, preferentemente, biodegradable.

Actualmente, existe una gran cantidad de fármacos antitumorales utilizados en quimioterapia, los cuales se podrían incorporar a un NHM y ser dirigidos al tumor. El libro *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems* ² abarca una revisión detallada de NHM a partir de óxidos de hierro y de distintos fármacos que pueden llevar unidos en su superficie ^{3,4}

Para que se produzca una liberación eficiente de los fármacos, los NHM tienen que ser internalizados por las células diana sobre las que tienen que actuar y, una vez en su interior, deben liberar el agente terapéutico. Para ello, se incorporan sensores moleculares a las NPs, que son capaces de responder a diferentes estímulos químicos o biológicos, como cambios en el pH, en el potencial redox o actividades enzimáticas, entre otros ^{5,6,7}.

Un mecanismo efectivo para dirigir los NHM, constituidos por MNPs, hacia órganos diana se basa en la utilización de un campo magnético externo. Esta propiedad tiene un gran interés en el área de la nanobiomedicina ya que permite el control de la acumulación de los NHM, de forma no invasiva, en el sitio de acción farmacodinámico, con la consecuente liberación del fármaco vehiculizado^{8 9}. Este favorecería una posible reducción de la dosis del fármaco, que sumado al direccionamiento hacia la diana terapéutica, podría reducir los efectos secundarios no deseados sobre otras células o tejidos sanos⁵.

Como se mencionó en el Capítulo I *Introducción general*, entre las diferentes patologías que son objeto de estudio para la optimización de sus tratamientos, mediante el uso de sistemas portadores de fármacos, se encuentra el cáncer. Éste es considerado como una de las enfermedades con mayor mortalidad a nivel global¹⁰. El estudio de nuevas terapias para su tratamiento, ya sea por medio de la síntesis de nuevos principios activos o bien por la utilización de fármacos de reconocida utilidad terapéutica vehiculizados en sistemas portadores para optimizar su acción, son un área en constante actualización y crecimiento.

4.1.1. Nuevos tratamientos para el cáncer

Como se mencionó en la sección 1.5, el cáncer se caracteriza por poseer un mecanismo de crecimiento celular anómalo, el cual, cuando logra escapar de los mecanismos de control y defensa del organismo, desemboca en invasión y metástasis¹¹. Los fármacos antineoplásicos específicos para cada tipo de cáncer actúan sobre una o varias fases del ciclo de división celular para evitar su proliferación¹². En particular, el cáncer de mama es el más frecuente y es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. Un fármaco antineoplásico muy usado para combatir esta enfermedad es el TMX^{13,14} (Figura 1.3) el cual tiene como función evitar que el estrógeno se una a las células afectadas y, así impedir que éstas logren crecer y dividirse. Sin embargo, se presentan casos en

donde se producen alteraciones genéticas que provocan heterogeneidad celular, dando como resultado una mala respuesta al tratamiento, condición que se conoce como resistencia a la quimioterapia^{12,15}. Por esta razón, en muchos casos se recomienda que el tratamiento cuente con la máxima dosis de fármaco tolerable, con el fin de incrementar el porcentaje de muerte de las células tumorales; no obstante, esto aumenta la incidencia de efectos secundarios en el organismo¹⁶.

En virtud de lo expuesto en los capítulos precedentes, la nanotecnología se ha convertido en una herramienta esencial en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Ya que, a través del uso de nuevos sistemas portadores, se podría lograr la vehiculización y direccionamiento de los fármacos antineoplásicos hacia el sitio diana y, de esta manera, reducir los efectos adversos que están asociados al tratamiento del cáncer. Si bien se han desarrollado muchos sistemas portadores con esta finalidad terapéutica, solo una pequeña parte ha logrado alcanzar las fases clínicas en desarrollo. Aunque en muchos casos se han empleado compuestos biocompatibles para su obtención, su conjugación con los fármacos anticancerígenos no ha logrado resolver eficientemente los problemas de toxicidad y efectos adversos asociados a sus usos. Algunos de estos problemas pueden surgir por una difícil degradación o eliminación del sistema por parte del huésped, junto a la dificultad para vehiculizar el fármaco dentro de la estructura del portador o a la ineficiente modulación de su liberación, entre otros^{17,18,19}.

La agencia sanitaria de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA) ha aprobado algunas nanomedicinas para su uso en la terapia contra el cáncer de mama. La mayoría corresponden a formulaciones de base lipídica, así como sistemas nanoparticulados²⁰. Entre los sistemas lipídicos y nanoparticulados se encuentran: Doxil[®]/Caelyx[®], Myocet[®] que son vehículos lipídicos cargados con doxorubicina y Abraxane[®], el cual se basa en NPs de albúmina para vehiculizar paclitaxel. Cabe recalcar que existe una gran

cantidad de nuevas formulaciones, aún en diversas etapas de estudios preclínicos y clínicos, que se espera presenten resultados superiores a los tratamientos convencionalmente utilizados y sean plausibles de aprobación por las agencias sanitarias para su uso en diferentes terapias contra el cáncer ²⁰.

4.1.1.1. NHM como portadores de fármacos antitumorales

La terapia convencional contra una enfermedad presenta muchas veces un bajo índice de éxito terapéutico. Esto debido a que los fármacos de reconocida utilidad terapéutica presentan propiedades desfavorables como una baja solubilidad en los fluidos biológicos; inadecuado coeficiente de reparto; insuficiente permeabilidad; inestabilidad química del fármaco en los fluidos biológicos previo a alcanzar el sitio de acción; degradación metabólica por sistemas enzimáticos antes de llegar a la circulación sistémica o estrecho margen terapéutico. Todos estos aspectos hacen necesario un estricto seguimiento y monitoreo de los niveles de fármaco en los fluidos biológicos durante el tratamiento y, así, evitar superar la concentración máxima tóxica (CMT), pero manteniendo los niveles del fármaco por encima de concentración mínima eficaz (CME) ²¹. Estas propiedades que influyen negativamente la acción terapéutica, pueden ser superadas mediante estrategias de diseño y formulación. Entre estas estrategias se encuentra el desarrollo de NM como plataformas para liberación modificada de fármacos, que permiten controlar o modular su liberación en medios biológicos.

En este sentido, las razones del éxito de los sistemas portadores están relacionadas con las múltiples ventajas que éstos pueden ofrecer, entre las cuales se destacan: reducción en las fluctuaciones de niveles plasmáticos del fármaco (evitando o reduciendo los picos/valles en las concentraciones plasmáticas), mantenimiento el estado estacionario durante períodos prolongados de tiempo, con la consiguiente disminución de la frecuencia de dosificación y, en vistas a una aplicación clínica, un mejor cumplimiento del

tratamiento por parte del paciente; así como el direccionamiento a sitios específicos para reducir efectos adversos.

Al considerar las ventajas que presentan las NPs como sistemas portadores de fármacos, diferentes estudios se han centrado en la vehiculización de fármacos antitumorales para el tratamiento de cáncer, como el docetaxel, doxorubicina o TMX ^{22,23}. Por ejemplo, el uso de AH como portador de estos fármacos demostró mejores resultados en el tratamiento y disminución de proliferación de células MCF7 (adenocarcinoma de mama), A549 (adenocarcinoma de pulmón) y S180 (sarcoma) en comparación con el fármaco puro ^{24,25,26}.

Las propiedades prometedoras del AH como portador de fármacos antitumorales alentaron su uso en el presente trabajo de tesis para el desarrollo de NHM, tal como se describió en el Capítulo III. La utilización del AH, como matriz polimérica para modificar la superficie de las MNPs, no solo contribuye al aumento de la compatibilidad biológica del sistema portador, sino que también es el responsable del aumento del reconocimiento celular, dada la sobre expresión de receptores CD44 por los cuales el AH presenta afinidad. Si bien este compuesto presenta características excepcionales en la lucha contra el cáncer, como: direccionamiento del fármaco vehiculizado, reconocimiento celular, aumento de dispersabilidad acuosa y posibilidad de interacción electrostática con fármacos ionizables de carga opuesta ²⁷, su uso en exceso podría generar algunos inconvenientes como: aumento de la migración celular o resistencia a los fármacos ²⁸.

En consecuencia, su uso implica un compromiso para que sus efectos favorables sean aprovechados y se eviten los efectos no deseados de su acción. Por tal motivo, en el presente trabajo de tesis se utilizó el AH como agente para funcionalizar la superficie de las MNPs, formando parte de NHM como portadores del fármaco antitumoral TMX.

4.2. Objetivos

El objetivo general de este Capítulo fue evaluar los NHM como sistemas portadores de TMX.

Como objetivos específicos se propuso incorporar TMX en los NHM y evaluar la eficiencia de cargado; determinar la estructura y morfología de los NHM una vez incorporado el TMX, para lo cual se efectuó la caracterización fisicoquímica completa de los sistemas con y sin *L*-Cis. Adicionalmente, se propuso estudiar la naturaleza de la interacción entre las plataformas y el TMX mediante estudios de desplazamiento iónico. Con la finalidad de determinar la capacidad de los NHM para modular la liberación de TMX se propuso estudiar su comportamiento *in vitro*. Tomando en consideración la potencial utilidad terapéutica de los NHM-TMX desarrollados, se propuso estudiar la seguridad de las plataformas mediante evaluación del potencial hemolítico y la eficacia en cultivos celulares tumorales de cáncer de mama.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Cargado y caracterización de las NHM-TMX

Los NHM, con y sin *L*-Cis presentadas, en el Capítulo III fueron evaluados como sistemas portadores de TMX. Además, dado que el TMX es una molécula orgánica que posee un grupo amino capaz de protonarse en medios ácidos, se propuso utilizar la posible interacción iónica con los grupos $-\text{COO}^-$ del AH presentes en los NHM tal como se muestra en la Figura 4.1

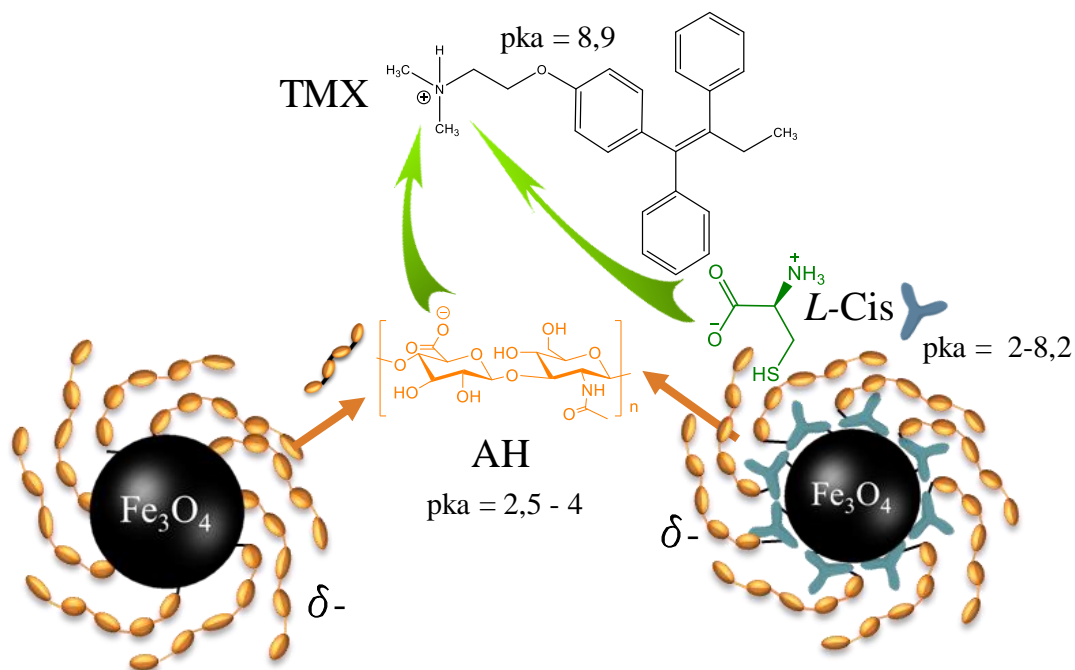


Figura 4-1: Estructura química del TMX y representación esquemática de su interacción con los NHM con y sin *L-Cis*.

4.3.1.1. Interacción de TMX con los NHM

Los NHM seleccionados, MNPs-*L-Cis*-AH y MNPs-AH, se cargaron con TMX, utilizando una solución acuosa del fármaco 122 μM de concentración y se los dejó interaccionar durante 72 h. Durante este proceso, se utilizó un mecanismo de agitación vertical con el fin de favorecer la homogeneidad de los sistemas y evitar posibles sedimentaciones de los componentes. Finalizado el tiempo de interacción, se realizaron 3 lavados con agua Milli-Q y los sistemas NHM-TMX fueron separados por acción de un imán comercial de neodimio. Las soluciones remanentes obtenidas fueron analizadas por espectrofotometría UV-*vis*, a 235 nm ($\epsilon = 16748 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) con la finalidad de determinar la eficiencia de cargado del fármaco (%ECF) en los NHM-TMX. En la Tabla 4.1. se muestran los resultados obtenidos.

Se alcanzó una eficiencia de cargado de TMX en los NHM superior al 65% en ambos casos. La diferencia en el %EFC entre el sistema con y sin *L-Cis* podría explicarse considerando que los sistemas con *L-Cis* presentaban una

mayor proporción de grupos -COOH, aportados tanto por la *L*-Cis como por el AH, plausibles de ser ionizados para interactuar con el TMX. En este punto, resulta de relevancia destacar que el pH del medio utilizado durante la interacción entre el TMX y los NHM (pH≈7) favoreció la deprotonación de los grupos -COOH, de modo tal que estos grupos presentaban una carga negativa; mientras que, el TMX se encontraba protonado. En consecuencia, pudo tener lugar una interacción de tipo electrostática entre los grupos -COO⁻ expuestos por parte del AH (principalmente) y el grupo amonio del TMX (Figura 4.1).

Tabla 4-1: Eficiencia de cargado de TMX en los NHM

NHM-TMX	ECF (%) ^a
Fe ₃ O ₄ - <i>L</i> -Cis-AH-TMX	72 ± 2
Fe ₃ O ₄ -AH-TMX	66 ± 1

a) % Eficiencia de cargado %ECF: $((TMX_i - TMX_r) * 100 / TMX_i)$,

4.3.2. Caracterización físicoquímica de los NHM-TMX

Los espectros FT-IR (Figura 4.2) demostraron la presencia del fármaco conjugado en los NHM-TMX, ya que se observaron señales características para este compuesto ^{29,30}. Junto con las señales características de las plataformas como: las tensiones Fe-O del núcleo magnético alrededor de 600 cm⁻¹, las bandas cercanas 1390 cm⁻¹ correspondientes a los grupos -COO⁻ de AH; y las bandas alrededor de 1620 cm⁻¹ características de los estiramientos del -CONHR del AH. Además, se observaron bandas nuevas alrededor de 1230 cm⁻¹, correspondiente a flexiones del grupo HCO presente en el sustituyente (-OCH₂CH₂-N(CH₃)₂) de TMX. Asimismo, cercano a 1500 cm⁻¹ se observó una señal débil originada por las deformaciones en los enlaces HCC presentes en los anillos aromáticos de TMX. Finalmente, la aparición de pequeño hombro por encima 1700 cm⁻¹, puede atribuirse a la presencia de grupos -COOH de la plataforma, así como también en parte a una asociación con el grupo citrato presente como contra ion del TMX empleado.

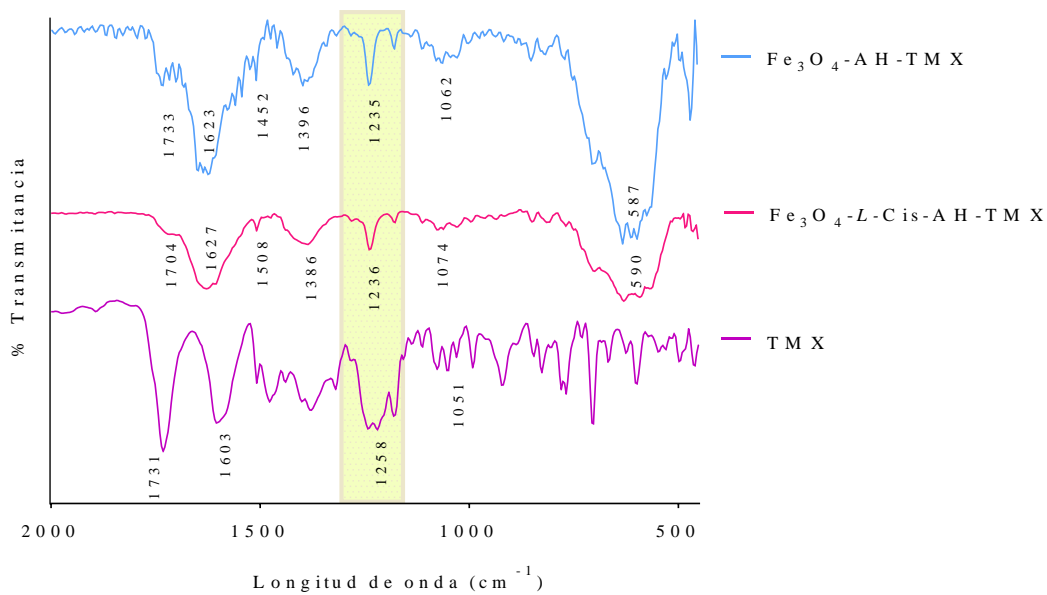


Figura 4-2: Espectros FT-IR de los sistemas NHM-TMX con y sin *L*-Cis

El análisis mediante DRXP (Figura 4.3) permitió evidenciar una nueva fase en los NHM-TMX correspondiente a la incorporación del fármaco, que se reflejó un pico característico a $20,6^\circ$, muy similar al observado para TMX puro. Por otra parte, los picos subsiguientes para ángulos de $30,5^\circ$, $35,9^\circ$, $43,5^\circ$, $54,0^\circ$, $57,5^\circ$, y $63,1^\circ$ corresponden al núcleo magnético presente en los NHM, y otros picos característicos de las plataformas (sección 3.3.2 y 3.3.3).

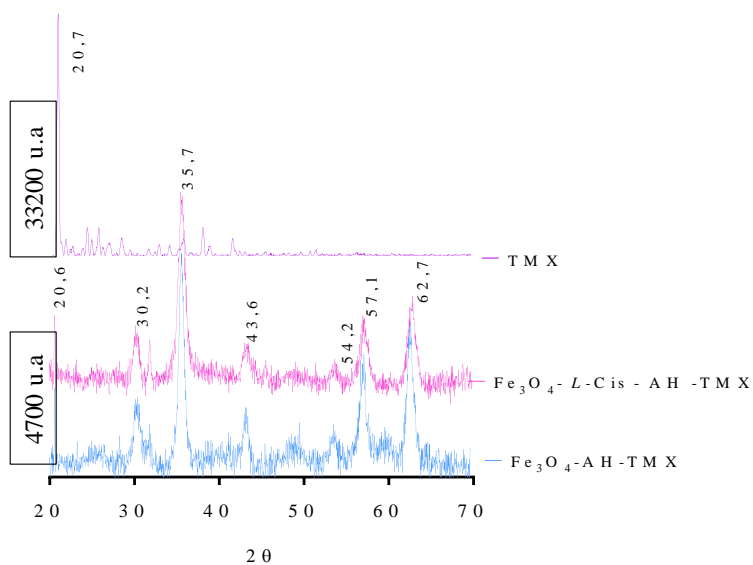


Figura 4-3: Difractogramas para TMX y los NHM-TMX con y sin *L*-Cis.

Se realizaron análisis de TGA para los sistemas NHM- TMX con y sin *L*-Cis, y TMX puro (Figura 4.4). La curva de TGA del TMX puro mostró dos etapas de descomposición térmica, la primera a una temperatura de 153°C y la segunda a 184°C³¹. Para los sistemas NHM-TMX con y sin *L*-Cis se observó un solo proceso de degradación, el cual comenzó a temperaturas cercanas a 153°C, abarcando las descomposiciones de AH, *L*-Cis y TMX. Estos resultados indican un aumento de la estabilidad térmica de cada uno de los componentes precursores al estar integrados en los NHM-TMX. En los sistemas NHM-TMX, con y sin *L*-Cis, se observó que el componente orgánico total representó pérdidas de masa porcentual de 11% y 10 %, respectivamente. Esta diferencia, aunque mínima, podría explicarse considerando la mayor eficiencia de cargado de TMX por parte del NHM-TMX con *L*-Cis en comparación con la plataforma que no presenta *L*-Cis en su composición.

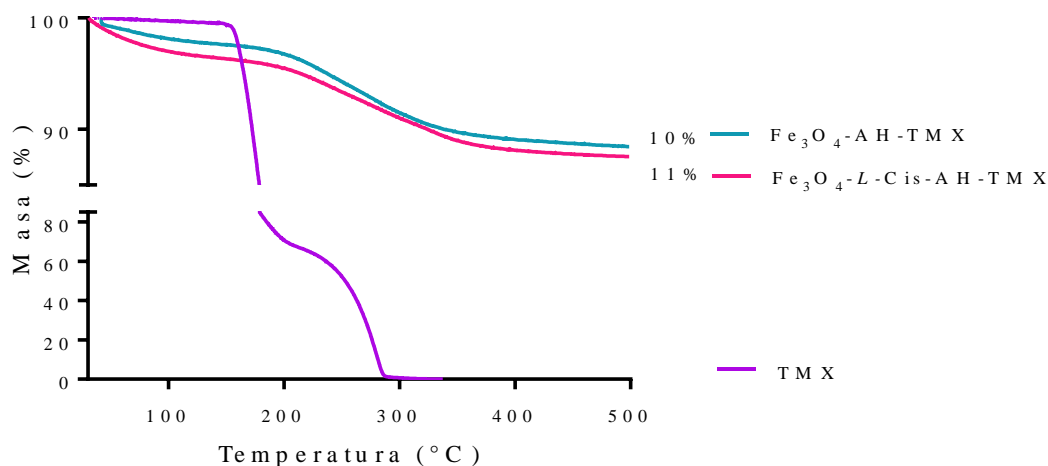


Figura 4-4: Curvas de TGA para los NHM-TMX con y sin *L*-Cis.

La morfología, tamaño y distribución de tamaños fueron analizadas mediante TEM y DLS. Las imágenes de TEM obtenidas (Figura 4.5) muestran que las NHM-TMX con y sin *L*-Cis presentaron tamaños de (10±3) nm y (11±3) nm respectivamente. Sin embargo, se observó que ambos sistemas presentan menor grado de aglomeración en comparación a los NHM sin TMX. Esta disminución de tamaño puede explicarse considerando una menor

atracción entre los núcleos magnéticos debido al alto grado de funcionalización en los NHM-TMX.

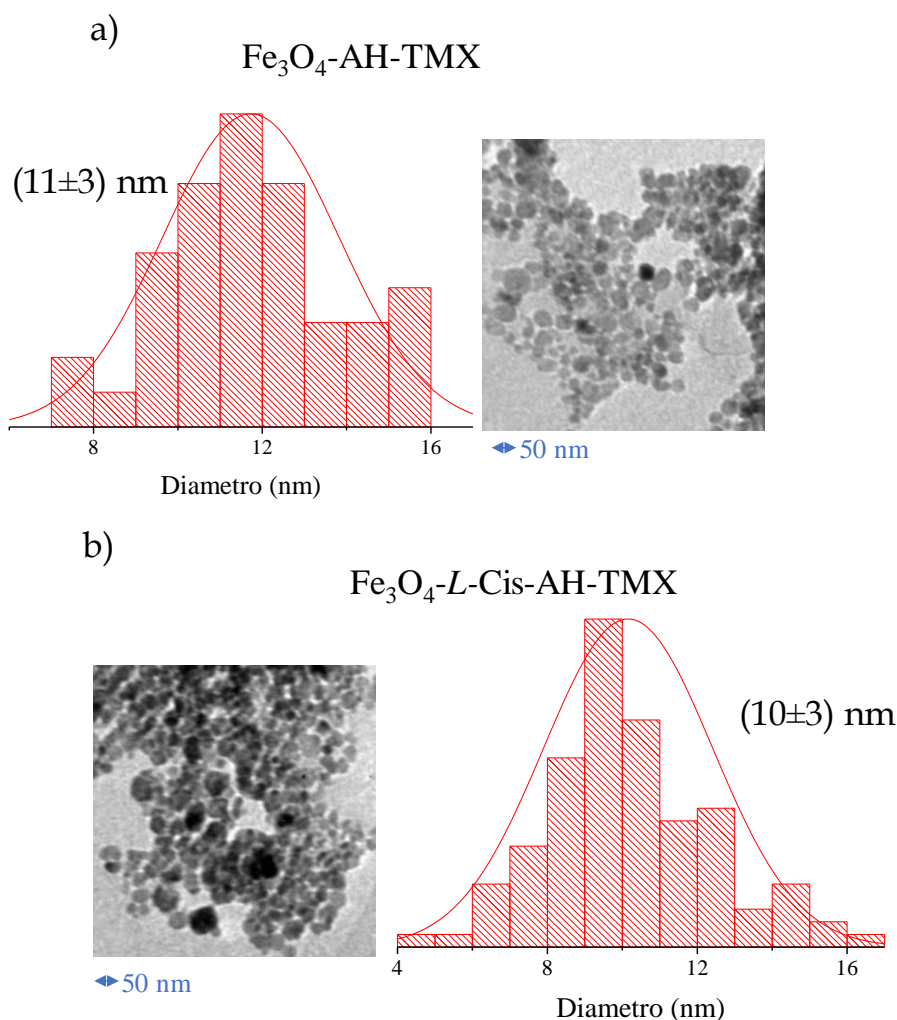


Figura 4-5: Imágenes de TEM e histogramas de los NHM-TMX a) sin *L-Cis* y b) con *L-Cis*.

Por otro lado, se realizó el análisis por DLS de los NHM-TMX en dispersión, con la finalidad de evaluar su comportamiento en fluidos biorrelevantes como lo son el medio de cultivo (MC) y las soluciones PBS 7,4 y ACS 5 (Tabla 4.2). Estos medios fueron evaluados considerando los estudios de liberación *in vitro* del TMX y eficacia antitumoral en cultivos celulares. Este ensayo demostró que tanto los NHM-TMX con y sin *L-Cis* se dispersan adecuadamente, pero sedimentaron con el tiempo, lo que indicaría que en estos medios podría tener lugar un proceso de agregación de las partículas.

Tabla 4-2: d_H , PDI y ζ de las dispersiones de NHM-TMX en ACS 5, PBS 7,4 y medio de cultivo (MC) al día 0 y luego de 16 días de contacto de las partículas con estos medios.

			d_H (nm) $\times 10^2$	PDI	ζ (mV)
0 días	Fe_3O_4 -AH-TMX	ACS 5	5 \pm 1	0,37	-21,62
		PBS 7,4	2,1 \pm 0,5	0,46	-22,36
		MC	3,4 \pm 0,8	0,43	-13,51
	Fe_3O_4 -L-Cis-AH-TMX	ACS 5	4 \pm 1	0,22	-15,32
		PBS 7,4	3,1 \pm 0,7	0,30	-25,67
		MC	3,4 \pm 0,9	0,39	-14,9
16 días	Fe_3O_4 -AH-TMX	ACS 5	4 \pm 1	0,30	-19,27
		PBS 7,4	2,3 \pm 0,6	0,23	-26,55
		MC	1,1 \pm 0,3	0,22	-12,09
	Fe_3O_4 -L-Cis-AH-TMX	ACS 5	3,7 \pm 0,5	0,29	-4,2
		PBS 7,4	1,2 \pm 0,3	0,26	-22,88
		MC	1,0 \pm 0,3	0,27	-12,03

Al considerar condiciones de plasma sanguíneo, se estudió el comportamiento de las partículas en PBS pH 7,4; para condiciones de entorno celular endocítico se utilizó ACS pH 5 y, también, se evaluó el comportamiento de las partículas con MC. Los valores de ζ obtenidos producto de las dispersiones frescas realizadas al día 0, evidenciaron que los NHM-TMX con y sin L-Cis mantienen una carga superficial negativa, lo que favorecería su dispersabilidad en todos los medios estudiados³². Sin embargo, se observó que luego de 16 días todos los sistemas se encontraban sedimentados. En consecuencia, para poder realizar las mediciones de estos sistemas, a dicho tiempo de estudio, fue necesario redispersarlos mediante agitación vigorosa manual durante 2 min. Los valores obtenidos de ζ fueron similares a los de las dispersiones frescas (día 0) y se mantuvieron en el mismo orden de magnitud, con excepción del sistema NHM-TMX con L-Cis en ACS 5 que presentó un valor de -4.2 mV, lo cual podría ser indicativo de posibles problemas de estabilidad de la dispersión en este medio.

Con respecto al análisis comparativo de los resultados de d_H y PDI para los sistemas NHM-TMX medidos al día 0 y luego de 16 días de preparadas, las dispersiones, no se observaron diferencias significativas en los PDI de las muestras dispersadas en PBS 7,4, ACS 5 y MC.

Adicionalmente, cabe recalcar que ambos sistemas NHM-TMX, con y sin *L-Cis*, experimentaron una reducción del d_H luego de 16 días de preparada la dispersión, siendo este comportamiento más evidente en el sistema Fe_3O_4 -*L-Cis*-AH-TMX en PBS 7,4. Esta reducción de tamaño podría explicarse por una posible desagregación de las partículas debido al tiempo de transcurrido desde que las dispersiones fueron preparadas, sumado a una posible disminución de la imanación por parte del núcleo magnético de los sistemas, lo cual fue observado empíricamente durante el ensayo ³³. Esto se podría fundamentar, también, considerando la disminución de los PDI a los 16 días, principalmente para los sistemas Fe_3O_4 -AH-TMX, en donde el efecto del núcleo magnético sobre las propiedades de imanación sería más marcado, dado que el núcleo no se encuentra tan protegido como en el caso de los sistemas con *L-Cis*. Para corroborar este efecto sería necesario realizar futuros estudios sobre cómo se afectaría a la susceptibilidad magnética y las estructuras de las NMH-TMX luego de ser dispersadas en un medio de relevancia biológica.

Al considerar que los NHM-TMX tienen como finalidad su aplicación en un organismo, las principales características que estos sistemas deben poseer son estabilidad en el tiempo y afinidad acuosa. En las siguientes secciones se detallarán los estudios realizados para determinar estas características de las NHM-TMX.

4.3.2.1. Evaluación de las características hidrofóbicas e hidrofílicas de los NHM-TMX

Una característica importante de los NHM empleados en nanomedicina se basa en que, además de una alta biocompatibilidad, los sistemas deben exhibir carácter hidrofílico y ser estables en medios acuosos. Una estrategia para determinar el comportamiento hidrofóbico o hidrofílico de un NM, consiste en evaluar su partición en sistemas bifásicos orgánicos y acuosos ³⁴.

El estudio de afinidad de los NHM-TMX con y sin *L*-Cis en un medio acuoso fue realizado con la finalidad de evaluar la hidrofiliidad de los sistemas portadores. A modo esquemático, la Figura 4.6 se muestran los resultados obtenidos. Cuando se realizó la mezcla de solventes (orgánico y acuoso), se observó que las partículas se dispersaron adecuadamente (tiempo 0 min). Cuando las fases comenzaron a separarse, las partículas se mantuvieron dispersas solo en el medio acuoso (tiempo 120 min), lo cual demuestra su hidrofiliidad (Figura 4.6a). Asimismo, se observó que preservaron sus propiedades magnéticas durante el proceso los NHM al estar frente a la acción de un imán (Figura 4.6b).

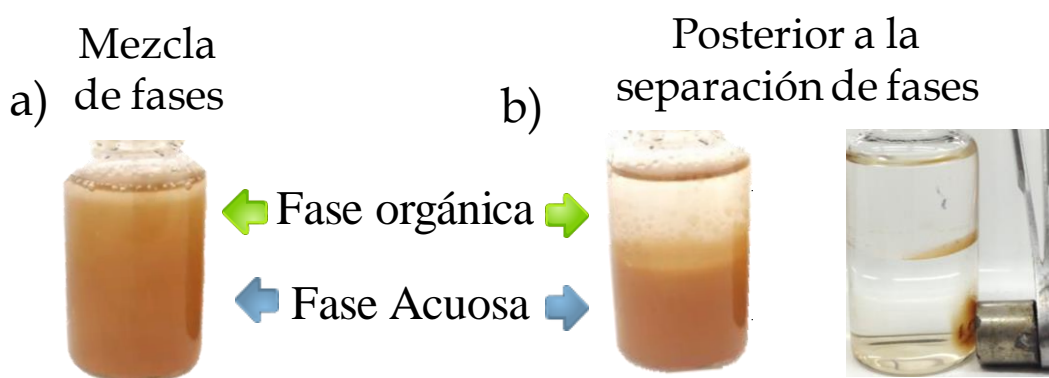


Figura 4-6: a) Estudio de afinidad de los NHM-TMX por fases acuosas y orgánicas. b) MHN-TMX atraídas magnéticamente luego de que particionaron a la fase acuosa.

4.3.3. Evaluación de la sedimentación de los NHM-TMX en dispersión acuosa

La permanencia en dispersión de los sistemas portadores de fármacos en medios acuosos es de gran relevancia, no sólo para la realización de los estudios *in vitro* que se propusieron realizar, sino también con vistas a su aplicación *in vivo*, particularmente si se considera una administración parenteral. En este sentido, es necesario estudiar el comportamiento de los NHM-TMX en dispersión acuosa, así como también explorar el uso de diversos cosolventes biocompatibles con el fin de disminuir la sedimentación de las partículas.

Aunque los NHM-TXM con y sin *L*-Cis exhibieron hidrofiliidad (Figura 4.7), su dispersabilidad en agua pura fue baja, y no permitió mantener los NHM-TXM en dispersión durante largos períodos de tiempo. Por este motivo, se realizaron estudios de dispersabilidad acuosa de NHM-TXM usando PBS 7,4 solo o combinado con cosolventes biocompatibles. Cabe destacar que se seleccionó PBS 7,4 por ser un medio que simula condiciones de plasma sanguíneo. Se estudiaron la glicerina y el propilenglicol como cosolventes, ya que son excipientes aprobados para aplicaciones biomédicas y están incluidos en la lista GRAS de la FDA (*Generally recognized as safe*, por sus siglas en inglés)³⁵. En particular, la glicerina es uno de los cosolventes de elección para aumentar la viscosidad de soluciones o dispersiones acuosas³⁶.

A partir de los resultados obtenidos se evidenció que el agregado de glicerina como cosolvente mejoró la dispersabilidad de las partículas en comparación con el PBS 7,4 puro o combinado con propilenglicol. Esto se justifica considerando la influencia de los cosolventes en el aumento en la viscosidad del medio dispersante. Por este motivo, los estudios de sedimentación de las partículas se realizaron en el medio PBS 7,4:glicerina (2:1 v/v). Así, la estabilidad de las dispersiones de los NHM-TXM con y sin *L*-Cis se evaluó en tiempo real para determinar la proporción de partículas sedimentadas a diferentes tiempos, alcanzando un máximo a 24 h.

Los NHM-TXM mostraron comportamientos diferentes en lo que respecta al inicio de la sedimentación. Los NHM-TXM con y sin *L*-Cis comenzaron a sedimentar a las 8 y 5,5 h, respectivamente (Figura 4.7). Además, se mantuvieron en dispersión hasta las 22,5 y 16 h, respectivamente, tiempos a partir de los cuales todas las partículas se encontraron sedimentadas.

Estas diferencias en el comportamiento de los NHM-TXM pueden explicarse considerando que, si bien el AH es uno de los ligandos utilizados para conjugar MNPs y, así, mejorar su dispersabilidad en medios acuosos, la

presencia de *L*-Cis ofrece propiedades adicionales como estabilizante ^{37,38,39}, mejorando la estabilidad en dispersión acuosa, de los NHM-TMX. Otro aspecto de relevancia a destacar es que, una vez sedimentadas las partículas, éstas pudieron ser redispersadas mediante simple agitación manual. Además, considerando los tiempos que tardan los NHM-TMX hasta la completa sedimentación, se propuso que esta mezcla de solventes (PBS 7,4: glicerina; 2:1 v/v) era adecuada para dispersar las plataformas con vistas a los estudios de liberación *in vitro* de TMX.

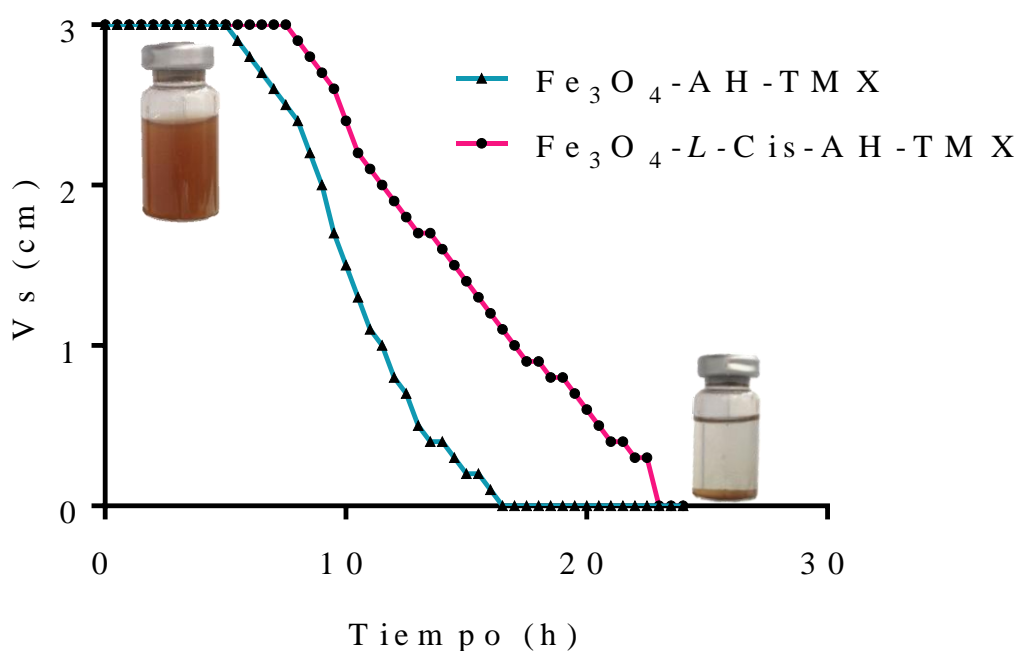


Figura 4-7: Volumen de sedimentación (V_s) de las dispersiones de a) NHM-TMX con *L*-Cis y b) NHM-TMX sin *L*-Cis en PBS 7,4: glicerina; 2:1 v/v en función del tiempo

4.3.4. Desplazamiento de TMX desde los NHM-TMX

Al considerar que la naturaleza de la interacción entre el fármaco y el portador podría ser de tipo iónica, se decidió realizar un ensayo para evaluar si los sistemas NHM-TMX participan de un proceso de intercambio iónico frente al agregado de un electrolito, tal como se muestra en la Ec 4.1



Para ello se realizaron titulaciones empleando como agentes titulantes NaCl al 0,9%, como electrolito, y una solución de glucosa 5%, como no electrolito. La adición de titulante se realizó considerando diferentes proporciones de los los equivalentes de grupos ácidos carboxílicos ionizables del AH en los NHM. Además, se decidió agregar un exceso de titulante (hasta 4000%) con la finalidad de forzar al sistema a desplazar el TMX desde las NHM-TMX (Figura 4.8).

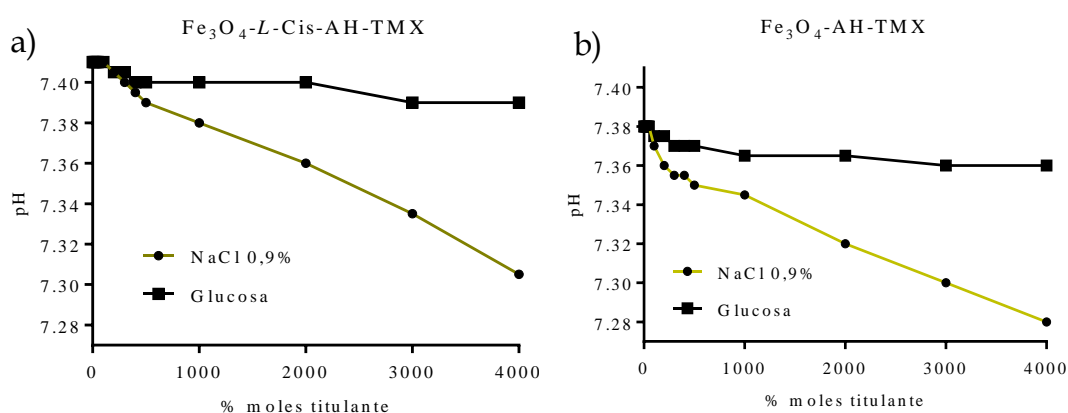


Figura 4-8: Cambios de pH de las dispersiones acuosas de a) $Fe_3O_4-L-Cis-AH-TMX$, b) $Fe_3O_4-AH-TMX$ frente al agregado de NaCl 0,9% y glucosa 5% como agentes titulantes.

Se observó que, producto de la adición de NaCl 0,9% sobre las dispersiones de NHM-TMX, se produjo un cambio en el pH del medio, específicamente una reducción. Esto puede explicarse considerando que, la adición del Na^+ en el medio, produce un desplazamiento del equilibrio hacia la derecha en la ecuación 4.1, causando un efecto protogénico desencadenado por el desplazamiento del TMX protonado ($TMX-H^+$) desde la plataforma ^{40,41}.

Este comportamiento fue observado para ambas plataformas NHM-TMX con y sin *L-Cis*. Es importante notar que, si bien se observaron reducciones del valor de pH, éste decreció lentamente incluso luego de agregado 4000% en moles de exceso del agente titulante, lo que demuestra que la interacción entre

el TMX y los NHM es fuerte, pero reversible ⁴². Por el contrario, cuando ambos sistemas NHM-TMX fueron evaluados frente a la adición de un no electrolito, como es la glucosa en solución, se observó que este agente titulante no provocó un efecto alguno sobre el desplazamiento del TMX desde ambos NHM-TMX.

Las mínimas variaciones en el pH pueden explicarse considerando un efecto de dilución de las dispersiones por el agregado de volúmenes crecientes de la solución titulante de glucosa. Sobre la base de lo expuesto, los NHM-TMX pueden considerarse como sistemas inteligentes, ya que son capaces de liberar el fármaco en condiciones fisiológicas por un mecanismo de intercambio iónico.

4.3.5. Liberación *in vitro* de TMX desde NHM-TMX

Para los estudios de liberación *in vitro* de TMX desde las NHM-TMX con y sin *L-Cis* se utilizaron celdas bicompartimentales (sección experimental 6.3.3.5).

En el compartimento donante se colocaron los NHM-TMX dispersos en PBS 7,4:glicerina (2:1 v/v) y como medios de liberación se usaron PBS 7,4 y ACS 5 los cuales fueron colocadas en el compartimento receptor. Además, se usó una dispersión de TMX puro como referencia, en la misma concentración a la que se encontraba en los NHM-TMX. Los obtenidos se muestran en la Figura 4.9.

Se observó una liberación modulada (lenta y controlada) de TMX desde los NHM-TMX, mientras que el TMX puro alcanzó rápidamente el compartimento receptor, ya que se observó un efecto de estallido (*burst*, por su denominación en inglés) importante, el cual alcanzó aproximadamente un 20% de liberación del fármaco en los primeros 5 minutos del experimento en ambos medios (Figura 4-9c2). Por el contrario, se observaron efectos *burst* mínimos en las liberaciones de TMX desde los NHM-TMX con y sin *L-Cis*, en ambos medios evaluados, los cuales fueron de aproximadamente el 5% en los primeros 5

minutos. Esta pequeña liberación masiva podría explicarse debido a que parte del fármaco pudo encontrarse adsorbido en la superficie de los NHM-TMX. Además, debido al pequeño tamaño de las partículas, éstas presentan una gran superficie expuesta, lo cual simula lo que ocurre en la liberación *burst*, tal como ha sido propuesto por Joshi *et al.* ⁴³. También, cabe destacar que Albert *et al.* ⁴⁴ desarrollaron NPs de Fe₃O₄ conjugadas con TMX y la liberación mostró un gran efecto *burst* en comparación con los NHM-TMX desarrollados en el presente trabajo de tesis, debido a que la incorporación de TMX sobre el NM desarrollado por Albert *et al.* ⁴⁴ fue mayoritariamente superficial, dando como resultado la aparición de este efecto indeseado en terapias contra el cáncer, debido a que la rápida liberación del fármaco podría aumentar la incidencia de efectos adversos. Sin embargo, el comportamiento final de los NHM-TMX fueron similares, ya que luego de esta liberación masiva, la liberación del TMX fue controlada en el tiempo.

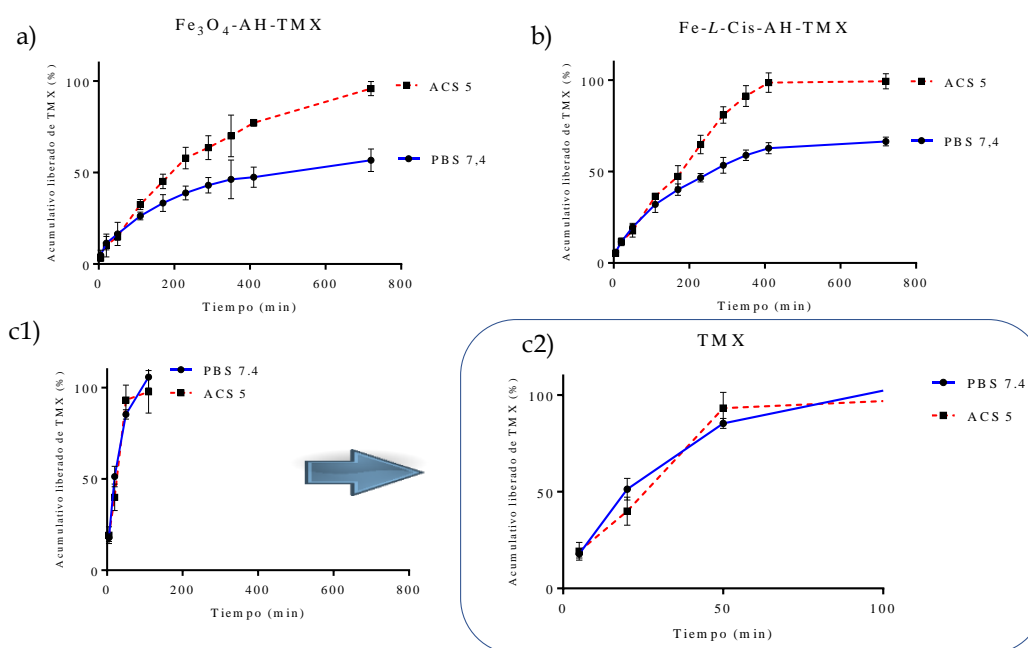


Figura 4-9: Perfiles de liberación de TMX desde a) Fe₃O₄-AH-TMX , b) Fe₃O₄-L-Cis-AH-TMX y c1) muestra de referencia TMX, c2) Acercamiento del perfil de liberación del TMX a 100 min

Luego de esta liberación inicial de TMX, la cantidad total de TMX liberado desde los NHM-TMX con y sin *L*-Cis alcanzó, aproximadamente, 99 y 95% en ACS 5, y 66 y 57 % en PBS 7,4, respectivamente. Como se puede observar, a cualquier tiempo, el porcentaje de TMX liberado es mayor hacia ACS 5 en comparación con PBS 7,4. Este comportamiento es, posiblemente, ocasionado por el pH del medio, ya que a pH 5 una mayor proporción de los grupos ácidos carboxílicos en los NHM podrían estar nuevamente protonados, lo que podría afectar la interacción iónica entre el TMX y los NHM, promoviendo una mayor liberación de TMX en el medio ACS 5.

El análisis de los factores de diferencia y similitud (f_1 y f_2 , respectivamente, ver sección experimental 6.3.3.5) denotó diferencias estadísticamente significativas en la liberación de TMX desde los NHM-TMX, con y sin *L*-Cis, con valores de $f_1 = 32$ y $f_2 = 34$ en PBS 7,4 y $f_1 = 15$ y $f_2 = 47$ en ACS 5. Esta diferencia pudo explicarse por la presencia de *L*-Cis, la cual aporta al sistema Fe_3O_4 -*L*-Cis-AH-TMX una mayor hidrofiliidad, lo que pudo favorecer la hidratación de las partículas y facilitar la liberación del TMX desde los NHM-TMX.

Tabla 4-3 : Datos de cinética de liberación a 37°C obtenidos mediante el análisis de los perfiles de liberación de TMX desde los NHM-TMX utilizando las ecuaciones de orden cero, Higuchi y Korsmeyer- Peppas

Medio	NHM	Orden Cero			Higuchi			Korsmeyer-Peppas		
		% TMX	K_0	R^2	% TMX	K_H	R^2	K_P	R^2	n
PBS 7,4	1	10,59	0,15	0,96	<u>3,27</u>	<u>-2,48</u>	<u>0,99</u>	1,73	0,99	0,5
	2	18,88	0,06	0,85	2,14	3,88	0,97	<u>1,61</u>	<u>0,99</u>	<u>0,5</u>
	3	<u>15,28</u>	<u>1,45</u>	<u>0,97</u>	13,93	-12,52	0,96	1,99	0,93	0,7
ACS 5	1	<u>5,47</u>	<u>0,26</u>	<u>0,99</u>	-6,02	3,98	0,98	1,85	0,99	0,6
	2	<u>5,14</u>	<u>0,23</u>	<u>0,99</u>	-13,78	4,57	0,98	1,00	0,98	0,7
	3	<u>9,23</u>	<u>1,66</u>	<u>0,99</u>	-20,11	15,43	0,96	6,15	0,95	0,7

1. Fe_3O_4 -*L*-Cis-AH-TMX, 2. Fe_3O_4 -AH-TMX, 3. TMX; K_c expresado como (%.min⁻¹) y K_H como (%.min^{-0.5}); Modelos representados en la Ec 5.6, 5.7, 5.8

El análisis cinético de los perfiles de liberación se presenta en la Tabla 4.3. Al considerar los perfiles de liberación de TMX desde la muestra de referencia,

puede observarse que en ambos medios tiene lugar un proceso de disolución del fármaco desde la superficie del fármaco disperso (partículas de TMX sólido en dispersión dada su baja solubilidad acuosa ⁴⁵), dado que el mejor ajuste se obtiene para modelo de orden cero.

En el caso de las liberaciones de TMX hacia PBS 7,4, tanto para los NHM-TMX con o sin *L*-Cis, la liberación del fármaco respondió a un mecanismo de difusión, gobernado por la ley de Fick, lo que se evidenció por el buen ajuste con el modelo de Higuchi y un $n = 0,5$ obtenido por el ajuste con Korsmeyer-Peppas.

Por el contrario, hacia ACS 5 el mecanismo preponderante para la liberación del TMX desde los NHM-TMX fue la disolución, dado el buen nivel de ajuste con la cinética de orden cero. Aunque, los valores de $n=0,6$ y $0,7$ (para las plataformas con y sin *L*-Cis, respectivamente) obtenidos para Korsmeyer-Peppas indicaron además de la disolución, otros mecanismos como el intercambio iónico o relajación de las cadenas del polímero que influenciaron la liberación del TMX desde las plataformas.

Esta diferencia en el mecanismo de liberación involucrado podría deberse al comportamiento diferencial que mostraron las partículas en contacto con el ACS 5 o el PBS 7,4, de acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 4.2, en donde no solo el tamaño aparente de las partículas fue diferente (menor en PBS 7,4 en comparación con ACS 5, con excepción del NHM-TMX con *L*-Cis), sino también que el pH del medio de liberación puede afectar significativamente el comportamiento de polímeros hidrofílicos que contengan grupos ionizables en su estructura molecular ⁴⁶.

Adicionalmente, cabe señalar que la difusión del TMX puro, desde la muestra de referencia, a través de la membrana semipermeable hacia ACS 5 o PBS 7,4 no mostró diferencias estadísticamente significativas ($f1=11$ y $f2=55$).

Esto sugiere que los NHM-TMX participan activamente en la modulación de la liberación del fármaco, con menores proporciones de TMX liberado en PBS 7,4 en comparación con ACS 5.

Estos resultados son de destacar, considerando que la mayor modulación de la liberación del TMX en un medio que simula el plasma sanguíneo (PBS 7,4) permitiría reducir la cantidad de fármaco que se liberaría fuera del sitio de acción. Es decir, la liberación incrementada de TMX desde los NHM-TMX al comparar los perfiles en PBS 7,4 y ACS 5 demuestran el gran potencial de los sistemas desarrollados para el tratamiento del cáncer, ya que podrían presentar menores efectos adversos, al considerar una vía de administración parenteral, porque la liberación de TMX se vería promovida dentro de las células (pH 5), mientras que su liberación en la circulación sistémica (pH 7,4) sería menor.

Además, dado el tamaño nanométrico, estas plataformas podrían acumularse en los sitios tumorales mediante el efecto EPR (*enhanced permeability and retention*, por sus siglas en inglés) y liberar el TMX, principalmente, en las células tumorales luego de la internalización ⁴⁰.

De acuerdo con lo expresado anteriormente y considerando los NHM desarrollados, las cuales presentan un núcleo magnético, resultó de relevancia estudiar el comportamiento de liberación del TMX en condiciones que simularían la hipertermia generada si se aplicara un campo magnético oscilante en el sitio de acción ⁴⁷ (Figura 4.10). Para tales fines, se termostataron los medios receptores ACS 5 y PBS 7,4 a 43 °C y se evaluó el comportamiento de liberación de TMX desde las NHM-TMX.

Se observó una liberación modulada (lenta y controlada) de TMX desde los NHM-TMX, mientras que el TMX puro alcanzó rápidamente el compartimento receptor, ya que se observó un efecto de estallido (*burst*, por su denominación en inglés) importante, el cual alcanzó aproximadamente un 20%

de liberación del fármaco en los primeros 5 minutos del experimento en ambos medios (Figura 4-9c2). Por el contrario, se observaron efectos *burst* mínimos en las liberaciones de TMX desde los NHM-TMX con y sin *L*-Cis, en ambos medios evaluados, los cuales fueron de aproximadamente el 5% en los primeros 5 minutos. Esta pequeña liberación masiva podría explicarse debido a que parte del fármaco pudo encontrarse adsorbido en la superficie de los NHM-TMX. Además, debido al pequeño tamaño de las partículas, éstas presentan una gran superficie expuesta, lo cual simula lo que ocurre en la liberación *burst*, tal como ha sido propuesto por Salem *et al.* ⁴⁸ También, cabe destacar que Albert *et al.* ⁴⁴ desarrollaron NPs de Fe₃O₄ conjugadas con TMX y la liberación mostró un gran efecto *burst* en comparación con los NHM-TMX desarrollados en el presente trabajo de tesis. Sin embargo, el comportamiento final de la plataforma fue similar, ya que luego de esta liberación masiva, la liberación del TMX fue controlada en el tiempo.

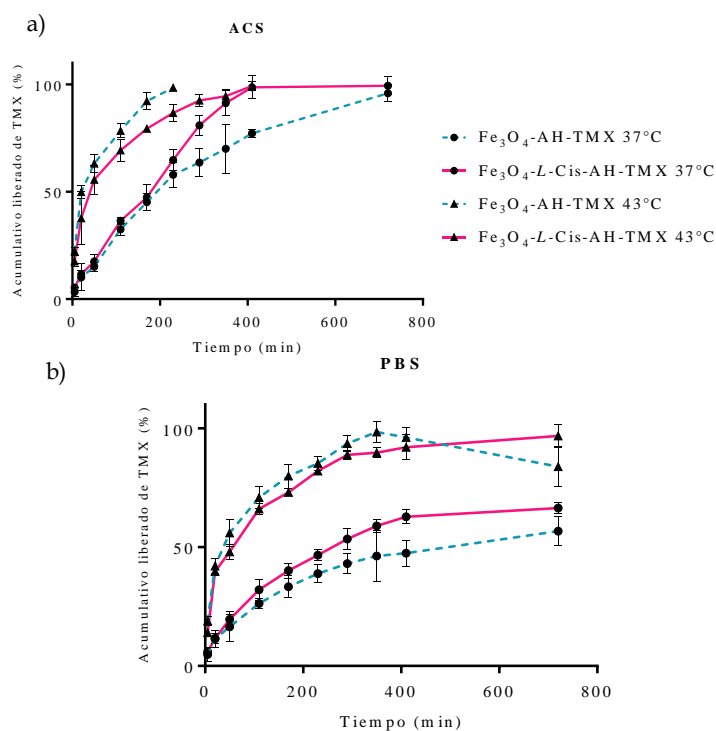


Figura 4-10 Perfiles de liberación de TMX desde Fe₃O₄-AH-TAM y Fe₃O₄-LCis-AH-TAM hacia los medios a) ACS 5 y b) PBS 7,4 a 43 °C. Se presentan también los perfiles de liberación a 37°C a los fines comparativos.

Tabla 4-4 : Datos de cinética de liberación a 43°C obtenidos mediante el análisis de los perfiles de liberación de TMX desde los NHM-TMX utilizando las ecuaciones de orden cero, Higuchi y Korsmeyer- Peppas

Medio	NHM	Orden Cero			Higuchi			Korsmeyer-Peppas		
		% TMX	K ₀	R ²	% TMX	K _H	R ²	K _P	R ²	n
PBS 7,4	1	30,38	0,33	0,85	13,28	5,39	0,96	<u>2,61</u>	<u>0,97</u>	<u>0,5</u>
	2	28,45	0,26	0,86	<u>11,19</u>	<u>4,87</u>	<u>0,95</u>	2,60	0,95	0,4
	3	10,96	0,60	0,94	-10,05	8,03	0,98	<u>2,67</u>	<u>0,98</u>	<u>0,7</u>
ACS 5	1	<u>27,96</u>	<u>0,34</u>	<u>0,99</u>	10,41	5,56	0,97	9,65	0,98	0,4
	2	<u>31,87</u>	<u>0,46</u>	<u>0,99</u>	14,01	6,49	0,94	12,67	0,96	0,4
	3	35,65	1,05	0,90	14,60	10,28	0,97	<u>19,08</u>	<u>0,99</u>	<u>0,5</u>

1. Fe₃O₄-L-Cis-AH-TMX, 2. Fe₃O₄-AH-TMX, 3. TMX; K_c expresado como (%.min⁻¹) y K_H como (%.min^{-0.5}); Modelos representados en la Ec 5.6, 5.7, 5.8

4.3.6. Estudios de eficacia antitumoral y potencial hemolítico de los NHM-TMX

Como se mencionó en el Capítulo I *Introducción general*, el TMX sigue siendo el fármaco de elección para el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, sus efectos adversos muchas veces impactan negativamente en el éxito terapéutico.

El TMX presenta un alto potencial tóxico frente a los eritrocitos humanos, causando anemia hemolítica. Esto es debido a que induce defectos en la estructura de la membrana de los eritrocitos al interactuar con proteínas de membrana o provocar cambios en el citoesqueleto celular, con la consecuente ruptura estructural ^{49 31}.

En virtud de lo expuesto, la optimización de la farmacoterapia del cáncer debe centrar sus metas en lograr tratamientos eficaces y seguros. A tal efecto, se evaluaron la eficacia antitumoral en cultivos celulares de cáncer de mama (línea celular MCF 7, adenocarcinoma mamario) y el potencial hemolítico de los NHM-TMX, respectivamente. La actividad de las plataformas cargadas con TMX fue comparada con la de TMX puro.

Los resultados de viabilidad celular obtenidos (Figura 4.11) evidencian un comportamiento de TMX dosis-dependiente, ya que a mayor concentración la viabilidad celular se redujo significativamente ($p < 0,05$), con excepción de las concentraciones 8 y 16 μM que mostraron efectos citotóxicos similares sobre las células tumorales. La marcada actividad citotóxica observada con TMX en concentración 256 μM puede explicarse considerando que este fármaco, en altas concentraciones, podría presentar un comportamiento inespecífico y no mediado por receptores de estrógeno⁵⁰ o bien podría intervenir en otras fases del ciclo celular incrementando su actividad apoptótica⁵¹.

En todas las concentraciones evaluadas, con excepción de la concentración más alta (256 μM), los NHM-TMX con y sin *L-Cis* mostraron mayor eficacia antitumoral comparada con el TMX puro a la misma concentración ($p < 0,001$ y $p < 0,01$). Esto demuestra una mayor eficacia del tratamiento con TMX al estar vehiculizado en los NHM, debido a que el tamaño nanoparticulado produciría un incremento en la internalización celular de los NHM-TMX, lo que aumentaría, en consecuencia, la concentración de TMX intracelular⁵². Estas características se suman al hecho de que la presencia del AH en la estructura de las plataformas mediaría un mecanismo de unión entre los NHM-TMX y los receptores de membrana CD44 presentes en las células tumorales, que podría desencadenar una cascada de señalización intracelular, culminando con un incremento de la cantidad de TMX internalizado dentro las células⁵³. Cabe destacar que en ambos NHM-TMX, principalmente para los que contienen *L-Cis*, no se observó un efecto dosis-dependiente, ya que la viabilidad celular disminuyó a medida que aumentó la concentración de TMX entre 8 y 64 μM , pero en las dos concentraciones más altas (128 y 256 μM) se observó un incremento en la viabilidad celular, es decir, menor actividad antitumoral. Esto puede explicarse considerando que, a mayor concentración, las partículas de NHM-TMX presentan mayor agregación⁵⁴, lo que dificultaría la internalización celular.

En lo que respecta a los estudios de seguridad de los sistemas NHM-TMX desarrollados, se evaluó su efecto sobre los eritrocitos humanos mediante estudios de potencial hemolítico, utilizando muestras de sangre humana. Se estudiaron las mismas concentraciones que las evaluadas en los estudios de viabilidad celular tanto para el TMX puro y como vehiculizado en las plataformas. También, se evaluó la actividad hemolítica de los NHM sin TMX con el fin de analizar la hemocompatibilidad de las plataformas. Estas fueron evaluadas en las mismas proporciones en las que se encuentran en los sistemas portadores cargados con el fármaco.

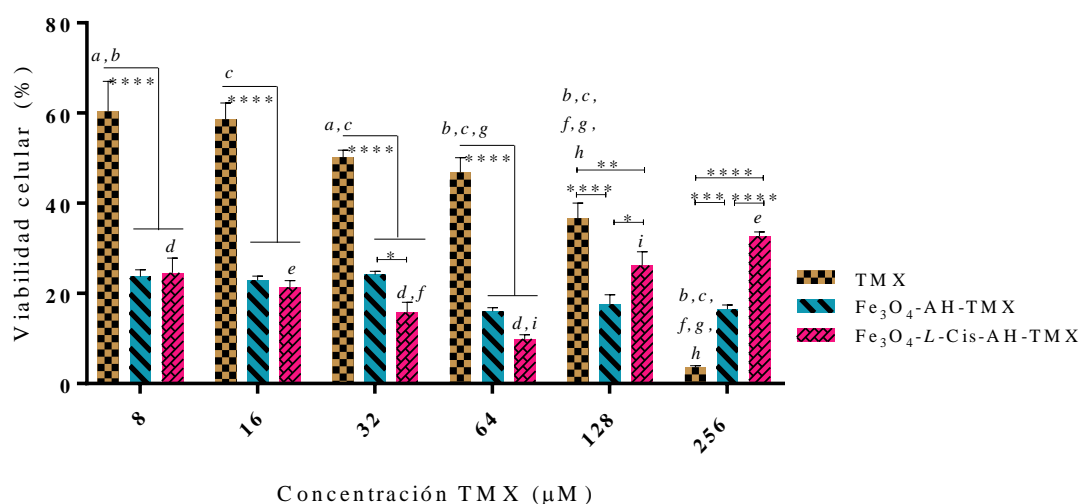


Figura 4-11: Viabilidad celular de células MCF 7, luego de 48 h de incubación con los tratamientos: TMX, NHM-TMX con y sin *L*-Cis. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos comparados (****y*** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$) y las letras minúsculas también representan diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones comparadas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos (Figura 4.12) muestran que a mayor concentración de TMX puro, mayor es el potencial hemolítico ($p < 0,05$), con una tendencia de aumento exponencial en el daño sobre los eritrocitos al aumentar la concentración del fármaco ³¹. Los NHM y los NHM-TMX con y sin *L*-Cis producen una significativa reducción del daño sobre los eritrocitos humanos en comparación con el TMX puro en las concentraciones 64, 128 y 256 μM. Resultados similares se han observado para otros sistemas portadores de TMX

31. El comportamiento observado para los NHM-TMX puede explicarse considerando, no solo la inocuidad que las plataformas exhiben sobre los eritrocitos humanos (hemocompatibilidad), sino también por el control en la liberación de TMX en comparación con el TMX puro. Es de destacar que, ambos NHM con y sin *L*-Cis, independientemente de la concentración evaluada y de la presencia o ausencia de TMX (NHM-TMX y NHM, respectivamente), presentaron los mismos valores de potencial hemolítico, el cual fue $\leq 5\%$ en las diferentes condiciones evaluadas, demostrando que las plataformas además de ser seguras para la terapia contra el cáncer de mama, permiten disminuir uno de los efectos adversos asociados con el uso de TMX (anemia hemolítica) ³¹.

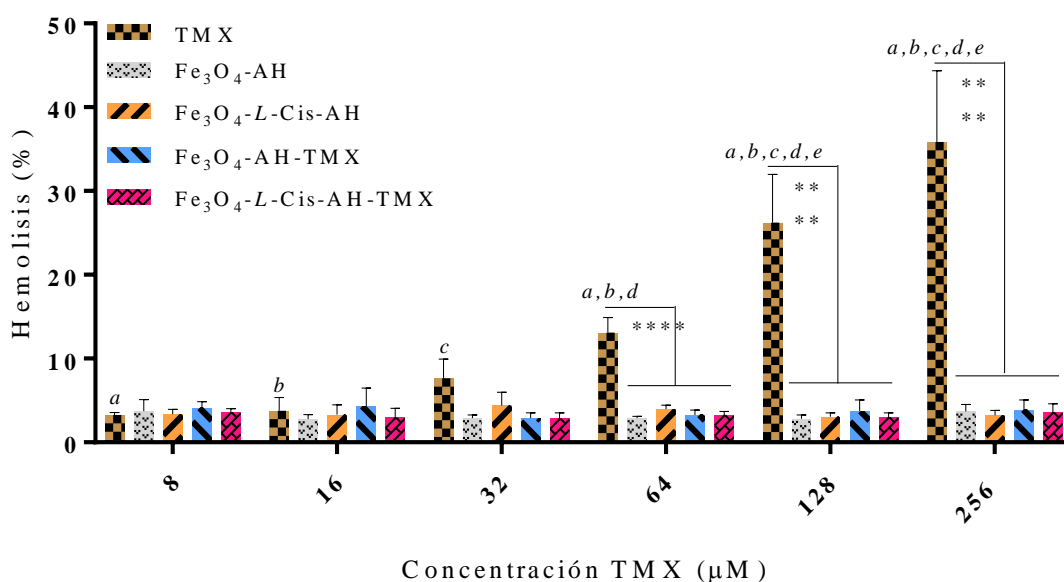


Figura 4-12: Potencial hemolítico de: TMX, NHM-TMX y NHM, con y sin *L*-Cis en muestras conteniendo 5% de sangre humana, luego de 2 h de incubación. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos comparados (****y*** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$) y las letras minúsculas también representan diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones comparadas ($p < 0,05$).

En conjunto el análisis de resultados demostró que la mayor eficiencia de TMX puro se logró en concentraciones de 256 μM ; mientras que al estar vehiculizado en las plataformas se obtuvo una eficacia similar, pero en concentraciones cuatro veces inferiores (64 μM). Además, tanto a 64 μM como a 256 μM de concentraciones de los NHM-TMX presentaron mínimo potencial

hemolítico (<5%). Por lo contrario, el fármaco puro a dichas concentraciones produjo porcentajes de hemólisis significativamente superiores ($p < 0.001$)

4.4. Conclusiones

Los sistemas NHM-TMX se obtuvieron mediante una metodología simple y reproducible. De acuerdo con los estudios espectroscópicos, microscópicos y calorimétricos de las partículas se determinó la presencia de cada uno de los componentes en las plataformas, además, de su tamaño y morfología.

Los resultados de sedimentación e hidrofiliidad evidenciaron que, si bien el AH mejora la dispersabilidad de las NHM-TMX, la conjugación con *L-Cis* permitió mayor afinidad por medios acuosos, característica muy importante para aplicaciones biomédicas.

Las plataformas desarrolladas se comportaron como sistemas inteligentes y pudieron liberar el TMX desde las plataformas en forma lenta, controlada, y su liberación se vio promovida en condiciones que simulan entornos tumorales.

La condición de hipertermia estudiada denotó la utilidad potencial de los NHM-TMX para liberar el fármaco en estas condiciones, es decir, mediante la aplicación de un campo magnético externo para elevar así su temperatura en el sitio de acción (como, por ejemplo, un tumor de mama).

Los estudios de eficacia y seguridad demostraron el gran potencial de los NHM-TMX para el tratamiento del cáncer de mama, ya que no solo lograron incrementar la eficacia del fármaco antitumoral, sino que también ofrecieron una mayor seguridad por la reducción significativa del daño a los eritrocitos humanos, evidenciada por la reducción en el potencial hemolítico.

4.5. Bibliografía

1. Thakor, A. S. & Gambhir, S. S. Nanooncology : The Future of Cancer Diagnosis and Therapy. *Cancer J. Clin.* **63**, 395–418 (2013).
2. Bucak, S., Yavuztürk, B. & Sezer, A. D. Magnetic Nanoparticles : Synthesis, Surface Modifications and Application in Drug Delivery. *Recent Adv. Nov. Drug Carr. Syst.* **2**, 165–200 (2012).
3. Attaluri, A. *et al.* Magnetic nanoparticle hyperthermia enhances radiation therapy: A study in mouse models of human prostate cancer. *Int. J. Hyperth.* **31**, 359–374 (2015).
4. Anderson, J. M. & Kim, S. W. *Recent Advances in Drug Delivery Systems.* (Springer US, 2012).
5. Liu, J. *et al.* PH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnol. Adv.* **32**, 693–710 (2014).
6. Menon, J. U. *et al.* Nanomaterials for photo-based diagnostic and therapeutic applications. *Theranostics* **3**, 152–166 (2013).
7. García MC, C. J. Stimulus-responsive nanogels for drug delivery. in *Stimulus Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications* (ed. Abu-Thabit., A. S. H. M. N. Y.) (Elsevier, 2018).
8. Estelrich, J., Escribano, E., Queralt, J. & Busquets, M. A. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 8070–8101 (2015).
9. Mejías, R. *et al.* Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials* **32**, 2938–2952 (2011).
10. Torre, L. A. *et al.* Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J. Clin.* **65**, 87–108 (2015).
11. McLaughlin, F., Finn, P. & La Thangue, N. B. The cell cycle, chromatin and cancer: Mechanism-based therapeutics come of age. *Drug Discov. Today* **8**, 793–802 (2003).
12. McCubrey, J. A. *et al.* Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 75–101 (2015).
13. Zembutsu H, Nakamura S, Akashi ST, Kuwayama T, Watanabe C, Takamaru T, Takei H, Ishikawa T, Miyahara K, Matsumoto H, Hasegawa Y, Kutomi G, Shima H, Satomi F, Okazaki M, Zaha H, Onomura M, Matsukata A, Sagara Y, Baba S, Yamada A, Shimada K, Shimizu D, Tsug, N. Y. Significant Effect of Polymorphisms in CYP2D6 on Response to Tamoxifen 2 Therapy for Breast Cancer; a Prospective Multicenter Study. *Clin Cancer Res* **23**, 2019–2026 (2016).
14. Burstein, H. J., Lacchetti, C. & Griggs, J. J. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Ovarian Suppression Summary. *J. Oncol. Pract.* **12**, 390–393 (2016).
15. Larsen, S. L. *et al.* Aurora kinase B is important for antiestrogen resistant cell growth and a potential biomarker for tamoxifen resistant breast cancer. *BMC Cancer* **15**, 1–15 (2015).

16. Ferioli, M. *et al.* Impact of physical exercise in cancer survivors during and after antineoplastic treatments. *Oncotarget* **9**, 14005–14034 (2018).
17. Sarker, D. & Workman, P. Pharmacodynamic Biomarkers for Molecular Cancer Therapeutics. *Adv. Cancer Res.* **96**, 213–268 (2006).
18. Lewinski, N., Colvin, V. & Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* **4**, 26–49 (2008).
19. Mishra, B., Patel, B. B. & Tiwari, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **6**, 9–24 (2010).
20. Duncan, R. & Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.* **8**, 2101–2141 (2011).
21. Freiberg, S. & Zhu, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* **282**, 1–18 (2004).
22. Heidari Majd, M. *et al.* Tamoxifen loaded folic acid armed PEGylated magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy of cancer. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **106**, 117–125 (2013).
23. Zhu, Z., Li, Y., Yang, X., Pan, W. & Pan, H. The reversion of anti-cancer drug antagonism of tamoxifen and docetaxel by the hyaluronic acid-decorated polymeric nanoparticles. *Pharmacol. Res.* **126**, 84–96 (2017).
24. Oyarzun-Ampuero, F. A., Rivera-Rodriguez, G. R., Alonso, M. J. & Torres, D. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 483–490 (2013).
25. Lollo, G., Rivera-Rodriguez, G., Torres, D. & Alonso, M. J. Nanoterapias oncológicas: Aplicaciones actuales y perspectivas futuras. *An. la Real Acad. Nac. Farm.* **77**, 76–98 (2011).
26. Battistini, F. D., Flores-Martin, J., Olivera, M. E., Genti-Raimondi, S. & Manzo, R. H. Hyaluronan as drug carrier. the in vitro efficacy and selectivity of Hyaluronan-Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **65**, 122–129 (2014).
27. Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S. & Maiti, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **3**, 7 (2018).
28. Lee, T. *et al.* Minimum hyaluronic acid (HA) modified magnetic nanocrystals with less facilitated cancer migration and drug resistance for targeting CD44 abundant cancer cells by MR imaging. *J. Mater. Chem. B* **5**, 1400–1407 (2017).
29. Maji, R., Dey, N. S., Satapathy, B. S., Mukherjee, B. & Mondal, S. Preparation and characterization of tamoxifen citrate loaded nanoparticles for breast cancer therapy. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 3107–3118 (2015).
30. Badawi, H. M. & Khan, I. A study of the molecular conformations and the vibrational, ¹H and ¹³C NMR spectra of the anticancer drug tamoxifen and triphenylethylene. *J. Mol. Struct.* **1117**, 22–29 (2016).
31. Altmeyer, C., Karam, T. K., Khalil, N. M. & Mainardes, R. M. Tamoxifen-loaded poly(L-lactide) nanoparticles: Development, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity. *Mater. Sci. Eng. C* **60**, 135–142 (2016).

32. Nosrati, H., Rashidi, N., Danafar, H. & Manjili, H. K. Anticancer Activity of Tamoxifen Loaded Tyrosine Decorated Biocompatible Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Against Breast Cancer Cell Lines. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **28**, 1178–1186 (2018).
33. Cullity, B. D. & Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials*. (Wiley, 2011).
34. Hayashi, K. *et al.* High-frequency, magnetic-field-responsive drug release from magnetic nanoparticle/organic hybrid based on hyperthermic effect. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2**, 1903–1911 (2010).
35. Castro, S. G. *et al.* Enhanced dissolution and systemic availability of albendazole formulated as solid dispersions. *Pharm. Dev. Technol.* **18**, 434–442 (2013).
36. Rowe, R. C., Sheskey, P. J. & Quinn, M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. (Pharmaceutical Press, 2009).
37. Schwaminger, S. P. *et al.* Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **119**, 23032–23041 (2015).
38. Cohen, H., Gedanken, A. & Zhong, Z. One-Step Synthesis and Characterization of Ultrastable and Amorphous Fe O Colloids Capped with Cysteine Molecules One-Step Synthesis and Characterization of Ultrastable and Amorphous Fe₃O₄ Colloids Capped with Cysteine Molecules. *Chem. Eng.* 15429–15438 (2008).
39. Vieira, A. P. *et al.* Adsorption of cysteine on hematite, magnetite and ferrihydrite: FT-IR, Mössbauer, EPR spectroscopy and X-ray diffractometry studies. *Amino Acids* **40**, 205–214 (2011).
40. Cuggino, J. C. *et al.* Responsive nanogels for application as smart carriers in endocytic pH-triggered drug delivery systems. *Eur. Polym. J.* **78**, 14–24 (2016).
41. García, M. C. *et al.* A novel gel based on an ionic complex from a dendronized polymer and ciprofloxacin: Evaluation of its use for controlled topical drug release. *Mater. Sci. Eng. C* **69**, 236–246 (2016).
42. Battistini, F. D., Olivera, M. E. & Manzo, R. H. Equilibrium and release properties of hyaluronic acid-drug complexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 588–594 (2013).
43. Joshi, V. B., Geary, S. M. & Salem, A. K. Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters. *AAPS J.* **15**, 85–94 (2013).
44. Albert, E. L., Shirosaki, Y., Azurahaman, C. & Abdullah, C. Drug Release and Kinetic Study of Tamoxifen Citrate conjugated with Magnetite Nanoparticle for Drug Delivery Application. *Int. J. Appl. Eng. Res.* **13**, 5360–5369 (2018).
45. Citrate, Tamoxifen. Drug Bank. (2018).
46. Suñé, J. Nuevas Aportaciones Galénicas a las Formas de Administración. *Ferrer Grup. Barcelona, España* 41–47 (2000).
47. Coimbra, P. *et al.* Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: Synthesis and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 573–579 (2011).
48. Joshi, A. V., Bhusare, S., Baidossi, M., Qafisheh, N. & Sasson, Y. Oxidative coupling of thiols to disulfides using a solid anhydrous potassium phosphate catalyst. *Tetrahedron Lett.* **46**, 3583–3585 (2005).

49. Kassem, M. A. *et al.* Enhancing the Therapeutic Efficacy of Tamoxifen Citrate Loaded Span-Based Nano-Vesicles on Human Breast Adenocarcinoma Cells. *AAPS PharmSciTech* **19**, 1529–1543 (2018).
50. Benz, C. *et al.* Tamoxifen and 5-Fluorouracil in Breast Cancer: Cytotoxic Synergism in Vitro. *Cancer Res.* **43**, 5298–5303 (1983).
51. Abbasalipourkabir, R., Salehzadeh, A. & Abdullah, R. Tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles-induced apoptosis in breast cancer cell lines. *J. Exp. Nanosci.* **11**, 161–174 (2016).
52. Hu, F. X., Neoh, K. G. & Kang, E. T. Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. *Biomaterials* **27**, 5725–5733 (2006).
53. Upadhyay, K. K. *et al.* The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly(γ -benzyl l-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials* **31**, 2882–2892 (2010).
54. Baalousha, M. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Sci. Total Environ.* **407**, 2093–2101 (2009).

Capítulo V

Conclusiones generales y proyecciones

5.1 Conclusiones Generales

Durante el desarrollo del presente trabajo de tesis, se prepararon NHM, utilizando metodologías amigables con el ambiente, para ser empleados como plataformas para liberación controlada de fármacos. Los NM fueron diseñados a partir de compuestos biocompatibles como son la magnetita (Fe_3O_4), *L*-Cis y AH. La síntesis de las MNPs empleando el método de coprecipitación sumado a las funcionalizaciones con *L*-Cis y AH permitieron el desarrollo de NHM para vehiculización de fármacos antitumorales como el TMX, el cual fue seleccionado como modelo de agente antitumoral para el tratamiento del cáncer de mama. Los estudios realizados sobre los NHM-TMX demostraron su posible aplicabilidad en el campo de la nanomedicina. A continuación, se presentan las conclusiones más relevantes obtenidas en este trabajo de tesis:

La síntesis de los NHM con y sin *L*-Cis permitió la obtención de NPs con tamaño menor a 15 nm aproximadamente. El núcleo magnético presentó un comportamiento superparamagnético y un elevado valor de saturación de la magnetización. Mediante la incorporación del ligando *L*-Cis se logró una mejor dispersabilidad de las MNPs en medios acuosos. Asimismo, la posterior unión covalente con el AH, mediante la formación de un enlace tipo amida entre los grupos amino de *L*-Cis y carboxilatos del AH, permitieron obtener NHM (MNPs-*L*-Cis-AH) útiles para ser usados con el fin propuesto. También, se prepararon NHM sin *L*-Cis, mediante la síntesis y funcionalización directa de las MNPs con AH (MNPs-AH). Si bien ambas plataformas mostraron un comportamiento hidrofílico, los estudios comparativos entre ambos sistemas demostraron que la presencia de *L*-Cis en los NHM, impactó positivamente en la dispersabilidad acuosa de las plataformas, en comparación con aquellas funcionalizadas solo con AH.

Los NHM presentaron una carga superficial negativa producto de la disposición de los grupos carboxilato presentes en ambos sistemas, debido a la

presencia de AH y *L*-Cis. De esta forma, los NHM con y sin *L*-Cis fueron utilizados para la vehiculización de TMX, el cual fue incorporado eficientemente sobre los NHM mediante interacciones electrostáticas, dada la carga positiva que poseía el grupo amonio del TMX en el pH del medio de interacción. La eficiencia de cargado fue superior al 65% para las dos plataformas desarrolladas. Ambos NHM-TXM preservaron la carga superficial negativa, aún luego de la interacción con el fármaco. Si bien esto podría traducirse en que a un mayor tiempo de interacción entre los NHM y el TMX la incorporación del fármaco podría ser mayor, dicho efecto podría provocar que éste se una lábilmente al NHM, lo cual afectaría la modulación de la liberación de TMX desde el sistema portador, resultando en un sistema poco eficiente.

La liberación de TMX desde las plataformas pudo ser activada por el cambio de pH desde condiciones plasmáticas (pH 7,4) a condiciones de entorno endocítico de células tumorales (pH 5). Además, el reconocimiento provisto por parte del AH, componente presente en ambos sistemas NHM, permitiría un direccionamiento hacia receptores específicos de membrana sobreexpresados en las células tumorales. Esto disminuiría la proporción de fármaco liberado fuera del sitio de acción, en zonas no específicas dentro del organismo, disminuyendo los efectos secundarios.

Los NHM-TMX con y sin *L*-Cis demostraron ser prometedores sistemas portadores del TMX, ya que no solo modulan de manera eficiente, sino que, además, presentan una potencial aplicación en tratamientos de hipertermia magnética, puesto que, con el aumento de la temperatura (43 °C), se promovió la liberación del fármaco, alcanzando proporciones de TMX liberado superiores a las observadas en condiciones fisiológicas (37° C).

La evaluación de la eficacia y seguridad de los NHM-TMX, en vistas al tratamiento del cáncer de mama, demostró que las plataformas desarrolladas exhiben propiedades prometedoras. La eficacia antitumoral del TMX

vehiculizado en los NHM fue superior en comparación con el tratamiento con TMX puro a la misma concentración. Además, los NHM-TMX presentaron una significativa reducción del daño sobre los eritrocitos humanos, debido a la reducción del potencial hemolítico. Esto implica que las plataformas son hemocompatibles y además reducen uno de los efectos secundarios del TMX (anemia hemolítica), a la vez que mejoran significativamente la actividad antitumoral del fármaco. Estos resultados son muy alentadores y promisorios para la realización de estudios *in vivo* en modelos murinos en un futuro cercano.

Como conclusión final, las metodologías de síntesis desarrolladas en este trabajo de tesis permitieron la obtención de MNPs de Fe₃O₄ modificadas superficialmente con AH o L-Cis-AH. Éstas fueron portadores eficientes para la incorporación de un fármaco antitumoral modelo como es el TMX. Los NHM-TMX demostraron ser adecuados para vehicular el fármaco y permitir su liberación preferencial en un sitio diana, siendo más eficaces frente a células tumorales y más seguros en comparación con el TMX puro.

5.2 Proyecciones

Dado que la presencia del núcleo magnético favorecería el direccionamiento hacia células tumorales mediante la aplicación de un campo magnético externo, esto podría ser explotado en tratamientos de hipertermia; sumado a la presencia del AH que permitiría aumentar el reconocimiento celular.

A partir de lo expuesto, sería de relevancia llevar a cabo estudios de liberación en condiciones de hipertermia generadas por la aplicación de un campo magnético externo, como así también avanzar con el estudio de la seguridad de las NHM-TMX utilizando cultivos MCF-10 correspondientes a una línea celular normal de mama. También resultaría de gran relevancia evaluar el desempeño *in vivo* de los NHM-TMX empleando modelos experimentales murinos de cáncer de mama

Capítulo VI

Materiales y métodos

En el presente capítulo se detallarán los aspectos experimentales relacionados con los Capítulos II, III y IV de la presente tesis. En este se han estructurado diferentes secciones correspondientes a: 1) sección de reactivos usados, que describe cada uno de los compuestos, especificando su procedencia, fórmula y nombre comercial, 2) descripción general de la instrumentación empleada durante el desarrollo de este proyecto y 3) detalle experimental de las condiciones óptimas de operación en las cuales se prepararon los NM obtenidos y se evaluaron sus propiedades en este trabajo de tesis. Todos los reactivos empleados en este trabajo fueron obtenidos comercialmente y se utilizaron sin previa purificación, a menos que se indique lo contrario. La instrumentación detallada a continuación fue provista por el INFIQC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba-FCQ, salvo aquellos casos en que se indique otra información. Todas las reacciones de síntesis fueron efectuadas bajo atmósfera inerte empleando N₂ grado 4.8.

6.1. Materiales

6.1.1. Reactivos generales empleados en el Capítulo II

6.1.1.1. Reactivos para la síntesis de las MNPs

Cloruro férrico anhidro (FeCl₃, Merck®, 98 % de pureza); cloruro ferroso anhidro (FeCl₂, Stream Chemicals, 98 % de pureza); hidróxido de sodio granulado (NaOH, Cicarelli®); solución de hidróxido de amonio al 28 % p/p (NH₄OH, Cicarelli®); ácido clorhídrico 37% p/p (HCl, Cicarelli®); polivinilpirrolidona PVP K50 ((C₆H₉NO)_n, Sigma Aldrich®); glicerina, grado USP (HOCH₂CH(OH)CH₂OH, Todo droga); bromuro de potasio grado espectroscópico (KBr, Sigma Aldrich®).

6.1.1.2. Interacción de las MNPs con derivados de L-Cis

L-Cisteína clorhidrato monohidrato, (C₃H₈ClNO₂S.H₂O, L-Cis Parafarm®); L-Cistina clorhidrato (C₆H₁₇ClN₂O₄S₂, Parafarm®); cloruro de trimetilsilano (CITMS) ((CH₃)₃SiCl, Sigma Aldrich®); diterbutil dicarbonato

((Boc₂O) ((CH₃)₃COCO)₂O, Sigma Aldrich®); 1,4-dioxano pro-análisis (C₄H₈O₂, Cicarelli®); metanol pro-análisis (CH₃OH, Cicarelli®); cloruro de sodio (NaCl, Cicarelli®); trifenilfosfina 98 % ((C₆H₅)₃P, Cicarelli®); ácido acético glaciar (CH₃COOH Cicarelli®)

6.1.1.3. Reactivos generales empleados en el Capítulo III

Hialuronato de sodio ((NaC₁₄H₂₂NO₁₁)_n, AH, Parafarm®); N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDAC, C₈H₁₇N₃. HCl, Sigma Aldrich®); 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (HOBT) (C₆H₅N₃O.H₂O, Sigma Aldrich®), borohidruro de sodio (NaBH₄, Sigma Aldrich®), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (C₁₀H₁₆N₂O₈ Sigma Aldrich®), reactivo de Ellman's (5,5-ditio-bis-ácido 2-nitrobenzoico, DNTB) (C₁₄H₈N₂O₈S₂, Sigma Aldrich®).

6.1.1.4. Reactivos generales empleados en el Capítulo IV

Tamoxifeno citrato (C₂₆H₂₉NO.C₆H₈O₇, TMX, Parafarm®); carbonato de sodio decahidratado (Na₂CO₃ • 10H₂O, Sigma Aldrich®); bicarbonato de sodio (NaHCO₃, Sigma Aldrich®); fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄, Cicarelli®); hidróxido de sodio perlado (NaOH, Cicarelli®); acetato de etilo (C₄H₈O₂, Sintogran, grado PA); acetato de sodio (NaC₂H₃O₂. 3H₂O, Cicarelli®), bromuro de potasio grado espectroscópico (KBr, Sigma Aldrich®), medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 5% de suero bovino fetal, células MCF-7 (línea celular del cáncer epitelial derivado del adenocarcinoma de mama)

6.2. Instrumentación

6.2.1. Espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis)

Los espectros UV-*vis* fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro UV-1800 manufacturado por Shimadzu Corporation Analytical & Measuring

Instruments Division. Las mediciones fueron realizadas para un rango de longitud de onda entre 200 y 800 nm con una velocidad de escaneo rápida en modo absorbancia. Los espectros fueron analizados mediante el uso del programa UVProbe versión 2.34.

Con respecto a las microplacas, las mediciones fueron realizadas en un Lector de placas Tecan Sunrise Modelo 16039400 con 12 canales de medición y 1 de referencia en una longitud de onda de 540 nm. Como programa de análisis se usó el software de Tecan Magellan™ v7.1.

6.2.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR fueron obtenidos mediante el uso del equipo Nicolet iN10 IR Microscope manufacturado por Thermo Scientific. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente en modo transmitancia junto con una velocidad de escaneo de 64 por segundo en un rango entre 400 a 4000 cm^{-1} . Para la toma de los espectros las muestras se soportaron en pastillas de KBr (1:200 muestra:KBr). Los espectros FT-IR fueron analizados mediante el uso del programa OMNIC versión 8.3.103.

6.2.3. Difracción de rayos X de polvos (PDRX)

Los patrones de difracción de las muestras fueron obtenidos en un equipo PANalytical X'Pert Pro alimentado por un generador de rayos X Philips PW3040/60 y equipado con una lámpara de Cu $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) junto con un detector Pixcell 1D a un voltaje de 40 kV e intensidad de 40 mA, calibrados para un tiempo y ángulo de paso en 1.3 segundos y 0.03 grados, en un rango de trabajo entre 10° a 70° en unidades 2θ . El análisis de los difractogramas se realizó mediante el programa X'Pert HighScore versión 2.1b (2005).

6.2.4. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes de microscopia TEM fueron obtenidas en un microscopio TEM JEM-Jeol 1120 con una fuente de tungsteno a 80 kV y magnificación entre 10000x a 50000x. Estos estudios se realizaron en el laboratorio de microscopia perteneciente al CIAP-INTA-Córdoba. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ 1.42q

6.2.5. Espectroscopia de correlación fotónica (dynamic light scattering, DLS)

El diámetro hidrodinámico (d_H) y el índice de polidispersidad (PDI) de las partículas en dispersión fueron determinados mediante DLS. Los datos fueron obtenidos mediante el método de cumulantes y los PDI mediante el algoritmo de Contin, para un rango de 10 a 4000 nm. Las mediciones fueron realizadas en un equipo Beckman Coulter modelo Delsa Nano C (A53878), con 50 acumulaciones y 1 repetición. Los resultados obtenidos fueron procesados con el software Delsa Nano versión 2.20.

6.2.6. Potencial electrocinético (potencia Zeta ζ)

La carga superficial de las partículas, conocida como potencial zeta (ζ), se midió por el método láser Doppler en un equipo Beckman Coulter modelo Delsa Nano C (A53878), con 50 acumulaciones y 1 repetición. Los resultados obtenidos fueron procesados con el software Delsa Nano versión 2.20.

6.2.7. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN ^1H fueron registrados en un espectrómetro de RMN Bruker FT-400, operando a 400 MHz en ^1H , empleando cloroformo deuterado (CDCl_3) o H_2O deuterada (D_2O) como solventes. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm, relativos a tetrametilsilano (TMS).

6.2.8. Magnetometría de muestra vibrante (VSM)

Las propiedades magnéticas de las MNPs fueron evaluadas mediante el uso de un magnetómetro Lake Shore 7300, las curvas de histéresis fueron medidas en campos entre $\pm 0,9$ T a temperatura ambiente. Estos estudios fueron realizados en colaboración por la Dra. Paula Bercoff (IFEG-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, FAMAF)

6.2.9. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las curvas de TGA se obtuvieron en un equipo Shimadzu Corporation Analytical modelo DTG-60, en atmósfera oxidante, con un flujo de aire de $75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y un calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Los resultados fueron analizados con el programa TG-60 versión 2.21.

6.3. Metodologías

6.3.1. Metodologías del Capítulo II

6.3.1.1. Obtención de MNPs de Fe_3O_4

Para la síntesis del núcleo magnético se usó la metodología de coprecipitación con base en la metodología descrita en literatura ². Con la finalidad de optimizar la obtención de las partículas se realizaron ciertas modificaciones. Primeramente, se empleó agua decarbonata, la cual se obtuvo por calentamiento del agua Milli-Q a 100°C por 30 min con una agitación de 1000 rpm. El material de vidrio empleado fue sometido a una remoción de metales usando agua regia (una mezcla 1 HNO_3 : 3 HCl). Los núcleos magnéticos se obtuvieron con el uso de una mezcla de soluciones de sales de hierro (FeCl_3 y FeCl_2), en una relación molar de 2:1. Inicialmente, se usaron dos tipos soluciones básicas (NaOH [0,7 M] y NH_4OH [0,7M]), en una relación molar de base:Fe total 22:3. Además, con el fin de comparar la estabilidad de las MNPs se usó PVP a una concentración de 16 mg/mL .

La reacción se realizó en un balón de tres bocas de 100 mL, equipado con a un mecanismo de agitación mecánica (3000 rpm) y una entrada de N₂, tal como se muestra en la Figura 5.1. De manera representativa, se colocaron 75 mL de solución de básica de NH₄OH. En el caso en que se usó un polímero estabilizante como es el PVP, éste fue incorporado junto con el NH₄OH. Las soluciones de sales de Fe²⁺ y Fe³⁺ fueron preparadas mediante la disolución de 2,36 mmol de FeCl₂ en 6 mL de HCl (3 M) y 4,73 mmol de FeCl₃ en 3 mL de agua descarbonatada. Una vez obtenidas, estas soluciones fueron mezcladas en una jeringa para su adición rápida al reactor. La formación de las MNPs fue evidenciada por la formación inmediata de una dispersión oscura. Esta fue continuamente agitada bajo N₂ por el lapso de 30 min. Transcurrido este tiempo, el precipitado fue colectado con un imán de neodimio comercial y lavado 4 veces con 150 mL de una mezcla agua:etanol 1:1. La metodología de lavado permitió la remoción de productos secundarios de síntesis y reactivos en exceso. Con el fin de mejorar la evaporación y remoción del solvente de lavado a temperatura ambiente (25°C), se usó un recipiente de amplia área superficial (Cápsula de Petri), tal como se muestra en la Figura 6.1. Las MNPs obtenidas fueron almacenadas en recipientes cerrados para su posterior uso y caracterización.

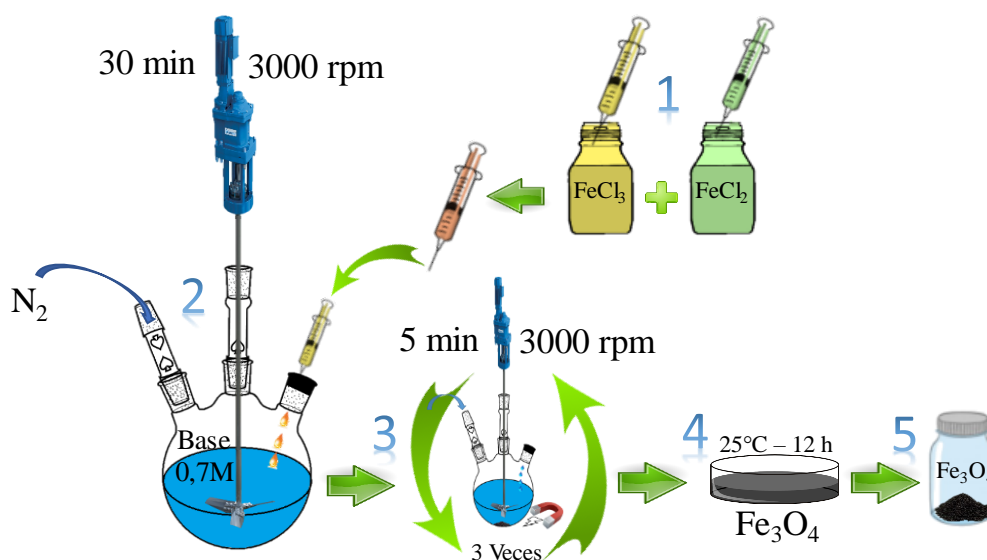


Figura 6-1: Esquema de síntesis de las MNPs de Fe₃O₄

6.3.1.2. Obtención de derivados de L-Cis

Para obtener los compuestos derivados de la *L*-Cis se dispuso de este aminoácido, así como de su dímero conocido como *L*-Cistina (**1**) (Figura 6.2)

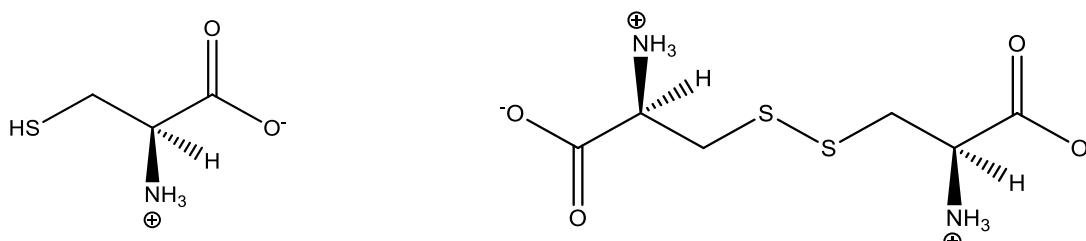


Figura 6-2: Estructura desarrollada de los compuestos *L*-Cis y *L*-Cistina

6.3.1.2.1. Obtención de *L*-Cistina metil éster (**2**)

Para el proceso de obtención de 913 mg de *L*-Cistina protegida en su grupo -COOH se siguió un metodología previamente reportada ¹⁰⁶, aplicando ciertas modificaciones para aumentar el rendimiento del proceso y alcanzar así un 91%. Se utilizó un tubo Schlenk, previamente secado y equipado con agitación magnética a 6000 rpm y en atmósfera inerte de N₂, tal como se muestra en la Figura 6.3. En este sistema, se colocaron 33 mL de metanol y 2,8 mL de cloruro de trimetilsilano (CITMS), y se lo dejó en agitación durante 15 min. Una vez transcurrido dicho tiempo, se adicionaron 3,19 mmol de *L*-Cis (1000 mg). El equipo de reacción fue cubierto con papel aluminio con la finalidad de evitar la exposición a la luz durante la reacción y el sistema se dejó bajo agitación durante un período de 6 h. Posteriormente, se adicionó una segunda fracción de 2,8 mL CITMS y el sistema se dejó reaccionar nuevamente por 6 h más, alcanzándose un total de 12 h de reacción. Una vez finalizado dicho tiempo, el solvente fue removido por medio del uso de un evaporador rotatorio durante 20 min. El producto final obtenido fue almacenado para su posterior uso y caracterización.

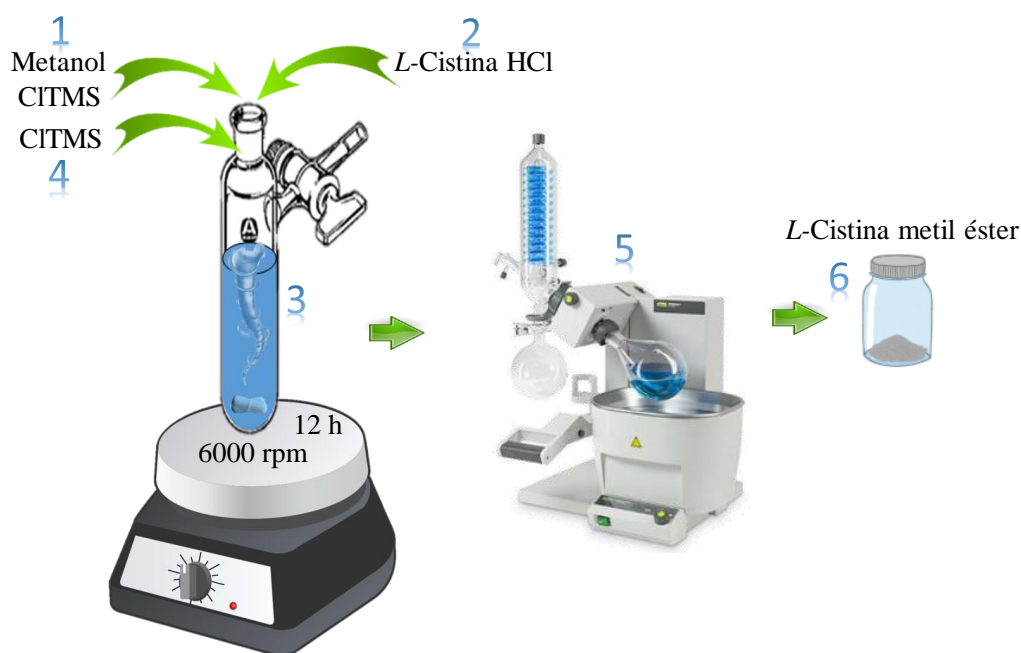


Figura 6-3: Esquema de síntesis de *L*-Cistina metil éster

6.3.1.2.2. Obtención de *N*-Boc-*L*-Cistina metil éster (4)

Para la protección del grupo funcional amonio ($-\text{NH}_3^+$), se siguió una metodología ya reportada ¹⁰⁸. Sin embargo, se realizaron modificaciones puntuales para tratar de mejorar el rendimiento del proceso. Para la obtención de aproximadamente 484,6 mg del compuesto 4 se usó, nuevamente, un tubo Schlenk equipado de manera similar a lo detallado en la sección previa. Se colocaron 2,59 mmol de 1 (500 mg) junto con dos soluciones. La primera fue una solución de dioxano-agua en relación 2:1 (4,4 mL), mientras que la segunda fue una solución de NaOH [1M] (2,9 mL) (Figura 6.4). Posteriormente, se adicionaron 6,38 mmol de *N*-Boc (1,5 mL) y se dejó que el sistema reaccionara a temperatura ambiente (25°C) por 24 h.

Una vez finalizado el tiempo de reacción, se realizaron cuatro extracciones del crudo de reacción con acetato de etilo, siendo dos veces con solución salmuera (sol. acuosa de NaCl saturada) y dos más con HCl 1M. Finalmente, la fase orgánica se secó empleando Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó a sequedad empleando un evaporador rotatorio durante 15 min. Este procedimiento

permitió obtener el producto **4** con un 97 % de rendimiento. Al producto resultante se lo almacenó a una temperatura de -8°C para su posterior empleo y caracterización.

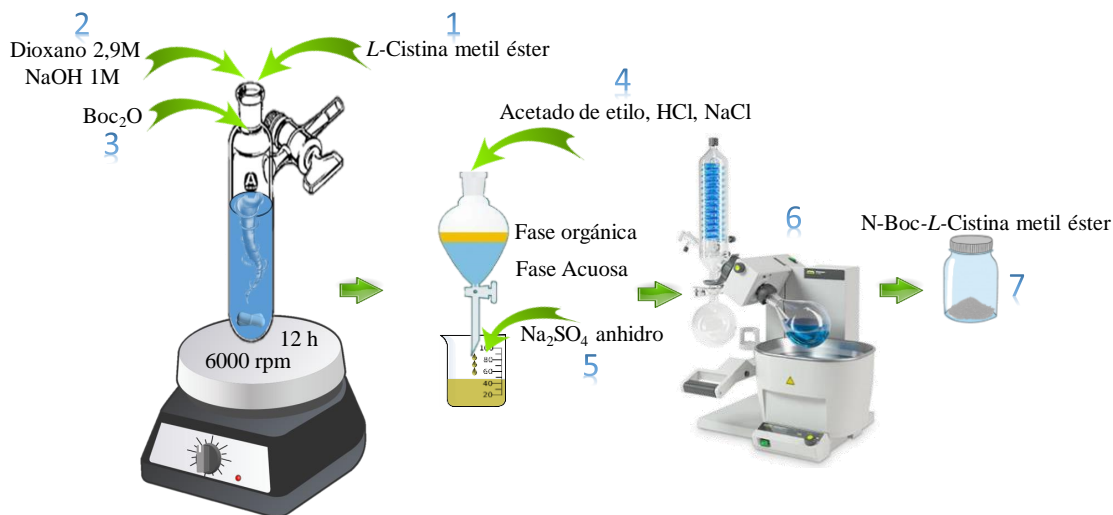


Figura 6-4: Esquema de síntesis de *N*-Boc-*L*-Cistina metil éster

6.3.1.2.3. Obtención de *N*-Boc-*L*-Cis metil éster (3)

La ruptura del puente disulfuro de la molécula de *N*-Boc-*L*-Cistina metil éster (**4**) se realizó siguiendo una metodología ya reportada ¹⁰⁸, pero con modificaciones puntuales. La preparación de 387,2 mg de *N*-Boc-*L*-Cis metil éster (**3**) consistió de dos etapas. En la primera etapa, se usó nuevamente un tubo Schlenk equipado con las mismas condiciones que ya fueron descritas en las secciones presentes. Se colocaron 500 mg del compuesto **4** junto con metanol (3,9 mL), 1,3 mmol de trifetilfosfina (275,4 mg), 0,4 mmol de acetato de sodio (32,3 mg) y 1,9 mL de agua Milli-Q. A esta mezcla se la dejó en agitación durante 5 min y, posteriormente, se adicionaron 2,1 mmol de ácido acético glacial (118 μL). El sistema se dejó reaccionar por 30 min a reflujo (Figura 6.5). Una vez finalizado el tiempo de reacción, se procedió a realizar 3 extracciones empleando diclorometano, H₂O y una solución de salmuera. La fase orgánica obtenida fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrada y evaporada a sequedad empleando un evaporador rotatorio por 15 min. El producto resultante presentó un color amarillento junto con una apariencia aceitosa.

A este producto se lo purificó mediante cromatografía en columna empleando como fase estacionaria sílica gel (60-230 mesh) y como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo en una relación 7:3. Cada fracción recuperada fue monitoreada mediante cromatografía en capa fina (TLC). De esta forma, el producto **3** se obtuvo en un 77 % de rendimiento. Finalmente, dicho compuesto fue almacenado para su posterior uso y caracterización.

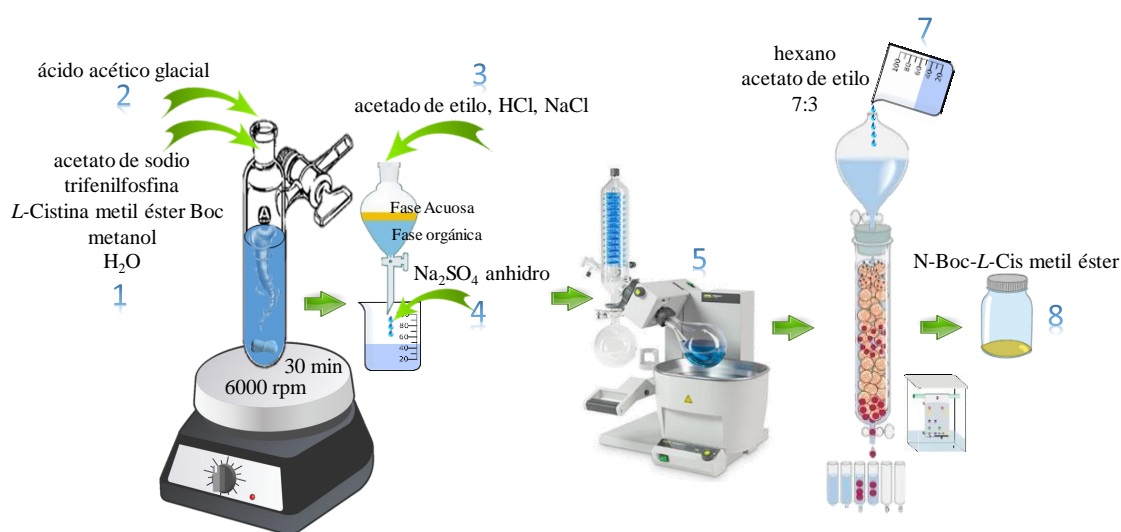


Figura 6-5: Esquema de síntesis de *N*-Boc-*L*-Cis metil éster (**3**) por ruptura del puente S-S

6.3.1.2.4. Interacción de las MNPs con derivados de *L*-Cis

Para realizar la funcionalización de las MNPs con los derivados de *L*-Cis, en primer lugar, se realizó la síntesis de los núcleos magnéticos siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.3.1.1. Una vez lavadas las MNPs, bajo atmósfera inerte y presentes dentro del balón de reacción, con aproximadamente 2,36 mmol, las MNPs fueron redispersadas en 75 mL de etanol (Figura 6.6). El ligando orgánico se adicionó manteniendo una relación de 2:1 mol con respecto a las MNPs, disueltos en 75 mL de buffer carbonato de pH 8,8. Esta dispersión, se adicionó rápidamente al reactor y se agitó mecánicamente a 3000 rpm por un tiempo de 3 h, a una temperatura de 37°C en atmósfera de N₂ y bajo sonicación (Figura 6.6). Una vez finalizada la reacción, se realizaron lavados con la finalidad

de remover productos secundarios de síntesis y reactivos en exceso. Se usó una mezcla agua: etanol 1:1 junto con un imán de neodimio comercial y las partículas fueron depositadas en un recipiente de amplia área superficial para ser secadas a temperatura ambiente (25 °C). Los NHM obtenidos producto de cada interacción fueron almacenados en recipientes cerrados para su posterior uso y caracterización.

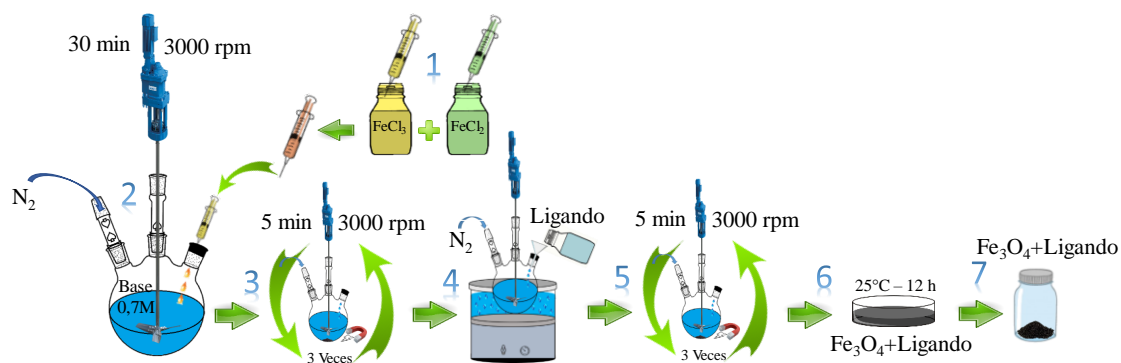


Figura 6-6: Esquema de síntesis de las MNPs con *L-Cis* y sus derivados

6.3.2. Metodologías del Capítulo III

6.3.2.1. Modificación del AH por conjugación con *L-Cis*

La conjugación entre AH y *L-Cis* fue realizada de acuerdo con una metodología ya reportada ¹⁷⁶. Sin embargo, se aplicaron algunas modificaciones puntuales con la finalidad de mejorar el rendimiento del proceso. En una primera etapa se realizó la activación de los grupos ácidos carboxílicos del AH. Para ello, se usó un tubo Schlenk, previamente seco y en atmósfera de N₂, se colocaron 100 mg de AH dispersos en 25 mL de agua Milli-Q y, posteriormente, se adicionaron 1,25 mmol de EDAC y 1,25 mmol de HOBt. Dicha mezcla se mantuvo con agitación magnética a 6000 rpm por un tiempo de 15 min (Figura 6.7). Una vez finalizado dicho tiempo, se adicionaron 1,25 mmol de *L-Cis* y se reguló el pH con una solución de HCl 0,1 M hasta alcanzar un valor de 5. El sistema se dejó reaccionar por un tiempo de 4 h, con regulaciones constantes de pH. Una vez culminado el tiempo de reacción, la mezcla fue sometida a un proceso de dializado hacia una solución de NaCl 0,9 % p/v, usando una membrana

semipermeable de acetato de celulosa (*cut-off* 12KDa) por 6 h. Este proceso se realizó dos veces, cambiando la solución receptora entre cada diálisis, con el fin de remover los reactivos en exceso. Finalmente, la mezcla resultante fue liofilizada (Rificor Liofilizador L-T8) y el sólido obtenido fue pulverizado y almacenado para su posterior uso y caracterización.

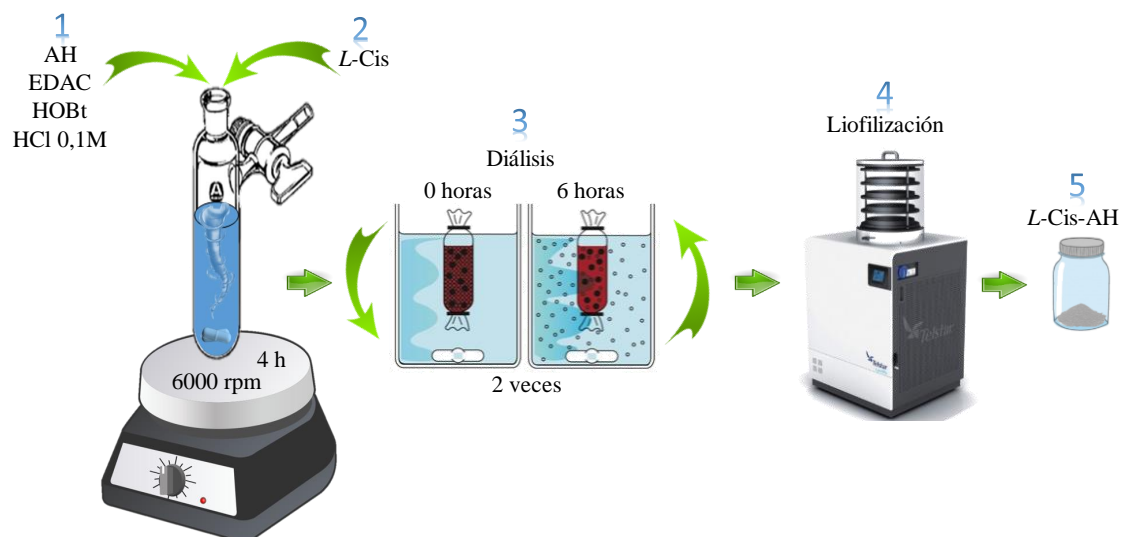


Figura 6-7: Esquema de funcionalización de AH con *L-Cis* para obtener el conjugado *L-Cis-AH*

6.3.2.2. MNPs-*L-Cis* funcionalizadas con AH

Para obtener las MNPs-*L-Cis* funcionalizadas con AH, se emplearon dos relaciones en masa (AH: Fe_3O_4 (teórica)) de 0,3 (5) y 0,6 (6). Esta síntesis consistió en tres etapas.

Primero, se utilizaron las MNPs-*L-Cis* que se obtuvieron de acuerdo con el detalle experimental en dos etapas descripto en la sección 6.3.1.2.4 con una masa teórica de Fe_3O_4 aproximada de 1,6 g.

Segundo, para la posterior funcionalización con AH con respecto a la masa de MNPs-*L-Cis*, fue necesario activar 328,8 mg de AH por 25 min a temperatura ambiente (25°C) en un tubo Schlenk provisto con agitación magnética a 6000 rpm (Figura 6.8). Para esto, se colocaron 82,2 mL de una dispersión de AH (0,4 % p/v),

la cual se pre activó con el uso de 0,4 mmol de EDAC, 0,4 mmol de HOBT y se controló su pH \approx 5.5 con una solución 0.1M de HCl .

Tercero, una vez que se completó dicho tiempo de activación, la solución se transvasó a un reactor que contenía las MNPs-*L*-Cis dispersas en una mezcla agua: etanol 1:1 (2,21 % p/v). El sistema se dejó con agitación mecánica a 3000 rpm durante un tiempo de 4 h a temperatura ambiente (25°C), pH \approx 5.5 y bajo atmósfera de N₂. Finalizada esta etapa, se realizó la separación magnética de las MNPs, se las redispersó en agua y seguidamente se las sometió a un proceso de dializado hacia una solución de NaCl 0.9% p/v utilizando una membrana semipermeable de acetato de celulosa (*cut-off* 12KDa) por 6 h. Este proceso se realizó dos veces, cambiando la solución receptora entre diálisis, con la finalidad de remover reactivos en exceso o subproductos de la reacción. Al producto obtenido (MNPs *L*-Cis-AH) se lo secó a temperatura ambiente (25°C) y se lo almacenó para su posterior uso y caracterización.

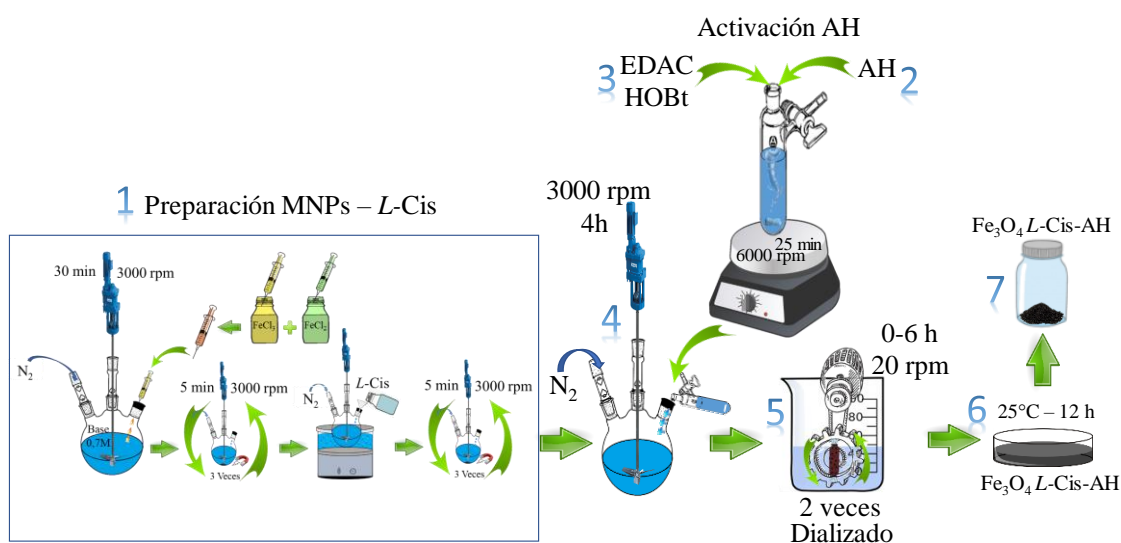


Figura 6-8: Esquema de síntesis de las MNPs *L*-Cis-AH

6.3.2.3. MNPs funcionalizadas con AH

Para la funcionalización de la MNPs directamente con el ligando de AH, se optó por efectuar una adición directa del AH durante la síntesis de los núcleos magnéticos. Para ello, se utilizó el mismo diseño experimental detallado en la

sección 6.3.1.1. Se colocaron, en un balón de tres bocas, 328 mg de AH junto con 75 mL de solución de NH_4OH 0,7 M (Figura 6.9). A esta mezcla se le agregó, rápidamente y mediante el empleo de una jeringa, una solución de sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} preparada de acuerdo con el detalle experimental de la de la sección 6.3.1.1. El sistema se dejó reaccionar por 30 min con una velocidad de agitación mecánica de 3000 rpm y bajo atmósfera de N_2 . Una vez finalizado el tiempo de reacción, el producto resultante se sometió a lavados con una mezcla agua:etanol 1:1. El sobrenadante que contenía restos de reactantes y subproductos fue removido previa separación de las MNPs con ayuda de un imán de neodimio. Con el fin de mejorar la purificación del NHM obtenido, éste se sometió a un proceso de dializado con giro vertical. Las partículas resultantes fueron secadas a temperatura ambiente (25°C) utilizando un recipiente de área superficial amplia. Finalmente, estas fueron almacenadas en recipientes cerrados para su posterior uso y caracterización.

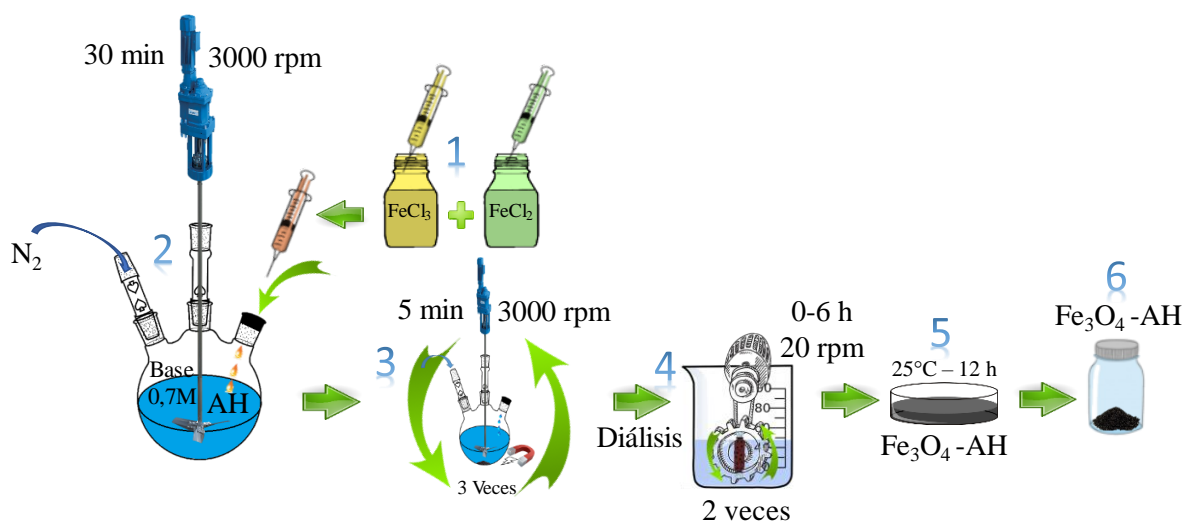


Figura 6-9: Esquema de síntesis de las MNPs- AH

6.3.2.4. Cuantificación de los grupos tiol (SH) en las NHM con L-Cis

Para la cuantificación de los grupos tiol (-SH) presentes en los NHM funcionalizados con L-Cis se siguió una metodología ya reportada ¹²⁵ Se partió de la preparación de diferentes soluciones de L-Cis como estándares (rango de concentraciones de 0 a 1,5 mM, 7 patrones de diferente concentración).

Se prepararon los tubos de prueba conteniendo 50 μL del reactivo de Ellman's en un buffer fosfatos de pH 8 (fosfato de sodio 0,1 M, 1 mM de EDTA). A cada tubo, adicionalmente, se le agregaron 250 μL de cada solución estándar. Las muestras fueron mezcladas con agitación magnética a 1000 rpm por 15 min. Finalmente, cada una fue medida por espectrofotometría UV-*vis* a una longitud de onda de 412 nm. La curva de calibración obtenida dio como resultado un coeficiente de absortividad molar de 10013 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y una regresión lineal con R^2 de 0,9961. Para determinar las concentraciones de los grupos -SH libres en cada muestra de NHM se disolvieron 4 mg del reactivo de Ellman's en 1 mL de buffer fosfato de pH 8. Se colocaron 50 μL de esta solución en tubos que contenían 2,5 mL de buffer pH 8. Seguidamente, se adicionaron 250 μL de una dispersión de cada NHM con *L*-Cis. Para esto, se planteó la siguiente metodología: se tomaron 3 mg de cada NHM (o del conjugado AH-*L*-Cis) y se adicionaron 6 mL de buffer fosfato pH 8 junto con 6 mL de una solución de borohidruro de sodio 10 mM. A esta mezcla se la agitó por 30 min a 40°C. Finalizado este tiempo, se adicionaron 6 mL de acetona y 1,8 mL de HCl 1M, y la mezcla se agitó por 5 min adicionales. Las mezclas contenidas en los diferentes tubos fueron agitadas mediante agitación magnética a 1000 rpm por 15 min. Finalmente, cada una fue medida espectrofotométricamente a 412 nm. Los datos de absorbancia fueron analizados de acuerdo con la curva de calibración para cuantificar los grupos -SH libres en cada NHM con *L*-Cis.

6.3.3. Metodologías del Capítulo IV

6.3.3.1. Incorporación de TMX en los NHM con y sin *L*-Cis

Para la incorporación de TMX en las NHM obtenidos se usó un equipo de agitación vertical, tal como se muestra en la Figura 6.10. Para ello, se dispersaron 45 mg de NHM en 45 mL de solución acuosa de TMX 122 μM (pH \approx 7). La mezcla fue sometida a agitación vertical durante 72 h a una velocidad de giro de 6 rpm. Una vez finalizado dicho tiempo, el producto resultante fue sometido a 3 lavados con agua Milli-Q con el fin de remover remanentes de TMX sin interaccionar.

Entre cada lavado los NHM fueron recuperados por separación magnética mediante el uso de un imán de neodimio.

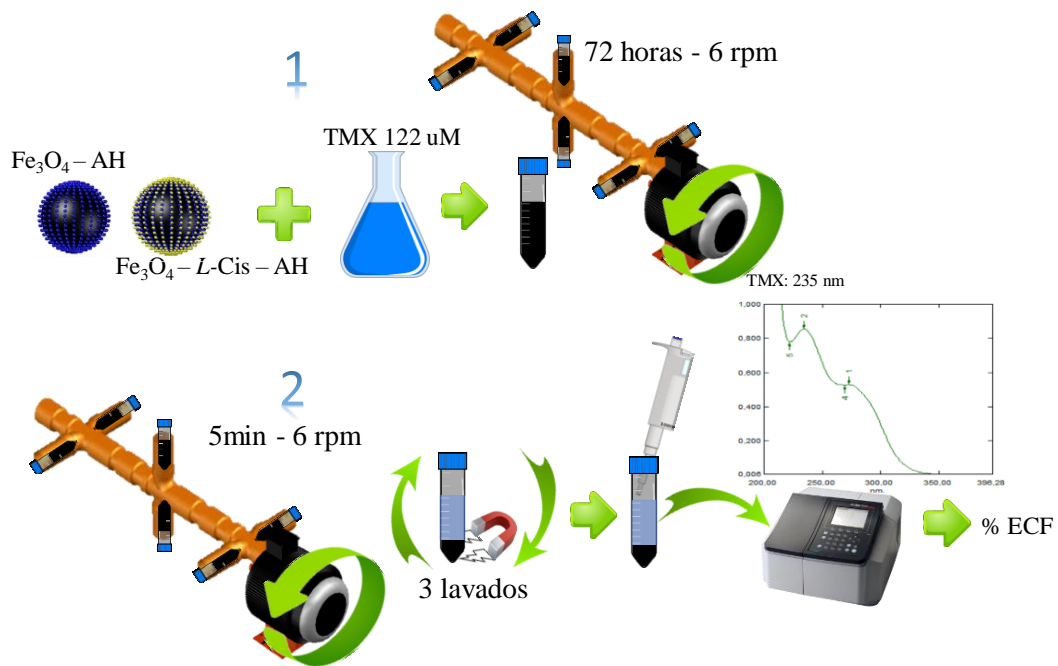


Figura 6-10: Esquema de interacción entre los NHM y TMX 1) cargado del fármaco y 2) lavados y representación para determinar la eficiencia de cargado del fármaco (%ECF)

Para la determinación de la cantidad de TMX incorporado en los NHM con y sin *L-Cis*, se elaboró, en primera instancia, una curva de calibración, la cual constó de 5 concentraciones de soluciones acuosas de TMX conocidas (rango de concentraciones: $4-50 \mu g/mL$, 5 patrones). Las soluciones estándar fueron cuantificadas por espectrofotometría UV-*vis* a una longitud de onda de 235 nm. La curva de calibración obtenida mostró un buen ajuste, con un R^2 de $0,9943$. Para determinar la eficiencia de cargado del fármaco (%ECF, Ec 6.1), se realizó un análisis indirecto, determinado la cantidad acumulativa de TMX retirada en cada lavado.

$$\%ECF = \frac{TMX_i - TMX_r}{TMX_i} \times 100 \quad (Ec 6.1)$$

Donde TMX_i corresponde a la cantidad inicial de TMX agregada para ser incorporada a los NHM y TMX_r corresponde a la cantidad total de TMX removido durante los lavados.

6.3.3.2. Dispersabilidad de los NHM-TMX en dispersión acuosa

Las NHM con y sin *L-Cis* fueron dispersados en medio acuoso en una concentración de 0,83 % p/v. Como medio se usó buffer fosfato de pH 7,4 solo o en combinación con glicerina y propilenglicol en una relación 2:1, que fueron seleccionados como cosolventes. La dispersabilidad acuosa en cada medio fue evaluada mediante un registro de imagen en tiempo real hasta alcanzar la sedimentación total de los NHM-TMX (Figura 5.11).

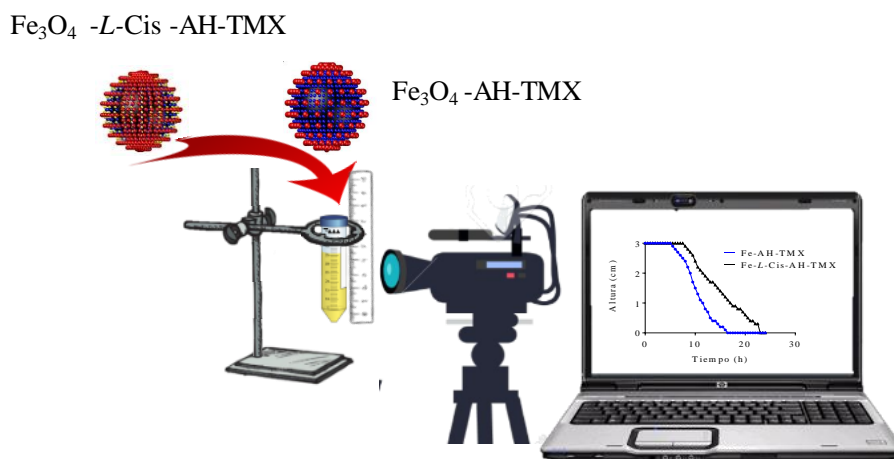


Figura 6-11: Esquema del diseño experimental utilizado para la medición de la sedimentación de los NHM (MNPs-AH-TMX y MNPs -L-Cis-AH-TMX)

El volumen de sedimentación (V_s) de cada dispersión fue calculado por el radio del recipiente contenedor y las alturas a la cuales se encontraba la dispersión a diferentes tiempos (V_d) en relación con el volumen original de la dispersión (V_o) (Ec 6.2).

$$V_s = \frac{V_d}{V_o} \quad (\text{Ec 6.2})$$

Las mediciones fueron realizadas a 25°C. Los resultados obtenidos fueron expresados en un gráfico de Vs en función del tiempo. Además, se evaluó la facilidad de redispersión de las partículas, una vez sedimentadas, por agitación manual simple durante 15 s.

6.3.3.3. Evaluación del desplazamiento iónico de TMX desde las NMH-TMX

Los efectos de la adición de un electrolito, como el NaCl, y un no electrolito, como la glucosa, ambos en solución acuosa y con concentraciones de 0,9% y 5% p/v, respectivamente, fueron analizados para evaluar la naturaleza de la interacción entre el TMX y los NHM y el mecanismo de desplazamiento del TMX desde estos portadores (Figura 6.12). El pH de las dispersiones se midió inicialmente y durante la adición de cantidades crecientes de NaCl o glucosa a la dispersión NHM. Esta cantidad se expresó en % en moles del agente titulante con respecto a los grupos ácidos carboxílicos presentes en el AH de los NHM.

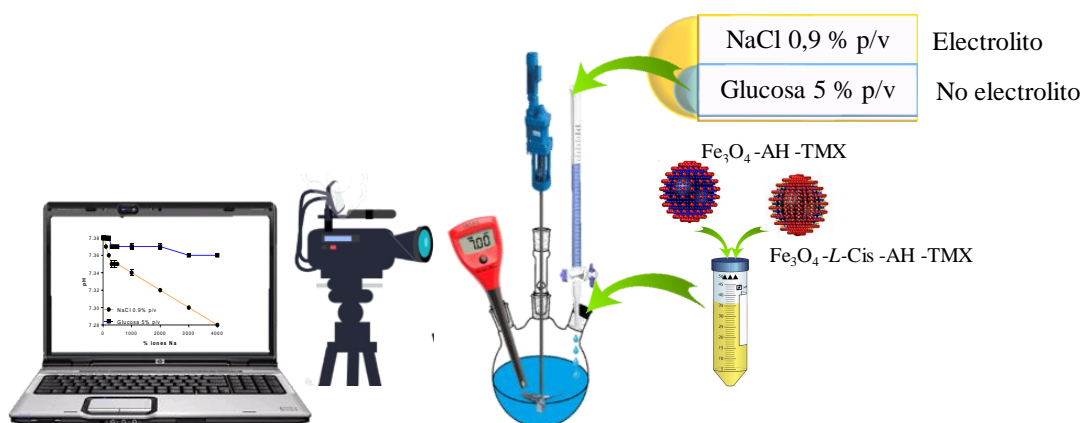


Figura 6-12: Esquema del diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de la adición de un electrolito y un no electrolito sobre la dispersión de NHM- TMX

6.3.3.4. Evaluación de la afinidad hidrofílica-hidrofóbica de los NHM-TMX

Los sistemas NHM-TMX con y sin *L*-Cis fueron sometidos a una prueba de afinidad para comprobar su hidrofiliicidad o hidrofobicidad ¹⁵⁸. Para esto, se

emplearon como solventes orgánicos y acuosos, acetato de etilo y agua, respectivamente. En la mezcla de solventes la proporción de la fase orgánica (acetato de etilo): fase acuosa (agua) fue de 1:1.

La afinidad de los NHM por la fase acuosa u orgánica se evaluó mediante el registro de imágenes en tiempo real de cada dispersión que contenía cada uno de los componentes (4 mg de NHM-TMX con y sin *L*-Cis junto con 4 mL de fase orgánica y 4 mL de fase acuosa) por un tiempo de 2 h (Figura 6.13). Cada experimento se realizó a temperatura ambiente (25°C) y por triplicado.

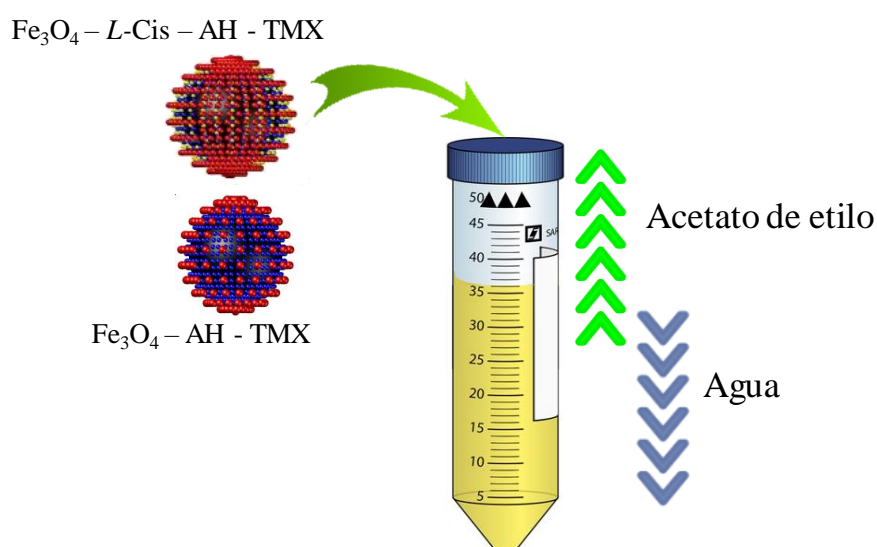


Figura 6-13: Esquema del diseño experimental utilizado para evaluar la afinidad de las NHM-TMX con y sin *L*-Cis por un medio orgánico o acuoso.

6.3.3.5. Estudios de liberación *in vitro* de TMX desde los NHM-TMX

Se evaluó la liberación *in vitro* de TMX desde dispersiones acuosas de NHM-TMX. Una solución de TMX puro, en una concentración equivalente de TMX en los NHM-TMX se utilizó como referencia. Los experimentos se realizaron en celdas bicompartimentales montadas con membrana semipermeable de acetato de celulosa (*cut-off* 12 kDa, Sigma-Aldrich®, EE. UU.) entre el compartimento donante y el receptor.

Se colocaron 4 mL de dispersión (10.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en el compartimento donante, en contacto con 10 mL de buffer fosfato (PBS) pH 7,4 o buffer acetato (ACS) pH 5 utilizados como medios receptores que simulan plasma sanguíneo y entorno endocítico, respectivamente. Se tomaron muestras de 1,5 mL de medio receptor a intervalos de tiempo predeterminados y se los reemplazó con cantidades iguales de medio receptor fresco (libre de TMX y termostatzado). Los experimentos se llevaron a cabo en ausencia de cualquier campo magnético aplicado, a 37 y 43° C. La concentración del TMX liberado se analizó espectrofotométricamente a 235 nm y todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se corroboró que en todo momento se mantuvieron las condiciones de estado estacionario requeridas para los estudios de liberación, por lo que no se produjo saturación del TMX en el medio receptor (Figura 6.14).

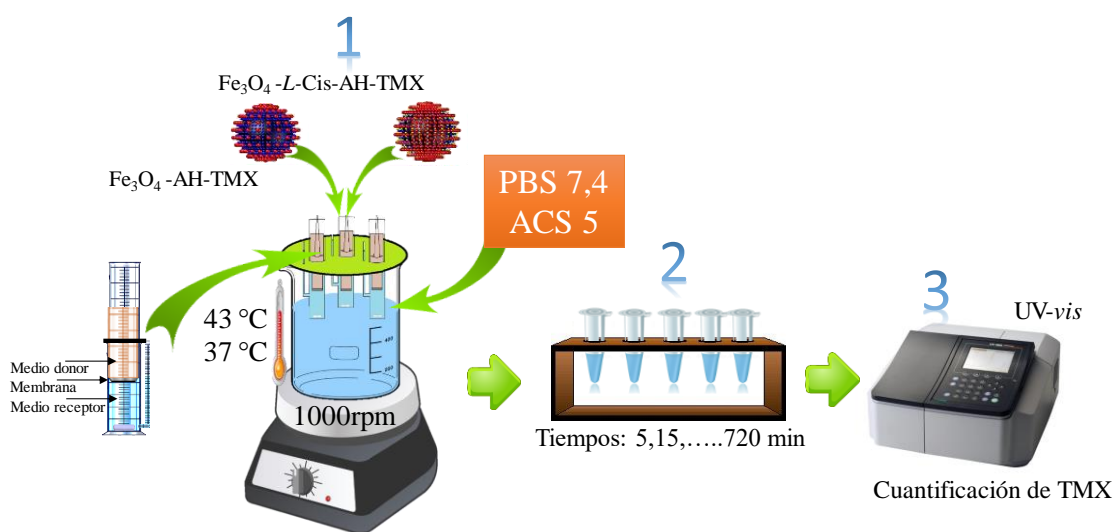


Figura 6-14: Esquema de las celdas bicompartimentales utilizadas para evaluar la liberación de TMX desde las NHM-TMX con y sin *L-Cis* y representación de las diferentes etapas involucradas en el análisis de las muestras.

Los resultados se expresan como porcentaje acumulado de TMX liberado en función del tiempo y corresponden al promedio con su respectiva desviación estándar (SD).

Los perfiles de liberación de TMX desde los sistemas NHM-TMX, así como también el perfil de la muestra de referencia, se compararon estadísticamente

utilizando el factor de diferencia (f_1) y el factor de similitud (f_2) (Ec 6.3 y Ec 6.4), respectivamente). De acuerdo con esta metodología, un valor de f_1 por encima de 15 y un valor de f_2 entre 0 y 50 implica una diferencia significativa entre los perfiles de liberación^{177,178}.

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum R_t} \quad (\text{Ec 6.3})$$

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left(1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - P_t)^2 \right)^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (\text{Ec 6.4})$$

Donde n es el número de puntos de tiempo de muestreo, Σ es la suma en todos los puntos de tiempo y R_t junto con P_t son los porcentajes acumulados de fármaco liberado en cada uno de los n puntos de tiempo, tanto del producto de referencia como el de prueba. El coeficiente de variación fue inferior al 15% en todos los casos. Solo se utilizó hasta el 85% de la liberación del fármaco al momento de aplicar las ecuaciones.

Los perfiles de liberación obtenidos para PBS 7,4 y ACS 5 se ajustaron de acuerdo con los siguientes modelos cinéticos (Ecuación 6.5, 6.6 Y 6.7)^{177,179} para incluir en los mecanismos de liberación del fármaco. La ecuación 6.6 se conoce generalmente como el modelo Higuchi simplificado, en el cual la liberación del fármaco se encuentra limitada por un proceso de difusión, de acuerdo con la ley de Fick:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \times t^{0.5} \quad (\text{Ec 6.6})$$

Donde (M_t) es la cantidad de fármaco liberado a tiempo (t), (M_∞) es la cantidad inicial de fármaco en el compartimento donante y (k_H) es una constante de liberación de Higuchi. A partir del análisis de la regresión lineal de los perfiles de liberación, trazando el porcentaje de la liberación de TMX en función de la raíz cuadrada del tiempo, se analizó el grado de correlación de la liberación del fármaco con este modelo.

El modelo de difusión semi empírico (Ec 6.7), propuesto por Peppas ¹⁷⁹, relaciona la liberación exponencial del fármaco con el tiempo transcurrido y puede usarse para caracterizar diferentes mecanismos de liberación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_p \times t^n \quad (\text{Ec 6.7})$$

Donde M_t , t y M_∞ se describieron anteriormente y k_p es la constante de liberación. A n se lo conoce como el exponente de liberación que caracteriza el mecanismo de liberación del fármaco desde el sistema portador. Cuando n es 0,5, la fracción de fármaco liberado es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo y el mecanismo preponderante en la liberación es la difusión. En cambio, cuando n es 1, el mecanismo preponderante en la liberación del fármaco es la disolución. Los valores de n entre 0,5 y 1 indican un transporte anómalo y una superposición de ambos fenómenos e incluso el aporte de otros mecanismos como pueden ser el intercambio iónico o la relajación de las cadenas poliméricas. Esta ecuación es válida en el intervalo de liberación entre el 5 y el 60% del fármaco acumulado liberado. Para el análisis se trazaron los gráficos de $\ln M_t / M_0$ en función del $\ln t$ y se analizó el grado de linealidad por medio del coeficiente de correlación (R^2). Los valores de n se determinaron de las pendientes de las líneas de regresión.

Al modelo de orden cero (Ec 6.8) se lo conoce por tener una velocidad de difusión del fármaco constante e independiente de la concentración del fármaco en el sistema portador ¹⁷⁷.

$$M_t = M_0 + k_0 \times t \quad (\text{Ec 6.8})$$

Donde M_t y t fueron descriptos anteriormente, M_0 corresponde a la cantidad inicial del fármaco en el compartimento receptor y k_0 corresponde a la constante de liberación de orden cero. Para analizar el ajuste con este modelo se graficó el porcentaje acumulativo de fármaco liberado en función del tiempo y se analizó el R^2 obtenido por regresión lineal.

6.3.3.6. Estudio del potencial hemolítico de las MNPs híbridas

Se determinó el efecto del TMX sobre la integridad de la membrana de los eritrocitos mediante un estudio de hemólisis *in vitro* ¹⁸⁰. Se prepararon dispersiones de NHM-TMX con concentraciones de TMX iguales a 256, 128, 65, 32, 16 y 8 μM en PBS 7,4. El TMX puro en las mismas concentraciones se usó como referencia. Sobre las muestras (1 mL) se colocó sangre humana, gentilmente donada por el Banco de Sangre de la Universidad Nacional de Córdoba, la cual se adicionó para alcanzar una concentración final del 5% v/v en cada muestra. Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 2 h, bajo agitación mecánica suave. Finalizada esta etapa, cada muestra fue centrifugada a 25 °C y 10000 rpm durante 5 min. Se utilizaron muestras de agua Milli-Q y PBS 7,4 como control positivo y negativo de hemólisis, respectivamente, las cuales fueron procesadas de igual forma que las muestras de NHM-TMX y TMX puro. Adicionalmente, se estudiaron las plataformas (NHM con y sin L-Cis) sin TMX con el fin de evaluar su seguridad, colocando masas iguales a la de los sistemas con y sin L-Cis que incluían TMX.

El porcentaje de hemólisis (H%) se determinó por medición de la absorbancia del sobrenadante mediante espectrofotometría UV-*vis* a 540 nm (Figura 6.15) y se calculó de acuerdo con la ecuación 6.9.

$$\%H = \frac{Abs\ Muestra}{Abs\ agua\ Milli-Q} \times 100 \quad (\text{Ec } 6.9)$$

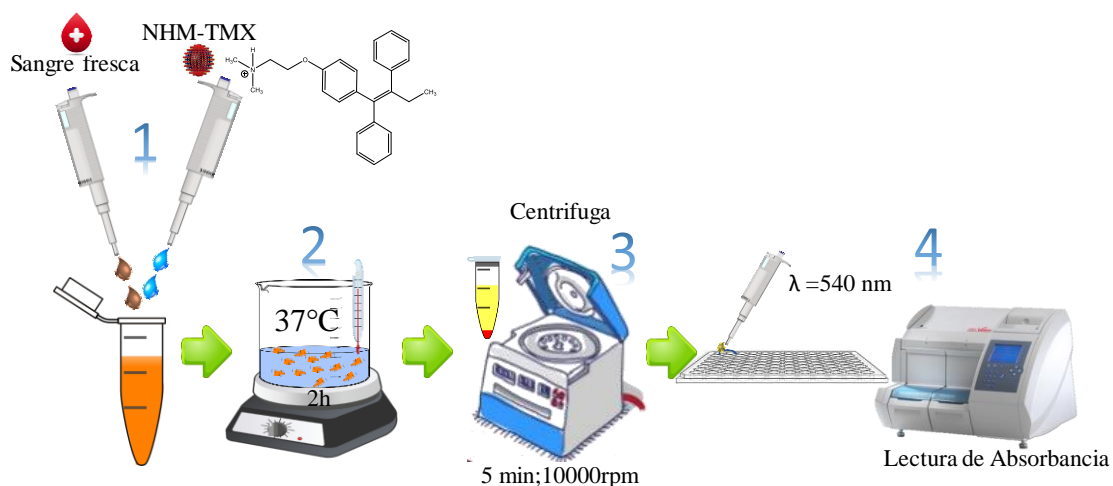


Figura 6-15: Representación esquemática de la metodología empleada en el estudio de hemólisis de los NHM-TMX con y sin *L-Cis*.

6.3.3.7. Evaluación de la eficacia de NHM-TMX en células tumorales de cáncer de mama (línea MCF-7)

El ensayo biológico se realizó utilizando el método de Loosdrecht¹⁸¹ mediante el uso de células MCF-7. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos (5000 células/pocillo/200 µL finales), en medio de cultivo DMEM suplementado con 5% de suero bovino fetal.

La actividad citotóxica fue investigada por la adición de diferentes concentraciones de TMX puro o cargado en las plataformas NHM-TMX con y sin *L-Cis*. Se evaluaron las mismas concentraciones que las empleadas en el estudio de potencial hemolítico (8, 16, 32, 64, 128 y 256 µM). Para mejorar la compatibilidad de las muestras de TMX y NHM-TMX con el medio de cultivo, se utilizó DMSO en una concentración final de 1%. Un grupo de células sin tratamiento fue mantenido como control. Después de 48 h de incubación a 37°C y atmósfera del 2,5% de CO₂, se añadieron 20 µL de solución de MTT (0,5 mg de dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium) de concentración 5 mg/mL a cada uno de los pocillos y la placa se incubó nuevamente durante 4 h. Al finalizar la incubación, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 µL de DMSO a cada pocillo. La coloración así obtenida fue leída a 595 nm en un lector de microplacas. El porcentaje de viabilidad celular se determinó de acuerdo con la ecuación 6.10 y los resultados se expresan como el promedio con su respectiva SD.

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Control}} \times 100 \quad (\text{Ec 6.10})$$

Estos estudios fueron realizados en colaboración con el Dr. Gerardo Gatti de la Fundación para el Progreso de la Medicina, Córdoba, Argentina.

6.3.3.8. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de la significancia estadística para comparar las diferentes condiciones experimentales en los estudios de potencial hemolítico y eficacia antitumoral. Se llevó a cabo este análisis asumiendo una distribución normal de los datos obtenidos. Adicionalmente, se realizó una comparación de las medias (por medio del *test* de *t-Student* de dos colas) y el análisis de varianza (por medio de ANOVA de dos vías). Para el procesamiento y análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el software GraphPad Prism®. Un valor de $p < 0,05$ o inferior fue considerado significativo.

6.4. Bibliografía

1. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951 (2015).
2. Murty, B. S., Shankar, P., Raj, B., Rath, B. B. & Murday, J. Applications of Nanomaterials. in *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology* 107–148 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-28030-6_4
3. European Commission. Commission recommendation on the definition of nanomaterial. *Off. J. Eur. Union* **L**, 38–40 (2011).
4. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
5. Rabinow, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 785–796 (2004).
6. García, M. C., Aloisio, C., Onnainty, R. & Ullio-Gamboa, G. *Self-assembled nanomaterials. Nanobiomaterials* (Elsevier Ltd., 2018). doi:10.1016/B978-0-08-100716-7.00003-9
7. Grislain, L. *et al.* Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier. *Int. J. Pharm.* **15**, 335–345 (1983).
8. Kairdolf, B. A., Qian, X. & Nie, S. Bioconjugated nanoparticles for biosensing, in vivo imaging, and medical diagnostics. *Anal. Chem.* **89**, 1015–1031 (2017).
9. Lin, W. Introduction: Nanoparticles in Medicine. *Chem. Rev.* **115**, 10407–10409 (2015).
10. Bawarski, W. E., Chidlow, E., Bharali, D. J. & Mousa, S. A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **4**, 273–282 (2008).
11. Panyam, J. & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 61–71 (2012).

12. Laurent, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).
13. Irache, J. M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M. & Espuelas, S. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Vet. Parasitol.* **180**, 47–71 (2011).
14. Karakoti, A. S., Shukla, R., Shanker, R. & Singh, S. Surface functionalization of quantum dots for biological applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **215**, 28–45 (2015).
15. Cai, Z., Zhang, H., Wei, Y. & Cong, F. Hyaluronan-Inorganic Nanohybrid Materials for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **18**, 1677–1696 (2017).
16. Huang, H. C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K. & Rege, K. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *J. Control. Release* **155**, 344–357 (2011).
17. Li, Z., Barnes, J. C., Bosoy, A., Stoddart, J. F. & Zink, J. I. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2590–2605 (2012).
18. Giljohann, D. A. *et al.* Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 3280–3294 (2010).
19. Lee, N. *et al.* Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magneto-responsive Therapy. *Chem. Rev.* **115**, 10637–10689 (2015).
20. Kumar, C. S. S. R. & Mohammad, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 789–808 (2011).
21. Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P. & Möller, L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* **188**, 112–118 (2009).
22. Neuringer, J. L. & Rosensweig, R. E. Ferrohydrodynamics. *Phys. Fluids* **7**, 1927–1937 (1964).
23. LOWENSTAM, H. A. Magnetite in Denticle Capping in Recent Chitons (Polyplacophora). *GSA Bull.* **73**, 435–438 (1962).
24. Blakemore, R. Magnetotactic bacteria. *Science (80-.)*. **190**, 377–379 (1975).
25. Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
26. Safronov, A. P. *et al.* Spherical magnetic nanoparticles fabricated by laser target evaporation. *AIP Adv.* **3**, 0–18 (2013).
27. Salas, G. *et al.* Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **22**, 21065–21075 (2012).
28. Liu, Z. L. & Wang, X. Synthesis of magnetite nanoparticles in W / O microemulsion. *J. Mater. Sci.* **9**, 2633–2636 (2004).
29. Mohanpuria, P., Rana, N. K. & Yadav, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *J. Nanoparticle Res.* **10**, 507–517 (2008).
30. Shen, L. *et al.* Facile co-precipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles. *Ceram. Int.* **40**, 1519–1524 (2014).
31. Roth, H. C., Schwaminger, S. P., Schindler, M., Wagner, F. E. & Berensmeier, S. Influencing factors in the CO-precipitation process of superparamagnetic iron oxide nano particles: A model based study. *J. Magn. Magn. Mater.* **377**, 81–89 (2015).

32. Khalil, M. I. Co-precipitation in aqueous solution synthesis of magnetite nanoparticles using iron(III) salts as precursors. *Arab. J. Chem.* **8**, 279–284 (2015).
33. Cotton, F. A., Wilkinson, G., Murillo, C. A. & Bochmann, M. *Advanced Inorganic Chemistry: Sixth Edition*. 1145 (1999).
34. Yang, C., Wu, J. & Hou, Y. Fe₃O₄ nanostructures: synthesis, growth mechanism, properties and applications. *Chem. Commun.* **47**, 5130 (2011).
35. Cullity, B. D. & Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials*. (Wiley, 2011).
36. Kip, A. F. & Sebastián, J. L. L. L. *Fundamentos de electricidad y magnetismo*. (Ediciones del Castillo, 1977).
37. Svenson, S. & Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 102–115 (2012).
38. Vallet-Regi M, A. N. D. Magnetic Nanoceramics for Biomedical Applications. in *Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications (2)* 275–312 (The Royal Society of Chemistry, 2016). doi:10.1039/9781782622550-00275
39. Hadinoto, K., Sundaresan, A. & Cheow, W. S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85**, 427–443 (2013).
40. Kumar, A. *et al.* Development of hyaluronic acid-Fe₂O₃ hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of peptides. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **3**, 132–137 (2007).
41. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* **112**, 5818–5878 (2012).
42. Maity, A. R. & Stepensky, D. Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: Analysis of research trends and targeting efficiencies. *Int. J. Pharm.* **496**, 268–274 (2015).
43. Makhoulouf, A. S. H. & Abu-Thabit, N. Y. *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications: Volume 1: Types and triggers*. (Elsevier Science, 2018).
44. ANMAT. Farmacopea Argentina. Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de la salud de la Nación. in (2013).
45. The United States Pharmacopeia Convention. The national formulary and dispensing information USP38-NF33. in 1884 (2015).
46. Hildebrandt, B. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **43**, 33–56 (2002).
47. Harmon, B. V *et al.* Cell death induced in a murine mastocytoma by 42–47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**, 845–858 (1990).
48. Horsman, M. R. & Overgaard, J. Hyperthermia: a Potent Enhancer of Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **19**, 418–426 (2007).
49. Mudunkotuwa, I. A. & Grassian, V. H. Histidine adsorption on TiO₂ nanoparticles: An integrated spectroscopic, thermodynamic, and molecular-based approach toward understanding nano-bio interactions. *Langmuir* **30**, 8751–8760 (2014).

50. Churchill, H., Teng, H. & Hazen, R. M. Correlation of pH-dependent surface interaction forces to amino acid adsorption: Implications for the origin of life. *Am. Mineral.* **89**, 1048–1055 (2004).
51. Gao, Q. *et al.* Amino Acid Adsorption on Mesoporous Materials: Influence of Types of Amino Acids, Modification of Mesoporous Materials, and Solution Conditions. *J. Phys. Chem* **112**, 2261–2267 (2008).
52. Milani, P., Demasi, M., de Rezende, L., Amaral, A. T. -d. & Andrade, L. H. Synthesis of <sc>I</sc>-cysteine-based boron compounds and their evaluation as proteasome inhibitors. *New J. Chem.* **38**, 4859–4871 (2014).
53. Viota, J. L., Arroyo, F. J., Delgado, A. V. & Horno, J. Electrokinetic characterization of magnetite nanoparticles functionalized with amino acids. *J. Colloid Interface Sci.* **344**, 144–149 (2010).
54. Jiang, Z. W., Dai, F. Q., Huang, C. Z. & Li, Y. F. Facile synthesis of a Fe₃O₄/MIL-101(Fe) composite with enhanced catalytic performance. *RSC Adv.* **6**, 86443–86446 (2016).
55. Mattheolabakis, G., Milane, L., Singh, A. & Amiji, M. M. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *J. Drug Target.* **23**, 605–618 (2015).
56. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. & Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**, 1303–1313 (1990).
57. Huang, Z., Zhao, C. & Radi, A. Characterization of hyaluronan, hyaluronidase PH20, and HA synthase HAS2 in inflammation and cancer. *Inflamm. Cell Signal.* 1–6 (2014). doi:10.14800/ics.306
58. Wu, H. *et al.* Hyaluronic acid conjugated graphene oxide for targeted drug delivery. *Carbon N. Y.* **69**, 379–389 (2014).
59. Luo, Y. & Prestwich, G. D. Hyaluronic Acid- N-hydroxysuccinimide: A Useful Intermediate for Bioconjugation. *Bioconjug. Chem.* **12**, 1085–1088 (2001).
60. Lemarchand, C., Gref, R. & Couvreur, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 327–341 (2004).
61. Battistini, F. D., Flores-Martin, J., Olivera, M. E., Genti-Raimondi, S. & Manzo, R. H. Hyaluronan as drug carrier. the in vitro efficacy and selectivity of Hyaluronan-Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **65**, 122–129 (2014).
62. Dicker, K. T. *et al.* Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater.* **10**, 1558–1570 (2014).
63. García-Posadas, L. *et al.* CD44 and RHAMM hyaluronan receptors in human ocular surface inflammation. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **252**, 1289–1295 (2014).
64. Song, S. *et al.* Hyaluronan-based nanocarriers with CD44-overexpressed cancer cell targeting. *Pharm. Res.* **31**, 2988–3005 (2014).
65. Skandalis, S. S., Gialeli, C., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. *Advances and advantages of nanomedicine in the pharmacological targeting of hyaluronan-CD44 interactions and signaling in cancer. Advances in Cancer Research* **123**, (Elsevier Inc., 2014).

66. Bourguignon, L. Y. W., Shiina, M. & Li, J. J. *Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. Advances in Cancer Research* **123**, (Elsevier Inc., 2014).
67. Dalerba, P. & Clarke, M. F. Cancer Stem Cells and Tumor Metastasis: First Steps into Uncharted Territory. *Cell Stem Cell* **1**, 241–242 (2007).
68. Bardelli, A. *et al.* PRL-3 Expression in Metastatic Cancers. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5607–5615 (2003).
69. M. Ángeles Gómez del río y Benedí, J. Fármacos antineoplásicos (II). **20**, 5 (2006).
70. Oskarsson, T., Batlle, E. & Massagué, J. Metastatic stem cells: Sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* **14**, 306–321 (2014).
71. Wong, H. L. *et al.* A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharm. Res.* **23**, 1574–1585 (2006).
72. Terán Dávila, J. & Teppa Garrán, A. D. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs): Bioquímica, farmacología y aplicación clínica en ginecología. *Ginecol. Obstet. Mex.* **73**, 424–435 (2005).
73. Top, S. *et al.* Selective estrogen-receptor modulators (SERMs) in the cyclopentadienylrhenium tricarbonyl series: Synthesis and biological behaviour. *ChemBioChem* **5**, 1104–1113 (2004).
74. Yilmaz, S., Gönenç, I. M. & Yilmaz, E. Genotoxicity of the some selective estrogen receptor modulators: A review. *Cytotechnology* **66**, 533–541 (2014).
75. Hall, J. M. & McDonnell, D. P. The estrogen receptor b-isoform (ERb) of the human estrogen receptor modulates ERa transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* **140**, 5566–78. (1999).
76. Cruz Silva, M. M., Madeira, V. M. C., Almeida, L. M. & Custódio, J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1464**, 49–61 (2000).
77. Zhao, X., Zhao, H., Chen, Z. & Lan, M. Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **14**, 210–220 (2014).
78. Wan, J. *et al.* Stable and Biocompatible Colloidal Dispersions of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Minimum Aggregation for Biomedical Applications. *J. Phys. Chem. C* **120**, 23799–23806 (2016).
79. Liu, Y. *et al.* Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1193–1201 (2009).
80. Fortin, M. A. *et al.* Polyethylene glycol-covered ultra-small Gd₂O₃nanoparticles for positive contrast at 1.5 T magnetic resonance clinical scanning. *Nanotechnology* **18**, (2007).
81. Shin, J. *et al.* Hollow manganese oxide nanoparticles as multifunctional agents for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 321–324 (2009).
82. Sharma, R. K. *et al.* Fe₃O₄ (iron oxide)-supported nanocatalysts: synthesis, characterization and applications in coupling reactions. *Green Chem.* **18**, 3184–3209 (2016).

83. Colombo, M. *et al.* Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4306 (2012).
84. Thanh, N. T. K., Maclean, N. & Mahiddine, S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chem. Rev.* **114**, 7610–7630 (2014).
85. Lara, N. *et al.* Redalyc.Magnetita (Fe₃O₄): Una estructura inorgánica con múltiples aplicaciones en catálisis heterogénea. *Rev. Colomb. Química* **46**, 42–59 (2017).
86. Lee, Y. *et al.* Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer imaging. *Adv. Mater.* **20**, 4154–4157 (2008).
87. Schwaminger, S. P. *et al.* Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **119**, 23032–23041 (2015).
88. Nguyen, V. Du *et al.* Nanohybrid magnetic liposome functionalized with hyaluronic acid for enhanced cellular uptake and near-infrared-triggered drug release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **154**, 104–114 (2017).
89. Lee, T. *et al.* Minimum hyaluronic acid (HA) modified magnetic nanocrystals with less facilitated cancer migration and drug resistance for targeting CD44 abundant cancer cells by MR imaging. *J. Mater. Chem. B* **5**, 1400–1407 (2017).
90. Li, J. *et al.* Hyaluronic acid-modified Fe₃O₄ at Au core/shell nanostars for multimodal imaging and photothermal therapy of tumors. *Biomaterials* **38**, 10–21 (2015).
91. Ahmadi, R., Ranjbarbodeh, E. & Gu, N. Synthesizing cysteine-coated magnetite nanoparticles as MRI contrast agent: Effect of pH and cysteine addition on particles size distribution. *Mater. Sci.* **30**, 382–389 (2012).
92. Cornell, R. M. & Schwertmann, U. Crystal Structure. in *The Iron Oxides* 9–38 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/3527602097
93. Alvear, D., Galeas, S., Guerrero, V. H. & Debut, A. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles. *Rev. Politécnica* **39**, 2–7 (2017).
94. Lambert, J. F. Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: A review. *Orig. Life Evol. Biosph.* **38**, 211–242 (2008).
95. Lambert, J.-F., Jaber, M., Georgelin, T. & Stievano, L. A comparative study of the catalysis of peptide bond formation by oxide surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 13371 (2013).
96. Patel, D., Chang, Y. & Ho, G. Amino acid functionalized magnetite nanoparticles in saline solution. *Curr. Appl. Phys.* **9**, S32–S34 (2009).
97. Cohen, H., Gedanken, A. & Zhong, Z. One-Step Synthesis and Characterization of Ultrastable and Amorphous Fe O Colloids Capped with Cysteine Molecules One-Step Synthesis and Characterization of Ultrastable and Amorphous Fe₃O₄ Colloids Capped with Cysteine Molecules. *Chem. Eng.* 15429–15438 (2008). doi:10.1021/jp805090y
98. Mehta, R. V. Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 901–916 (2017).
99. Arsalani, N., Fattahi, H. & Nazarpour, M. Synthesis and characterization of PVP-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as an MRI contrast agent. *Express Polym. Lett.* **4**, 329–338 (2010).

100. Betancourt, R. G., Sald, R. & Rodr, O. Preparacion de latices magneticos. *Rev. Mex. FÍSICA* **1**, 33–36 (2004).
101. Sun, Y. K., Ma, M., Zhang, Y. & Gu, N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **245**, 15–19 (2004).
102. Joshi, A. V., Bhusare, S., Baidossi, M., Qafisheh, N. & Sasson, Y. Oxidative coupling of thiols to disulfides using a solid anhydrous potassium phosphate catalyst. *Tetrahedron Lett.* **46**, 3583–3585 (2005).
103. Vieira, A. P. *et al.* Adsorption of cysteine on hematite, magnetite and ferrihydrite: FT-IR, Mössbauer, EPR spectroscopy and X-ray diffractometry studies. *Amino Acids* **40**, 205–214 (2011).
104. Jiang, W., Chen, X., Niu, Y. & Pan, B. Spherical polystyrene-supported nano-Fe₃O₄ of high capacity and low-field separation for arsenate removal from water. *J. Hazard. Mater.* **243**, 319–325 (2012).
105. Ahmadi, R. *et al.* Ultrasonic-assisted synthesis of magnetite based MRI contrast agent using cysteine as the biocapping coating. *Mater. Chem. Phys.* **131**, 170–177 (2011).
106. Li, J. & Sha, Y. A convenient synthesis of amino acid methyl esters. *Molecules* **13**, 1111–1119 (2008).
107. Rakauskaite, R. *et al.* Biosynthetic selenoproteins with genetically-encoded photocaged selenocysteines. *Chem. Commun.* **51**, 8245–8248 (2015).
108. Busnel, O. *et al.* Synthesis and evaluation of new ω -borono- α -amino acids as rat liver arginase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **13**, 2373–2379 (2005).
109. Gawande, M. B. *et al.* A facile synthesis of cysteine-ferrite magnetic nanoparticles for application in multicomponent reactions - A sustainable protocol. *RSC Adv.* **2**, 6144–6149 (2012).
110. Sun, C. G., Hu, B. C., Zhou, W. Y., Xu, S. C. & Liu, Z. L. Synthesis of disulfide-derivatized metallodeuteroporphyrins as novel catalysts to imitate cytochrome P 450 in the selective oxidation of cyclohexane. *J. Chem. Res.* **35**, 681–685 (2011).
111. Kim, K. Y. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine* **3**, 103–110 (2007).
112. Kim, S., Kim, J. H., Jeon, O., Kwon, I. C. & Park, K. Engineered polymers for advanced drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**, 420–430 (2009).
113. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
114. Yang, P. F. & Lee, C. K. Hyaluronic acid interaction with chitosan-conjugated magnetite particles and its purification. *Biochem. Eng. J.* **33**, 284–289 (2007).
115. Ahmadi, R., Gu, N., Reza, H. & Hosseini, M. Characterization of Cysteine Coated Magnetite Nanoparticles as MRI Contrast Agent. *Nano-Micro Lett.* **4**, 180–183 (2012).
116. Entwistle, J., Hall, C. L. & Turley, E. A. HA receptors: Regulators of signalling to the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.* **61**, 569–577 (1996).
117. Bonengel, S. & Bernkop-Schnürch, A. Thiomers - From bench to market. *J. Control. Release* **195**, 120–129 (2014).

118. Andreas Bernkop-Schnurch. Preactivated Thiomers : A New Generation of Mucoadhesive Polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **5**, 1–3 (2013).
119. Fuhrman, Lc. *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. American Journal of Pharmaceutical Education* **70**, (2006).
120. Heidari Majd, M. *et al.* Tamoxifen loaded folic acid armed PEGylated magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy of cancer. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **106**, 117–125 (2013).
121. Zhu, Z., Li, Y., Yang, X., Pan, W. & Pan, H. The reversion of anti-cancer drug antagonism of tamoxifen and docetaxel by the hyaluronic acid-decorated polymeric nanoparticles. *Pharmacol. Res.* **126**, 84–96 (2017).
122. Prabha, G. & Raj, V. Synthesis and characterization of chitosan–polyvinylpyrrolidone–bovine serum albumin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as potential carrier for delivery of tamoxifen. *J. Iran. Chem. Soc.* **15**, 871–884 (2018).
123. Zhou, Y. & Xie, Q. Sensors and Actuators B : Chemical Hyaluronic acid-coated magnetic nanoparticles-based selective collection and detection of leukemia cells with quartz crystal microbalance. *Sensors Actuators B. Chem.* **223**, 9–14 (2016).
124. Li, X., Yu, G., Jin, K. & Yin, Z. Hyaluronic acid L-cysteine conjugate exhibits controlled-release potential for mucoadhesive drug delivery. *Pharmazie* **67**, 224–228 (2012).
125. Instruccions. Ellman ' s Reagent. *Thermo Scientific* **22582**, 0311.3
126. Badyal, J. P. *et al.* A simple method for the quantitative analysis of resin bound thiol groups. *Tetrahedron Lett.* **42**, 8531–8533 (2001).
127. Lapcik, L. *et al.* Physicochemical Analysis of Hyaluronic Acid Powder for Cosmetic and Pharmaceutical Processing. *Hyaluronic Acid Biomed. Pharm. Appl.* 89–101 (2014).
128. Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P. & Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med. (Praha).* **53**, 397–411 (2008).
129. Goya, G. F., Berquó, T. S., Fonseca, F. C. & Morales, M. P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **94**, 3520–3528 (2003).
130. Thakor, A. S. & Gambhir, S. S. Nanooncology : The Future of Cancer Diagnosis and Therapy. *Cancer J. Clin.* **63**, 395–418 (2013).
131. Bucak, S., Yavuztürk, B. & Sezer, A. D. Magnetic Nanoparticles : Synthesis, Surface Modifications and Application in Drug Delivery. *Recent Adv. Nov. Drug Carr. Syst.* **2**, 165–200 (2012).
132. Attaluri, A. *et al.* Magnetic nanoparticle hyperthermia enhances radiation therapy: A study in mouse models of human prostate cancer. *Int. J. Hyperth.* **31**, 359–374 (2015).
133. Anderson, J. M. & Kim, S. W. *Recent Advances in Drug Delivery Systems.* (Springer US, 2012).
134. Liu, J. *et al.* PH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnol. Adv.* **32**, 693–710 (2014).
135. Menon, J. U. *et al.* Nanomaterials for photo-based diagnostic and therapeutic applications. *Theranostics* **3**, 152–166 (2013).

136. García MC, C. J. Stimulus-responsive nanogels for drug delivery. in *Stimulus Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications* (ed. Abu-Thabit., A. S. H. M. N. Y.) (Elsevier, 2018).
137. Estelrich, J., Escribano, E., Queralt, J. & Busquets, M. A. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 8070–8101 (2015).
138. Mejías, R. *et al.* Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials* **32**, 2938–2952 (2011).
139. Torre, L. A. *et al.* Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J. Clin.* **65**, 87–108 (2015).
140. McLaughlin, F., Finn, P. & La Thangue, N. B. The cell cycle, chromatin and cancer: Mechanism-based therapeutics come of age. *Drug Discov. Today* **8**, 793–802 (2003).
141. McCubrey, J. A. *et al.* Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 75–101 (2015).
142. Zembutsu H, Nakamura S, Akashi ST, Kuwayama T, Watanabe C, Takamaru T, Takei H, Ishikawa T, Miyahara K, Matsumoto H, Hasegawa Y, Kutomi G, Shima H, Satomi F, Okazaki M, Zaha H, Onomura M, Matsukata A, Sagara Y, Baba S, Yamada A, Shimada K, Shimizu D, Tsug, N. Y. Significant Effect of Polymorphisms in CYP2D6 on Response to Tamoxifen 2 Therapy for Breast Cancer; a Prospective Multicenter Study. *Clin Cancer Res* **23**, 2019–2026 (2016).
143. Burstein, H. J., Lacchetti, C. & Griggs, J. J. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Ovarian Suppression Summary. *J. Oncol. Pract.* **12**, 390–393 (2016).
144. Larsen, S. L. *et al.* Aurora kinase B is important for antiestrogen resistant cell growth and a potential biomarker for tamoxifen resistant breast cancer. *BMC Cancer* **15**, 1–15 (2015).
145. Ferioli, M. *et al.* Impact of physical exercise in cancer survivors during and after antineoplastic treatments. *Oncotarget* **9**, 14005–14034 (2018).
146. Sarker, D. & Workman, P. Pharmacodynamic Biomarkers for Molecular Cancer Therapeutics. *Adv. Cancer Res.* **96**, 213–268 (2006).
147. Lewinski, N., Colvin, V. & Drezek, R. Cytotoxicity of nanopartides. *Small* **4**, 26–49 (2008).
148. Mishra, B., Patel, B. B. & Tiwari, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **6**, 9–24 (2010).
149. Duncan, R. & Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.* **8**, 2101–2141 (2011).
150. Freiberg, S. & Zhu, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* **282**, 1–18 (2004).
151. Oyarzun-Ampuero, F. A., Rivera-Rodriguez, G. R., Alonso, M. J. & Torres, D. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 483–490 (2013).
152. Lollo, G., Rivera-Rodriguez, G., Torres, D. & Alonso, M. J. Nanoterapias oncológicas: Aplicaciones actuales y perspectivas futuras. *An. la Real Acad. Nac. Farm.* **77**, 76–98 (2011).

153. Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S. & Maiti, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **3**, 7 (2018).
154. Maji, R., Dey, N. S., Satapathy, B. S., Mukherjee, B. & Mondal, S. Preparation and characterization of tamoxifen citrate loaded nanoparticles for breast cancer therapy. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 3107–3118 (2015).
155. Badawi, H. M. & Khan, I. A study of the molecular conformations and the vibrational, ¹H and ¹³C NMR spectra of the anticancer drug tamoxifen and triphenylethylene. *J. Mol. Struct.* **1117**, 22–29 (2016).
156. Altmeyer, C., Karam, T. K., Khalil, N. M. & Mainardes, R. M. Tamoxifen-loaded poly(L-lactide) nanoparticles: Development, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity. *Mater. Sci. Eng. C* **60**, 135–142 (2016).
157. Nosrati, H., Rashidi, N., Danafar, H. & Manjili, H. K. Anticancer Activity of Tamoxifen Loaded Tyrosine Decorated Biocompatible Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Against Breast Cancer Cell Lines. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **28**, 1178–1186 (2018).
158. Hayashi, K. *et al.* High-frequency, magnetic-field-responsive drug release from magnetic nanoparticle/organic hybrid based on hyperthermic effect. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2**, 1903–1911 (2010).
159. Castro, S. G. *et al.* Enhanced dissolution and systemic availability of albendazole formulated as solid dispersions. *Pharm. Dev. Technol.* **18**, 434–442 (2013).
160. Rowe, R. C., Sheskey, P. J. & Quinn, M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. (Pharmaceutical Press, 2009).
161. Cuggino, J. C. *et al.* Responsive nanogels for application as smart carriers in endocytic pH-triggered drug delivery systems. *Eur. Polym. J.* **78**, 14–24 (2016).
162. García, M. C. *et al.* A novel gel based on an ionic complex from a dendronized polymer and ciprofloxacin: Evaluation of its use for controlled topical drug release. *Mater. Sci. Eng. C* **69**, 236–246 (2016).
163. Battistini, F. D., Olivera, M. E. & Manzo, R. H. Equilibrium and release properties of hyaluronic acid-drug complexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **49**, 588–594 (2013).
164. Joshi, V. B., Geary, S. M. & Salem, A. K. Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters. *AAPS J.* **15**, 85–94 (2013).
165. Albert, E. L., Shirotsaki, Y., Azurahaman, C. & Abdullah, C. Drug Release and Kinetic Study of Tamoxifen Citrate conjugated with Magnetite Nanoparticle for Drug Delivery Application. *Int. J. Appl. Eng. Res.* **13**, 5360–5369 (2018).
166. Citrate, T. Drug Bank. (2018).
167. Suñé, J. Nuevas Aportaciones Galénicas a las Formas de Administración. *Ferrer Grup. Barcelona, España* 41–47 (2000).
168. Coimbra, P. *et al.* Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: Synthesis and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 573–579 (2011).
169. Kassem, M. A. *et al.* Enhancing the Therapeutic Efficacy of Tamoxifen Citrate Loaded Span-Based Nano-Vesicles on Human Breast Adenocarcinoma Cells. *AAPS PharmSciTech* **19**, 1529–1543 (2018).

170. Benz, C. *et al.* Tamoxifen and 5-Fluorouracil in Breast Cancer: Cytotoxic Synergism in Vitro. *Cancer Res.* **43**, 5298–5303 (1983).
171. Abbasalipourkabir, R., Salehzadeh, A. & Abdullah, R. Tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles-induced apoptosis in breast cancer cell lines. *J. Exp. Nanosci.* **11**, 161–174 (2016).
172. Hu, F. X., Neoh, K. G. & Kang, E. T. Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. *Biomaterials* **27**, 5725–5733 (2006).
173. Upadhyay, K. K. *et al.* The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly(γ -benzyl L-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials* **31**, 2882–2892 (2010).
174. Baalousha, M. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Sci. Total Environ.* **407**, 2093–2101 (2009).
175. Petcharoen, K. & Sirivat, A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* **177**, 421–427 (2012).
176. Kafedjiiski, K. *et al.* Synthesis and in vitro evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery. *Int. J. Pharm.* **343**, 48–58 (2007).
177. Costa, P., & Lobo, J. M. S. Modelling and Comparison of Dissolution Profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**, 123–133 (2001).
178. FDA. Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate. *Evaluation* **4**, 15–22 (1997).
179. Siepmann, J. & Peppas, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev* **48**, 139–157 (2001).
180. Valenzuela-Oses, J. K. *et al.* Development and characterization of miltefosine-loaded polymeric micelles for cancer treatment. *Mater. Sci. Eng. C* **81**, 327–333 (2017).
181. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).

Anexos

Anexo: Publicaciones generadas a partir de esta tesis

Publicaciones en revistas con referato.

- Diego F. Cadena, Mónica C. García, Sandra E. Martín y Paula M. Uberman. Biocompatible hybrid magnetic nanoplatform based on Fe_3O_4 -(L-cysteine)-hyaluronic acid conjugated for controlled tamoxifen release. En consideración.

Avances de presentaciones a congresos (*Proceedings*)

- Diego F. Cadena, Mónica C. García, Sandra E. Martín y Paula M. Uberman. Síntesis de nanomateriales híbridos de ácido hialurónico y nanopartículas magnéticas. Desarrollo de plataformas de liberación de fármacos. *XXI Simposio Nacional de Química Orgánica*. Potrero de los Funes, Argentina (8 al 11 de noviembre de 2017). e-Book ISBN 2347-0267 Disponible en: www.sinaqo2017.uns.edu.ar/attachments/article/62Libro%20de%20Resumen%20XXI%20SINAQO_20nov.pdf

Presentaciones a congresos, simposios y conferencias

- Cadena D, Gatti G, Martín S, García M, Uberman P. Nanomateriales híbridos magnéticos basados en Fe_3O_4 , L-cisteína y ácido hialurónico para liberación controlada de tamoxifeno. *5ta Reunión internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa) y 50º Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE)*. San Luis, Argentina (14 al 16 de noviembre de 2018). Trabajo presentado.

Trabajos de divulgación científica

- Diego F. Cadena, Mónica C. García, Sandra E. Martín y Paula M. Uberman. Síntesis de nanomateriales híbridos de ácido hialurónico y nanopartículas magnéticas. Desarrollo de plataformas de liberación de fármacos. *VIII*

Jornadas de Posgrado y II Jornadas de Ciencia y Tecnología. Córdoba, Argentina (junio, 2018).

- Diego F. Cadena, Mónica C. García, Sandra E. Martín y Paula M. Uberman, Nanomateriales híbridos para aplicaciones biomédicas (Hybrid nanomaterials for biomedical applications). *Revista Bitácora@Digital* (2018). En revisión.

- Diego Cadena Castro. Participación del concurso “Mi tesis en 3 minutos” en el marco de las VIII Jornadas de Posgrado y II Jornadas de Ciencia y Tecnología de la FCQ (UNC).