

Síntesis y caracterización de nanoportadores de fármacos basados en hidróxidos dobles laminares para la administración sitio-específica en tejido óseo

Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

Qca. Dariana Aristizábal Bedoya



Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba
Departamento de Físicoquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Argentina
2019

DE PROCESES DE EJECUCION

14 21

NA DE ASESORADO: 05/14/14

SEDE: AMACU

100.

PATRIMONIAL Y FECHAS

LIC:

GLON:

ADERNADO:

DE CLASIFICACION: 541.30

CACION: R-T

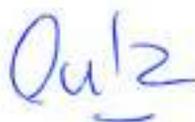
IVENTARIADO EN:

CECO: JML

El presente trabajo fue realizado en Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba (INFIQC), Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Carla Giacomelli y se presenta a consideración de dicha facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Córdoba, 20 de marzo de 2019.

Directora de Tesis:



Prof. Dra. Carla Giacomelli.

Comisión Evaluadora:



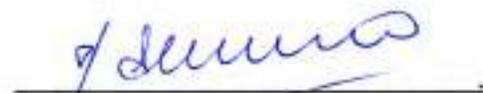
Prof. Dr. Ricardo Rojas y Delgado.



Prof. Dra. Miriam C. Strumia.



Prof. Dra. Marcela L. Longhi.



Prof. Dra. Vera Alejandra Álvarez.
(Evaluadora externa)

A mis padres.

Agradecimientos

Agradezco a CONICET y la Republica de Argentina por otórgame la beca que hizo posible realizar este doctorado, además de darme la oportunidad de enriquecerme culturalmente, al permitirme compartir con tantas personas y cada uno de sus mundos. Así mismo, agradezco a las entidades que financiaron esta investigación: CONICET, SECyT-UNC y FONCyT.

Le agradezco a la Universidad Nacional de Córdoba, especialmente a la Facultad de Ciencias Químicas y al Departamento de Fisicoquímica, por brindarme el espacio y el conocimiento para realizar este trabajo de tesis, así como permitirme dar mis primeros pasos como "profe".

Y por supuesto a cada una de esas personas que hicieron parte de este proceso:

A mi directora de tesis Carla, le agradezco sus enseñanzas tanto en lo académico como en lo personal, su gran dedicación, cada momento de preocupación y por siempre estar atenta a lo que yo necesitaba. Le agradezco su comprensión, la megapaciencia que tuvo conmigo. Igualmente, le estoy muy agradecida por ayudarme a comprender e interpretar cada resultado, por leer las barbaridades que escribí y traducirlas a un lenguaje más científico y comprensible. Mil gracias, por siempre estar ahí y darme los "jalones de orejas" cuando los necesitaba y sobre todo le agradezco infinitamente por la confianza brindada y no dejarme "tirar la toalla" mil gracias profe.

A Ricky, le estoy muy agradecida por mostrarme el universo de los LDHs y por ser un guía durante todo este proceso, le agradezco la paciencia infinita que tuvo conmigo, por enseñarme, por ayudarme a interpretar y darle sentido a cada uno de los resultados, por brindarme soluciones cuando ya no encontraba salidas. Gracias por leer y corregir mil veces este trabajo hasta que tomo forma, muchas gracias porque sin él y su dedicación incansable no hubiera sido posible llegar a la meta ...¡Ah! Y claro mil gracias por los Trabubus y esos días de trabajo y buena música en la oficina.

A los demás miembros de la comisión asesora, la Dra. Miriam Strumia y la Dra. Marcela Longhi por su acompañamiento, sus consejos y el seguimiento durante todo este proceso, así como les agradezco infinitamente leer y pulir cada detalle de este trabajo de Tesis.

A la Dra. Alejandra Vera Álvarez por aceptar evaluar esta Tesis y por tomarse el tiempo de leer y brindar las sugerencias necesarias para mejorar este trabajo de Tesis.

A los Chicos que hacen o hicieron parte del Lab. 112: Maru, Jess, Jhan, Vale, Yadi, Guilty, Fer, Lau Valenti, Lau chiquita, Ricky y Ceci, gracias por compartir el día a día, su buena onda y las tantas rondas de mate o café acompañadas de al algún chisme y una discusión académica claro está. Muy especialmente quiero agradecer a Ceci por compartir sus conocimientos, por darme una manita con las cosas que no entendía y además por darle ese toque Bio que tanto me gusta, a este trabajo. Agradezco a Lau chiquita, por la compañía y el consuelo brindado cuando las cosas no andaban muy bien, además por desenredarme con todos los trámites burocráticos y recordarme siempre que documento debía entregar. Y a Jess porque desde que llegó al Lab las cosas no empezaron a salir muy

bien jeje, pero, al mismo tiempo los días laborales fueron mucho más agradables llenos de risas con sus tragedias y sus Jessicadas, mil gracias porque además de ser una gran compañera encontré una gran amiga, "a las cuatro merendamos algoito".

A la Dra. Patricia y el Dr. De Pauli por sus visitas cortas llenas de consejos y cariño.

A Susi por hacer mucho más linda la vida en el inframundo (el sótano), por aceptar mis mates "malucos" y llenar mis días de buena onda con sus mimos, consejos y sonrisas.

A la familia Colombo-Argentina que hizo que los días lejos de casa fueran mucho más lindos y llenos de maravillosas vivencias, Andrés, Rafa, Vivi, Alejo, Jess, Ka, Guido, Wil, Eli, Diame, Caro, Fer, Maria y Fede, mil gracias por estar en las buenas y en las no tan buenas.

Y doble gracias a Fer, Vivi, Andrés y mis padres por ser un gran apoyo durante este proceso además de convertirse en una parte indispensable de mi vida, mil gracias:

Fer, gracias por ser ese ser insoportablemente maravilloso, lleno de alegría y bondad, gracias por hacer mucho más fácil el proceso de adaptación, por acompañarme en las carcajadas y en las lloradas, por destemplarme los oídos con tus cantos de quarteto y cumbia, por los grandes momentos vividos, pero sobre todo mil gracias por brindarme tu amistad y estar siempre a mi lado.

Vivi, te agradezco todos estos años de amistad, por que más que una amiga te has convertido en la hermana que nunca tuve o como dice mi mama en "mi ángel de la guarda", gracias y mil gracias por llenar cada día de mi vida con tus ocurrencias, risas y grandes consejos, por darme fortaleza cuando más la necesitaba y ser esa hermanita incondicional jajaja y claro lo regañones de mama que no pueden faltar, gracias y mil gracias.

Andrés, gracias por la comprensión infinita durante el proceso de escritura, por aguantar mis "crisis internacionales" y por curar el "síndrome de Apu", porque aunque llegaste en el momento más difícil hiciste que todo fuera más lindo, gracias por impulsarme a seguir adelante cada día. Pero sobre todo mil gracias por ser ese estupendo compañero de vida y por explorar junto a mí este nuevo mundo, gracias y mil gracias por enseñarme que el amor no es una historia de ficción.

A mis padres mil gracias por ser un ejemplo insuperable, a Doña Mercedes gracias por ser "la mama maluca" que necesite, "porque me amaste lo suficiente para decir No, cuando la niña caprichosa quería algo, porque me amaste lo suficiente para preguntarme ¿a dónde iba?, ¿con quién?, ¿a qué hora regresaría a casa?". A Don Darío mil gracias por mostrarme que las acciones hablan más que las palabras, gracias por las noches de filosofar junto al tablero de ajedrez, por enseñarme, que en la vida se debe ser como el caballo, que siempre se deben saltar los obstáculos y seguir con la batalla. "Pas" mil gracias por sus enseñanzas, consejos, por todo el cariño, la cantaleta, la bondad y amor incansable, por sembrar la semillita donde crece la raíz de la persona que soy hoy, Infinitas gracias por ser unos padres **extraordinarios.**

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUÍMICAS



Índice de contenidos

| | |
|---|-----|
| Introducción General | 29 |
| Capítulo 1: Introducción general | 31 |
| 1.1 Portadores de fármacos | 31 |
| 1.2 Hidróxidos dobles laminares (LDHs) | 33 |
| 1.2.1 Aspectos estructurales | 33 |
| 1.2.2 Rutas de síntesis y proceso de maduración | 37 |
| 1.3 LDHs como nanoportadores de fármacos | 39 |
| 1.3.1 Eficacia de lo LDHs como nanoportadores de fármacos | 43 |
| 1.5 Objetivos y Organización de la tesis | 51 |
| 1.6 Referencias bibliográficas | 55 |
| Técnicas y métodos de caracterización | 69 |
| Capítulo 2: Técnicas y métodos de caracterización | 71 |
| 2.1 Análisis químico | 72 |
| 2.1.1 Análisis elemental de C y N | 72 |
| 2.1.2 Espectrometría de absorción atómica | 73 |
| 2.1.3 Espectroscopia de energía dispersiva | 75 |
| 2.1.4 Análisis térmico | 75 |
| 2.1.5 Espectroscopia ultravioleta visible | 77 |
| 2.2 Análisis estructural | 79 |
| 2.2.1 Difracción de rayos X | 79 |
| 2.2.2 Espectroscopia Infrarroja | 80 |
| 2.2.3 Espectroscopia Raman | 81 |
| 2.3 Análisis morfológico e Interfacial | 82 |
| 2.3.1 Microscopia electrónica de barrido | 83 |
| 2.3.2 Dispersión dinámica de la luz | 84 |
| 2.3.3 Dispersión de luz electroforética | 85 |
| 2.4 Análisis de composición de la corona proteica | 88 |
| 2.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida | 89 |
| 2.4.2 Cromatografía líquida-espectrometría de masas | 90 |
| 2.4.3 Interacción proteína-proteína | 91 |
| 2.5 Referencias bibliográficas | 93 |
| nanoLDH y nanoLDH@Ris | 95 |
| Capítulo 3: nanoLDH y nanoLDH@Ris | 97 |
| 3.1 Introducción | 97 |
| 3.2 Metodología experimental | 102 |
| 3.2.1 Síntesis de nanoLDH | 102 |
| 3.2.2 Preparación de nanoLDH@Ris | 104 |
| 3.2.2.1 Síntesis por coprecipitación a pH constante | 104 |
| 3.2.2.2 Funcionalización de nanoLDH con Ris | 104 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.3 Caracterización | 105 |
| 3.2.4 Estabilidad de la funcionalización y tamaño en condiciones de relevancia fisiológica | 105 |
| 3.2.4.1 Efecto de la concentración | 106 |
| 3.2.4.2 Efecto de la fuerza iónica | 106 |
| 3.2.4.3 Efecto del pH | 107 |
| 3.2.5 Especificidad por hidroxiapatita | 108 |
| 3.3 Resultados y discusión | 109 |
| 3.3.1 Síntesis de nanoLDH | 109 |
| 3.3.2 Preparación de nanoLDH@Ris | 113 |
| 3.3.2.1 Síntesis por coprecipitación a pH constante | 113 |
| 3.3.2.2 Funcionalización de nanoLDH con Ris | 114 |
| 3.3.3 Caracterización | 117 |
| 3.3.4 Estabilidad de la funcionalización y tamaño en condiciones de relevancia fisiológica | 127 |
| 3.3.4.1 Efecto de la concentración | 127 |
| 3.3.4.2 Efecto de la fuerza iónica | 130 |
| 3.3.4.3 Efecto del pH | 132 |
| 3.3.5 Especificidad por hidroxiapatita | 135 |
| 3.4 Conclusiones | 139 |
| 3.5 Referencias bibliográficas | 141 |
| nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris | 149 |
| Capítulo 4: nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris | 151 |
| 4.1 Introducción | 151 |
| 4.2 Metodología experimental | 155 |
| 4.2.1 Síntesis de nanoLDH-MTX | 155 |
| 4.2.1.1 Síntesis por intercambio aniónico | 155 |
| 4.2.1.2 Síntesis por coprecipitación | 156 |
| 4.2.1.2.1 Síntesis por coprecipitación a pH constante | 156 |
| 4.2.1.2.2 Síntesis por coprecipitación a pH variable | 157 |
| 4.2.2 Funcionalización de nanoLDH-MTX con Ris | 160 |
| 4.2.3 Caracterización | 161 |
| 4.2.4 Liberación del fármaco (MTX) | 161 |
| 4.2.4.1 Intercambio aniónico | 161 |
| 4.2.4.2 Disolución | 161 |
| 4.3 Resultados y discusión | 162 |
| 4.3.1 Síntesis de nanoLDH-MTX | 162 |
| 4.3.1.1 Síntesis por intercambio aniónico | 162 |
| 4.3.1.2 Síntesis por coprecipitación | 164 |
| 4.3.1.2.1 Síntesis por coprecipitación a pH constante | 164 |
| 4.3.1.2.2 Síntesis por coprecipitación a pH variable | 166 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.2 Funcionalización de nanoLDH-MTX con Ris | 173 |
| 4.3.3 Caracterización | 175 |
| 4.3.4 Liberación del Fármaco (MTX) | 184 |
| 4.3.4.1 Intercambio aniónico | 184 |
| 4.3.4.2 Disolución | 188 |
| 4.4 Conclusiones | 191 |
| 4.5 Referencias bibliográficas | 192 |
| Interacción con fluidos biológicos | 199 |
| Capítulo 5: Interacción con fluidos biológicos | 201 |
| 5.1 Introducción | 201 |
| 5.2 Metodología experimental | 204 |
| 5.2.1 Interacción con medios biológicos | 204 |
| 5.2.2 Adsorción de albúmina (Alb) | 205 |
| 5.2.3 Formación de corona proteica y determinación de la identidad Biológica | 205 |
| 5.2.3.1 Identificación de proteínas | 206 |
| 5.2.3.2 Interacción proteína-proteína | 208 |
| 5.3 Resultados y discusión | 209 |
| 5.3.1 Interacción con medios biológicos | 209 |
| 5.3.2 Adsorción de albúmina (Alb) | 211 |
| 5.3.3 Formación de corona proteica y determinación de la identidad Biológica | 213 |
| 5.3.3.1 Identificación de proteínas | 215 |
| 5.3.3.2 Interacción proteína-proteína | 220 |
| 5.4 Conclusiones | 223 |
| 5.5 Referencias bibliográficas | 225 |
| Conclusiones y perspectivas futuras | 231 |
| Capítulo 6: Conclusiones y perspectivas | 233 |
| 6.1 Conclusiones | 233 |
| 6.2 Perspectivas | 236 |

Índice de figuras

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 1.1 | Esquema de la estructura de los hidróxidos dobles laminares. | 34 |
| Figura 1.2 | Representación esquemática de las conformaciones para el anión 5-fluorouracilo intercalado entre las láminas de LDH. | 37 |
| Figura 1.3 | Ilustración esquemática de las principales propiedades que afectan la eficacia de los nanoportadores de fármacos. | 44 |
| Figura 1.4 | Ilustración esquemática de la endocitosis y la transfección celular de los nanoportadores de LDH. | 46 |
| Figura 1.5 | Esquemización de los sistemas de LDHs estudiados. | 53 |
| Figura 2.1 | Representación esquemática de la doble capa eléctrica. | 86 |
| Figura 3.1 | Estructura química y equilibrios acido-base del risedronato. | 100 |
| Figura 3.2 | Esquema de síntesis de nanoLDH | 103 |
| Figura 3.3 | Esquema de preparación de nanoLDH@Ris | 105 |
| Figura 3.4 | Difractogramas de rayos X de las muestras de LDHs sintetizadas a las diferentes condiciones (I-V). | 110 |
| Figura 3.5 | Distribución de tamaño y valores de ζ durante los diferentes pasos de la síntesis de nanoLDH (LDH III). | 112 |
| Figura 3.6 | Interacción de Ris con los nanoLDH ya formados. | 114 |
| Figura 3.7 | Distribución de tamaño y valores de ζ de nanoLDH, nanoLDH@Ris y LDH-Ris. | 116 |
| Figura 3.8 | Espectros Raman de las sales de risedronato, nanoLDH y nanoLDH@Ris. | 118 |
| Figura 3.9 | Curvas de TGA/DTA correspondientes a los nanoLDH y nanoLDH@Ris. | 120 |
| Figura 3.10 | Difractogramas de rayos X de nanoLDH y nanoLDH@Ris. | 124 |
| Figura 3.11 | Espectros infrarrojo para los nanoLDH y nanoLDH@Ris. | 125 |
| Figura 3.12 | Imágenes SEM de nanoLDH y nanoLDH@Ris | 127 |
| Figura 3.13 | Efecto de la concentración. | 128 |
| Figura 3.14 | Efecto de la fuerza iónica. | 130 |
| Figura 3.15 | Efecto del pH | 132 |
| Figura 3.16 | Cinética de desorción de Ris del nanoLDH@Ris dispersó en buffer fosfato (BF) y buffer acetato (BA). | 134 |
| Figura 3.17 | Especificidad por hidroxiapatita. | 136 |
| Figura 4.1 | Estructura química y equilibrios acido-base del Metotrexato. | 152 |
| Figura 4.2 | Esquema de preparación de nanoLDH-MTX@Ris. | 156 |
| Figura 4.3 | Esquema de síntesis de nanoLDH-MTX por coprecipitación a pH constante. | 157 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 4.4 | Esquema de síntesis de nanoLDH-MTX por coprecipitación a pH variable. | 158 |
| Figura 4.5 | Esquema de preparación de nanoLDH@Ris. | 160 |
| Figura 4.6 | Síntesis por intercambio aniónico | 162 |
| Figura 4.7 | Distribución de tamaño y valores de ζ para LDH-MTX sintetizado por coprecipitación a pH constante. | 165 |
| Figura 4.8 | Curvas de titulación | 166 |
| Figura 4.9 | Difractogramas de rayos X de LDH-MTX sintetizados por coprecipitación a pH variable. | 169 |
| Figura 4.10 | Distribución de tamaño, valores de ζ y concentraciones de MTX libre en función del tiempo. | 172 |
| Figura 4.11 | Funcionalización de nanoLDH-MTX con Ris | 174 |
| Figura 4.12 | Curvas de TGA/DTA correspondientes a los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris. | 176 |
| Figura 4.13 | Difractogramas de rayos X de (A) nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris y muestras de referencia | 179 |
| Figura 4.14 | Posibles configuraciones del anion MTX entre las laminas de LDHs | 181 |
| Figura 4.15 | Espectros infrarrojo para los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris | 182 |
| Figura 4.16 | Imágenes SEM de nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris. | 183 |
| Figura 4.17 | Cinéticas de liberación de MTX para los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris mediante intercambio aniónico | 185 |
| Figura 4.18 | Cinéticas de disolución para los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris. | 188 |
| Figura 5.1 | Identidad sintética e identidad biológica de los nanoportadores. | 202 |
| Figura 5.2 | Metodología experimental para realizar la identificación y caracterización de las proteínas constituyentes de las coronas proteicas de los nanoportadores. | 206 |
| Figura 5.3 | Valores de d y ζ para los nanoLDH@Ris y nanoLDH dispersos en diferentes medios de relevancia fisiológica. | 209 |
| Figura 5.4 | Adsorción de albúmina (Alb) en los nanoportadores. | 211 |
| Figura 5.5 | Porcentaje de número de proteínas que forman parte de las coronas proteicas de los nanoLDH y nanoLDH@Ris clasificadas de acuerdo a su función biológica. | 218 |
| Figura 5.6 | Red PPI de las coronas proteicas formadas en los nanoLDH y nanoLDH@Ris. | 220 |

Índice de tablas

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Tabla 1.1 | Estudios <i>in-vitro</i> de nanohíbridos LDH-MTX. | 48 |
| Tabla 1.2 | Estudios <i>in-vivo</i> de nanohíbridos MTX-LDH. | 50 |
| Tabla 3.1 | Estructura química de los bifosfonatos y sus respectivos sustituyentes. | 99 |
| Tabla 3.2 | Condiciones de síntesis para preparar nanoLDHs. | 102 |
| Tabla 3.3 | Valores de d , ζ e índice de polidispersidad (I.P) determinados con los LDHs sintetizados en las diferentes condiciones, antes y después del tratamiento hidrotérmal (TH). | 109 |
| Tabla 3.4 | Análisis químico y elemental de los LDHs. | 121 |
| Tabla 3.5. | Parámetros de celda para los nanoportadores. | 125 |
| Tabla 4.1 | Condiciones de síntesis evaluadas para preparar nanoLDH-MTX. | 157 |
| Tabla 4.2 | Valores de d y ζ determinados con los LDH-MTX sintetizados en las diferentes condiciones, después del tratamiento hidrotérmal (TH). | 168 |
| Tabla 4.3 | Valores de d , ζ y Γ_{MTX} determinados con los nanoLDH-MTX sintetizados empleando una solución de metales de relación de Mg/Al 2:1 con MTX al 50%, después del tratamiento hidrotérmal (TH). | 171 |
| Tabla 4.4 | Análisis químico y elemental de los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris. | 177 |
| Tabla 4.5 | Valores de ζ correspondientes a los nanoLDH-MTX@Ris dispersas en los diferentes medios. | 186 |
| Tabla 5.1 | Valores de d y ζ medidos para nanoLDH y nanoLDH@Ris dispersos en agua (identidad sintética) y SFB (identidad biológica). | 214 |
| Tabla 5.2 | Proteínas séricas constituyentes de las coronas proteicas de los nanoLDH y nanoLDH@Ris. | 216 |
| Tabla 5.3. | Parámetros estadísticos de la red PPI. | 221 |

Lista de abreviaturas y símbolos

| | |
|-----------------|---|
| % Ris | Risedronato desorbido |
| %MTX | Metotrexato liberado |
| @ | Especie adsorbido en la superficie |
| μ_e | Movilidad electroforética |
| 2H | Ordenamiento hexagonal |
| 3R | Ordenamiento romboédrico |
| Å | Ángstrom |
| Alb | Albúmina |
| A ⁿ⁻ | Anión interlamina con carga n |
| APCI | Ionización química a presión atmosférica |
| API | Ionización a presión atmosférica |
| ATG | Análisis termogravimétrico |
| B.A | Buffer acetato |
| B.F | Buffer fosfato |
| BP _s | Bifosfonatos |
| CIA | Capacidad de intercambio aniónico |
| d | Diámetro hidrodinámico aparente |
| D | Coefficiente de difusión traslacional |
| DE | Dosis efectiva |
| DHFR | Dihidrofolato reductasa |
| DL | Dosis letal |
| DLS | Dispersión dinámica de la luz |
| DMAEMA | Acrilato de dimetilaminoetilo |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DRXP | Difracción de rayos X de polvo |
| DTA | Análisis térmico diferencial |
| EDS | Espectroscopia de energía dispersiva |
| ELS | Dispersión de luz electroforética |
| EPR | Efecto de permeación y retención mejorada |

| | |
|-----------------|--|
| ESI | Ionización por electrospray |
| ϵ | Constante dieléctrica del agua |
| ϵ_0 | Constante dieléctrica del vacío |
| FTIR | Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier |
| Hap | Hidroxiapatita |
| I,P | Índice de polidispersidad |
| IR | Espectroscopia infrarroja |
| K _{ps} | Constante del producto de solubilidad |
| LC-MS | Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas |
| LDHs | Hidróxidos dobles laminares |
| M ²⁺ | Metal divalente |
| M ³⁺ | Metal trivalente |
| MTX | Metotrexato |
| η | Viscosidad del medio |
| nanoLDH | LDH intercalado con anión Cl ⁻ o NO ₃ ⁻ |
| nanoLDH@Ris | nanoLDH con risedronato adsorbido (funcionalizado) |
| nanoLDH-MTX | LDH intercalado con metotrexato |
| nanoLDH-MTX@Ris | nanoLDH-MTX con risedronato adsorbido (funcionalizado) |
| LDH-Ris | LDH intercalado con risedronato |
| NIH | Instituto Nacional de Salud de los EEUU |
| pI | Punto isoeléctrico |
| PLGA | Ácido poli-(láctico-co-glicólico) |
| PM | Peso molecular |
| PPI | Interacciones proteína-proteína |
| Ris | Risedronato |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SAA | Espectrometría de absorción atómica |
| SDS-PAGE | Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| SEM | Microscopía electrónica de barrido |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| SFM | Sistema fagocítico mononucleares |
| TH | Tratamiento hidrotermal |

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| U.V-vis | Espectroscopia ultravioleta visible |
| Γ_H | Consumo de protones |
| Γ_{MTX} | Cantidad de MTX incorporado |
| Γ_{Ris} | Cantidad de Ris incorporado |
| ζ | Potencial zeta |
| Γ_{Alb} | Cantidad de albúmina adsorbida |
| $\Gamma_{Alb\ max}$ | Máxima cantidad de albúmina adsorbida |
| $\Gamma_{Alb}/\Gamma_{Alb\ max}$ | Grado de cubrimiento |



Capítulo 1

Introducción General

Capítulo 1: Introducción general

1.1 Portadores de fármacos

Uno de los avances más importantes y fascinantes de la ciencia, es el desarrollo de nanomateriales que se caracterizan por presentar al menos una dimensión a nivel nanométrico. Esta característica les otorga propiedades físicas y químicas inusuales, entre ellas una alta reactividad y área superficial [1]. El avance de la nanociencia y, en especial, del diseño de nanomateriales, ha llevado a ampliar su rango de aplicación en diferentes áreas, como la medicina y los sectores energético, agrícola, alimenticio, industrial, entre tantos otros [2]. En la actualidad, la "nanomedicina" es un área de gran interés, que, según el Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) de los EEUU, se refiere a una intervención médica altamente específica a escala molecular para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades [3].

En los sistemas terapéuticos convencionales, el principio farmacológicamente activo se libera rápidamente, sin control sobre la tasa de liberación y la fluctuación en los niveles de fármaco en el torrente sanguíneo y en otros órganos, incluyendo el tejido objeto del tratamiento. Además, la mayoría de ellos sufren procesos de degradación química o enzimática, así como presentan escasa solubilidad en agua. En consecuencia, es necesario usar altas dosis de fármaco, lo que puede causar una diversidad de efectos adversos [4-6]. Es así, como los sistemas de administración de fármacos nanométricos o "nanoportadores de fármacos" constituyen una porción significativa de la investigación actual y se han dedicado esfuerzos significativos para su desarrollo [7-13].



Los nanoportadores ofrecen muchas ventajas en la administración de fármacos, centrándose principalmente en mejorar la seguridad y la eficacia de los principios farmacológicamente activos. Por ejemplo, proporcionando una vehiculización dirigida hacia un tejido específico, mejorando la biodisponibilidad, extendiendo el efecto terapéutico en el tejido objetivo y mejorando la estabilidad de los agentes terapéuticos contra la degradación química/enzimática [14].

Los nanoportadores se pueden clasificar de acuerdo al material que los constituyen. Principalmente, existen dos grupos: 1) materiales orgánicos, como polímeros naturales y sintéticos o 2) materiales inorgánicos, como sólidos laminares, mesoporosos, metálicos, entre otros [15]. Sin embargo, estos materiales se pueden combinar para sintetizar nanoportadores con diferentes propiedades, geometrías y configuraciones. Asimismo, se pueden recubrir con agentes de direccionamiento y/o marcado molecular y celular, que permitan el seguimiento, la detección o la administración sitio-específica del fármaco [16]. Conceptualmente, esta modularidad ofrece una matriz infinita de nanoportadores con diferentes propiedades, lo que hace que estos sistemas terapéuticos sean más versátiles que los convencionales para realizar funciones complejas dentro de los sistemas fisiológicos [17].

Dentro de los materiales inorgánicos estudiados para la vehiculización de fármacos, se encuentran los hidróxidos dobles laminares (LDHs), que han despertado un interés creciente en su estudio como nanoportadores. Este interés, se debe a su fácil obtención en el laboratorio, baja toxicidad, solubilidad selectiva, alta capacidad de carga y protección del fármaco. A su vez, la posibilidad de modificar su composición y sus propiedades superficiales permite modular el tiempo de circulación y controlar la interacción con las células [18-23].

1.2 Hidróxidos dobles laminares (LDHs)

Los LDHs son compuestos naturales o sintéticos con estructuras laminares, análogas a la hidrotalcita, por lo que en la literatura científica se les conoce también como compuestos tipo hidrotalcita, arcillas aniónicas o arcillas sintéticas [24]. La historia de los LDHs comenzó con el descubrimiento del mineral hidrotalcita, un hidroxicarbonato de Mg y Al con fórmula general $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{14}](\text{CO}_3)_4(\text{H}_2\text{O})$, realizado por Hochstetter en Suecia en 1842 [25]. Los primeros estudios sobre la síntesis y caracterización de estos sólidos fueron realizados por Feitknecht en 1930 [26]. Sin embargo, sólo hasta la década de 1960 se lograron entender sus principales características estructurales, gracias a los estudios de difracción de rayos X en polvo realizados por Allmann y Taylor [27].

Con los años, las investigaciones y el conocimiento acerca de los LDHs fue creciendo exponencialmente, lo que se ve reflejado en el creciente número de publicaciones en diferentes áreas como medio ambiente [28-30], catálisis [31-33], electroquímica [34-36], materiales [37, 38] y medicina [39-41].

1.2.1 Aspectos estructurales

La estructura de los LDHs se describe a partir de la estructura del hidróxido de magnesio, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, comúnmente llamado brucita. En la brucita las unidades básicas son láminas con cationes Mg^{2+} localizados en el centro y coordinados con seis grupos HO^- . Las estructuras octaédricas resultantes están conectadas entre sí para formar láminas que se apilan de forma ordenada para dar como resultado una estructura bidimensional [42]. Cada catión Mg^{2+} comparte sus cargas con seis aniones por los que aporta $+2/6 =$

+1/3 de carga, mientras que cada HO^- está coordinado con tres centros de Mg^{2+} y aporta $-1/3 = -1/3$, lo que resulta en una carga electrostática total $[+1/3 - 1/3 = 0]$ neutra [24].

Los LDHs son el resultado de la sustitución isométrica parcial de cationes divalentes (M^{2+}) por trivalentes (M^{3+}), generando un exceso de carga positiva entre las láminas. Esta carga positiva, se neutraliza localizando aniones que comparten el espacio entre las láminas con moléculas de agua. La estructura de los LDHs se mantiene mediante interacción electrostática y enlaces de hidrógeno entre las láminas y las especies interlaminares [43]. En la figura 1.1 se esquematiza la estructura de los LDHs.

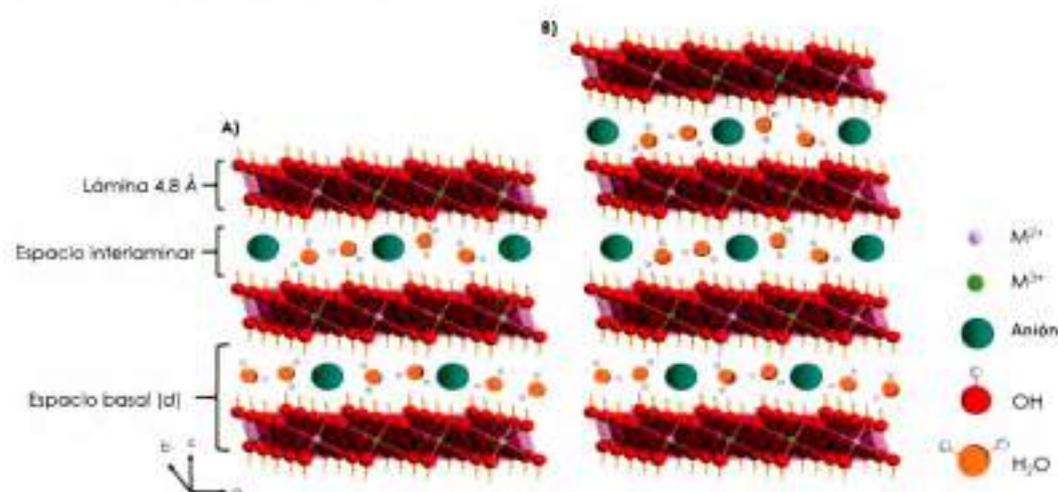


Figura 1.1 Esquema de la estructura de los hidróxidos dobles laminares, mostrando ordenamientos (A) hexagonal y (B) romboédrico, modificado de la referencia [44, 45].

La estructura cristalina de los sólidos se describe a través de la celda unidad, que es el ordenamiento tridimensional de sus átomos que se repite periódicamente en el espacio y las dimensiones de la celda unidad están dados por los parámetros a, b y c. Los LDHs pueden presentar dos tipos de

estructuras cristalinas, ya que las láminas se pueden apilar bien sea en un ordenamiento romboédrico (3R) o bien en un ordenamiento hexagonal (2H). En el ordenamiento romboédrico, el parámetro de celda unidad c , es igual a tres veces el espacio basal, mientras que en el ordenamiento hexagonal, c es igual al doble del espacio basal (figura 1.1) [45].

En general, las dimensiones de los LDHs se describen mediante la distancia entre dos láminas consecutivas de cationes metálicos, denominado espacio basal, como se indica en la figura 1.1. Esta distancia está conformada por el espesor de una lámina (4,8 Å) y el espacio entre ellas, que dependen de las dimensiones del anión interlamilar y de su conformación entre las láminas. Los aniones como, Cl⁻, NO₃⁻ o CO₃²⁻, son pequeños y no ocupan mucho espacio entre las láminas. Por lo tanto, estos LDHs tienen valores de espacio basal bajo, entre 7,0 y 8,0 Å. Por otro lado, si el anión presente entre las láminas de LDHs es de mayor tamaño y complejidad estructural, se observa un desplazamiento de las láminas, que resulta en valores mayores de espacio basal [46]. Por ejemplo, los valores para LDHs intercalados con los anión NO₃⁻ o CO₃²⁻ son de 8,0 y 7,7 Å, respectivamente [47], mientras que, la intercalación de fenoximetilpenicilina [48], ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfónico [49] o vitamina E [50], presentan valores desde 18,7 Å, 24,0 Å hasta 53,8 Å, respectivamente.

La fórmula general de los LDHs puede escribirse como:



Donde, M²⁺ y M³⁺ son cationes metálicos divalentes y trivalentes, respectivamente, y Aⁿ⁻ es un anión interlamilar con carga n . La fracción x del catión trivalente determina la carga de las láminas $x = M^{3+}/(M^{2+}+M^{3+})$ [42]. Estos compuestos tienen una composición con amplias variaciones según la naturaleza de los cationes y las relaciones molares M²⁺/M³⁺, así como el tipo



de anión [24]. El rango de $0,2 \leq x \leq 0,4$ se considera generalmente adecuado para la síntesis de estos compuestos; es decir, la relación de M^{2+}/M^{3+} debe ser entre 2:1 y 4:1. Cuando $x > 0,4$ la cantidad de M^{3+} conduce a la formación de $M(OH)_3$. De manera análoga, los valores de $x < 0,2$ resultan en la precipitación de $M(OH)_2$ [25, 42].

Para la síntesis de LDHs, se puede usar cualquier catión M^{2+} o M^{3+} siempre y cuando se mantenga la relación carga/radio adecuada, puesto que a partir de radios iónicos mayores de $0,8 \text{ \AA}$ la estructura se hace más inestable [51]. Los cationes metálicos divalentes más utilizados son: Mg, Zn, Co, Ni, Fe, Mn. Entre los trivalentes: Al, Cr, Co, V, Fe, Y, Mn, Ga y algunos lantánidos [52].

Asimismo, existe una gran variedad de aniones que se pueden incorporar a la estructura de los LDHs, ya sea en el espacio interlaminar o en la superficie de las láminas. Como ya se mencionó anteriormente, la naturaleza de estos aniones va desde iones simples a complejos e incluso macromoléculas [52]. La relación tamaño/carga del anión es muy importante, ya que un anión de gran tamaño con baja carga no puede intercalarse homogéneamente entre las láminas cargadas positivamente. Para los aniones no esféricos, y muy especialmente cuando los aniones contienen cadenas largas (carboxilatos o sulfonatos con largas cadenas de alquilo), son posibles varios arreglos o conformaciones entre las láminas. Se pueden presentar monocapas o bicapas paralelas a las láminas, como también monocapas o bicapas con diferente ángulo de inclinación con respecto a las láminas [25, 53]. Por ejemplo, Wang encontró diferentes conformaciones para el 5-fluorouracilo intercalado entre las láminas de LDH, dependiendo de las condiciones de síntesis, en la figura 1.2 se esquematiza dichas conformaciones [54].

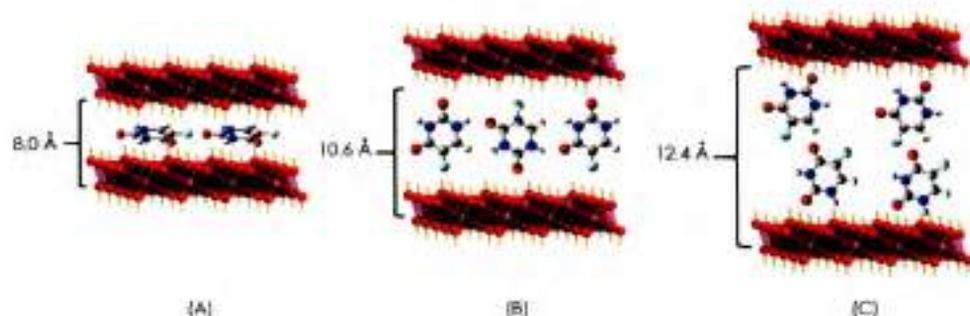


Figura 1.2: Representación esquemática de las conformaciones para el anión 5-fluorouracilo intercalado entre las láminas de LDH: (a) monocapa de disposición horizontal, (b) monocapa de disposición vertical, y (c) bicapa, modificado de la referencia [54].

Es importante mencionar en este punto que las macromoléculas, como las proteínas y polímeros, generalmente no pueden ser incorporadas en la región interlaminaar aunque tienen alta afinidad por la superficie de los LDHs, ya sea por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o puente hidrógeno [45].

1.2.2 Rutas de síntesis y proceso de maduración

Las estructuras tipo hidrotalcita son poco comunes en la naturaleza, aunque a nivel laboratorio e industrial su síntesis es relativamente sencilla y de bajo costo [24]. Existen diferentes rutas por las cuales se puede preparar LDHs. La más utilizada es el método de coprecipitación, seguida del método por intercambio aniónico y, en tercer lugar, la reconstrucción, o como también es llamado, efecto memoria. Igualmente, se ha reportado la síntesis de LDHs



empleando métodos electroquímicos, sol-gel, sol-óxido, utilizando urea y proceso de nucleación rápido, entre otros [55]. Algunas veces, se emplean procesos de maduración adicionales, como el tratamiento hidrotérmal, ultrasonido o microondas, que principalmente, permiten mejorar la cristalinidad de estos sólidos [24].

El método de coprecipitación es la principal ruta de síntesis utilizada para la preparación de LDHs en el presente trabajo de tesis. En este método, una solución acuosa de sales que contienen los cationes M^{2+} y M^{3+} , y una solución alcalina se mezclan de forma controlada para producir una suspensión. El anión a intercalar entre las láminas puede estar contenido en cualquiera de estas soluciones. Generalmente, luego de la síntesis, a la suspensión resultante se le realizan procesos de maduración en las condiciones elegidas para mejorar las propiedades cristalinas y morfológicas del sólido obtenido [25]. Hay varias formas de llevar a cabo el proceso de coprecipitación:

a) pH constante: este método también se conoce como de baja sobresaturación y consiste en la adición lenta de una solución de las sales de los cationes M^{2+} y M^{3+} en una solución que contiene el anión a intercalar. El pH se mantiene constante durante toda la síntesis, mediante la adición controlada y continua de una solución básica. Una ventaja de este método, es que las condiciones de baja sobresaturación suelen dar lugar a precipitados con mayor cristalinidad en comparación con los sólidos obtenidos en condiciones de alta sobresaturación. Esto se debe a que la tasa de crecimiento de los cristales es mayor que la tasa de nucleación [55].

b) pH variable: este método también se conoce como método de alta sobresaturación e implica la adición de una solución de las sales de los cationes M^{2+} y M^{3+} a una solución alcalina mediante una agitación vigorosa.

el anión a intercalar puede estar disuelto en cualquiera de las dos soluciones. Este método generalmente da lugar a sólidos menos cristalinos debido al alto número de núcleos de cristalización [55]. Sin embargo, presenta la gran ventaja que los tiempos requeridos para la síntesis son menores que los necesarios para la síntesis a pH constante. En la bibliografía, se propone, además, un menor tamaño de partícula de los LDHs sintetizados por este método, debido principalmente al proceso de nucleación [46].

La formación de los cristales de LDH y de los sólidos cristalinos en general, implica dos etapas. La primera etapa es la nucleación, en la cual los núcleos de cristales de LDH se forman por medio de la reacción química. La segunda etapa, involucra el crecimiento de los núcleos, también conocido como proceso de envejecimiento o maduración [55]. En muchos casos, se hace necesario favorecer a estos procesos para mejorar el proceso de formación y crecimiento de los cristales para preparar sólidos altamente cristalinos [56]. El tratamiento hidrotérmal (TH) generalmente es el proceso de maduración más utilizado para este objetivo. Este proceso, se basa en el aumento de la presión que se produce en el sistema con volumen constante cuando se aumenta la temperatura en presencia de vapor de agua [42, 57].

1.3 LDHs como nanoportadores de fármacos

La fácil preparación de los LDHs, su composición flexible y las diversas propiedades fisicoquímicas que presentan estos sólidos, hacen que sean útiles para una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, debido a su excelente capacidad para almacenar e inmovilizar aniones, los LDHs se han utilizado como adsorbentes [58, 59] o en sensores electroquímicos [60, 61]. También se ha reportado su uso en campos tales como catálisis, remediación ambiental, productos farmacéuticos y como reforzantes en la preparación



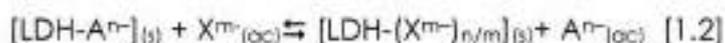
de plásticos [62]. En particular, en cuanto a su uso en formulaciones farmacéuticas, la biocompatibilidad de algunos LDHs [formados por Mg^{2+} y Al^{3+} , por ejemplo] y sus propiedades ácido-base han conducido a productos comerciales como antiácidos (Talcid® y Almax®) [63, 64].

Una de las crecientes aplicaciones informadas en la bibliografía para los LDHs, es su uso como nanoportadores de fármacos [1]. Se ha propuesto utilizar nanoportadores basados en LDHs para administrar principios activos como antiinflamatorios [65], antibióticos [66], reguladores de la resorción ósea [67], antihipertensivos [68], anticancerígenos [69], entre otros. Además, se han incorporado biomoléculas, como vitaminas, ácidos nucleicos y proteínas [39] [52, 70, 71]. El desarrollo de los LDHs como nanoportadores de fármacos ha adquirido gran interés gracias a las ventajas que presenta este sólido frente a otros sistemas para su aplicación en la nanomedicina. Los LDHs ofrecen alta eficiencia para la carga del fármaco, así como una excelente protección de las moléculas cargadas contra la degradación (fotoquímica o enzimática). Además, la estructura laminar de estos compuestos permite la incorporar de moléculas, tanto en el espacio interlaminar como en la superficie de las láminas. Igualmente, los estudios toxicológicos han demostrado que los LDHs formados con Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} o Al^{3+} son biocompatibles [44], especialmente en comparación con otros nanoportadores ampliamente utilizadas, como óxido de hierro, sílica o nanotubos de carbono [72]. Otra gran ventaja que se encontró en la vehiculización de fármacos con LDHs, es un mayor efecto terapéutico. Por ejemplo, la mayoría de los anticancerígenos presentan pobre solubilidad en agua y baja biodisponibilidad. Al ser vehiculizados en los LDHs, se encontró un aumento en la tasa de mortalidad de las células cancerígenas. Esto se traduce en mayor efecto terapéutico, debido a una mejor penetración celular del nanoportador [73]. Igualmente, se ha

demostrado que el potencial tóxico de varios fármacos puros, disminuyó después de ser vehiculizado [74].

Un factor muy importante para tener en cuenta en el diseño y desarrollo de nanoportadores, además de la capacidad de hospedar y brindar protección a los agentes activos (fármacos, biomoléculas, genes, etc.), es la capacidad para modificar el perfil de liberación dependiendo del medio [75]. Los LDHs presentan tres mecanismos de liberación de aniones en general, y de fármacos, en particular: a) intercambio iónico (altamente dependiente de los aniones del medio), b) disolución (altamente dependiente del pH del medio) y c) desorción (dependiente del pH y de la composición del medio)[76]. A pH neutro o ligeramente ácido, el fármaco se libera por un mecanismo de intercambio aniónico si en el medio se encuentran aniones con alta afinidad por los LDHs. Por el contrario, en condiciones ácidas el fármaco se libera principalmente por la disolución de las láminas de LDH [54, 77]. Finalmente, la desorción puede ocurrir tanto en presencia de aniones del medio con alta afinidad por los LDHs como por cambios de pH o fuerza iónica de la solución en contacto con los nanoportadores.

El intercambio aniónico, consiste en el remplazo de los aniones interlaminares de los LDHs, por los del medio de liberación. La posibilidad de este intercambio está dada por la afinidad que presenten estos aniones por las láminas de los LDHs. En este sentido, aniones con mayor densidad de carga y menor tamaño, presentan alta afinidad por las láminas y se intercambian fácilmente por aniones de menor densidad de carga, como es el caso de los iones Cl^- y NO_3^- , generalmente utilizados como aniones precursores para la síntesis de los LDHs [78]. Este proceso, generalmente, se describe mediante la siguiente reacción:

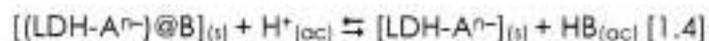


Como se indicó anteriormente, A^{n-} representa al anión interlamina (fármaco, en el caso de los nanoportadores) y X^{m+} un anión del medio (fluidos biológicos, por ejemplo) con mayor afinidad por las láminas.

El segundo mecanismo de liberación, se refiere a la disolución del nanoportador y supone la erosión ácida de las láminas. Esta erosión se produce mediante la protonación de los grupos hidroxilo de la superficie de los LDHs, lo cual debilita el enlace M-O, hasta la liberación del catión metálico desde la lámina hasta el seno de la solución [79]. Tanto la solubilidad como la velocidad de disolución de los LDHs dependen fuertemente del tipo de anión interlamina. Por ejemplo, los LDHs intercalados con ibuprofeno son más solubles y tienen una mayor velocidad de disolución en comparación con los LDHs intercalados con CO_3^{2-} [79]. Este proceso se puede describir de forma general mediante el siguiente equilibrio [80]:



Finalmente, la desorción supone la liberación de especies superficiales que puede ser causada por un cambio de pH, cuando las interacciones son electrostáticas entre el fármaco y los LDHs, o por la presencia en solución de especies con actividad superficial. De manera general, estas reacciones pueden representarse como:



Donde B representa a la especie adsorbida e Y una especie en solución con actividad superficial.

Estas reacciones generales que representan distintos mecanismos de liberación, muestran claramente una de las principales ventajas de los LDHs como portadores de fármacos: la posibilidad de albergar aniones interlaminares (A^n) y de funcionalizar su superficie con distintas moléculas (B). De esta manera, optimizando las condiciones de síntesis, es posible incorporar fármacos en la región interlaminares para su protección, transporte y liberación en condiciones fisiológicamente adecuadas. En paralelo, se puede funcionalizar la superficie con ligandos adecuados para inducir sitio-especificidad hacia un determinado tejido.

1.3.1 Eficacia de los LDHs como nanoportadores de fármacos.

La eficacia de los nanoportadores de fármacos es altamente dependiente, en primer lugar, de su capacidad para alcanzar el lugar de acción terapéutico desde el lugar de inyección, evitando ser eliminado por el sistema fagocítico mononuclear (SFM) en el torrente sanguíneo [81]. Se ha reportado que los nanoportadores de fármacos con carga positiva o hidrófobos, son más propensos a producir citotoxicidad o a ser eliminados rápidamente por el SFM, particularmente en el hígado y el bazo. Los nanoportadores con tamaños menores a 8 nm son excretados por los riñones, mientras que el hígado y el bazo remueven partículas con tamaños mayores a los 250 nm. En consecuencia, los nanoportadores de fármacos con carga negativa, hidrófilos y con tamaños entre 50 y 250 nm, presentan mayor probabilidad de aumentar sus tiempos de circulación en el torrente sanguíneo (figura 1.3) y, por ejemplo, acumularse en tejidos tumorales mediante mecanismos activos, como la funcionalización específica, o

pasivos, como la producida a través del efecto de permeación y retención mejorada (EPR) [82]. Por lo tanto, la hidrofobicidad, el tamaño y la carga de los nanoportadores son los factores determinantes de su respuesta *in vivo* [83].

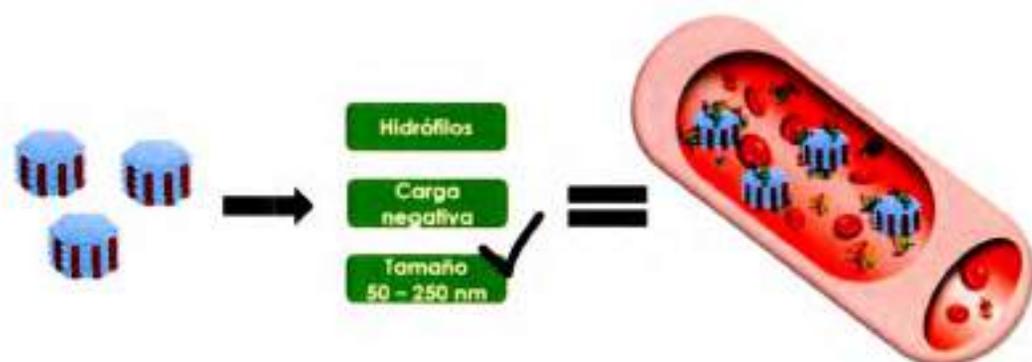


Figura 1.3: Ilustración esquemática de las principales propiedades que afectan la eficacia de los nanoportadores de fármacos.

Una vez que se alcanza el órgano objetivo, existen tres barreras para lograr una acción farmacéutica óptima: traspaso de la membrana celular, biodegradación del nanoportador y liberación de fármaco. En términos generales, luego de la endocitosis, los nanoportadores pueden seguir dos vías: exocítica (endosomas-aparato de Golgi) o endocítica (endosoma temprano-endosoma tardío-lisosoma). En este último caso, la presencia de los nanoportadores activa la bomba de los iones H^+ desde el citoplasma y el endosoma tardío se fusiona con el lisosoma (pH 5,0-5,5), transfiriendo su contenido para su degradación por enzimas lisosomales [84]. Ambas rutas son comunes en el transporte, almacenamiento, liberación y degradación de moléculas en las células. Sin embargo, la vía lisosomal, es indeseable para fines de administración de fármacos, ya que las enzimas contenidas en los lisosomas suelen degradar al fármaco.

Las propiedades fisicoquímicas de los nanoportadores basados en LDHs permiten superar la mayoría de las barreras descritas anteriormente (Figura 1.4). En general, el traspaso de la membrana celular está mediada por clatrina (esta proteína se encarga de formar las vesículas de membrana celular, mediante el reconocimiento específico de lipoproteínas de la membrana [85]). Además, la vía de degradación, por enzima lisosomales, está controlada por las propiedades particulares de los LDHs. Los iones H^+ que se bombean desde el citosol, disuelven parcialmente los nanoportadores en el endosoma tardío, lo que mantiene el pH endosómico entre 5 y 6 dificultado la vía lisosomal [86]. Más importante aún, esta reacción de neutralización da como resultado la erosión del nanoportador con la consecuente liberación de iones Mg^{2+} , Al^{3+} y fármacos [71][87]. A medida que avanza la reacción de disolución, un número creciente de iones se liberan dentro del endosoma, causando que las moléculas de agua, impulsadas por la fuerza osmótica, entren del citoplasma al endosoma. Esto da como resultado un aumento de la presión osmótica de la vesícula endosómica, que eventualmente se rompe y libera su contenido en el citoplasma [88]. En este caso, la liberación del fármaco se produce, entonces, mediante la disolución de la matriz. Este mecanismo de liberación presenta, además, la ventaja de evitar la acumulación de los nanoportadores, observada con otros tipos de nanopartículas inorgánicas [64].

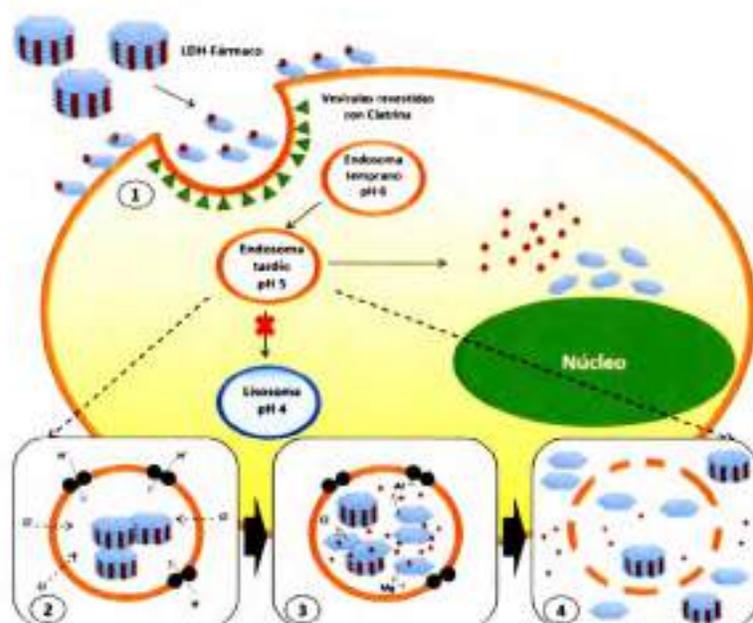


Figura 1.4: Ilustración esquemática de la endocitosis y el traspaso de los nanoportadores de LDH por la membrana celular. (1) Los LDHs se adhieren a la membrana celular y se da la endocitosis mediada por clatrina; (2) Bombeo de iones H^+ en el endosoma; (3) Disolución de los LDHs; (4) Entrada de moléculas de agua y ruptura del endosoma [64].

En esta dirección, el estudio de la interacción de los nanoportadores con los fluidos biológicos es de gran importancia para comprender su comportamiento como nanoportador y optimizar su eficacia. Cuando los nanoportadores entran en un fluido biológico desarrollan una nano-biointerfaz, que comprende las Interacciones fisicoquímicas entre la superficie de los nanoportadores y los componentes biológicos del medio, como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, en un entorno de alta fuerza iónica [89]. Por lo tanto, las proteínas adsorbidas en los nanoportadores, como la albúmina, forman un recubrimiento biológico conocido como corona proteica, que es la que, en definitiva, determina las propiedades fisicoquímicas de los nanoportadores [90]. La formación de esta

corona proteica define su *identidad biológica* que es diferente a su *identidad sintética* [70][91]. De este modo, la *identidad sintética* comprende tanto las características fisicoquímicas de los nanoportadores recién sintetizados como las modificaciones posteriores a la síntesis, realizadas en condiciones *in vitro*, antes de estar en contacto con los fluidos biológicos [92]. Por otra parte, la *identidad biológica* se relaciona con las propiedades de los nanoportadores en contacto con los fluidos biológicos, una vez formada la corona proteica. Sólo los nanoportadores con un tamaño y química superficial adecuados, después de la formación de la corona proteica, no serán reconocidas por el SFM y mostrarán un aumento en los tiempos de circulación [93], condición imprescindible para su posterior acumulación en el sitio de acción.

Como ya se ha mencionado, se han realizado varios estudios sobre LDHs como nanopotadores de fármacos oncológicos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado *in-vitro*, relacionando las propiedades fisicoquímicas de la identidad sintética de los LDHs con su comportamiento frente a la interacción con células, sin tener en cuenta la interacción de los nanoportadores con los fluidos biológicos. Específicamente, estudios en relación directa con el objetivo de esta tesis doctoral no han sido reportados en bibliografía. Choi y colaboradores recopilaron varios estudios tanto *in-vitro* como *in-vivo* donde se incorpora el agente oncológico metotrexato en los LDHs para la administración en diferentes líneas celulares, tal como se detalla en las tabla 1.1 y 1.2 [94]. En primer lugar es importante destacar que sólo dos de estos estudios contemplan la funcionalización de la superficie de los LDHs. En el primero, se funcionaliza la superficie de los LDHs con ácido fólico, un ligando específico para células cancerígenas [95]. En el segundo, se realiza un recubrimiento de ácido poli (láctico-co-glicólico) para aumentar la biocompatibilidad del nanoportador [96]. En ninguno de estos estudios, se

relacionan las propiedades interfaciales (tamaño, carga, etc.) de la identidad biológica de los nanoportadores con su respuesta celular.

Tabla 1.1. Estudios *in-vitro* de nanohíbridos LDH-MTX.

| Método de síntesis LDH-MTX | Tamaño de partícula (nm) | Línea celular | Logros | Ref. |
|----------------------------|--------------------------|--|---|-------|
| Co-precipitación | 150 | Osteosarcoma humano (células MNNG / HOS) | <ul style="list-style-type: none"> El valor de IC₅₀ de LDH-MTX en las células fue aproximadamente 2,5 veces menor que el de MTX libre. LDH-MTX penetran en la membrana celular de manera más efectiva que MTX libre. | [97] |
| Intercambio aniónico | 100-150 | Osteosarcoma humano (Saos-2, MG-63) | <ul style="list-style-type: none"> Alto efecto anticancerígeno de los nanohíbridos LDH-MTX debido a una mayor captación de las LDH. Los nanohíbridos LDH- MTX muestran 500 veces mayor eficacia que el MTX en términos de concentración. | [98] |
| Co-precipitación | 100-150 | Adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) | <ul style="list-style-type: none"> LDH-MTX penetran en la membrana celular de manera más efectiva que MTX libre. | [99] |
| Co-precipitación | 80 | Adenocarcinoma de pulmón humano (A549), carcinoma de hígado humano (Hep1), osteosarcoma humano (HOS) | <ul style="list-style-type: none"> Se estudió la eficacia de los nanohíbridos de LDH-fármaco y el fármaco oncológico libre. La eficacia en todas las líneas celulares fue: LDH-MTX > MTX > Dox > LDH-5-Fu > 5-Fu. | [100] |
| Co-precipitación | 100 | Osteosarcoma humano (Saos-2) | <ul style="list-style-type: none"> El tamaño de partícula de los LDH-MTX (100 nm) se mantuvo entre 100 y 200 cuando se dispersaron en diversos medios; siendo óptimo para la captación y retención celular. Los nanohíbridos son más efectivos, tanto en tiempo como en concentración, en comparación con el MTX libre. | [101] |

Continúa siguiente página.

Tabla 1.1. Continuación

| Método de síntesis LDH-MTX | Tamaño de partícula (nm) | Línea celular | Logros | Ref. |
|-------------------------------|-----------------------------------|--|--|-------|
| Co-precipitación | 200 | Carcinoma humano (KB) | <ul style="list-style-type: none"> Los LDH conjugadas con ácido fólico y MTX inhibieron el crecimiento de células cancerosas en comparación con MTX libre. | [95] |
| Intercambio aniónico | 145 | Cáncer de Colon humano (HCT-116) | <ul style="list-style-type: none"> Con los nanohíbridos LDH-MTX se alcanzó la concentración inhibitoria máxima en menor tiempo (48 h), mientras que con el MTX libre se alcanzó transcurrida 72 h. | [102] |
| a. Coprecipitación | 115 | Adenocarcinoma de pulmón humano (A549), Feocromocitoma suprarrenal de ratón (PC-12) | <ul style="list-style-type: none"> Los nanohíbridos LDH-MTX sintetizados por los diferentes métodos, mostraron mayor eficiencia en la supresión de células cancerosas que el MTX libre. Además, los LDH-MTX sintetizados por coprecipitación son los nanohíbridos con mejor efectos anticancerígenos. | [103] |
| b. Microemulsión inversa | 107 | | | |
| c. Intercambio aniónico | 111 | | | |
| d. Mecanoquímico | 102 | | | |

Tabla 1.2. Estudios *in-vivo* de nanohíbridos MTX-LDH.

| Método de síntesis LDH-MTX | Tamaño de partícula (nm) | Línea celular y modelo animal | Ruta de administración y cantidad | Logros | Ref. |
|----------------------------|--------------------------|--|---|--|-------|
| Co-precipitación | 130 | Células de cáncer de mama MCF-7 / mol, modelo de ratones con inyección ortotópica | Inyección intraperitoneal MTX 10 mg / Kg MTX-LDH 22 mg / Kg, correspondiente a 10 mg / Kg de MTX. | <ul style="list-style-type: none"> LDH-MTX presentaron un mejor efecto antitumoral MTX libre, fue 6 veces más alta que la del grupo tratado con MTX después de 2 h de tratamiento. El híbrido exhibió un efecto focalización superior dando como resultado una alta eficacia antitumoral, el volumen del tumor disminuyó 74,3% . | [104] |
| Co-precipitación | 100 | Células de cáncer cervical humano (C33A), modelo de ratones con inyección ortotópica | Inyección intraperitoneal MTX 50 mg / Kg MTX-LDH 120 mg / Kg correspondiente a 50 mg / Kg de MTX, | <ul style="list-style-type: none"> Se determinó que el efecto antitumoral de LDH-MTX es mucho más significativo que el de MTX libre, Representó una reducción del 81,5% y 66,4% en el volumen del tumor en relación con el grupo control y MTX, respectivamente . | [105] |
| Intercambio aniónico | 180-250 | Células de osteosarcom a humana (HOS), modelo de ratones con xenoinjerto | Inyección intravenosa MTX, PLGA-MTX, o PLGA- MTX-LDH, en una dosis equivalente de 30 mg / Kg de MTX. | <ul style="list-style-type: none"> El efecto antitumoral del LDH-MTX@PLGA representó una reducción del 70% y 49% en el volumen del tumor en relación con MTX y PLGA-MTX, respectivamente. | [96] |
| Co-precipitación | 100 | Células de osteosarcom a humana (HOS), modelo de ratones con xenoinjerto | Inyección intravenosa MTX 30 mg / kg LDH-MTX y 45 mg / Kg una dosis equivalente de 30 mg / Kg de MTX. | <ul style="list-style-type: none"> El estudio farmacocinético <i>in- vivo</i> demostró que el híbrido tenía comportamientos cinéticos similares al MTX libre. Sin embargo, el sistema híbrido suprimió notablemente el crecimiento del tumor, | [106] |

1.4 Objetivos y Organización de la tesis

Sobre la base de los antecedentes expuestos, en los cuales se indican las ventajas de los LDHs como portadores de fármacos, así como la necesidad de mantener el tamaño de partícula en un intervalo acotado y *dirigir* el agente terapéutico a un determinado tejido, el objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es sintetizar nanoportadores de fármacos basados en LDHs para la administración sitio-específica de agentes oncológicos en tejido óseo. Tal como se ha mencionado, no se han reportado previamente estudios sobre la funcionalización de los LDHs para el direccionamiento de agentes oncológicos en tejido óseo. En este marco general, se pretende realizar una contribución racional a la creciente necesidad de desarrollar nuevas terapias más eficientes y seguras, a partir de un estudio fundamental relacionado con la síntesis y optimización de estos nanoportadores.

En este sentido, para alcanzar este objetivo general se plantearon una serie de etapas de estudio que definen los objetivos específicos del trabajo de tesis doctoral, como se esquematiza en la figura 1.5. Uno de los puntos más críticos, se refiere a la síntesis de portadores basados en LDHs que mantengan su tamaño nanométrico, no sólo en las condiciones de síntesis (identidad sintética) sino también en los medios de relevancia fisiológica (identidad biológica). El segundo desafío se relaciona con la funcionalización de los nanoportadores para alcanzar sitio-especificidad en tejidos óseos. En este caso particular, se utilizó risedronato (Ris), un bifosfonato con alta afinidad por los LDHs y por la hidroxiapatita presente en los huesos, para preparar nanohíbridos funcionales. Finalmente, la incorporación de un fármaco oncológico, como el metotrexato (MTX), representa la última etapa



para la preparación de nanoportadores de fármacos basados en LDHs. Por lo tanto, los objetivos específicos de esta tesis doctoral implican las siguientes actividades:

- Sintetizar y caracterizar nanoportadores basados en LDHs (nanoLDH) funcionalizados con Ris (nanoLDH@Ris) para la administración sitio-específica en tejidos óseos.
- Sintetizar y caracterizar nanoLDH intercalados con el fármaco oncológico MTX (nanoLDH-MTX) para la administración sitio-específica en tejidos óseos (nanoLDH-MTX@Ris) y estudiar los mecanismos de liberación *in vitro* del fármaco.
- Estudiar las propiedades interfaciales y fisicoquímicas de los nanoportadores en condiciones de relevancia fisiológica.

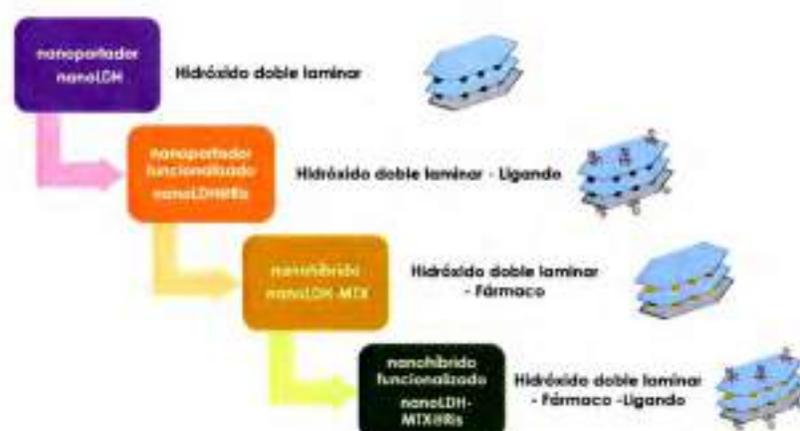


Figura 1.5: Esquematización de los sistemas de LDHs estudiados en la cual se indica el nanoportador en ausencia de fármaco antes (nanoLDH) y después de la adsorción con Ris (nanoLDH@Ris) y en presencia de fármaco interlaminar previo (nanoLDH-MTX) y posterior a la funcionalización con Ris [nanoLDH-MTX@Ris].

La descripción detallada para el desarrollo de estos objetivos, tanto metodológicos como de resultados obtenidos, se recopilan en este trabajo de tesis doctoral a lo largo de los cinco capítulos siguientes, cuyos contenidos se describen a continuación:

El **Capítulo 2**, consta de una descripción de los aspectos metodológicos generales que permitieron realizar la caracterización química, estructural, morfológica e interfacial de los nanoportadores y nanohíbridos sintetizados y de su comportamiento en diferentes condiciones experimentales.

El **Capítulo 3**, se centra en optimizar las condiciones para sintetizar nanoLDH con las propiedades adecuadas para ser utilizado como nanoportadores de fármacos. Además, se presentan distintas estrategias de funcionalización con Ris para preparar nanoLDH@Ris de tamaño adecuado y



con su afinidad intacta por el tejido óseo en distintas condiciones de relevancia fisiológica.

El **Capítulo 4**, se focaliza en las diferentes estrategias empleadas para sintetizar nanohíbridos, nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris, con propiedades óptimas para almacenar y transportar fármacos. De manera complementaria, se muestran los estudios de liberación *in vitro* del MTX utilizando condiciones que simulan distintas situaciones fisiológicas.

El **Capítulo 5**, se dedica a describir la interacción de los nanoportadores con fluidos biológicos, empezando con la incorporación de una proteína, hasta fluidos más complejos, como el suero fetal bovino. Como consecuencia de esta interacción, se analiza el proceso de formación de la corona proteica y su impacto en las propiedades fisicoquímicas de los nanoportadores.

Para finalizar en el **Capítulo 6**, se resumen las conclusiones generales alcanzadas en el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, así como las proyecciones y perspectivas futuras para esta línea de investigación.

1.5 Referencias bibliográficas

- [1] F. Barahuie, M. Z. Hussein, S. Fakurazi, and Z. Zainal, "Development of drug delivery systems based on layered hydroxides for nanomedicine," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 5, pp. 7750–7786, 2014.
- [2] M. Quintili. "Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño," *Cuaderno*, vol. 42, pp. 125–155, 2012.
- [3] K. Park, "Nanotechnology: What it can do for drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 120, no. 1–2, pp. 1–3, 2007.
- [4] J. D. Kingsley, H. Dou, J. Morehead, B. Rabinow, H. E. Gendelman, and C. J. Destache, "Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system.," *J. Neuroimmune Pharmacol.*, vol. 1, no. 3, pp. 340–50, 2006.
- [5] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 5, pp. 1310–1316, 2008.
- [6] S. Kannan, B. P. Devi, and B. Jayakar, "Innovations in Sustained Release Drug Delivery System and Its Market Opportunities," *J. Chem. Pharm. Res.*, vol. 2, no. 5, pp. 225–228, 2010.
- [7] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 24–36, 2012.
- [8] J. Panyam and V. Labhasetwar, "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. SUPPL., pp. 61–71, 2012.

- 
- [9] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 53, no. 2, pp. 283–318, 2001.
- [10] P. R. Lockman, R. J. Mumper, M. A. Khan, and D. D. Allen, "Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–13, 2002.
- [11] K. H. Min *et al.*, "Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy," *J. Control. Release*, vol. 127, no. 3, pp. 208–218, 2008.
- [12] Z. Fang, L.-Y. Wan, L.-Y. Chu, Y.-Q. Zhang, and J.-F. Wu, "'Smart' nanoparticles as drug delivery systems for applications in tumor therapy," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 12, no. 12, pp. 1943–1953, 2015.
- [13] M. Hamidi, A. Azadi, and P. Rafiei, "Hydrogel nanoparticles in drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 15, pp. 1638–49, 2008.
- [14] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.
- [15] S. S. Ray, D. Mosangi, and S. Pillai, "Layered Double Hydroxide-Based Functional Nanohybrids as Controlled Release Carriers of Pharmaceutically Active Ingredients," *Chem. Rec.*, vol. 18, no. 7, pp. 913–927, 2018.
- [16] L. Y. T. Chou, K. Ming, and W. C. W. Chan, "Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 233–245, 2011.

- [17] Z. Shen, M.-P. Nieh, and Y. Li, "Decorating Nanoparticle Surface for Targeted Drug Delivery: Opportunities and Challenges," *Polymers (Basel)*, vol. 8, no. 3, p. 83, 2016.
- [18] H. Zuo, Z. Gu, H. Cooper, and Z. P. Xu, "Crosslinking to enhance colloidal stability and redispersity of layered double hydroxide nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 459, pp. 10–16, 2015.
- [19] Z. Gu, H. Zuo, L. Li, A. Wu, and Z. P. Xu, "Pre-coating layered double hydroxide nanoparticles with albumin to improve colloidal stability and cellular uptake," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 16, pp. 3331–3339, 2015.
- [20] J.-M. Oh, S.-J. Choi, G.-E. Lee, S.-H. Han, and J.-H. Choy, "Inorganic Drug-Delivery Nanovehicle Conjugated with Cancer-Cell-Specific Ligand," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 10, pp. 1617–1624, 2009.
- [21] J.-H. Choy, M. Park, and J.-M. Oh, "Bio-nanohybrids based on layered double hydroxide.," *Curr. Nanosci.*, vol. 2, no. 3, pp. 275–281, 2006.
- [22] D. Li, X. Xu, J. Xu, and W. Hou, "Poly(ethylene glycol) haired layered double hydroxides as biocompatible nanovehicles: Morphology and dispersity study," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 384, no. 1–3, pp. 585–591, 2011.
- [23] M. Chen, H. M. Cooper, J. Z. Zhou, P. F. Bartlett, and Z. P. Xu, "Reduction in the size of layered double hydroxide nanoparticles enhances the efficiency of siRNA delivery.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 390, no. 1, pp. 275–81, 2013.
- [24] D. R. Martínez and G. G. Carbajal, "Hidróxidos dobles laminares : arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología," vol. 7, no. 1, pp. 87–99, 2012.

- 
- [25] G. Mishra, B. Dash, and S. Pandey, "Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials," *Appl. Clay Sci.*, vol. 153, no. pp. 172–186, 2018.
- [26] Brindley and Kikkawa, "A crystal-chemical study of Mg,Al and Ni,N hydroxy-perchlorates and hydroxy(carbonates)," vol. 64, no. pp. 836–843, 1979.
- [27] D. G. Evans and R. C. T. Slade, "Structural aspects of layered double hydroxides," *Struct. Bond.*, vol. 119, no. pp. 1–87, 2005.
- [28] J. Zhang, Y. Li, J. Zhou, D. Chen, and G. Qian, "Chromium (VI) and zinc (II) waste water co-treatment by forming layered double hydroxides: Mechanism discussion via two different processes and application in real plating water," *J. Hazard. Mater.*, vol. 205–206, pp. 111–117, 2012.
- [29] T. Zhang, Q. Li, H. Xiao, H. Lu, and Y. Zhou, "Synthesis of Li-Al layered double hydroxides (LDHs) for efficient fluoride removal," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 51, no. 35, pp. 11490–11498, 2012.
- [30] E. H. Elkhatabi, M. Lakraimi, M. Badreddine, A. Legrouri, O. Cherkaoui, and M. Berraho, "Removal of Remazol Blue 19 from wastewater by zinc-aluminium-chloride-layered double hydroxides," *Appl. Water Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 431–438, 2013.
- [31] M. Baikousi, A. Stamatis, M. Louloudi, and M. A. Karakassides, "Thiamine pyrophosphate intercalation in layered double hydroxides (LDHs): An active bio-hybrid catalyst for pyruvate decarboxylation," *Appl. Clay Sci.*, vol. 75–76, pp. 126–133, 2013.
- [32] X. Lei *et al.*, "Activated MgAl-layered double hydroxide as solid base catalysts for the conversion of fatty acid methyl esters to monoethanolamides," *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 399, no. 1–2, pp. 87–92,

2011.

- [33] G. S. Machado, G. G. C. Arizaga, F. Wypych, and S. Nakagaki, "Immobilization of anionic metalloporphyrins on zinc hydroxide nitrate and study of an unusual catalytic activity," *J. Catal.*, vol. 274, no. 2, pp. 130–141, 2010.
- [34] L. Zhang, Y. Chen, Z. Zhang, and C. Lu, "Highly selective sensing of hydrogen peroxide based on cobalt- ethylenediaminetetraacetate complex intercalated layered double hydroxide-enhanced luminol chemiluminescence," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 193, pp. 752–758, 2014.
- [35] F. T. Zhang *et al.*, "Layered double hydroxide-hemin nanocomposite as mimetic peroxidase and its application in sensing," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 192, pp. 150–156, 2014.
- [36] Y. Lu and Y. Zhao, "Synthesis of layered cathode materials $\text{Li}[\text{Co}_x\text{Ni}_y\text{Mn}_{1-x-y}]\text{O}_2$ from layered double hydroxide precursors," *Particuology*, vol. 8, no. 3, pp. 202–206, 2010.
- [37] Z. P. Xu and P. S. Braterman, "Synthesis, structure and morphology of organic layered double hydroxide (LDH) hybrids: Comparison between aliphatic anions and their oxygenated analogs," *Appl. Clay Sci.*, vol. 48, no. 1–2, pp. 235–242, 2010.
- [38] C. Manzi-Nshuti, P. Songtipya, E. Manias, M. M. Jimenez-Gasco, J. M. Hossenlopp, and C. A. Wilkie, "Polymer nanocomposites using zinc aluminum and magnesium aluminum oleate layered double hydroxides: Effects of LDH divalent metals on dispersion, thermal, mechanical and fire performance in various polymers," *Polymer (Guildf.)*, vol. 50, no. 15, pp. 3564–3574, 2009.

- 
- [39] X. Kong, L. Jin, M. Wei, and X. Duan, "Antioxidant drugs intercalated into layered double hydroxide: Structure and in vitro release," *Appl. Clay Sci.*, vol. 49, no. 3, pp. 324–329, 2010.
- [40] U. ., Costantino, M. ., Nocchetti, L. ., Tammaro, and V. . Vittoria, "Modified hydrotalcite-like compounds as active fillers of biodegradable polymers for drug release and food packaging applications," *Recent Pat. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 3, pp. 218–230, 2012.
- [41] X. Pang, X. Ma, D. Li, and W. Hou, "Synthesis and characterization of 10-hydroxycamptothecin-sebacate-layered double hydroxide nanocomposites," *Solid State Sci.*, vol. 16, pp. 71–75, 2013.
- [42] V. Rives (Ed.), *Layered double hydroxides: present and future* - Nova Science Publishers, Inc., New York, IX+439 pp, 2001.
- [43] M. Sajid and C. Basheer, "Layered double hydroxides: Emerging sorbent materials for analytical extractions," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 174–182, 2016.
- [44] F. Duda, et al., "Highly biocompatible behaviour and slow degradation of a LDH (layered double hydroxide)-coating on implants in the middle ear of rabbits," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–8, 2015.
- [45] A. I. Khan, "Intercalation chemistry of layered double hydroxides: recent developments and applications," *J. Mater. Chem.* pp. 3191–3198, 2002.
- [46] J. He, M. Wei, B. Li, Y. Kang, D. G. Evans, and X. Duan, "Preparation of Layered Double Hydroxides," in *Layered Double Hydroxides*, vol. 22, no. 11, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 89–119, 2006.
- [47] Q. Zhenlan, Y. Heng, Z. Bin, and H. Wanguo, "Synthesis and release behavior of bactericides intercalated Mg–Al layered double

- hydroxides," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 348, no. 1–3, pp. 164–169, 2009.
- [48] W. Z. Li *et al.*, "Phenoxymethylpenicillin-intercalated hydrotalcite as a bacteria inhibitor," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 81, no. 1, pp. 89–93, 2006.
- [49] H. Nakayama, K. Takeshita, and M. Tsuchiko, "Preparation of 1-hydroxyethylidene-1, 1-diphosphonic acid-intercalated layered double hydroxide and its physicochemical properties," *J. Pharm. Sci.*, vol. 92, no. 12, pp. 2419–2426, 2003.
- [50] J. H. Choy and Y. H. Son, "Intercalation of Vitamer into LDH and Their Controlled Release Properties," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 25, no. 1, pp. 122–126, 2004.
- [51] R. R. Delgado, "TESIS DOCTORAL HIDROXISALES DE Ni y Zn: PROPIEDADES DE INTERCAMBIO Y PRODUCTOS DE DESCOMPOSICIÓN." UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, Córdoba, España, p. 206, 2005.
- [52] V. Rives, M. del Arco, and C. Martín, "Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review," *Appl. Clay Sci.*, vol. 88–89, pp. 239–269, 2014.
- [53] V. Rives, M. del Arco, and C. Martín, "Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review," *Appl. Clay Sci.*, vol. 88–89, pp. 239–269, 2014.
- [54] Z. Wang, E. Wang, L. Gao, and L. Xu, "Synthesis and properties of Mg₂Al layered double hydroxides containing 5-fluorouracil," *J. Solid State Chem.*, vol. 178, no. 3, pp. 736–741, 2005.

- 
- [55] K. Li, G. Wang, D. Li, Y. Lin, and X. Duan, "Intercalation assembly method and intercalation process control of layered intercalated functional materials," *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 21, no. 4, pp. 453–462, 2013.
- [56] Z. P. Xu, G. Stevenson, C.-Q. Lu, and G. Q. M. Lu, "Dispersion and size control of layered double hydroxide nanoparticles in aqueous solutions.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 34, pp. 16923–9, 2006.
- [57] I. Nebot-Díaz, V. Rives, J. Rocha, and J. B. Carda, "Estudio de la descomposición térmica de compuestos tipo hidrotalcita," *Bol. la Soc. Esp. Ceram. y Vidr.*, vol. 41, no. 4, pp. 411–414, 2002.
- [58] C. Chen, P. Gunawan, and R. Xu, "Self-assembled Fe₃O₄-layered double hydroxide colloidal nanohybrids with excellent performance for treatment of organic dyes in water," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 4, pp. 1218–1225, 2011.
- [59] R. Sasai, W. Norimatsu, and Y. Matsumoto, "Nitrate-ion-selective exchange ability of layered double hydroxide consisting of Mg II and Fe III," *J. Hazard. Mater.*, vol. 215–216, pp. 311–314, 2012.
- [60] S. Yuan, D. Peng, X. Hu, and J. Gong, "Bifunctional sensor of pentachlorophenol and copper ions based on nanostructured hybrid films of humic acid and exfoliated layered double hydroxide via a facile layer-by-layer assembly," *Anal. Chim. Acta*, vol. 785, pp. 34–42, 2013.
- [61] L. Fernández, I. Ledezma, C. Borrás, L. A. Martínez, and H. Carrero, "Horseradish peroxidase modified electrode based on a film of Co-Al layered double hydroxide modified with sodium dodecylbenzenesulfonate for determination of 2-chlorophenol," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 182, pp. 625–632, 2013.
- [62] T. Hibino, "Acid treatment of layered double hydroxides containing

- carbonate," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2014, no. 31, pp. 5311–5321, 2014.
- [63] P. Parashar, V. Sharma, D. D. Agarwal, and N. Richhariya, "Rapid synthesis of hydrotalcite with high antacid activity," *Mater. Lett.*, vol. 74, pp. 93–95, 2012.
- [64] R. Rojas, D. A. Bedoya, C. Vasti, and C. E. Giacomelli, "LDH nanoparticles: synthesis, size control and applications in nanomedicine." in *Layered Double Hydroxides: Synthesis, Characterization and Applications*, p. 101 - 120, 2015.
- [65] V. Rives, M. Del Arco, and C. Martín, "Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A review," *J. Control. Release*, vol. 169, no. 1–2, pp. 28–39, 2013.
- [66] S. J. Ryu, H. Jung, J. M. Oh, J. K. Lee, and J. H. Choy, "Layered double hydroxide as novel antibacterial drug delivery system," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 71, no. 4, pp. 685–688, 2010.
- [67] M. Chakraborti, J. K. Jackson, D. Plackett, D. M. Brunette, and H. M. Burt, "Drug intercalation in layered double hydroxide clay: application in the development of a nanocomposite film for guided tissue regeneration.," *Int. J. Pharm.*, vol. 416, no. 1, pp. 305–13, 2011.
- [68] H. Zhang, K. Zou, S. Guo, and X. Duan, "Nanostructural drug-inorganic clay composites: Structure, thermal property and in vitro release of captopril-intercalated Mg-Al-layered double hydroxides," *J. Solid State Chem.*, vol. 179, no. 6, pp. 1792–1801, 2006.
- [69] M. Z. bin Hussein, M. Y. Ghotbi, A. H. Yahaya, and M. Z. Abd Rahman, "Synthesis and characterization of (zinc-layered-gallate) nanohybrid using structural memory effect," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 113, no. 1, pp.



491–496, 2009.

- [70] K. Ladewig, M. Niebert, Z. P. Xu, P. P. Gray, and G. Q. (Max) Lu, "Controlled preparation of layered double hydroxide nanoparticles and their application as gene delivery vehicles," *Appl. Clay Sci.*, vol. 48, no. 1–2, pp. 280–289, 2010.
- [71] K. Ladewig, Z. P. Xu, and G. Q. M. Lu, "Layered double hydroxide nanoparticles in gene and drug delivery.," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 6, no. 9, pp. 907–22, 2009.
- [72] K. Zhang *et al.*, "Potential for layered double hydroxides-based, innovative drug delivery systems.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 5, pp. 7409–28, 2014.
- [73] K. Sugano *et al.*, "Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 8, pp. 597–614, 2010.
- [74] J. Yu, H. E. Chung, and S. J. Choi, "Acute oral toxicity and kinetic behaviors of inorganic layered nanoparticles," *J. Nanomater.*, vol. 2013, 2013.
- [75] G. Mishra, B. Dash, D. Sethi, S. Pandey, and B. K. Mishra, "Orientation of Organic Anions in Zn-Al Layered Double Hydroxides with Enhanced Antibacterial Property," *Environ. Eng. Sci.*, vol. 34, no. 7, pp. 516–527, 2017.
- [76] R. Rojas, M. C. Palena, a. F. Jimenez-Kairuz, R. H. Manzo, and C. E. Giacomelli, "Modeling drug release from a layered double hydroxide-ibuprofen complex," *Appl. Clay Sci.*, vol. 62–63, pp. 15–20, 2012.
- [77] S. J. Xia, Z. M. Ni, Q. Xu, B. X. Hu, and J. Hu, "Layered double hydroxides

as supports for intercalation and sustained release of antihypertensive drugs." *J. Solid State Chem.*, vol. 181, no. 10, pp. 2610–2619, 2008.

- [78] S. Saha, S. Ray, R. Acharya, T. K. Chatterjee, and J. Chakraborty, "Magnesium, zinc and calcium aluminium layered double hydroxide-drug nanohybrids: A comprehensive study," *Appl. Clay Sci.*, vol. 135, pp. 493–509, 2017.
- [79] M. L. Parello, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Dissolution kinetics and mechanism of Mg-Al layered double hydroxides: A simple approach to describe drug release in acid media," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 351, no. 1, pp. 134–139, 2010.
- [80] R. Rojas, A. F. Jimenez-Kairuz, R. H. Manzo, and C. E. Giacomelli, "Release kinetics from LDH-drug hybrids: Effect of layers stacking and drug solubility and polarity," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 463, pp. 37–43, 2014.
- [81] Q. T. H. Shubhra, J. Tóth, J. Gyenis, and T. Feczko, "Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Surface modification of HSA containing magnetic PLGA nanoparticles by poloxamer to decrease plasma protein adsorption," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 122, pp. 529–536, 2014.
- [82] M. Ferrari, "Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 161–171, 2005.
- [83] C. Vasti, D. A. Bedoya, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Effect of the protein corona on the colloidal stability and reactivity of LDH-based nanocarriers," *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 11, pp. 2008–2016, 2016.
- [84] L. K. Medina-Kauwe, J. Xie, and S. Hamm-Alvarez, "Intracellular trafficking of nonviral vectors.," *Gene Ther.*, vol. 12, no. 24, pp. 1734–51, 2005.

- 
- [85] H. T. McMahon and E. Boucrot, "Molecular mechanism and physiological functions of clathrin - mediated endocytosis," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 12, no. 8, pp. 517–533, 2011.
- [86] H.-E. Chung, D.-H. Park, J.-H. Choy, and S.-J. Choi, "Intracellular trafficking pathway of layered double hydroxide nanoparticles in human cells: Size-dependent cellular delivery," *Appl. Clay Sci.*, vol. 65–66, pp. 24–30, 2012.
- [87] S.-J. Choi, J.-M. Oh, and J.-H. Choy, "Safety Aspect of Inorganic Layered Nanoparticles: Size-Dependency In Vitro and In Vivo," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 10, pp. 5297–5301, 2008.
- [88] Z. P. Xu *et al.*, "Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles," *J. Control. Release*, vol. 130, no. 1, pp. 86–94, 2008.
- [89] A. E. Nel *et al.*, "Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface," *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 7, pp. 543–557, 2009.
- [90] J. Wolfram *et al.*, "The nano-plasma interface: Implications of the protein corona," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 124, no. 11, pp. 17–24, 2014.
- [91] F. Barahue, M. Z. Hussein, S. A. Gani, S. Fakurazi, and Z. Zainal, "Synthesis of protocatechuic acid-zinc/aluminium-layered double hydroxide nanocomposite as an anticancer nanodelivery system," *J. Solid State Chem.*, vol. 221, pp. 21–31, 2015.
- [92] C. Vasti, L. V. Bonnet, M. R. Galiano, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Relevance of protein–protein interactions on the biological identity of nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 166, pp. 330–338, 2018.

- [93] G. M. Mortimer, N. J. Butcher, A. W. Musumeci, Z. J. Deng, D. J. Martin, and R. F. Minchin, "Cryptic epitopes of albumin determine mononuclear phagocyte system clearance of nanomaterials," *ACS Nano*, vol. 8, no. 4, pp. 3357–3366, 2014.
- [94] G. Choi, T. Kim, J. Oh, and J. Choy, "Emerging nanomaterials with advanced drug delivery functions; focused on methotrexate delivery," vol. 359, pp. 32–51, 2018.
- [95] K. N. Y. and X. C. Li Yan, Wei Chen, Xiaoyue Zhu, Longbiao Huang, Zhigang Wang, c Guangyu Zhu, V. A. L. Roy, "Folic acid conjugated self-assembled layered double hydroxide nanoparticles for high-efficacy-targeted drug delivery," *Chem. Commun. (Camb).*, vol. 49, no. 93, 2013, pp. 10938–10940, 2013.
- [96] S. Ray, S. Saha, B. Sa, and J. Chakraborty, "In vivo pharmacological evaluation and efficacy study of methotrexate-encapsulated polymer-coated layered double hydroxide nanoparticles for possible application in the treatment of osteosarcoma," *Drug Deliv. and Transl. Res.* pp. 259–275, 2017.
- [97] J.-M. Oh, S.-J. Choi, S.-T. Kim, and J.-H. Choy, "Cellular uptake mechanism of an inorganic nanovehicle and its drug conjugates: Enhanced efficacy due to clathrin-mediated endocytosis.," *Bioconjug. Chem.*, vol. 17, no. 6, pp. 1411–7, 2006.
- [98] J.-M. Oh, M. Park, S.-T. Kim, J.-Y. Jung, Y.-G. Kang, and J.-H. Choy, "Efficient delivery of anticancer drug MTX through MTX-LDH nanohybrid system," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 67, no. 5–6, pp. 1024–1027, May 2006.
- [99] J. Y. Kim, S. Choi, J. Oh, T. Park, and J. Choy, "Anticancer Drug-Inorganic



Nanohybrid and Its Cellular Interaction," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 3, pp. 3700–3705, 2007.

- [100] S.-J. Choi, J.-M. Oh, and J.-H. Choy, "Anticancer drug-layered hydroxide nanohybrids as potent cancer chemotherapy agents," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 69, no. 5–6, pp. 1528–1532, 2008.
- [101] G. Choi, S. Y. Kim, J. Oh, and J. Choy, "Drug-Ceramic 2-Dimensional Nanoassemblies for Drug Delivery System in Physiological Condition," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 2765, no. 30422, pp. 2758–2765, 2012.
- [102] J. Chakraborty, S. Roychowdhury, S. Sengupta, and S. Ghosh, "Mg-Al layered double hydroxide-methotrexate nanohybrid drug delivery system: evaluation of efficacy.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 4, pp. 2168–74, 2013.
- [103] D. Tian, Y. Wang, S. Li, and X. Li, "Applied Clay Science Synthesis of methotrexatum intercalated layered double hydroxides by different methods: Biodegradation process and bioassay explore," *Appl. Clay Sci.*, vol. 118, pp. 87–98, 2015.
- [104] G. Choi, O.-J. Kwon, Y. Oh, C.-O. Yun, and J.-H. Choy, "Inorganic nanovehicle targets tumor in an orthotopic breast cancer model.," *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 4430, 2014.
- [105] G. Choi, H. Piao, Z. Aalothman, A. Vinu, C. O. Yun, and J. H. Choy, "Anionic clay as the drug delivery vehicle: Tumor targeting function of layered double hydroxide- methotrexate nanohybrid in C33A orthotopic cervical cancer model," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, pp. 337–348, 2016.
- [106] S.-J. Choi, J.-M. Oh, H.-E. Chung, S.-H. Hong, and I.-H. Kim, "In vivo anticancer activity of methotrexate-loaded layered double hydroxide nanoparticles.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, no. 41, pp. 7196–7202, 2013.



Capítulo 2

Técnicas y métodos de caracterización

Capítulo 2: Técnicas y métodos de caracterización

A lo largo de esta tesis doctoral, se utilizaron distintas técnicas y métodos que permitieron realizar la caracterización química, estructural, morfológica e interfacial de los LDHs sintetizados y del comportamiento de estos en diferentes condiciones de interés. En este capítulo se explican los métodos de caracterización empleados para el desarrollo de la tesis. Por otra parte, la metodología utilizada para las síntesis y los experimentos específicos de cada sistema estudiado se detallarán en los respectivos capítulos.

Las soluciones preparadas para los diferentes experimentos se realizaron con agua (18,2 MΩ MilliQ, Sistema Millipore). Las soluciones de NaOH y HCl empleadas para las síntesis y demás experimentos fueron previamente valoradas, en un titulador automático Metrohm, acoplado con un electrodo de pH de vidrio.

Se utilizaron fármacos y reactivos de grado analítico, adquiridos comercialmente a excepción del risedronato de sodio hemipentahidrato (Ris) que fue donado por IVAX, Argentina.

A continuación, se presenta una lista con los reactivos y fármacos empleados con sus respectivas marcas:

Parafarm: Metotrexato (MTX).

J.T Baker: NaOH, KOH, NaCl, KH_2PO_4 y K_2HPO_4 .

Cicarelli: H_2SO_4 , HNO_3 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CH_3COOH .

Anedra: KCl, CaCl_2 , CH_3COONa .

Merck: KBr.

Sigma-Aldrich: Albúmina de suero bovino, Hidroxiapatita.

Natocor: Suero Fetal Bovino (SFB).

2.1 Análisis químico

El análisis químico de una muestra comprende la determinación cualitativa y cuantitativa de los elementos que la constituyen. La caracterización cualitativa de los componentes de una muestra se puede abordar por varias técnicas instrumentales. Mientras, la cuantificación, en la mayoría de los casos, queda limitada a aquellas técnicas cuya señal específica es proporcional a la concentración de un determinado elemento en la muestra y permite elaborar las correspondientes curvas de calibración.

Con el propósito de determinar la composición de los LDHs sintetizados y lograr así proponer la fórmula química correspondiente, en esta tesis se emplearon técnicas como el análisis elemental de C y N, la espectrometría de absorción atómica (SAA), espectroscopia de energía dispersiva (EDS), análisis elemental, análisis termogravimétrico (ATG), análisis térmico diferencial (DTA) y espectroscopia ultravioleta visible (U.V-vis).

2.1.1 Análisis elemental de C y N

El análisis de C y N se realizó empleando el método Pregl-Dumas que consiste en la combustión de la muestra sólida en presencia de un exceso de oxígeno a una temperatura de aproximadamente 1000 °C. Al realizar la combustión, ocurren las siguientes reacciones





Luego los productos de la combustión son extraídos de la cámara de combustión por la acción de un gas portador inerte, como el helio y se pasan sobre cobre calentado (a 600 ° C) de alta pureza. La función del cobre es eliminar todo el oxígeno que no se haya consumido en la combustión inicial y convertir cualquier óxido de nitrógeno en nitrógeno gaseoso. Los gases resultantes se pasan a través de trampas absorbentes para dejar solo dióxido de carbono, agua, nitrógeno y dióxido de azufre. Finalmente, la mezcla de gases se pasa a través de una columna de separación de cromatografía frontal y la determinación de cada uno de estos gases se realiza con un detector de conductividad térmica [1].

Esta técnica se llevó a cabo para determinar el contenido de C y N de los LDHs sintetizados: LDH-Ris, nanoLDH, nanoLDH@Ris, nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris. El ensayo se realizó en un analizador elemental Perkin-Elmer 2400 Series II CHNS/O. La sustancia patrón utilizada para calibración fue la acetanilida.

2.1.2 Espectrometría de absorción atómica

La espectrometría de absorción atómica (SAA) se basa en la absorción de radiación por átomos libres en su estado fundamental. La longitud de onda de la radiación absorbida es específica para cada elemento, lo que permite su identificación. Mientras que la intensidad de la radiación a esa longitud de onda específica es proporcional a la cantidad del elemento presente en la muestra.

La SAA se divide en dos pasos:

A) La conversión del analito a sus átomos en fase gaseosa (atomización). Para este caso se utilizó un atomizador de llama. En primer lugar, la muestra se debe



nebulizar mediante un gas combustible (acetileno) que posteriormente se mezcla con un gas oxidante (aire). Luego, este gas se dirige hasta la llama donde se produce la atomización.

B) La determinación de la absorción de radiación por estos átomos libres para su posterior cuantificación. La fuente de radiación empleada fue una lámpara de cátodo hueco de los metales a analizar.

Los electrones de los átomos del analito en fase gaseosa, pueden ser promovidos a orbitales atómicos de mayor energía mediante la absorción de la radiación emitida por la lámpara de cátodo hueco. La longitud de onda a la que se produce la absorción aparece rodeada del resto de radiaciones de múltiples longitudes de onda de cada elemento que compone la muestra; por tanto, se requiere de un monocromador, que se encarga de filtrar la radiación característica del elemento a determinar. Esta radiación debe ser conducida desde la lámpara hasta el monocromador y desde este al detector. Finalmente, la radiación resultante debe ser detectada, amplificada y medida por los componentes del sistema electrónico.

La fuente de radiación más usada es la lámpara de cátodo hueco, que emite radiación con una señal estrecha, lo que proporciona sensibilidad y selectividad [2].

El contenido de Al y Mg de los nanoLDH y nanoLDH@Ris fue medido mediante SAA. El ensayo se llevó a cabo en un espectrómetro Varian AA240. Las muestras sólidas fueron disueltas en la mínima cantidad posible de HNO₃ concentrado y luego fueron diluidas con agua hasta alcanzar el rango de calibración (límite de cuantificación). Las curvas de calibración se realizaron mediante disoluciones a partir de patrones de Mg²⁺ y Al³⁺.

2.1.3 Espectroscopia de energía dispersiva

La Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (EDS) es una técnica de microanálisis que permite detectar rápidamente los elementos presentes en la superficie de una muestra. Se utiliza como complemento de la microscopía electrónica de barrido (SEM). Básicamente, consiste en bombardear una muestra sólida con electrones de alta energía en un microscopio electrónico. Cuando la muestra es impactada por el haz de electrones, los electrones de las capas externas presentes en los átomos de la muestra son expulsados. Esta carencia de electrones es abastecida por la transición de electrones desde un estado electrónico superior, generando la liberación de rayos X para estabilizar la diferencia de energía entre los dos estados. Finalmente, se realiza la detección de estos rayos X, que son característicos de cada elemento presente en la muestra, lo que da información sobre su composición elemental [3].

El contenido de Al y Mg de los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris fue medido mediante EDS. Se empleó una pastilla de cada una de las muestras, preparada por compresión, que fueron sujetadas al portamuestras con una cinta adherente de carbono. Se utilizó un equipo SEM Carl Zeiss Sigma equipado con un sistema de detección EDS.

2.1.4 Análisis térmico

Se conoce como análisis térmico a un grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la variación de temperatura, mientras la sustancia se somete a un programa de temperatura controlado. El análisis térmico permite detectar y medir los procesos químicos o físicos que ocurren al calentar una



muestra. En esta tesis se emplearon dos de estas técnicas, el análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA).

La primera de ellas consiste en medir continuamente la masa de una muestra en función de la temperatura o el tiempo. Para determinar la pérdida o ganancia de masa, la muestra se somete a un programa de temperatura controlada en una determinada atmósfera. Los gráficos obtenidos, donde se representa la masa o el porcentaje de masa en función del tiempo o la temperatura, se denominan termogramas o curvas termogravimétricas. Así, el TGA brinda información sobre la estabilidad térmica y la composición de la muestra original y de los intermediarios que se puedan formar, al igual que la composición del residuo de la muestra [4].

Por otra parte, el DTA se basa en registrar la temperatura de una muestra en comparación con la de un material térmicamente inerte, ambos calentados a una velocidad constante en una atmósfera controlada. Los cambios de temperatura en la muestra con respecto a la referencia se deben a los procesos exotérmicos o endotérmicos que tienen lugar en ella, como los producidos por: fusión, ebullición, sublimación, vaporización, cambios de fase, inversiones de estructura cristalina, procesos de adsorción, reacciones químicas de deshidratación, disociación, descomposición, oxidación, reducción, etc. Fenómenos como los de deshidratación, reducción o cambios de fase, darán lugar a efectos endotérmicos, mientras que reacciones de oxidación, descomposición o procesos de adsorción producirán efectos exotérmicos. Como consecuencia de estos procesos se obtiene un termograma diferencial en el que se registra la diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia en función de la temperatura del sistema. Los procesos exotérmicos, en los que se desprende calor de la

muestra, provocan un aumento de su temperatura con respecto a la referencia y dan lugar a máximos en el termograma. Por el contrario, los procesos endotérmicos originan mínimos en la curva como consecuencia de la absorción de calor por parte de la muestra [5].

Los requisitos instrumentales básicos para el análisis térmico son: una balanza de precisión, un horno que está programado para un aumento lineal de la temperatura con el tiempo y las termocuplas que se encargan de registrar la temperatura tanto del material de referencia como de la muestra. Igualmente, se requiere un gas de purga que fluye a través de la balanza para controlar la atmósfera. Este gas puede ser inerte, (nitrógeno, argón o helio), oxidante (aire u oxígeno) o reductor (8 - 10% de hidrógeno en nitrógeno) [6].

Por un lado, el TGA se utilizó para determinar el contenido de agua interlaminar, mientras que la pérdida de peso total fue utilizada para establecer la fórmula química de los sólidos. El DTG se empleó para identificar los procesos involucrados en esta degradación térmica.

Los ensayos fueron llevados a cabo en la muestra sólida, empleando un equipo Shimadzu DTG-60, con un flujo de aire a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y un intervalo de temperatura entre 30 y $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.5 Espectroscopia ultravioleta visible

La espectroscopia UV-Vis está basada en el proceso de absorción de radiación electromagnética en el intervalo UV-Vis (longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) [7]. Las energías que constituyen esta región del espectro electromagnético, son del orden de 1 a 25 eV. Estas producen transiciones



electrónicas en los átomos y moléculas desde el estado fundamental a estados electrónicos excitados, además se producen cambios en la población de los niveles vibracionales y rotacionales.

El espectro de absorción UV-Vis de un compuesto se debe por lo general a tres tipos de transiciones:

- Transiciones producidas por electrones π , σ y n .
- Transiciones producidas por electrones d y f .
- Transiciones producidas por transferencia de carga.

Dado que parte de la energía de una frecuencia determinada es absorbida por el analito, la intensidad de la radiación disminuye, lo que sirve a efectos prácticos para la identificación o cuantificación del analito, empleando la ley de Lambert-Beer [7].

La espectroscopía UV-Vis fue utilizada para cuantificar especies cromóforas incorporadas a los LDHs, como albúmina (Alb), Ris y MTX. Asimismo, se empleó para determinar la estabilidad de la funcionalización frente a la desorción en las diferentes condiciones de estudio. Estas determinaciones se llevaron a cabo en los sobrenadantes de los diferentes sólidos dispersos, previamente centrifugados y filtrados. Luego se calculó la concentración de las especies, comparando la concentración remanente en los sobrenadantes con la concentración inicial. Las concentraciones de Ris, Alb y MTX se determinaron a 262nm, 278 nm y 370 nm respectivamente.

El equipo empleado fue un espectrofotómetro Shimadzu UV1700, Pharma Spec. Las soluciones empleadas para construir las diferentes curvas de calibración se prepararon en buffer fosfato pH 7,4.

2.2 Análisis estructural

El análisis estructural se realizó mediante el uso de técnicas como la difracción de rayos X de polvo (DRXP), espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia Raman. Las técnicas espectroscópicas proporcionan información de las especies presentes en las muestras y el modo en que interaccionan con la estructura del sólido. La DRXP permite identificar las fases presentes en una muestra sólida cristalina, conocer su simetría, los parámetros que describen la estructura cristalina y los defectos que puede presentar esta estructura.

2.2.1 Difracción de rayos X

La fuente de rayos X se origina cuando una partícula acelerada con suficiente energía colisiona con un átomo, su energía es absorbida por este, y los electrones de las capas internas son desplazados, llegando incluso a provocar su ionización o expulsión del electrón del átomo. De este modo se genera una vacante en la estructura electrónica del átomo. El átomo excitado es inestable, ya que se encuentra en un estado de energía elevado y por tanto tiende a decaer a su estado electrónico fundamental o de mínima energía. Para ello un electrón externo de la estructura electrónica del átomo ocupa la vacante y el átomo emite un fotón de rayos X característico del átomo del que procede.

La DRXP se basa en la capacidad que tienen las estructuras cristalinas de difractar estos rayos X. Las interferencias constructivas de las ondas



asociadas a esta radiación dan como resultado patrones de difracción característicos para cada sólido. Por ello, la DRX es una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de materiales cristalinos. Se ha aplicado tradicionalmente para la identificación de fases en una muestra y, en algunos casos, para su análisis cuantitativo. Igualmente, brinda información sobre la estructura cristalina, el ordenamiento de los átomos, simetría y los parámetros que describen la celda unidad de sólidos cristalinos [8].

Las mediciones fueron realizadas en un intervalo de $(5^\circ \text{ a } 70^\circ) 2\theta$, en un difractómetro Philips X'pert Pro con una lámpara de $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1,5408 \text{ \AA}$) a 40 kV y 40 mA y se utilizó un paso de $(0,05^\circ, 1,2 \text{ s})$.

2.2.2 Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopia infrarroja (IR) permite estudiar la interacción entre la materia y la radiación infrarroja, radiación que corresponde a la región del espectro electromagnético comprendida entre 400 y 4000 cm^{-1} . Esta región se subdivide en IR cercano, infrarrojo medio e IR lejano. La espectroscopia IR es sensible a la presencia de grupos funcionales en una molécula, lo que permite identificar especies químicas a través de la determinación de la frecuencia (número de onda) a la que los distintos grupos funcionales presentan bandas de absorción en el rango IR.

El espectro IR se origina por la absorción de fotones con la energía correspondiente a una transición vibracional de la molécula en la región del infrarrojo. En términos generales la absorción de fotones IR genera una transición a un estado vibracional de mayor energía dentro del estado electrónico en que se encuentre esa especie. En moléculas poliatómicas

pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión [11].

La espectroscopia IR se utilizó para identificar las bandas de absorción características de los LDHs, lo que permitió verificar la presencia de diferentes especies. Los espectros fueron obtenidos utilizando una pastilla de KBr (proporción 1: 200: relación de Muestra: KBr) en un equipo Bruker IFS28. Se hicieron 32 acumulaciones, en un rango de medición entre 400 y 4000 cm^{-1} .

2.2.3 Espectroscopia Raman

La molécula excitada puede decaer al estado fundamental de dos maneras. Volviendo al estado energético fundamental en el que se encontraba o poblando un estado energético diferente. Si regresa al estado energético fundamental en el que se encontraba, se libera una energía igual a la absorbida. Esto sucede en la inmensa mayoría de las interacciones y constituye la dispersión elástica o de Rayleigh. Sin embargo, si la molécula no regresa a su estado inicial, la energía liberada será distinta de la absorbida, de modo que ha ocurrido un intercambio de energía, que resulta en la dispersión inelástica que caracteriza al fenómeno Raman. Normalmente, la molécula acaba en un nivel energético más elevado, de modo que la energía que se libera es menor que la que se absorbe. Esta dispersión Raman se denomina Stokes. Por el contrario, si la molécula acaba en un nivel energético inferior, se libera más energía que la que se absorbe. Esta dispersión Raman se denomina *anti-Stokes*.



Aunque las espectroscopias IR y Raman se basan en los cambios de energía vibracional, lo hacen desde perspectivas diferentes, ya que en IR se estudia la luz absorbida mientras que en Raman la luz dispersada. En Raman la muestra se irradia con un haz laser cuya longitud puede ser cualquiera entre ultravioleta, visible, infrarrojo cercano o infrarrojo. La luz dispersada, presenta una frecuencia que cambia con respecto a la luz incidente. De modo que en la espectroscopia Raman se obtienen las frecuencias vibracionales como un desplazamiento entre la energía del haz incidente y la energía que es dispersada por la molécula. Esta diferencia con respecto a la luz incidente no depende de la longitud de onda que se irradia sobre la muestra. De modo que, si el desplazamiento Raman se normaliza respecto a la frecuencia del haz incidente, se obtiene el mismo valor de frecuencia en las bandas Raman observadas, independientemente de la luz usada para irradiar la muestra. De este modo, se pueden medir desplazamientos Raman (vibracionales) sin usar radiación infrarroja (la característica de las transiciones vibracionales) [11].

En esta tesis se empleó la espectroscopia Raman para identificar la especie presente en los LDH-Ris y nanoLDH@Ris. Los espectros Raman se midieron sobre las muestras sólidas en un Microscopio confocal Raman LABRAM-HR, Horiba Jobin-Yvon. Las fuentes de excitación utilizadas fueron de 633 y 514 nm. Se hicieron 50 acumulaciones, en un rango de medición entre 50 y 4000 cm^{-1} .

2.3 Análisis morfológico e interfacial

El conocimiento de las propiedades interfaciales, además de las características como la forma y el tamaño de los nanoportadores. Son de vital importancia para lograr entender el comportamiento que tendrían los nanoportadores en un sistema biológico. Con este propósito se empleó microscopia electrónica de barrido (SEM) para el estudio morfológico mientras que la

caracterización interfacial se realizó mediante técnicas como la dispersión dinámica de la luz (DLS) y dispersión de luz electroforética (ELS).

2.3.1 Microscopia electrónica de barrido

Un microscopio electrónico de barrido (SEM), forma imágenes topográficas de alta resolución a partir de los electrones generados por la interacción de un haz de electrones con la muestra. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para conocer las propiedades morfológicas acerca de las partículas de sólidos inorgánicos [12].

El haz de electrones se origina en el cañón electrónico, donde un filamento de tungsteno, al ser calentado eléctricamente hasta su incandescencia comienza a emitir electrones que son condensados para formar el haz, el cual es dirigido hacia la muestra, a la que impacta, bariendo su superficie. Cuando el haz electrónico impacta sobre la muestra origina distintos tipos emisiones que escapan de la muestra bajo la forma de electrones secundarios, radiación X, electrones retrodifundidos, radiación visible, electrones Auger, entre otras. Cada modo de emisión constituye, potencialmente, una señal a partir de la cual se puede crear una imagen. Para ello el "detector" se encarga de recoger las emisiones secundarias emitidas desde la muestra y las transforma en una señal eléctrica que se amplifica y procesa dando como resultado una micrografía SEM.

La mayoría de las muestras caracterizadas por SEM deber ser metalizadas previamente, para lo que se deposita sobre la superficie de la muestra una delgada capa de metal conductor (de alrededor de 100 Å). El metalizado asegura una adecuada conductividad eléctrica y la formación de una superficie que pueda



emitir un gran número de electrones secundarios tras el bombardeo con el haz incidente [13].

En esta tesis se utilizó SEM para conocer la morfología que presentaron los diferentes LDHs sintetizados. Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo FE-SEM Carl Zeiss Sigma (EHT = 5 kV).

Las muestras fueron preparadas a partir de las dispersiones de las muestras correspondientes, las cuales se diluyeron 1: 100 en etanol. Una gota de la dispersión diluida se colocó en un soporte de silicio y se dejó secar. Finalmente, fueron metalizadas con capa de cromo.

2.3.2 Dispersión dinámica de la luz

La dispersión dinámica de luz (o DLS por sus siglas en inglés) es una técnica empleada para la determinación de la distribución de tamaños, así como el radio hidrodinámico (d) de partículas en dispersión, o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros. Esta técnica, permite el cálculo de los coeficientes de difusión asociados con el movimiento browniano de partículas dispersas en medios líquidos. Este cálculo se realiza irradiando una muestra con un haz de luz láser y analizando las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada por las partículas.

El movimiento browniano es el movimiento de partículas causado por las colisiones aleatorias con moléculas de líquido en que se encuentran suspendidas. Una característica importante del movimiento browniano con respecto a la técnica DLS es que las partículas pequeñas se mueven más rápido que las partículas más grandes. En otras palabras, el coeficiente de difusión traslacional (D) de las partículas

está inversamente relacionado con su tamaño, como lo muestra la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d} \quad [2.1]$$

Donde, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en Kelvin, η es la viscosidad del medio de dispersión y d es el diámetro hidrodinámico de la partícula [14].

La técnica de DLS fue utilizada para determinar los valores de diámetro hidrodinámico (d). Junto con las imágenes SEM, permitió estudiar tanto el tamaño de las partículas individuales y el grado de agregación de los nanoportadores suspendidos en los diferentes medios de estudio. Estas mediciones se realizaron en un equipo Delsa Nano Beckman Coulter, para la obtención de los valores de d se realizaron 50 acumulaciones y 3 repeticiones.

2.3.3 Dispersión de luz electroforética

Para entender la técnica de dispersión de luz electroforética (o ELS por sus siglas en inglés) asociada a las medidas de potencial zeta (ζ), es primordial definir a la doble capa eléctrica. Este concepto se usa para describir la estructura que comprende la región de transición entre dos fases, en este caso sólido/líquido.

Las superficies de la mayoría de las partículas dispersas en un líquido tienen carga positiva o negativa. En la fase líquida, los iones que tienen carga opuesta a la superficie de la partícula se acercan a la superficie y los de la misma carga se alejan, tal como se esquematiza en la figura 2.1.

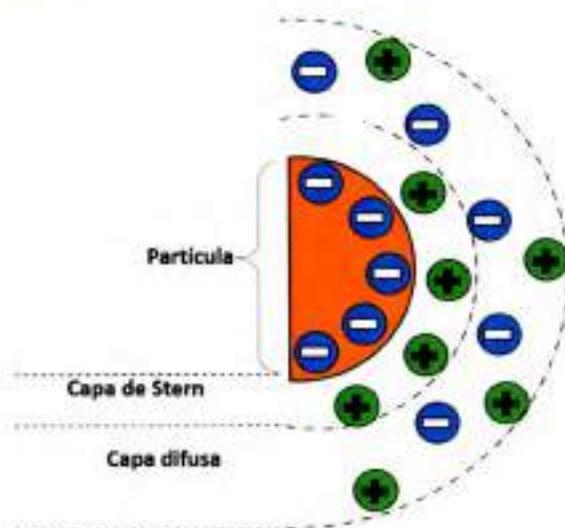


Figura 2.1: Representación esquemática de la doble capa eléctrica, distribución de iones positivos y negativos alrededor de la partícula cargada negativamente.

De acuerdo a este esquema, la concentración de los contraiones es alta en región cercana a la superficie de la partícula y disminuye gradualmente con la distancia. Así, la concentración de iones positivos y negativos confluye a las del seno de la solución lejos de la superficie de la partícula, para mantener la electroneutralidad. Este modelo de distribución de iones se denomina "doble capa eléctrica", que puede dividirse en dos regiones:

- La región de iones cerca de la superficie de la partícula se denomina "Capa de Stern", en la cual los iones de carga opuesta están fuertemente atraídos por la superficie. En esta región, la caída de potencial eléctrico es lineal con la distancia desde la superficie hacia el seno de la solución.

- La región externa a la capa de Stern se denomina "capa de Gouy-Chapman" o "capa difusa". El espesor de esta capa depende de la fuerza iónica y la caída del potencial eléctrico tiene forma exponencial [15].

Descripta la doble capa eléctrica, se define ζ como equivalente al potencial eléctrico en el punto donde se unen las capas de Stern y la difusa [16]. Cuando se aplica un campo eléctrico a la suspensión, las partículas cargadas se mueven hacia el electrodo opuesto a su carga. La velocidad de este movimiento (movilidad electroforética, μ_e) es proporcional al valor de ζ , de acuerdo a la ecuación de Smoluchowski (válida para fuerzas iónicas relativamente altas y suspensiones monodispersas):

$$\mu_e = \frac{\epsilon\epsilon_0}{\eta} \zeta \quad [2.2]$$

Donde, ϵ y ϵ_0 representan la constante dieléctrica del agua y del vacío respectivamente y η la viscosidad del medio. Esta ecuación permite determinar el valor de ζ en distintas condiciones. La ELS es el método más frecuentemente utilizado para determinar la movilidad electroforética de las partículas suspendidas en solución acuosa. Para determinar la velocidad del movimiento de las partículas, estas se irradian con luz láser, y se detecta la luz dispersada por las partículas. Debido al efecto Doppler, la frecuencia de la luz dispersada se desplaza respecto a la de la luz incidente. Esta variación depende de la velocidad del movimiento de las partículas, lo que permite determinar la movilidad electroforética de las partículas y el potencial zeta (ζ).

Cuando se desea determinar el valor del ζ en superficies sólidas macroscópicas se utilizan medidas de streaming potential. Esta es una



técnica electrocinética que consiste en medir la diferencia de potencial eléctrico, producida en la superficie sólida, cuando se fuerza por medio de presión hidráulica a pasar una solución de electrolito con carga neta a través del sólido [17].

La ELS se empleó para determinar los valores de ζ de los LDHs sintetizados. Estas mediciones se realizaron en un equipo Delsa Nano Beckman Coulter, en el que los valores de ζ se obtuvieron mediante 3 repeticiones. Por otra parte, se determinó el valor del ζ de la hidroxiapatita mediante medidas de streaming potential en un analizador electrocinético SurPASS 3 (Anton Paar).

2.4 Análisis de composición de la corona proteica

Los nanoportadores recién sintetizados presentan determinadas propiedades fisicoquímicas que engloban su identidad sintética. Sin embargo, una vez que este nanoportador esté en contacto con fluidos biológicos es cubierto por biomoléculas que forman una corona proteica. Las características fisicoquímicas que presentaba el nanoportador, cambiaron y ahora están determinadas por dicha corona proteica que además define la identidad biológica del nanoportador [18].

La caracterización de la corona proteica permite comprender la interacción entre el nanoportador y los sistemas biológicos. Con este propósito, se utilizó un enfoque proteómico para identificar las moléculas de la corona proteica mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Además, mediante una herramienta bioinformática se estudió la interacción proteína-proteína.

2.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. Esta técnica se basa en la separación de moléculas en función de su carga eléctrica, de acuerdo a su movilidad electroforética. La movilidad electroforética se define como la velocidad de desplazamiento por unidad de campo eléctrico. En unas condiciones determinadas de electroforesis, la diferente movilidad de cada molécula define su comportamiento y separación en el espacio. Es decir, cada molécula tendrá su respectiva movilidad electroforética en un medio determinado.

La electroforesis se lleva a cabo sobre un soporte inerte, generalmente sobre geles de poliacrilamida (PAGE). Cuando la electroforesis se lleva a cabo en presencia de un agente desnaturizante, como el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), se denomina SDS-PAGE. En este caso el SDS se une a las proteínas, rompiendo interacciones hidrofóbicas produciendo su desnaturización. Las proteínas desnaturizadas de la muestra adoptarán una estructura en forma de bastoncillo con una serie de moléculas de SDS cargadas negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. La carga original de la molécula está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto, se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular [19].

Esta técnica se empleó para realizar la separación de las proteínas que formaron la corona proteica de los nanoLDH y nanoLDH@Ris. Las



electroforesis se llevaron a cabo en un gel de SDS-poliacrilamida al 6%, durante 2 minutos a 200 V. El colorante empleado fue azul brillante de Coomassie G-250. El equipo utilizado fue Mini-PROTEAN (Bio-Rad).

2.4.2 Cromatografía líquida-espectrometría de masas

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), ofrece una poderosa técnica analítica que combina la cromatografía de líquidos como técnica de separación, y la espectrometría de masas como técnica de detección, identificación y cuantificación.

Luego de separar los componentes de la muestra por HPLC, pasan al espectrómetro de masas, a través de una interfaz, donde son ionizados. Los equipos de LC-MS pueden tener dos tipos distintos de interfaces que se incluyen dentro de la denominada ionización a presión atmosférica (API): electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI). Los iones generados en la interface son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga [m/z] mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados [20].

Esta técnica se utilizó para la separación e identificación de las proteínas que formaron la corona proteica de los nanoLDH y nanoLDH@Ris. Las muestras se analizaron mediante nanoLC-MS/MS en un espectrómetro de masas Thermo Scientific Q-Exactive y se ionizaron por electrospray con EASY-

SPRAY. La identificación de las proteínas se realizó mediante el software ProteomeDiscoverer 1.4 (Thermo Scientific).

Estos análisis se realizaron mediante un servicio prestado por el Sistema Nacional de Espectrometría de Masa en CEQUIBIEM-UBA.

2.4.3 Interacción proteína-proteína

Se ha establecido que la formación de la corona proteica en los nanoportadores está mediada por interacciones físicas no específicas como Vander Waals, electrostática, entre otras. Sin embargo, las interacciones proteína-proteína (PPI) involucran dominios que reconocen específicamente secuencias en otro polipéptido. Así, la PPI también juega un papel importante en la determinación de la composición de la corona proteica [18]. Además, Las PPI permiten analizar un fenómeno biológico en conjunto del total de sus componentes con propiedades del sistema dadas y las interacciones entre ellos. La comprensión de las interacciones que una proteína tiene con las moléculas de su entorno, es fundamental para una plena comprensión de los procesos en los que dicha proteína está involucrada, así como de los mecanismos por los cuales se regula [21].

Mediante una herramienta bioinformática como STRING es posible construir dichas redes de interacción. Los parámetros estadísticos que caracterizan a la red incluyen: el número de nodos e interacciones, el grado promedio de los nodos (representa cuántas interacciones tiene una proteína en promedio en la red), el coeficiente de agrupamiento (mide la conexión de los nodos en la red), el número esperado de interacciones (indica el número de interacciones que se esperan si los nodos se seleccionaron al azar) y el enriquecimiento PPI p-valor (indica si los nodos no son aleatorios y que el número observado de interacciones es significativo)[18].



Una vez identificadas las proteínas presentes en la corona de los nanoLDH y nanoLDH@RiS y el origen de estas. Mediante la herramienta bioinformática STRING (herramienta de búsqueda para la recuperación de genes / proteínas interactivas) ([http:// string-db.org/](http://string-db.org/)) se construyeron las redes PPI de estas proteínas.

2.5 Referencias bibliográficas

- [1] M. Thompson, "AMC Technical Briefs," *R. Soc. Chem.*, vol. 7, no. 29, pp. 1–2, 2010.
- [2] A. F. LAGALANTE, "Atomic Absorption Spectroscopy: A Tutorial Review *," *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 34, no. 3, pp. 173–189, 2004.
- [3] P. D. Ngo, "Energy Dispersive Spectroscopy," *Fail. Anal. Integr. Circuits*, pp. 205–215, 1999.
- [4] R. B. Prime, H. E. Bair, S. Vyazovkin, P. K. Gallagher, and A. Riga, "Thermogravimetric Analysis (TGA)," *Therm. Anal. Polym. Fundam. Appl.*, pp. 241–317, 2008.
- [5] S. Z. Lewin, "Chemical Instrumentation," *J. Chem. Educ.*, vol. 40, no. 2, pp. A87–A116, 1963.
- [6] M. Wagner, "Thermogravimetric Analysis," *Therm. Anal. Pract.*, vol. 1, no. 906, pp. 162–186, 2017.
- [7] D. A. Skoog, F. J. Holler, and T. A. Nieman, "Química electroanalítica," *Principios de Análisis Instrumental*. pp. 607–843, 2001.
- [8] D. Louër, "Powder X-Ray Diffraction, Applications," *Encycl. Spectrosc. Spectrom.*, pp. 723–731, 2017.
- [9] V. Rives (Ed.), *Layered double hydroxides: present and future - Nova Science Publishers, Inc.*, New York, IX+439 pp, 2001.
- [10] D. R. Martínez and G. G. Carbajal, "Hidróxidos dobles laminares: Arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología," *Av. en Quim.*, vol. 7, no. 1, pp. 87–99, 2012.
- [11] Faraldos, M., Goberna, C., Eds, "TECNICAS DE ANALISIS Y CARACTERIZACION DE MATERIALES," CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, Madrid, 2011.

- 
- [12] M. D. A. Pereira-da-silva and F. A. Ferri, *Scanning Electron Microscopy*, Elsevier Inc., 2017.
- [13] M. V. O. H. Prieto, "Aportes de la Microscopía Electrónica de Barrido a la Parasitología Veterinaria," pp. 10–27, 1996.
- [14] Ramos, A. P. Dynamic Light Hamburan Terapan Untuk Nano Partikel Karakterisasi. In *Nanocharacterization Techniques*; Elsevier Inc., pp 99–110, 2017.
- [15] D. C. Grahame, "The electrical double layer and the theory of electrocapillarity," *Chem. Rev.*, vol. 41, no. 3, pp. 441–501, 1947.
- [16] J. Batalla Mayoral, A. Cuadros Moreno, and E. San Martín-Martínez, "Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas," *Lat. Am. J. Phys. Educ*, vol. 8, no. 4, pp. 43191–6, 2014.
- [17] Oatley-Radcliffe, D. L.; Aljohani, N.; Williams, P. M.; Hilal, N. Electrokinetic Phenomena for Membrane Charge. In *Membrane Characterization*; Elsevier B.V., pp 405–422, 2017.
- [18] C. Vasti, L. V. Bonnet, M. R. Galiano, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Relevance of protein–protein interactions on the biological identity of nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 166, pp. 330–338, 2018.
- [19] H. M. G. Pérez, "Electroforesis en geles de poliacrilamida : fundamentos , actualidad e importancia," *Univ Diag*, vol. 1, no. 2, pp. 31–41, 2000.
- [20] O. Quintela, A. Cruz, M. Concheiro, and D. C. A. L. M, "Metodología LC – MS . Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología," *Medicina (B. Aires)*., pp. 7–14, 2005.
- [21] A. P. Martha Lucía Cervantes Henríquez, Pedro Puentes Rozo and Cognitiva, *Modelo de la red de interacción proteína-proteína del gen DAT1/SLC6A3 en relación al trastorno por déficit de atención e hiperactividad en humanos*. 2014.



Capítulo 3
nanoLDH y nanoLDH@Ris

Capítulo 3: nanoLDH y nanoLDH@Ris

3.1 Introducción

En los últimos años, ha habido un gran interés en el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos usando nanomateriales, esto se debe principalmente a que sus características como tamaño, forma, composición y propiedades de superficie se pueden controlar durante el proceso de síntesis [1]. La funcionalidad superficial juega el rol más importante, ya que los sitios superficiales de los nanoportadores de fármacos, se pueden unir con gran variedad de compuestos y así otorgar diferentes propiedades según los requerimientos [2, 3]. Por ejemplo, se pueden unir con determinados ligandos para dar especificidad hacia al tejido celular deseado, con ciertas moléculas que permite que los nanoportadores sean sensibles a diferentes estímulos, como temperatura, pH, fuerza iónica, luz, campos magnéticos, etc. [4-6], o incluso para mejorar su biocompatibilidad y así aumentar los tiempos de circulación en sangre [7].

Específicamente, en los LDHs se ha estudiado la intercalación de varios fármacos: antiinflamatorios [8], antimicrobianos [9], anticancerígenos [10, 11], entre otros [12], o biomoléculas como ácidos nucleicos [13, 14]. Igualmente, se ha estudiado la funcionalización de su superficie, se han unido diferentes moléculas a los LDHs como: agentes de contraste para hacer estudios de biodistribución [15], polímeros como ácido poli-(láctico-co-glicólico) (PLGA) o acrilato de dimetilaminoetiló DMAEMA para aumentar la biocompatibilidad de los nanoportadores [16, 17], también se han funcionalizado con moléculas para producir la especificidad hacia determinadas células [18]. Oh y colaboradores realizaron la funcionalización con ácido fólico para aumentar la internalización de los LDHs por células tumorales con sobreexpresión de los receptores de folato [19].



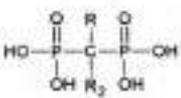
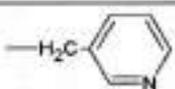
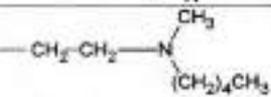
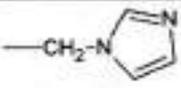
Además, se ha reportado la funcionalización con albúmina [20, 21], poliacrilato [22] y polietilenglicol [23, 24] para mejorar la estabilidad coloidal de los LDHs.

Tanto la especificidad hacia tejido óseo (osteoespecificidad), como la internalización celular eficiente de los fármacos, son dos desafíos para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas, como la osteoporosis o el cáncer de hueso. Se han diseñado varios agentes terapéuticos para este fin, pero la mayoría de ellos presentan baja o insignificante distribución específica en el tejido óseo, lo que resulta en una alta toxicidad y problemas para el paciente [25]. La liberación sitio-específica de estos fármacos brindaría nanoterapias óseas más eficientes y seguras [26]. Para esto, se pretende funcionalizar a los nanoportadores con moléculas que brinden osteoespecificidad como son los bifosfonatos (BPs).

Los BPs son una familia de fármacos ampliamente usada en el tratamiento de diversas enfermedades que afectan el sistema óseo, incluida la osteoporosis, metástasis ósea, la enfermedad de Paget, entre otras. Sus propiedades farmacológicas específicas incluyen la captación selectiva en tejido óseo y la supresión de la resorción ósea mediada por osteoclastos [27, 28]. Los BPs son análogos estables del pirofosfato natural, estos contienen dos grupos fosfonato unidos a un solo átomo de carbono, para dar una estructura P-C-P, donde el carbono central puede ser modificado por diferentes sustituyentes (ver tabla 3.1). Dentro de los bifosfonatos, los antiresortivos más potentes son aquellos que contienen un anillo heterociclo nitrogenado como sustituyente (por ejemplo, risedronato y zoledronato). La estructura central P-C-P es la responsable de la fuerte afinidad de los BPs por el tejido óseo [29, 30], los átomos de oxígeno presentes en los grupos fosfatos pueden unirse simultáneamente con más de un sitio de calcio en la hidroxiapatita, mineral constituyente del tejido óseo [31].

Debido a la alta afinidad que presentan los BPs por la hidroxiapatita, se ha intentado conjugarlos con los sistemas de administración de fármacos y así brindarles osteoespecificidad, para aumentar la efectividad y disminuir los efectos adversos que puedan causar estos tratamientos [32]. Esta estrategia ha sido utilizada en sistemas poliméricos [33], en nanopartículas de fosfato de calcio y nanopartículas metálicas [34]. Dentro de la familia de los bifosfonatos se encuentra el risedronato (Ris), un bifosfonato de tercera generación, cuyo potencial de inhibición de la resorción ósea es diez veces mayor que el del alendronato o demás BPs de segunda generación [31]. Uno de los objetivos específicos de esta tesis doctoral es "sintetizar y caracterizar nanoportadores basados en LDHs (nanoLDH) funcionalizados con Ris (nanoLDH@Ris) para la administración sitio-específica en tejidos óseos". Previamente se han reportado estudios de la intercalación de BPs como alendronato [35] y ácido etidróico [36] en los LDHs. Sin embargo, no se encontraron estudios sobre la funcionalización de los LDHs con BPs.

Tabla 3.1. Estructura química de los bifosfonatos y sus respectivos sustituyentes.

| | Bifosfonatos | R₁ | R₂ |
|---|---------------------|----------------------|--|
|  <p>Estructura general de los bifosfonatos</p> | Clodronato | -Cl | -Cl |
| | Etidronato | -OH | -CH ₃ |
| | Risedronato | -OH |  |
| | Ibandronato | -OH |  |
| | Alendronato | -OH | -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ |
| | Zoledronate | -OH |  |

En la figura 3.1 se presenta la estructura del ácido risedrónico (H_5Ris^+) y sus equilibrios ácido base. Debido a su naturaleza poliprótica, el Ris puede disociar hasta cinco protones a medida que el pH aumenta, cuatro protones de los grupos P-OH y un protón unido al átomo de nitrógeno del anillo piridínico [37, 31].

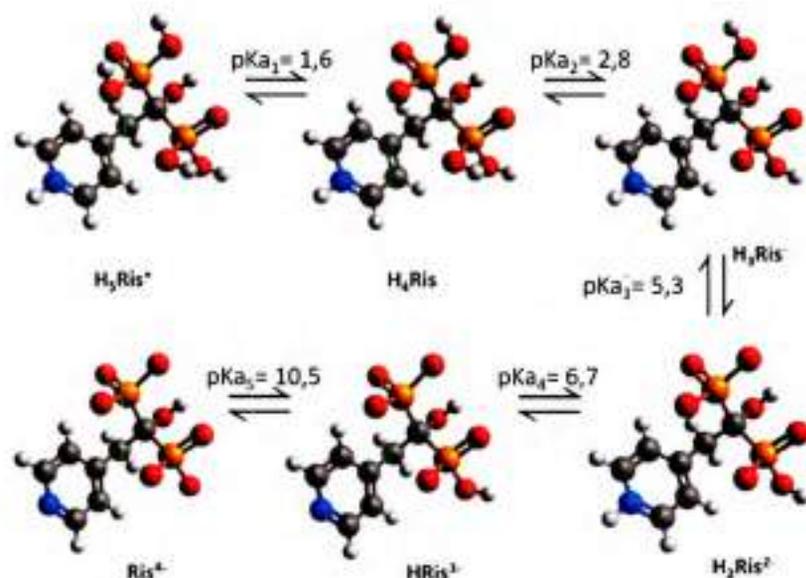


Figura 3.1: Estructura química y equilibrios ácido-base del risedronato.

La rica reactividad ácido-base que posee el Ris, además de brindar osteoespecificidad, permitiría obtener nanoLDH sensibles al pH. Modular la respuesta frente al pH de los nanoportadores es una de las estrategias más utilizadas en la vehiculización de fármacos hacia células tumorales.

El pH extracelular de los tejidos normales, además del pH de la sangre es de 7,4, mientras que el pH intracelular es de 7,2. Sin embargo, en la mayoría de los tumores el pH puede variar entre un rango de 5,7 a 7,8, dependiendo de la histología y el volumen del tumor. Se ha demostrado que

cuando los nanoportadores se combinan con mecanismos de liberación activados por acidez endosomal o lisosomal, estos son más eficientes y logran superar la resistencia a múltiples fármacos que presentan algunos tumores [38, 39].

Por lo tanto, la funcionalización con Ris puede proporcionar nanoLDH con especificidad hacia tumores óseos.

En este capítulo, se presenta la síntesis de nanoportadores basados en LDH (nanoLDH) y su funcionalización con Ris (nanoLDH@Ris) para inducir la osteoespecificidad de los nanoportadores sin alterar su tamaño nanométrico. Por una parte, se estudiará la distribución de tamaños de las dispersiones, tanto de los nanoLDH, como los nanoLDH@Ris en diferentes condiciones de relevancia fisiológica. Por otra parte, se estudiará la estabilidad de la funcionalización frente a la desorción en estas condiciones. Finalmente, se corroborará la osteoespecificidad que tienen los nanoLDH@Ris por la hidroxiapatita (Hap).

3.2 Metodología experimental

3.2.1 Síntesis de nanoLDH

Se determinaron las condiciones óptimas para preparar nanoLDH de magnesio y aluminio intercalados con cloruro. Con este propósito, se sintetizaron LDHs por coprecipitación a pH constante en diferentes condiciones, de tal manera que fuera posible estudiar variables de síntesis, tales como la relación Mg/Al, el pH y la concentración de estos cationes (ver tabla 3.2).

Tabla 3.2. Condiciones de síntesis para preparar nanoLDHs.

| LDH | Mg/Al | pH | [Al] (mol/L) |
|-----|-------|-----|--------------|
| I | 2:1 | 8,0 | 0,2 |
| II | 3:1 | 8,0 | 0,2 |
| III | 3:1 | 9,0 | 0,2 |
| IV | 4:1 | 8,0 | 0,2 |
| V | 3:1 | 9,0 | 0,6 |

Las condiciones óptimas de síntesis se establecieron en función de lograr: a) una única fase de LDH (se comprobó mediante difracción de rayos X), b) partículas monodispersas, con diámetro hidrodinámico aparente (d) de alrededor de 100 nm (se comprobó mediante DLS) y c) potencial zeta (ζ) mayores a 30 mV (se comprobó mediante determinaciones de ELS). Las condiciones que cumplieron con las anteriores especificaciones son las empleadas en la síntesis general que se describe a continuación en la figura 3.2.

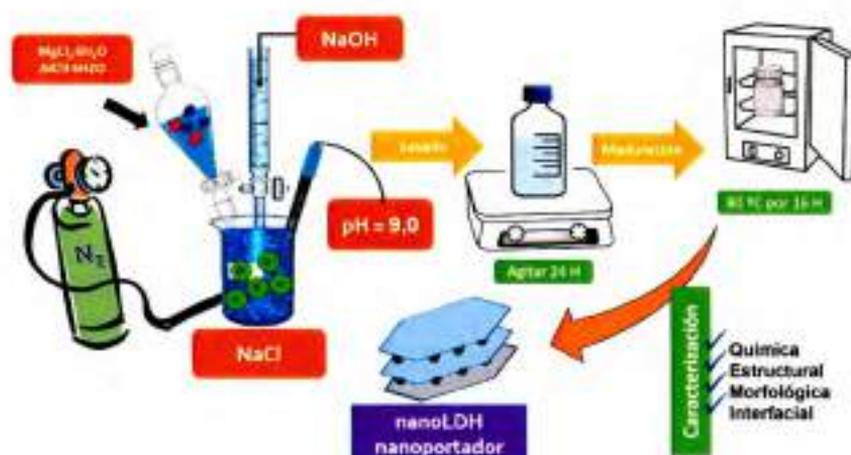


Figura 3.2: Esquema de síntesis de nanoLDH.

Se tomaron 0,1L de una solución conteniendo a los cationes metálicos ($MgCl_2$ y $AlCl_3$) y se agregaron gota a gota a 0,2 L de una solución de $NaCl$ 4,0 M manteniendo el pH constante por la adición controlada de $NaOH$ 2,0 M. La síntesis se realizó en flujo continuo de N_2 para evitar la contaminación con carbonatos por la presencia del CO_2 de la atmósfera. Una vez sintetizados los LDHs se agitaron las suspensiones por una hora. El sólido fue separado del agua de síntesis mediante centrifugación, se lavó dos veces y se dispersó, estos procesos se realizaron con agua descarbonatada. La dispersión de LDH se dejó en agitación toda la noche y se realizó su maduración bajo condiciones hidrotermales (a $80\text{ }^\circ\text{C}$ por 16 horas) [40].

Se determinaron los valores de d y ζ de las partículas en suspensión durante los diferentes pasos del proceso de síntesis, así como la composición química, la caracterización estructural y morfológica de la muestra sólida final liofilizada.

3.2.2 Preparación de nanoLDH@Ris

Se estudiaron distintas estrategias para preparar nanoLDH funcionalizados con Ris; es decir, nanopartículas con una máxima adsorción y mínima intercalación de Ris, sin perder su tamaño nanométrico (nanoLDH@Ris).

3.2.2.1 Síntesis por coprecipitación a pH constante

Esta síntesis se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el ítem **3.2.1**, reemplazando la solución de NaCl por una solución de Ris 0,023M. Se determinaron los valores de d y ζ y la composición química de las partículas obtenidas (LDH-Ris).

3.2.2.2 Funcionalización de nanoLDH con Ris

La funcionalización de los nanoLDH se realizó empleando la síntesis por intercambio aniónico. Para elegir las condiciones adecuadas de síntesis, primero, se realizó el estudio de la interacción de Ris con nanoLDH. Con este objetivo, se utilizó una dispersión de 1,0 g/L de nanoLDH con concentraciones crecientes (0,1- 6,0 mM) de Ris a pH 9,0 y se equilibró durante 24 horas. La dispersión resultante se centrifugó y filtró. El sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de Ris libre mediante espectrofotometría UV-Vis a 262 nm y por diferencia calcular la cantidad de Ris incorporado (Γ_{Ris} , g/ g). Asimismo, se determinaron los valores de d y ζ de las partículas en suspensión. Finalmente, una parte de las muestras fueron liofilizadas para obtener los patrones de DRX.

De acuerdo a los resultados del experimento anterior, se eligieron las condiciones óptimas para realizar la funcionalización: se agregó 0,1 L de solución de Ris [0,021M a pH 9,0] a 1,0 L de dispersión de nanoLDH (5,7 g/L) y se equilibró durante

24 horas. Finalmente, se determinó la composición química y se realizó la caracterización estructural, morfológica e interfacial de la muestra final (ver figura 3.3) [41].



Figura 3.3: Esquema de preparación de nanoLDH@Ris.

3.2.3 Caracterización

La caracterización química, estructural, morfológica e interfacial de los nanoportadores se realizó como se describe en el capítulo 2.

3.2.4 Estabilidad de la funcionalización y tamaño en condiciones de relevancia fisiológica

Se determinó la estabilidad de la funcionalización, mediante el estudio de la desorción de Ris adsorbido sobre nanoLDH@Ris a diferentes condiciones de concentración de los nanoportadores funcionalizados, la fuerza iónica y el pH. Para estos experimentos, se determinó el porcentaje de Ris desorbido (% Ris) mediante espectrofotometría UV-Vis, empleando la ecuación 3.1.

$$\%Ris = \frac{M_{Ris,des}}{M_{Ris,ads}} \times 100 \quad [3.1]$$

Donde $M_{Ris,ads}$ es la cantidad de Ris, expresada en molaridad, presente en los nanoLDH@Ris inicialmente y $M_{Ris,des}$ es la diferencia entre $M_{Ris,ads}$ y $M_{Ris,eq}$, la cantidad de Ris presente en el sobrenadante después de equilibrar los nanoLDH@Ris en cada condición. Es decir:

$$M_{Ris,des} = M_{Ris,ads} - M_{Ris,eq} \quad [3.2]$$

Además, se determinaron los valores de d y de ζ de las dispersiones tanto de los nanoLDH como los nanoLDH@Ris en estas condiciones.

3.2.4.1 Efecto de la concentración

Se estudió el efecto de la concentración de los nanoLDH@Ris sobre la estabilidad de la funcionalización. Además, se evaluó el efecto de la concentración en los tamaños y potenciales zeta de las dispersiones tanto de los nanoLDH como los nanoLDH@Ris. Se realizaron diluciones en agua de las dispersiones de nanoLDH y nanoLDH@Ris (3 g/L hasta 0,05 g/L). Después de equilibrar toda la noche se determinó el pH y los valores de d , ζ y $M_{Ris,des}$, expresado como %Ris.

3.2.4.2 Efecto de la fuerza iónica

Se evaluó el efecto de la incorporación de electrolitos como el Na^+ y Cl^- en el medio de los nanoLDH@Ris sobre la estabilidad de la funcionalización. Además, se evaluó el efecto en los valores de d y ζ de las dispersiones tanto de los nanoLDH como los nanoLDH@Ris. Se utilizaron dispersiones 1,0 g/L de nanoLDH y nanoLDH@Ris

con concentraciones crecientes de NaCl (0 - 250 mM). Después de equilibrar toda la noche se determinó el pH y los valores de d , ζ y $M_{Ris,des.}$ expresado como %Ris.

3.2.4.3 Efecto del pH

Para estudiar el efecto del pH sobre la estabilidad de la funcionalización y en los valores de d y ζ de las dispersiones tanto de los nanoLDH como los nanoLDH@Ris se realizaron dos experimentos.

Por una parte, se evaluó el comportamiento de la funcionalización de los nanoLDH@Ris frente al pH. Se realizaron dispersiones 1,0 g/L de nanoLDH y nanoLDH@Ris con concentraciones crecientes de HCl (0 - 40 mM). Después de equilibrar toda la noche, se determinó el pH y los valores de d , ζ y $M_{Ris,des.}$ expresado como %Ris.

Por otra parte, se estudió la estabilidad de la funcionalización a valores de pH de relevancia fisiológica mediante cinéticas de desorción en buffer fosfato (pH 7,4) y buffer acetato (pH 4,7). El primer medio se utilizó con el fin de reproducir el pH del plasma sanguíneo en presencia de iones fosfato, un anión con una alta afinidad por los LDH [42]. El segundo medio presenta un pH ácido que se ha asociado al pH de las organelas de las células, como el endosoma temprano, lisosoma y mitocondria [43]. Se emplearon dispersiones de 0,5 g/L de nanoLDH@Ris en buffer fosfato (0,05 M a pH 7,4) y buffer acetato (0,05 M a pH 4,7), se dejaron en agitación por 8 horas. Cada cierto tiempo se sacaron muestras que se centrifugaron y filtraron para determinar la cantidad de Ris desorbido en función del tiempo.

3.2.5 Especificidad por hidroxiapatita

Para evaluar la especificidad que tienen los nanoLDH@Ris por la Hap, se determinó la capacidad de unión de los nanoLDH@Ris con los iones Ca^{2+} , ya sea en solución o como parte de la Hap.

En primer lugar, se utilizó una dispersión 1,0 g/L de nanoLDH@Ris con concentraciones crecientes de CaCl_2 (0 – 3 mM) a pH 9,0. Después de equilibrar por 24 horas se determinó el pH y los valores de d , ζ y $M_{\text{rel. des.}}$, expresado como %Ris.

En segundo lugar, se evaluó la afinidad de los nanoLDH y los nanoLDH@Ris por la Hap, realizando medidas continuas de streaming potential. Primero, se determinó el valor de ζ de la Hap. Con este propósito, se intercaló Hap en polvo entre dos membranas, utilizando una solución de KCl 0,5 M como electrolito de medida. Posteriormente, se hicieron pasar dispersiones de nanoLDH y nanoLDH@Ris de 1,0 g/L a través de la muestra de Hap y se midieron los correspondientes valores de ζ .

Finalmente, se tomaron micrografías SEM de la Hap en contacto con los nanoLDH y los nanoLDH@Ris. Para esto, se prepararon tres pastillas de Hap, por compresión. Uno de ellas, se sumergió en una dispersión de 1,0 g/L de nanoLDH y otra en una dispersión de 1,0 g/L de nanoLDH@Ris. Luego de 10 segundos de inmersión, se retiraron de las dispersiones y se lavaron cuidadosamente. La tercera pastilla de Hap se reservó como referencia.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Síntesis de nanoLDH

Se sintetizaron LDHs por coprecipitación a pH constante a las diferentes condiciones indicadas en la tabla 3.2 (LDH I-V). En la tabla 3.3 se presentan los valores medidos de d y ζ de estas dispersiones, antes y después del tratamiento hidrotermal (TH).

Tabla 3.3. Valores de d , ζ e índice de polidispersidad (I.P) determinados con los LDHs sintetizados en las diferentes condiciones, antes y después del tratamiento hidrotermal (TH).

| LDH | Sin tratamiento TH | | | Con tratamiento TH | | |
|-----|--------------------------|-----|--------------|--------------------------|-----|--------------|
| | d (nm) | I.P | ζ (mV) | d (nm) | I.P | ζ (mV) |
| I | $(2 \pm 1) \times 10^3$ | 1,0 | 14 ± 2 | 109 ± 1 | 0,1 | 45 ± 3 |
| II | $(7 \pm 2) \times 10^3$ | 1,9 | 13 ± 2 | 119 ± 1 | 0,1 | 57 ± 6 |
| III | $(7 \pm 2) \times 10^3$ | 2,5 | 12 ± 4 | 100 ± 1 | 0,2 | 39 ± 1 |
| IV | $(6 \pm 1) \times 10^3$ | 1,7 | 16 ± 5 | 122 ± 1 | 0,4 | 58 ± 5 |
| V | $(15 \pm 1) \times 10^3$ | 4,6 | 6 ± 8 | $(37 \pm 2) \times 10^1$ | 0,5 | 52 ± 1 |

Se puede observar que los LDHs sintetizados a las diferentes condiciones sufren un cambio drástico en los valores de d y ζ luego de realizar el proceso TH. Los valores de d disminuyen desde el orden de las micras a valores entre los 100 y 300 nm. Además, se observa que el índice de polidispersidad (I.P) y los valores correspondientes a las incertezas también disminuye. Mientras, que los valores de ζ aumentan desde los 10/15 mV hasta valores alrededor de los 50 mV.

Básicamente, durante el TH o proceso de maduración, lo que ocurre es la disolución de los LDHs amorfos, luego se forman nuevamente con una estructura cristalina más definida gracias a las condiciones de presión y temperatura, esto evita la aglomeración de las partículas. Además, el TH permite el crecimiento individual de los cristales, mientras que los cationes metálicos (Mg^{2+} y Al^{3+}) se distribuyen de manera más uniforme en las láminas, dando lugar a LDHs con estructura más cristalina y con mayor carga superficial. Por lo tanto, la repulsión electrostática entre las partículas de LDH es mayor, lo que impide la aglomeración, disminuye la polidispersidad y mantiene la suspensión estable. [44]

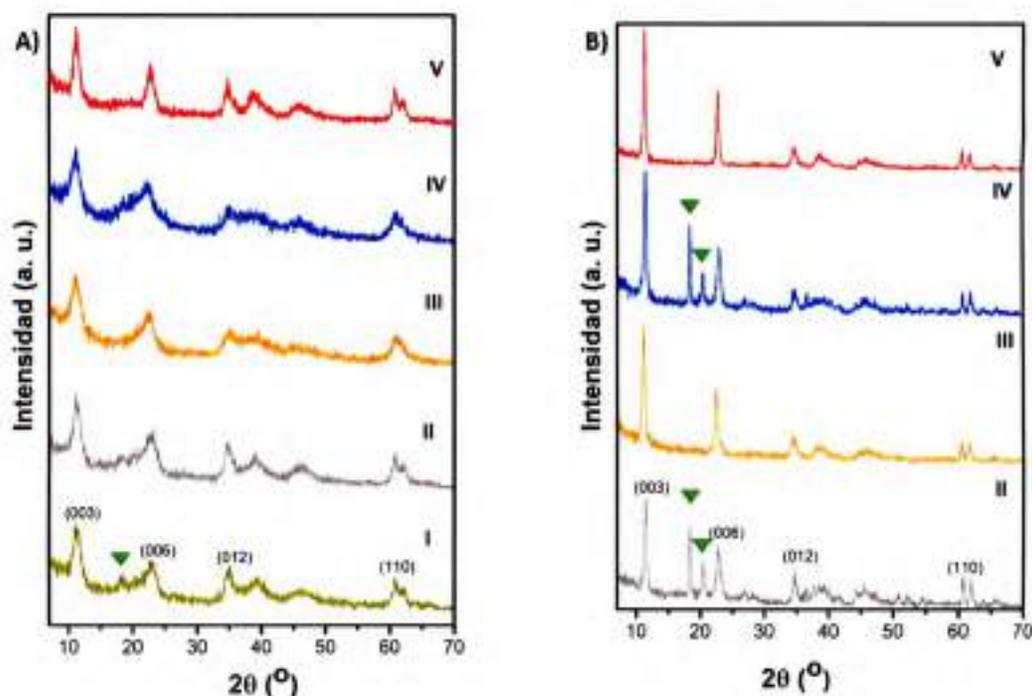


Figura 3.4: Difractogramas de rayos X de las muestras de LDHs sintetizadas a las diferentes condiciones [I-V] (A) antes y (B) después del tratamiento hidrotérmal (TH). ▼ fase no deseada de $MgAl_2(OH)_6$.

En la figura 3.4 se muestran los difractogramas de rayos X antes y después del TH de estos sólidos. Los difractogramas presentan las señales características para los LDHs [45]. Los picos de menor ángulo y mayor intensidad corresponden a las reflexiones armónicas de los planos (003), (006) y (012). La reflexión correspondiente al plano (110) se presenta a mayor ángulo y con menor intensidad. Sin embargo, en los difractogramas correspondientes a los LDHs I (antes del TH) y los LDHs II y IV (después del TH), se observa la presencia de otra fase no deseada de $\text{MgAl}_2(\text{OH})_8$, un hidróxido doble sin estructura laminar (identificado con ▼ en el difractograma).

A partir de estos resultados, se encontró que para obtener una única fase de nanoLDH de tamaño adecuado, la síntesis por coprecipitación se debe realizar a pH 9,0, con una relación 3:1 de Mg/Al y la concentración de Al^{3+} debe ser 0,2 M (LDH III ver tabla 3.2). El pH se debe ajustar a un valor de pH donde la precipitación de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se haya completado. De lo contrario, la disolución parcial de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ durante los pasos de lavado y maduración causa la formación de la fase de $\text{MgAl}_2(\text{OH})_8$ [46].

Así mismo, como muestra la figura 3.5, para lograr partículas monodispersas con tamaños de aproximadamente 100 nm, es necesario realizar 2 lavados con agua, con el fin de disminuir el exceso de NaCl producto de la síntesis. La presencia de NaCl aumenta la fuerza iónica del medio, lo que produce la disminución del espesor de la doble capa eléctrica y la compensación de las cargas que conduce a un aumento de la aglomeración de las partículas, lo que se ve reflejado en la disminución del valor de ζ [47].

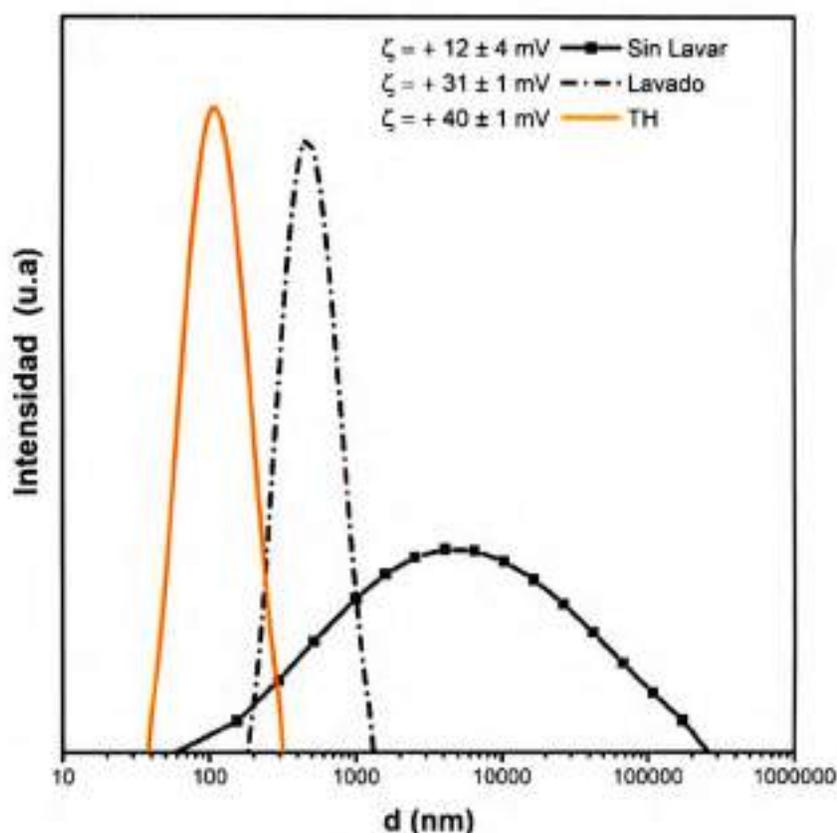


Figura 3.5: Distribución de tamaño y valores de ζ durante los diferentes pasos de la síntesis de nanoLDH (LDH III)

Como se ve en la figura 3.5 los valores de d de los LDHs disminuyeron considerablemente luego del TH. En consecuencia, para obtener nanoLDHs resulta necesario, además de realizar lavados, someter los LDHs a un proceso de maduración.

Por otra parte, el potencial zeta es una manera efectiva de monitorear el comportamiento de la suspensión coloidal. Ya que puede dar una idea de la carga de la partícula y las fuerzas de repulsión entre los coloides [48]. El ordenamiento que se produce en las láminas de LDH después del TH, produce un mayor número de cargas en los bordes, lo que se ve reflejado en el aumento del valor de ζ (40.0 ± 1

mV). De este modo, se genera mayor repulsión entre las partículas y se logran suspensiones con alta estabilidad coloidal. Incluso después de un año, se realizaron medidas de d y ζ y sus valores se mantienen alrededor de 100 nm y 40 mV, respectivamente.

3.3.2 Preparación de nanoLDH@Ris

3.3.2.1 Síntesis por coprecipitación a pH constante

Mediante la síntesis por coprecipitación a pH constante, se obtuvo LDH intercalado con Ris (LDH-Ris), que se utiliza como muestra de referencia en cuanto a composición y estructura con respecto a un LDH con Ris adsorbido (nanoLDH@Ris).

Por este método de síntesis el Ris ocupa el espacio interlaminar y el objetivo es la funcionalización de los nanoLDH, es decir que, el Ris ocupe la superficie de los nanoLDH y el espacio interlaminar esté ocupado por el fármaco que se desee liberar.

3.3.2.2 Funcionalización de nanoLDH con Ris

Las condiciones óptimas para funcionalizar nanoLDH se obtuvieron mediante el estudio de la interacción de Ris con los nanoLDH ya formados.

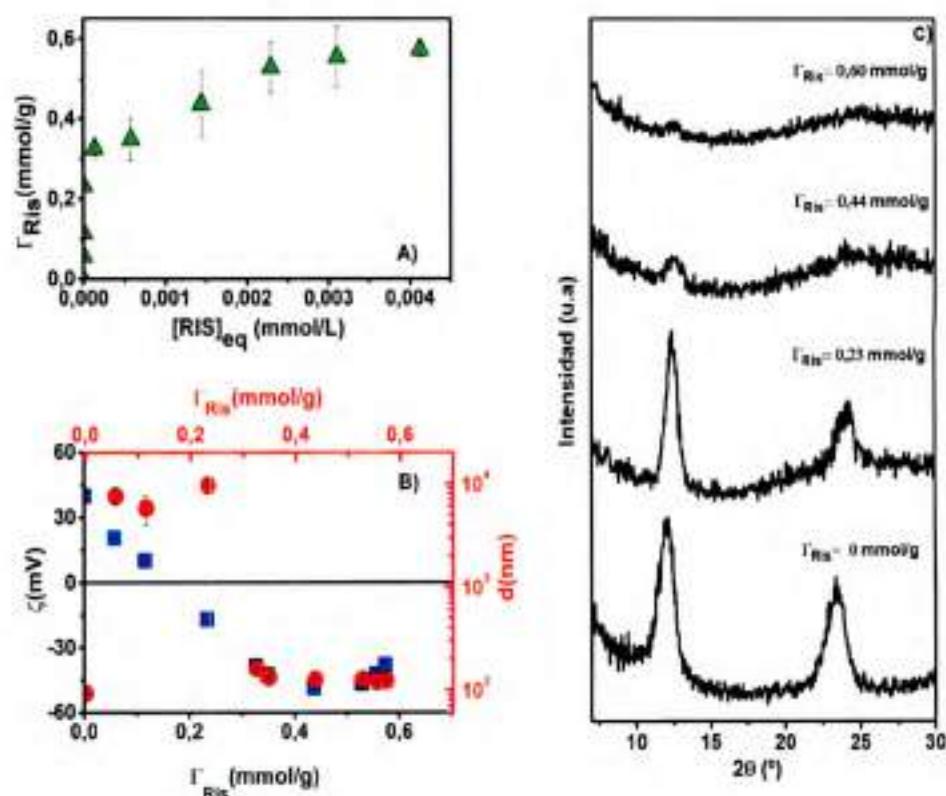


Figura 3.6: (A) Incorporación de Ris a los nanoLDH. Adsorción de Ris (Γ_{Ris}) sobre nanoLDH en función de la concentración en equilibrio de Ris $[Ris]_{eq}$, (B) en el eje de la izquierda ζ (cuadros) y en el eje de la derecha d (círculos) en función de Γ_{Ris} y (C) patrones de DRX de muestras a diferentes valores de Γ_{Ris} .

Se determinó la cantidad de Ris incorporado en función de su concentración en equilibrio ($[Ris]_{eq}$), como se muestra en la figura 3.6 A. Además, se determinaron los valores de d y ζ (figura 3.6 B) y los patrones de DRX (figura 3.6 C) a medida que se incorpora Ris en los nanoLDH.

Para la incorporación de Ris en los nanoLDH, se observa un marcado incremento en Γ_{Ris} a bajas $[Ris]_{eq}$. Este comportamiento indica una alta adsorción de Ris sobre los nanoLDH, y en consecuencia, una gran afinidad del anión por la superficie de los nanoLDH. Para valores de Γ_{Ris} entre 0,3 mmol/g y 0,6 mmol/g se presenta una disminución de la pendiente. Finalmente, para valores de $\Gamma_{Ris} = 0,6$ mmol/g se alcanza un plateau, lo que indica que se produce la saturación de la superficie, por lo que el Ris se incorpora entre las laminas de nanoLDH (figura 3.6 A).

Por otra parte, los patrones de DRX (figura 3.6 C) muestran los picos (001), correspondientes a una fase de LDH intercalada con iones cloruro, bien definidos y con intensidad similar hasta Γ_{Ris} alrededor de 0,3 mmol/g. Sin embargo, la intensidad de las señales disminuye para valores más altos de Γ_{Ris} .

Por último, el incremento de Γ_{Ris} produce cambios tanto en los valores de d como en los de ζ (figura 3.6 B). A medida que aumenta Γ_{Ris} hasta 0,3 mmol/g, se observa una disminución continua en los valores de ζ (de 40 a -40 mV) y luego se alcanza un valor constante. A su vez, los valores de d aumentan desde 100 nm (nanoLDH) hasta unos pocos μm para $\Gamma_{Ris} < 0,3$ mmol/g y disminuyen hasta su valor inicial para mayores Γ_{Ris} .

A partir del estudio de interacción de Ris con los nanoLDH, se puede deducir que a bajas concentraciones de Ris se puede presentar la intercalación, sin

embargo, se favorece la adsorción de Ris sobre los nanoLDH, ya que, el Ris presente se incorpora fácilmente a la superficie de los nanoLDH.

Para valores de $\Gamma_{\text{Ris}} > 0,3 \text{ mmol/g}$ la repulsión electrostática entre los aniones Ris presentes en la superficie incrementa y se ve favorecida la intercalación entre las laminas de nanoLDH. Este hecho se ve reflejado en la disminución de la intensidad del pico (001). Además, disminuye la pendiente de Γ_{Ris} vs. $[\text{Ris}]_{\text{eq}}$ y no varían los valores de ζ .

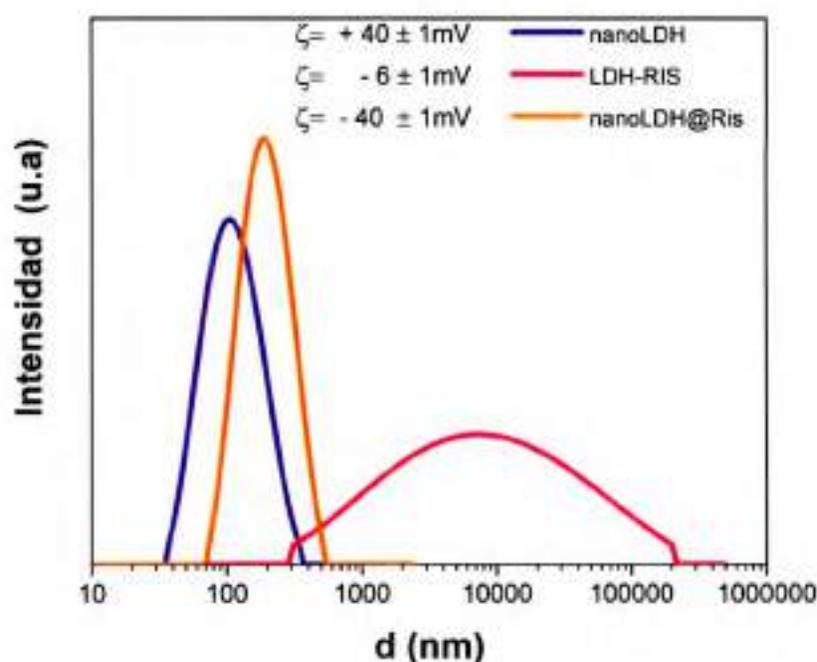


Figura 3.7: Distribución de tamaño y valores de ζ de nanoLDH, nanoLDH@Ris y LDH-Ris.

En la figura 3.7 se presentan las distribuciones de tamaños y los valores de ζ correspondientes a los nanoLDH, nanoLDH@Ris (funcionalizado) y LDH-Ris (intercalado).

Se puede decir que, para lograr la funcionalización sin perder las características de los nanoLDH, esta se debe realizar de tal forma que se presente la máxima adsorción y la mínima intercalación de Ris. Las condiciones óptimas encontradas fueron para valores de $\Gamma_{\text{Ris}} = 0,4$ mmol/g. Donde los nanoLDH@Ris presentan tamaño similar a los nanoLDH, alrededor de los 100 nm y $\zeta = -40 \pm 1$ mV.

3.3.3 Caracterización

Una vez obtenidos tanto los nanoLDH como los nanoLDH@Ris, se utilizaron diversas técnicas para realizar el estudio comparativo de su composición, estructura y morfología.

Se realizó el estudio de la muestra LDH-Ris, usada a modo de referencia y así comparar la diferencia entre un LDH con su superficie funcionalizada (nanoLDH@Ris) y uno con el anión mayoritariamente intercalado (LDH-Ris).

Mediante espectroscopia Raman se logró identificar y caracterizar la especie adsorbida en los nanoLDH@Ris. Con este fin, como se muestra en la figura 3.8, se determinaron las bandas características asociadas al Ris libre y al Ris presente en los LDHs. Para el primer caso, se tomaron los espectros del fármaco comercial (risedronato sódico hemipentahidratado) a distintos valores de pH. Por otro lado, se tomaron los espectros de LDH-Ris y de nanoLDH@Ris.

Los espectros de las especies H_3Ris^- (pH 4,2) y HRis^{3-} (pH 9,0), representados en la figura 3.8 como la sal NaH_2Ris y Na_2HRis respectivamente, presentan las bandas características de los grupos fosfonatos en el intervalo de $850\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ y $1150\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ [49].

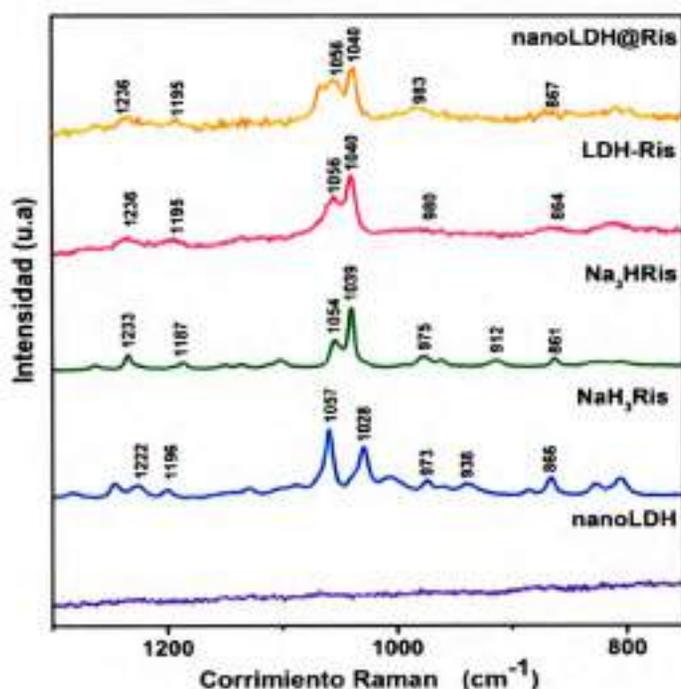


Figura 3.8: Espectros Raman de las sales de risedronato, nanoLDH y nanoLDH@Ris.

Para el espectro de la especie NaH_2Ris se observan las bandas correspondientes a los grupos fosfonatos a 861 cm^{-1} , 938 cm^{-1} , 937 cm^{-1} , 1196 cm^{-1} y 1222 cm^{-1} [49]. Estas bandas presentan un corrimiento en los espectros tanto de la especie Na_2HRis como de nanoLDH@Ris y LDH-Ris. Por un lado, ocurre la deprotonación de los grupos P-OH a pH 9,0. Por otra parte, alguna/s de la/s especie/s aniónica/s de Ris interacciona/n con las láminas de estos sólidos.

Sin embargo, la diferencia más marcada entre los espectros se observa en la región de $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$, donde se encuentran las bandas características del anillo

piridínico [50][51]. El espectro de la especie NaH_3Ris presenta dos bandas intensas a 1057 cm^{-1} y 1028 cm^{-1} , asociadas a la deformación del anillo piridínico, la primera más intensa que la segunda. Para el espectro de la especie Na_3HRis se observa un desplazamiento de estas bandas a 1054 cm^{-1} y 1039 cm^{-1} , respectivamente. Además, la intensidad de estas bandas se invierte, lo que sugiere un cambio a nivel estructural del Ris en función del pH de la solución, posiblemente ocasionado como consecuencia de la pérdida del protón ubicado en N del anillo piridínico.

El espectro de nanoLDH no presenta bandas características en la región espectral estudiada. Por el contrario, los espectros de nanoLDH@Ris y LDH-Ris fueron similares al espectro de la especie Na_3HRis , lo que indica que este el anión HRis^{3-} interactúa con los LDHs. Es importante recordar que este anión (figura 3.1) es la especie presente en las condiciones de funcionalización de los nanoLDH y de la síntesis de LDH-Ris (pH 9,0).

Por otra parte, se realizó el análisis termogravimétrico de los nanoportadores, los nanoLDH y los nanoLDH@Ris. Las curvas de TGA, fueron de utilidad para determinar la composición de las muestras, mientras que las curvas de DTA se emplearon para identificar los procesos involucrados en la degradación térmica de los nanoLDH y los nanoLDH@Ris, estos resultados se muestran a continuación en la figura 3.9.

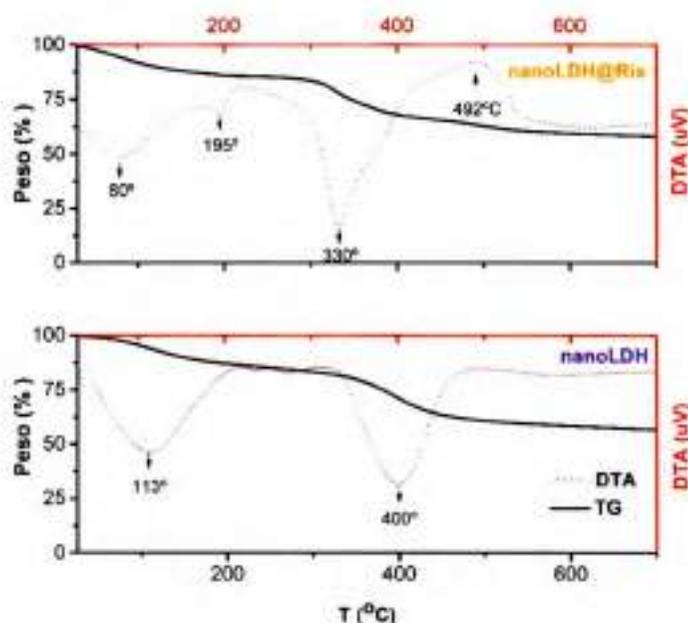


Figura 3.9: Curvas de TGA/DTA correspondientes a los nanoLDH y nanoLDH@Ris.

Las curvas de los nanoLDH y los nanoLDH@Ris (figura 3.9), mostraron los tres procesos principales involucrados en la degradación térmica de los LDH, deshidratación, deshidroxilación y descomposición del anión [52].

En el caso de los nanoLDH, se observó una pérdida de masa total de 55% al calentar hasta 800 °C. En las curvas TGA/DTA se exhibió el proceso de deshidratación hasta los 200°C aproximadamente, con un pico asociado a un efecto endotérmico centrado en los 113°C. Mientras que, la pérdida de peso debida a la deshidroxilación y la descomposición del anión se produjo entre los 300°C y los 450°C, donde el pico principal se registró alrededor de los 400°C y fue de carácter endotérmico. Estos procesos también se observaron en las curvas correspondientes para los nanoLDH@Ris, sin embargo se observó un pico adicional, centrado en los 492°C aproximadamente, de carácter exotérmico, este pico se designó a la descomposición del Ris presente en la

superficie de los nanoLDH@Ris. Por su parte, la pérdida de masa total de los nanoLDH@Ris fue de 58% al calentar hasta 800 ° C.

Empleando un conjunto de técnicas como el análisis elemental de C y N, la espectrometría de absorción atómica, análisis termogravimétrico y espectroscopia ultravioleta visible, se logró determinar la composición química de las diferentes muestras, estos resultados se recopilan en la tabla 3.4. A partir de estos resultados y la fórmula general de los LDHs se estableció una fórmula química para los diferentes LDHs obtenidos.

Tabla 3.4. Análisis químico y elemental de los LDHs.

| | %Mg | %Al | Mg/Al | %C | %N | % H ₂ O | Fórmula Química |
|-------------|------|-----|-------|-----|-----|--------------------|--|
| nanoLDH | 22,1 | 9,1 | 2,7 | | | 13,4 | Mg _{0,73} Al _{0,27} (OH) ₂ Cl _{0,27} · 0,59 H ₂ O |
| nanoLDH@Ris | 19,6 | 9,0 | 2,4 | 4,7 | 0,6 | 14,6 | Mg _{0,71} Al _{0,29} (OH) ₂ (Ris) _{0,04} (Cl) _{0,09} · 0,76 H ₂ O |
| LDH-RIS | 19,9 | 7,2 | 3,1 | 9,3 | 1,5 | 16,7 | Mg _{0,74} Al _{0,24} (OH) ₂ (Ris) _{0,10} · 0,32 H ₂ O |

La capacidad de intercambio aniónico (CIA), es decir, la cantidad de aniones que se puede incorporar mediante interacción electrostática a los LDHs, está dada por el catión trivalente (en este caso el Al) y el exceso de carga positiva que éste genera en las láminas de LDH [53]. La fórmula química de los nanoLDH se calculó bajo la simplificación que los iones Cl⁻ están ocupando el 100% de los sitios posibles en el nanoLDH. Se espera que por cada mol de Al³⁺, se incorpore un mol de Cl⁻ al tener sólo una carga negativa. Por otra parte, se espera que por cada mol de Al³⁺ se incorpore 0,33 mol de HRis³⁻ al presentar tres cargas negativas, si ocupara el 100% de los sitios intercambiables de los nanoLDH. Sin embargo, se observó que en el caso de los nanoLDH@Ris el HRis³⁻ sólo ocupa el 41% de estos sitios. El resto se supone ocupado ya sea por iones Cl⁻ o iones CO₃²⁻, como lo indican los espectros de I.R (se presentan más adelante en la figura 3.10). El CO₃²⁻ puede intercalarse entre las láminas en pequeñas cantidades producto del CO₂ de la atmósfera.

Para el LDH-Ris se encontró que el HRis³⁻ se presenta en exceso ya que ocupa el 125% de los sitios intercambiables. Además, el valor negativo de ζ para el LDH-Ris indica que este anión se ubica tanto en el espacio interlaminar como en la superficie del sólido. Este exceso puede deberse a interacciones diferentes a las electrostáticas, como fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrogeno. Asimismo, la cantidad de agua en el LDH-Ris es menor que en los nanoLDH@Ris, debido a que el HRis³⁻ está en mayor proporción, ocupa gran parte del espacio interlaminar y desplaza a las moléculas de agua.

La incorporación del anión en los LDHs puede darse tanto por la adsorción como por la intercalación del anión. En este estudio con Ris y en otros estudios con diferentes aniones, se ha encontrado que cerca del 20% de la CIA corresponde a los sitios que se encuentran en la superficie de los nanoLDH [22]. En base a la composición química y a los valores de ζ medido para los nanoLDH@Ris y LDH-Ris, se verificó que la incorporación del HRis³⁻ se da tanto por adsorción como por intercalación en el caso de LDH-Ris. Mientras que para los nanoLDH@Ris sólo se produce una mínima intercalación de este anión, dejando sitios libres que pueden ser ocupados por otro anión (por ejemplo, el fármaco que se desea vehicular).

Por otra parte, los difractogramas permitieron determinar la presencia de fases de LDH y los parámetros de celda unidad de las mismas. La mayoría de los LDHs naturales y sintéticos presentan un sistema cristalino con celda unidad de geometría hexagonal ó romboédrico, sus parámetros de celda son $a = b \neq c$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ [45].

Los LDHs presentan difractogramas característicos, donde las reflexiones de menor ángulo (2θ) corresponden a los índices de Miller (00l), estos brindan información del parámetro de celda unidad c , correspondiente

a la distancia entre las láminas paralelas que conforman la celda unidad. La intercalación de aniones de gran tamaño en los LDH, hace desplazar estas reflexiones a menores ángulos. Por otra parte, los índices de Miller (hk0) se presentan a reflexiones de mayor ángulo y brindan información del parámetro de celda a , que se refiere a la distancia entre los cationes metálicos dentro de la misma lámina [54]. Además, mediante el perfil de los picos presentes en los difractogramas se puede obtener información de la cristalinidad del sólido. En general los sólidos cristalinos exhiben una estructura bien definida con alta periodicidad, dando como resultado difractogramas con picos muy estrechos y de alta intensidad.

En la figura 3.10 se presentan los difractogramas de rayos X para los nanoLDH y nanoLDH@Ris que presentan las señales características para los LDHs [45]. La presencia de picos intensos y bien definidos en las reflexiones armónicas correspondientes a los planos (003), (006) y (012) es evidencia de la cristalinidad de estos sólidos. Los nanoLDH@Ris presentan picos menos definidos que los nanoLDH, corroborando así que este sólido perdió un poco de cristalinidad al incorporarse el anión orgánico. Este resultado concuerda con el estudio de interacción realizado anteriormente (figura 3.6. C), a mayor incorporación de HRis³⁻ se disminuye la cristalinidad de la muestra.

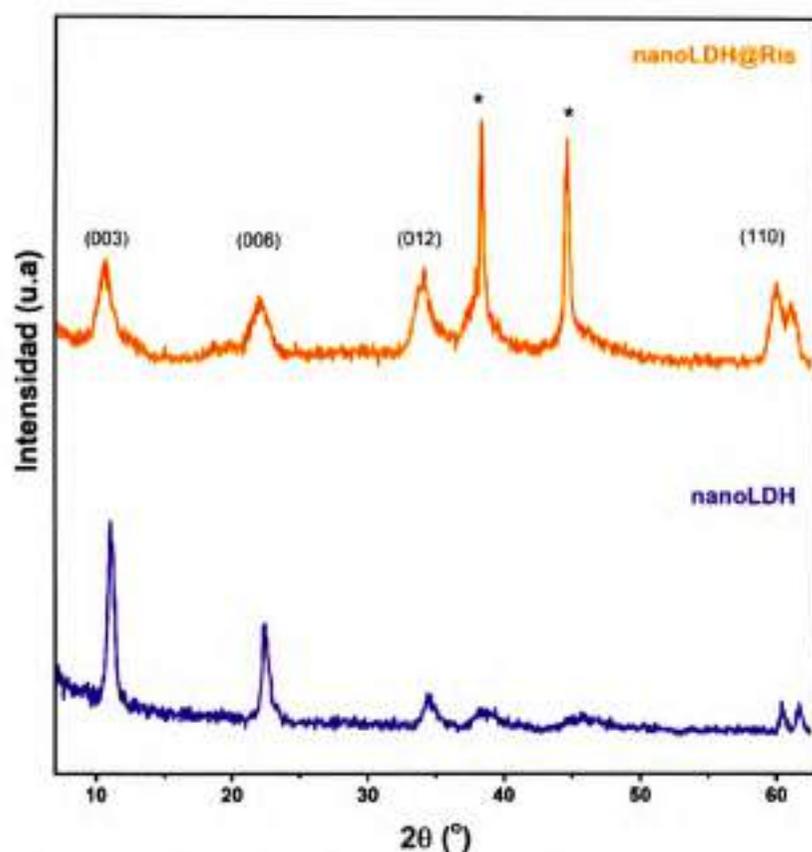


Figura 3.10: Difractogramas de rayos X de nanoLDH y nanoLDH@Ris, los picos identificados con (*) pertenecen al aluminio del porta muestras.

Sin embargo, se siguen manteniendo las características de los nanoLDH pues no se presenta desplazamientos de los picos, ni aumento del espacio interlaminar, ni ningún cambio en los parámetros de celda (tabla 3.5), luego de la incorporación del HRis³⁻.

Tabla 3.5. Parámetros de celda para los nanoportadores.

| Ángulo 2θ | Plano de reflexión | d (Å) | a (Å) | c (Å) |
|------------------|--------------------|---------|---------|---------|
| 12° | 003 | 7,267 | | 21,801 |
| 24° | 006 | 3,812 | | 22,872 |
| 62° | 110 | 1,508 | 3,016 | |

En la figura 3.11 se presentan los espectros Infrarrojo para los nanoLDH y nanoLDH@Ris. Estos espectros son muy similares, presentan las bandas características de los LDHs [55].

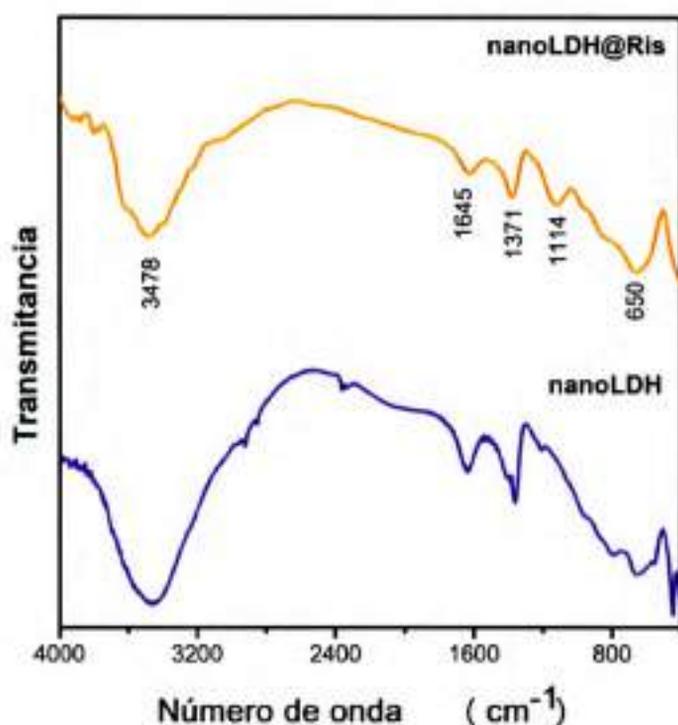


Figura 3.11: Espectros infrarrojo para los nanoLDH y nanoLDH@Ris.



En estos espectros se observa una banda ancha e intensa a 3478 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales de los grupos OH presentes, tanto en las láminas de LDH, como en las moléculas de agua interlamilar [56]. Asimismo, se observa una banda de menor intensidad a 1645 cm^{-1} , debido al modo de flexión del agua [56]. La presencia de carbonato como impureza, se confirma por la fuerte banda observada a 1371 cm^{-1} y la débil banda a 651 cm^{-1} , atribuida a vibraciones simétricas de estiramiento del enlace O-C-O del carbonato. Por lo general, en la síntesis de este tipo de sólidos siempre se presenta la incorporación de pequeñas cantidades de CO_3^{2-} , debido a que es un anión que presenta una alta afinidad por las láminas y se encuentra disponible en el ambiente [16]. Las bandas de intensidad media, presentes en la región de menor longitud de onda (entre 1000 cm^{-1} y 425 cm^{-1}), se deben a las vibraciones M-O y a las flexiones M-OH en las láminas de los LDH [57]. Los modos vibracionales de la red resultantes de los enlaces Al-O / Mg-O / O-Al-O / O-Mg-O se observan en 446 cm^{-1} , 431 cm^{-1} y 651 cm^{-1} . Otras bandas de absorción aparecen en 431 cm^{-1} , 560 cm^{-1} , 750 cm^{-1} y 940 cm^{-1} y se asignaron a movimientos rotacionales de Mg / Al-OH y Al-OH. Entre 400 cm^{-1} y 580 cm^{-1} se observa la deformación de Al-OH, Al-Cl y las vibraciones de estiramiento de Al-Cl / Mg-Cl se observan en $625\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ [57].

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), se corroboró la morfología de las muestras obtenidas. En la figura 3.12 se presentan las imágenes SEM de los nanoLDH y nanoLDH@Ris. Su forma es de láminas hexagonales, con tamaños menores a los 200nm . Sin embargo, se aprecia que las láminas de los nanoLDH@Ris son menos regulares y con bordes menos definidos que la de los nanoLDH.

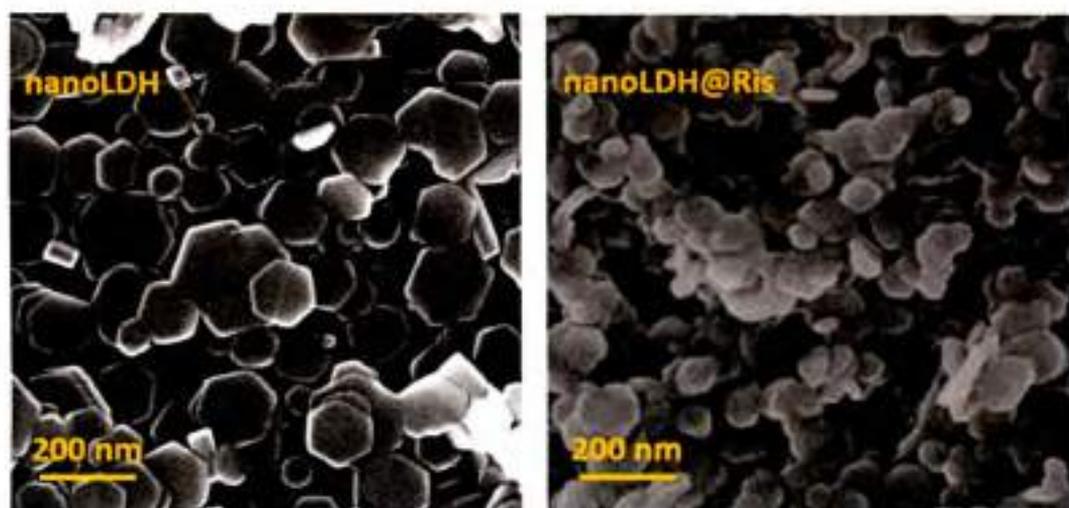


Figura 3.12: Imágenes SEM de nanoLDH y nanoLDH@Ris.

Estos cambios se deben a que esta muestra es menos cristalina, lo que concuerda con los resultados de DRX. La morfología hexagonal, encontrada para los nanoLDH y nanoLDH@Ris, es similar a la informada por otros autores para LDHs intercalados con el anión Cl⁻ [58].

3.3.4 Estabilidad de la funcionalización y tamaño en condiciones de relevancia fisiológica.

3.3.4.1 Efecto de la concentración

Los LDHs se ven afectados por equilibrios de solubilidad. Si la concentración de los LDHs es muy baja podrían disolverse y perder su estructura laminar. Es importante saber hasta que concentración se pueden diluir las suspensiones de los nanoLDH y

nanoLDH@Ris, sin perder su funcionalización, tamaño nanométrico y estructura de LDH.

En la figura 3.13 A se presenta la desorción de Ris presente en los nanoLDH@Ris en función de la concentración de los nanoLDH@Ris. La variación de los valores de ζ y d a estas condiciones se muestran en la figura 3.13 B y C, respectivamente.

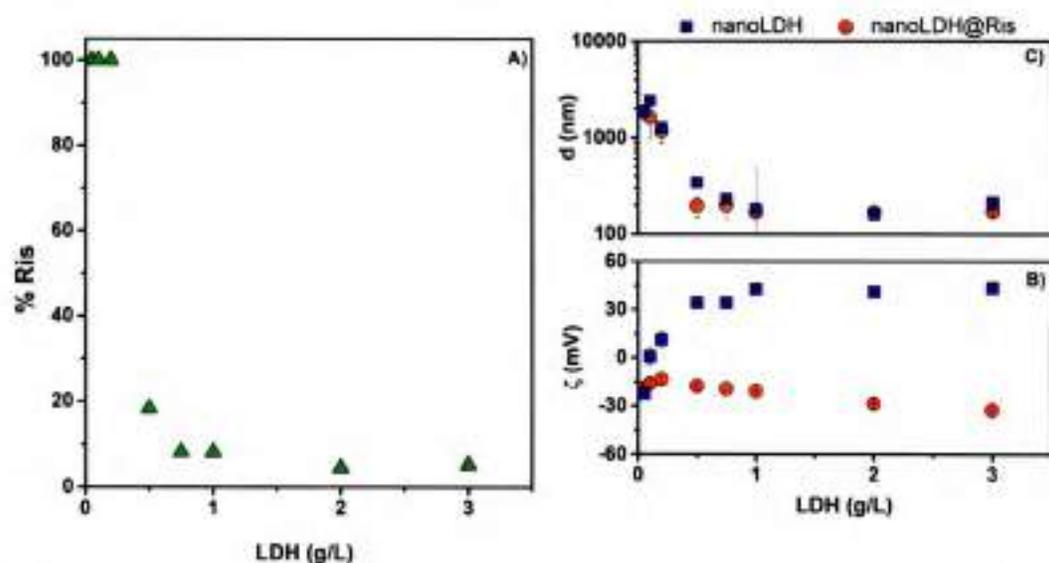


Figura 3.13: (A) Desorción de Ris, (B) potencial zeta (ζ) y (C) diámetro hidrodinámico aparente (d) para nanoLDH y nanoLDH@Ris en función de la concentración de estos nanoportadores.

Como se observa en la figura 3.13 A, se parte de una concentración de 3.0 g/L de las dispersiones tanto de nanoLDH como de nanoLDH@Ris y al disminuir la concentración de los nanoLDH@Ris la desorción de la funcionalización fue mínima, hasta concentraciones de 0,5 g/L se presentó una desorción menor al 20% de Ris adsorbido en los nanoLDH@Ris. A concentraciones más bajas de nanoLDH@Ris, la funcionalización se desorbió completamente.

Así mismo, se observó que los valores de d y ζ tanto de los nanoLDH, como los nanoLDH@Ris, solo se ven afectados a bajas concentraciones.

Por una parte, se observó que los valores de ζ medidos para los nanoLDH se mantienen constantes hasta concentraciones de 0,5 g/L. El punto isoeléctrico se presentó a una concentración de 0,1 g/L y para concentraciones menores los valores de ζ fueron negativos. Produciendo la formación de agregados, con valores de d alrededor de los μm , a concentraciones $< 0,5$ g/L.

Por otra parte, se observó que los valores de ζ medidos para los nanoLDH@Ris no presentaron un cambio tan drástico, su valor cambio de -30,0 a -20,0 mV. Sin embargo, se observó la formación de agregados con valores de d alrededor de los μm , a concentraciones $< 0,2$ g/L.

Este aumento en los valores de d se debe a la disolución de las láminas y en consecuencia la pérdida de la naturaleza LDH; formando $\text{Al}(\text{OH})_3$ y $\text{Mg}(\text{OH})_2$, productos de la disolución. Los hidróxidos de Mg presentan una alta solubilidad en agua ($K_{ps} = 6 \times 10^{-12}$) mientras que los hidróxidos de aluminio no son muy solubles ($K_{ps} = 3 \times 10^{-34}$) [59, 60].

Según los resultados obtenidos, se puede decir que el Ris adsorbido en los nanoLDH también actúa como protector ante la disolución de las láminas. Ya que los nanoLDH@Ris presentaron mayor estabilidad que los nanoLDH. La mínima concentración en que se logró tener nanoLDH funcionalizados dispersos en agua fue 0,5g/L.

3.3.4.2 Efecto de la fuerza iónica

La fuerza iónica es el principal factor que afecta la estabilidad coloidal, ya que al aumentar la concentración de electrolitos la doble capa eléctrica se hace más pequeña. En consecuencia, la fuerza de atracción entre las partículas aumenta y tienden a agregarse [61]. Por otra parte, la funcionalización puede intercambiarse con aniones del medio, si su afinidad por los nanoLDH es mayor que la del Ris.

En la figura 3.14A se presenta la desorción de Ris presente en los nanoLDH@Ris en función de la fuerza iónica. La variación de los valores de ζ y d a estas condiciones se muestran en la figura 3.14 B y C respectivamente.

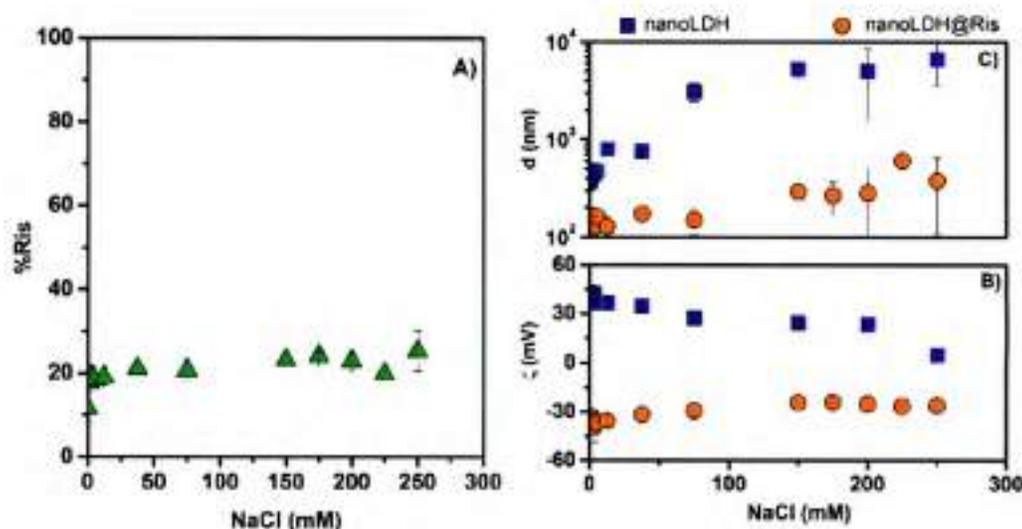


Figura 3.14: (A) Desorción de Ris, (B) potencial zeta (ζ) y (C) diámetro hidrodinámico aparente (d) para nanoLDH y nanoLDH@Ris en función del [NaCl].

Como se observa en la figura 3.14 A, al aumentar la fuerza iónica del medio de los nanoLDH@Ris la desorción de la funcionalización fue mínima. Incluso para valores altos de fuerza iónica $[\text{NaCl}] = 250 \text{ mM}$ la desorción no superó el 25 % de Ris. Cabe resaltar que la fuerza iónica en el plasma sanguíneo es de 150 mM [62].

Así mismo, se observó que los valores de d y ζ correspondientes a los nanoLDH se vieron fuertemente afectados por el aumento de la fuerza iónica. El caso contrario ocurrió para los valores de d y ζ correspondientes a los nanoLDH@Ris, estos presentaron una mínima variación al aumentar la fuerza iónica.

Por una parte, para los nanoLDH se observó que a medida que se aumentaba la fuerza iónica los valores de ζ disminuían hasta alcanzar valores cercanos a 0,0 mV. En consecuencia los valores de d aumentaron, es decir, se favoreció la formación de agregados, incluso para valores de fuerza iónica relativamente bajos, a $[\text{NaCl}] = 75 \text{ mM}$, se observaron valores de d alrededor de los μm .

Por otra parte, para los nanoLDH@Ris los valores de ζ se mantuvieron en valores cercanos a -30,0 mV a las diferentes concentraciones de fuerza iónica. Solo se presentó un pequeño aumento de los valores de d , el cual pasó de 120 a 300 nm, cuando la fuerza iónica fue de $[\text{NaCl}] = 250 \text{ mM}$, que corresponde a un valor de fuerza iónica más alto del correspondiente a el plasma sanguíneo.

Los resultados obtenidos indican que el Ris está fuertemente adsorbido sobre los nanoLDH. La poca variación de los valores de ζ y la baja desorción de Ris, demuestran que la funcionalización obtenida sería altamente estable frente a la alta fuerza iónica presente en el plasma sanguíneo.

3.3.4.3 Efecto del pH

La funcionalización con Ris, al presentar una alta reactividad ácido base, además de poder ser osteoespecífica, podría brindar nanoLDH responsivos a los cambios de pH. Debido a esto se evaluó el comportamiento de la funcionalización de los nanoLDH@Ris frente al pH.

En la figura 3.15 A se presenta el consumo de protones por parte de los nanoLDH y nanoLDH@Ris, además de la desorción de Ris presente en los nanoLDH@Ris en función del pH. La variación de los valores de ζ y d en estas condiciones se muestran en la figura 3.15 B y C, respectivamente.

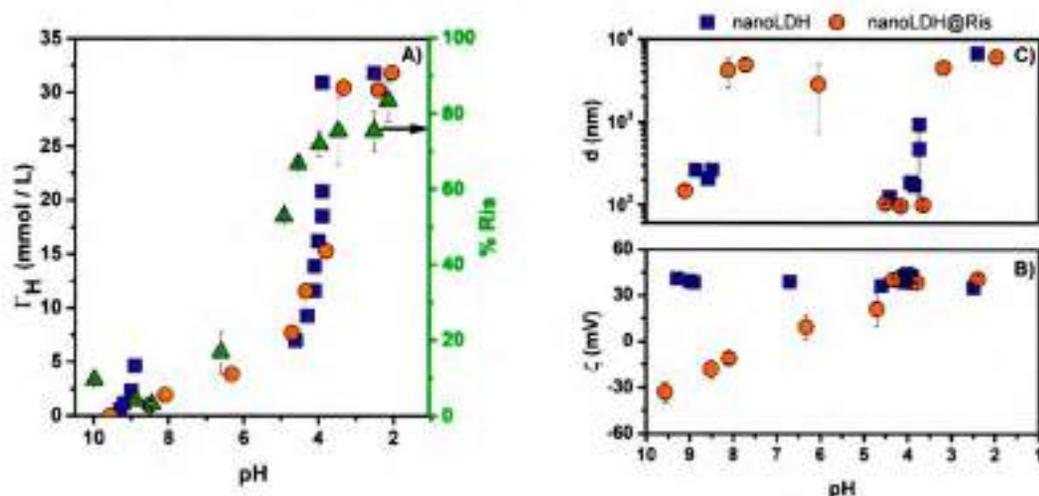


Figura 3.15: (A) Consumo de protones (Γ_H) y desorción de Ris (\blacktriangle). (B) potencial zeta (ζ) y (C) diámetro hidrodinámico aparente (d) para nanoLDH y nanoLDH@Ris en función del pH.

Como se observa en la figura 3.15 A, al disminuir el pH del medio el consumo de protones aumenta por parte tanto de los nanoLDH como los nanoLDH@Ris.

Por un lado, se observa para los nanoLDH que un ligero consumo de protones 5 mmol/g, produce una fuerte variación de pH, este pasó de un valor de 9,0 a 5,0. Asimismo, se observó que el mayor consumo de protones se presentó para valores de pH cercanos a 4,0, donde éste se mantuvo constante. Debido al proceso de disolución de las láminas de nanoLDH que ocurre a $\text{pH} < 5,0$ [63].

Por otro lado, se observa que el consumo de protones por parte de los nanoLDH@Ris fue más paulatino. El pH fue descendiendo gradualmente hasta que alcanzó un valor cerca de 4,0. Donde, al igual que para los nanoLDH, se presentó el mayor consumo de protones. Pero en este caso, además de la disolución de las láminas se presentó la protonación de la funcionalización, que pasa de ser un anión trivalente (HRis^{3-}) a un anión monovalente (H_3Ris) con menor afinidad por la superficie de nanoLDH. En consecuencia, a este valor de pH se encontró la mayor desorción de Ris. El % Ris desorbido aumentó del 17% en pH 6,3 a 67% en pH 4,3. Este hecho también se ve reflejado en la inversión del ζ .

En cuanto, a los valores de ζ para los nanoLDH, se observó que se mantuvieron estables en todo el rango de pH (10,0 - 2,0), alrededor de 40,0 mV. A pesar de esto los valores de d incrementaron considerablemente para valores de pH $< 4,0$. Lo que es acorde con el comienzo del proceso de disolución de las láminas de los nanoLDH y consecuente formación de agregados.

El caso contrario ocurrió para los nanoLDH@Ris, los valores de ζ se vieron fuertemente afectados por la disminución del pH. El valor de ζ aumentó

considerablemente, paso de un valor de $-40,0$ mV a un valor similar al de los nanoLDH $40,0$ mV. Su punto isoeléctrico se presentó alrededor de pH 7,0. En efecto se produce la formación de agregados, con valores de d próximos a de los μm . Sin embargo, los valores de d descendieron nuevamente al orden de los 100 nm a valores de pH cercanos a 4,0, donde se ha perdido la funcionalización y los nanoLDH@Ris se comportaron como los nanoLDH. Al igual que ocurrió para los nanoLDH, a valores de pH $< 4,0$, los nanoLDH@Ris formaron agregados.

Junto a los anteriores experimentos se realizaron las cinéticas de desorción de los nanoLDH@Ris realizadas en buffer fosfato (BF) y buffer acetato (BA), que permitieron conocer el comportamiento de la funcionalización de los nanoLDH@Ris a valores de pH de interés fisiológico; como el pH del plasma sanguíneo (7,4) y el pH de algunos organelos celulares (4,7). En la figura 3.16 se presentan dichas cinéticas.

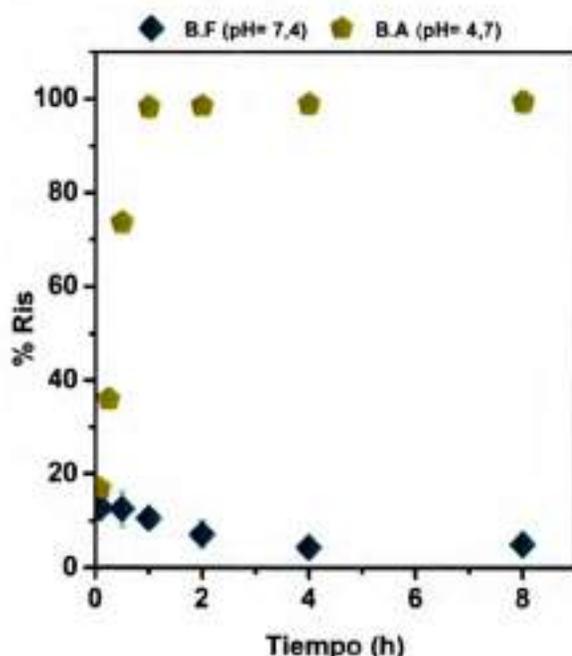


Figura 3.16: Cinética de desorción de Ris del nanoLDH@Ris dispersó en buffer fosfato (BF) y buffer acetato (BA).

Como se muestra en la figura 3.16 en buffer fosfato (pH=7,4) la desorción de Ris presente en los nanoLDH@Ris es mínima, menor al 10% de Ris, incluso después de 8 horas de agitación. Lo que demuestra la fuerte interacción del Ris con la superficie de los nanoLDH. Ya que, a pesar que los iones fosfato presentan una alta afinidad por los LDH [42] estos no se intercambian por el Ris adsorbido en los nanoLDH@Ris.

Por el contrario, la desorción de Ris en buffer acetato (pH= 4,7) fue del 100 % luego de una hora de agitación. A pesar de la poca afinidad que presentan los iones acetato por los LDH, el Ris presente en los nanoLDH@Ris, se liberó completamente en poco tiempo. Por tanto se infiere que la liberación del Ris se da por la protonación de HRis^3 o la disolución de los nanoLDH@Ris. Estos dos procesos ocurren a valores de pH cercanos al valor de pH estudiado.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos, indican que la funcionalización con Ris permite obtener nanoportadores sensibles a los cambios de pH. Además, la baja desorción de Ris en buffer fosfato, demuestra que la funcionalización de los nanoLDH@Ris sería altamente estable en el plasma sanguíneo.

3.3.5 Especificidad por hidroxiapatita

Aunque la capacidad de respuesta al pH de los nanoLDH@Ris es promisorio para la entrega de fármacos a las células cancerosas, no obstante, el principal objetivo de la funcionalización con Ris es darle especificidad al nanoportador hacia el tejido óseo. Esta capacidad fue evaluada *in vitro*, estudiando la interacción del Ris unido a los nanoLDH@Ris con iones Ca^{2+} , tanto en solución, como en la superficie de Hap. Estos estudios son presentados en la figura 3.17. Por una parte, la interacción

con CaCl_2 en solución, en la figura 3.17 A se muestra la desorción de Ris, mientras que, en la 3.17 B los valores de ζ . Por otra parte, la interacción con Ca^{2+} presente en la Hap sólida se expone en las figuras 3.17 C y D, donde se muestran los valores de ζ medidos por streaming potential y micrografías SEM de la Hap y en presencia de los nanoLDH y nanoLDH@Ris.

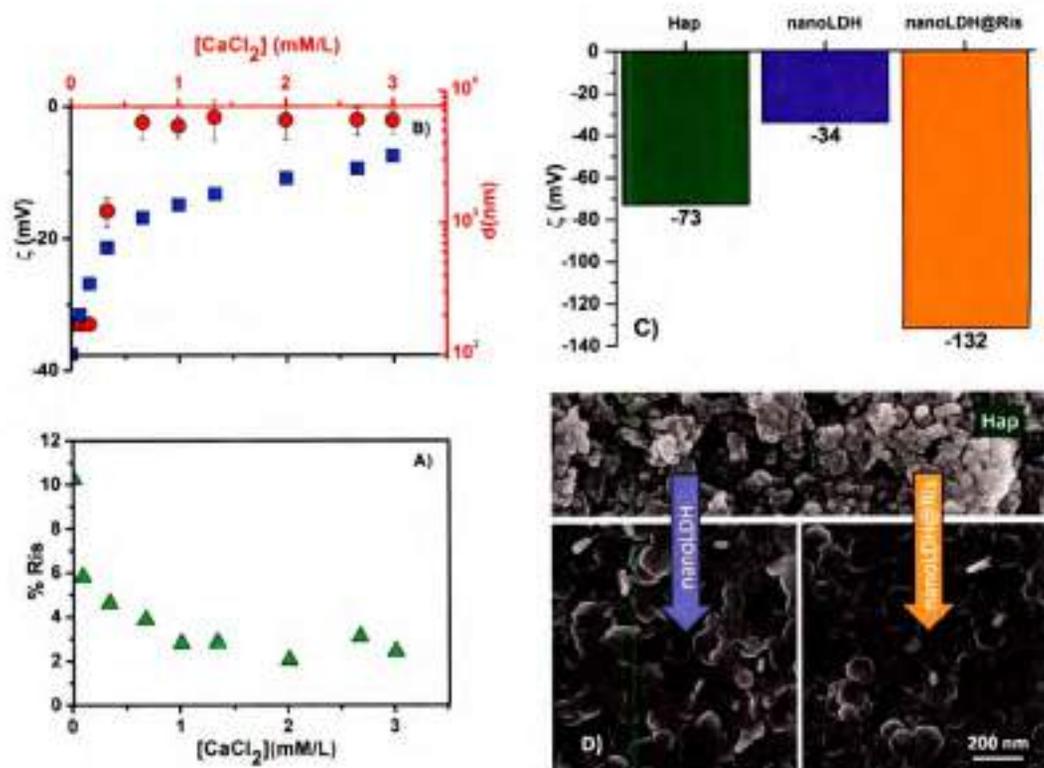


Figura 3.17: (A) Desorción de Ris (%Ris) presente en los nanoLDH@Ris, (B) potencial zeta (ζ , cuadros) en el eje de la izquierda, diámetro hidrodinámico aparente (d , círculos) en el eje de la derecha en función de $[\text{CaCl}_2]$. (C) Potencial zeta (ζ) medido por streaming potential correspondiente a la Hap en KCl 0.5 M y en nanoLDH y nanoLDH@Ris. (D) Imágenes SEM de Hap antes y después de ser sumergidas en dispersiones de nanoLDH y nanoLDH@Ris.

Como se observa en la figura 3.17 A, la desorción del Ris disminuye a medida que aumenta la concentración de CaCl_2 . En otras palabras, los iones Ca^{2+} incorporado a los nanoLDH@Ris mejoran la estabilidad de la funcionalización evitando su desorción.

Es posible evidenciar la incorporación de iones Ca^{2+} a la superficie de los nanoLDH@Ris gracias a la disminución de los valores de ζ . Inicialmente, su valor fue de $-40,0$ mV, a medida que se aumentó la concentración de CaCl_2 , los valores de ζ aumentaron hasta alcanzar valores de -10 mV. Como consecuencia, se formaron agregados con valores de d cercanos a los μm como se observa en la figura 13.17 B. Las determinaciones de Ris desorbido y las medidas de los valores de d y ζ confirmaron la fuerte afinidad del Ris por los iones Ca^{2+} en solución.

Para la interacción con Ca^{2+} presente en la Hap sólida, se determinó el valor de ζ correspondiente a la Hap, mediante medidas de streaming potential, este fue de -73 mV, lo que concuerda con lo reportado en literatura [51] [53]. Además, se observó que este valor cambió al forzar el paso de las dispersiones de nanoLDH y nanoLDH@Ris a través de la muestra de Hap.

En primer lugar, al interaccionar la dispersión de nanoLDH con la muestra de Hap, se presenta un aumento en el valor de ζ que pasa a -34 mV. Claramente, este cambio en el valor de ζ , es debido a una fuerte interacción electrostática entre sus cargas opuestas, la Hap (-73 mV) y los nanoLDH (40 mV).

En segundo lugar, al interaccionar la dispersión de nanoLDH@Ris con la misma muestra de Hap, el valor de ζ decae fuertemente a -132 mV. Es decir, que los nanoLDH@Ris se unen a la Hap a pesar de que la Hap (-73 mV) y los nanoLDH@Ris (-



40 mV) presentan valores de ζ negativos. Este hecho indica que la interacción ya no es electrostática sino específica, entre el HRis³⁻ adsorbido en los nanoLDH@Ris y los iones Ca²⁺ en la superficie de Hap.

Igualmente, la capacidad de unión de los nanoLDH y nanoLDH@Ris con Hap se ilustró mediante las micrografías SEM de los comprimidos de Hap antes y después de ser sumergidos en dispersiones de los correspondientes nanoportadores, como se observa en figura 3.17 D.

La micrografía de referencia (Hap sin ningún tratamiento) mostró partículas globulares dispuestas irregularmente. Mientras que en las otras dos imágenes se observó que la superficie de Hap fue cubierta tanto con nanoLDH como con nanoLDH@Ris, para ambos casos se observaron partículas hexagonales simétricas de morfología típica de los LDHs [23], en la superficie de Hap.

La fuerte unión entre los iones Ca²⁺ y el Ris ya se ha reportado en literatura [64]. En este estudio se encontró que el Ris se une a los iones Ca²⁺, ya sea en solución o en la Hap, mediante la formación de un enlace de coordinación tipo quelato, entre el Ca²⁺ y dos oxígenos de los grupos fosfato.

Los resultados obtenidos demuestran que existe una fuerte afinidad entre los nanoLDH funcionalizados con Ris y los iones Ca²⁺, tanto en solución como en la superficie de Hap. Por lo tanto, la funcionalización con Ris, además de ser pH responsiva, también presenta especificidad hacia el tejido óseo. En consecuencia, los nanoLDH@Ris tienen propiedades promisorias para ser utilizados como nanoportadores de fármacos con localización específica en el tejido óseo (osteoespecificidad).

3.4 Conclusiones

Se logró sintetizar nanoLDH de tamaño, composición y morfología adecuada, mediante síntesis por coprecipitación a pH 9,0, relación Mg/Al = 3:1 y concentración del catión Al de 0,2 M. Una vez sintetizados los nanoLDH se funcionalizaron con Ris, un bifosfonato con afinidad por la hidroxiapatita y rica reactividad ácido-base. La funcionalización es óptima a bajas concentraciones de Ris, proporcionando un potencial zeta negativo y tamaño alrededor de 100 nm. La especie trivalente (HRis^{3-}) se incorporó preferiblemente en la superficie de los nanoLDH y con una mínima intercalación entre las láminas, lo que permitiría la intercalación de un anión farmacéuticamente activo.

La funcionalización no se vio afectada por la fuerza iónica o por la presencia de aniones en el medio. Sólo sufrió cambios a bajas concentraciones de nanoLDH@Ris, donde se comienza a disolver el nanoportador, o a bajo pH, donde además de la disolución de las láminas, el anión trivalente se protona y se produce la desorción. Además, se encontró que la funcionalización actúa como estabilizante. Los valores de d y ζ medidos para nanoLDH@Ris no varían tanto como los medidos para los nanoLDH a las diferentes condiciones de concentración, fuerza iónica y pH estudiadas.

Se logró demostrar la fuerte afinidad que presenta la funcionalización de los nanoLDH con los iones Ca^{2+} , tanto en solución como en la superficie de Hap.



Por lo tanto, la funcionalización con Ris, además de ser sensible al pH también presenta afinidad específica por la hidroxiapatita. Esto hace que los nanoLDH@Ris tengan una promisoría aplicación como portadores de fármacos anticancerígenos para localización específica en tejido óseo.

3.5 Referencias bibliográficas

- [1] M. A. Macchione, C. Biglione, and M. Strumia, "Design, synthesis and architectures of hybrid nanomaterials for therapy and diagnosis applications," *Polymers (Basel)*., vol. 10, no. 5, pp. 1–34, 2018.
- [2] Z. Shen, M.-P. Nieh, and Y. Li, "Decorating Nanoparticle Surface for Targeted Drug Delivery: Opportunities and Challenges," *Polymers (Basel)*., vol. 8, no. 3, p. 83, 2016.
- [3] A. O. Elzoghby, W. M. Samy, and N. A. Elgindy, "Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 1, pp. 38–49, 2012.
- [4] L. Y. T. Chou, K. Ming, and W. C. W. Chan, "Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 233–245, 2011.
- [5] H. Priya James, R. John, A. Alex, and K. R. Anoop, "Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 4, no. 2, pp. 120–127, 2014.
- [6] A. K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu, and S. Kankane, "Responsive polymers in controlled drug delivery," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, no. 11, pp. 1088–1118, 2008.
- [7] R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, and V. Trubetsky, "Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres," *Science*, vol. 263, 1600–1603, 1994.
- [8] V. Rives, M. Del Arco, and C. Martín, "Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A review," *J. Control. Release*, vol. 169, no. 1–2, pp. 28–39, 2013.
- [9] U. Costantino *et al.*, "New polymeric composites based on poly(ϵ -



caprolactone] and layered double hydroxides containing antimicrobial species," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 1, no. 3, pp. 668–677, 2009.

- [10] S.-J. Choi, J.-M. Oh, and J.-H. Choy, "Anticancer drug-layered hydroxide nanohybrids as potent cancer chemotherapy agents," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 69, no. 5–6, pp. 1528–1532, 2008.
- [11] J. Chakraborty, S. Roychowdhury, S. Sengupta, and S. Ghosh, "Mg-Al layered double hydroxide-methotrexate nanohybrid drug delivery system: evaluation of efficacy.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 4, pp. 2168–74, 2013.
- [12] V. Rives, M. del Arco, and C. Martín, "Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review," *Appl. Clay Sci.*, vol. 88–89, pp. 239–269, 2014.
- [13] K. Ladewig, M. Niebert, Z. P. Xu, P. P. Gray, and G. Q. M. Lu, "Efficient siRNA delivery to mammalian cells using layered double hydroxide nanoparticles.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 7, pp. 1821–9, 2010.
- [14] K. Ladewig, Z. P. Xu, and G. Q. M. Lu, "Layered double hydroxide nanoparticles in gene and drug delivery.," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 6, no. 9, pp. 907–22, 2009.
- [15] Y.-M. Kuo *et al.*, "Layered double hydroxide nanoparticles to enhance organ-specific targeting and the anti-proliferative effect of cisplatin," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 17, pp. 3447–3458, 2015.
- [16] S. Ray, M. Joy, B. Sa, S. Ghosh, and J. Chakraborty, "pH dependent chemical stability and release of methotrexate from a novel nanoceramic carrier," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 49, pp. 39482–39494, 2015.
- [17] H. Hu, K. M. Xiu, S. L. Xu, W. T. Yang, and F. J. Xu, "Functionalized Layered Double Hydroxide Nanoparticles Conjugated with Disulfide-Linked Polycation Brushes for Advanced Gene Delivery," *Bioconj. Chem.* 24 (6), 968-978, 2013.

- [18] S.-J. Choi, J.-M. Oh, and J.-H. Choy, "Biocompatible Nanoparticles Intercalated with Anticancer Drug for Target Delivery: Pharmacokinetic and Biodistribution Study," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 4, pp. 2913–2916, 2010.
- [19] J.-M. Oh, S.-J. Choi, G.-E. Lee, S.-H. Han, and J.-H. Choy, "Inorganic Drug-Delivery Nanovehicle Conjugated with Cancer-Cell-Specific Ligand," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 10, pp. 1617–1624, May 2009.
- [20] Z. Gu, H. Zuo, L. Li, A. Wu, and Z. P. Xu, "Pre-coating layered double hydroxide nanoparticles with albumin to improve colloidal stability and cellular uptake," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 16, pp. 3331–3339, 2015.
- [21] H. Zuo, Z. Gu, H. Cooper, and Z. P. Xu, "Crosslinking to enhance colloidal stability and redispersity of layered double hydroxide nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 459, pp. 10–16, 2015.
- [22] C. Vasti, A. Borgiallo, C. E. Giacomelli, and R. Rojas, "Layered double hydroxide nanoparticles customization by polyelectrolyte adsorption: mechanism and effect on particle aggregation," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 533, pp. 316–322, 2017.
- [23] D. Li, X. Xu, J. Xu, and W. Hou, "Poly(ethylene glycol) haired layered double hydroxides as biocompatible nanovehicles: Morphology and dispersity study," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 384, no. 1–3, pp. 585–591, 2011.
- [24] X.-Q. Zhang, M.-G. Zeng, S.-P. Li, and X.-D. Li, "Methotrexate intercalated layered double hydroxides with different particle sizes: structural study and controlled release properties.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 117, pp. 98–106, May 2014.
- [25] N. LeVasseur, M. Clemons, B. Hutton, R. Shorr, and C. Jacobs, "Bone-targeted therapy use in patients with bone metastases from lung



cancer: A systematic review of randomized controlled trials," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 50, pp. 183–193, 2016.

- [26] J. Conde, J. T. Dias, V. Grazú, M. Moros, P. V Baptista, and J. M. de la Fuente, "Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine.," *Front. Chem.*, vol. 2, p. 48, 2014.
- [27] J. DeRuiter and R. Clark, "Bisphosphonates: Calcium Antiresorptive Agents," *Endocr. Modul.*, pp. 1–7, 2002.
- [28] E. V. Giger, B. Castagner, and J. C. Leroux, "Biomedical applications of bisphosphonates," *J. Control. Release*, vol. 167, no. 2, pp. 175–188, 2013.
- [29] T. Woo and J. D. Adachi, "Role of bisphosphonates and calcitonin in the prevention and treatment of osteoporosis," *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 15, no. 3, pp. 469–481, 2001.
- [30] G. H. Nancollas et al., "Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite," *Bone*, vol. 38, no. 5, pp. 617–627, 2006.
- [31] M. Meloun, Z. Ferenčíková, H. Málková, and T. Pekárek, "Thermodynamic dissociation constants of risedronate using spectrophotometric and potentiometric pH-titration," *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 10, no. 2, pp. 338–353, 2012.
- [32] D. Wang, S. C. Miller, P. Kopecková, and J. Kopecek, "Bone-targeting macromolecular therapeutics.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 7, pp. 1049–76, 2005.
- [33] K. Ramanlal Chaudhari et al., "Bone metastasis targeting: a novel approach to reach bone using Zoledronate anchored PLGA nanoparticle as carrier system loaded with Docetaxel.," *J. Control. Release*, vol. 158, no. 3, pp. 470–8, 2012.
- [34] D. A. Ossipov, "Bisphosphonate-modified biomaterials for drug delivery

- and bone tissue engineering," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 12, no. 9, pp. 1443–1458, 2015.
- [35] H. Nakayama, K. Takeshita, and M. Tsuchiko, "Acid-Intercalated Layered Double Hydroxide and its Physicochemical Properties," vol. 92, no. 12, pp. 2419–2426, 2003.
- [36] M. Chakraborti, J. K. Jackson, D. Plackett, D. M. Brunette, and H. M. Burt, "Drug intercalation in layered double hydroxide clay: application in the development of a nanocomposite film for guided tissue regeneration.," *Int. J. Pharm.*, vol. 416, no. 1, pp. 305–313, 2011.
- [37] A. M. Hounslow, J. Carran, R. J. Brown, D. Rejman, G. M. Blackburn, and D. J. Watts, "Determination of the Microscopic Equilibrium Dissociation Constants for Risedronate and Its Analogues Reveals Two Distinct Roles for the Nitrogen Atom in Nitrogen-Containing Bisphosphonate Drugs," pp. 4170–4178, 2008.
- [38] R. Zhu et al., "pH sensitive nano layered double hydroxides reduce the hematotoxicity and enhance the anticancer efficacy of etoposide on non-small cell lung cancer," *Acta Biomater.*, vol. 29, pp. 320–332, 2016.
- [39] E. Seong, Z. Gao, and Y. Han, "Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology," *J. Control. Release*, vol. 132, no. 3, pp. 164–170, 2008.
- [40] C. Vasti, D. A. Bedoya, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Effect of the protein corona on the colloidal stability and reactivity of LDH-based nanocarriers," *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 11, pp. 2008–2016, 2016.
- [41] D. A. Bedoya, C. Vasti, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Applied Clay Science Risedronate functionalized layered double hydroxides nanoparticles with bone targeting capabilities," *Appl. Clay Sci.*, vol. 141, pp. 257–264, 2017.
- [42] R. Rojas, M. C. Palena, A. F. Jimenez-Kairuz, R. H. Manzo, and C. E. Giacomelli, "Modeling drug release from a layered double hydroxide-

- 
- ibuprofen complex," *Appl. Clay Sci.*, vol. 62–63, pp. 15–20, 2012.
- [43] L. Wang et al., "Selective Targeting of Gold Nanorods at the Mitochondria of Cancer Cells: Implications for Cancer Therapy," pp. 772–780, 2011.
- [44] Z. P. Xu, G. Stevenson, C.-Q. Lu, and G. Q. M. Lu, "Dispersion and size control of layered double hydroxide nanoparticles in aqueous solutions.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 34, pp. 16923–9, 2006.
- [45] V. Rives (Ed.), *Layered double hydroxides: present and future* - Nova Science Publishers, Inc., New York, IX+439 pp, 2001.
- [46] R. Rojas, D. A. Bedoya, C. Vasti, and C. E. Giacomelli, "LDH nanoparticles: synthesis , size control and applications in nanomedicine." in *Layered Double Hydroxides: Synthesis, Characterization and Applications*, p. 101 - 120, 2015.
- [47] Z. P. Xu, Y. Jin, S. Liu, Z. P. Hao, and G. Q. M. Lu, "Surface charging of layered double hydroxides during dynamic interactions of anions at the interfaces.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 326, no. 2, pp. 522–9, 2008.
- [48] Z. P. Xu, G. S. Stevenson, C.-Q. Lu, G. Q. M. Lu, P. F. Bartlett, and P. P. Gray, "Stable suspension of layered double hydroxide nanoparticles in aqueous solution.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 1, pp. 36–7, 2006.
- [49] A. Juillard et al., "Molecular interactions between zoledronic acid and bone: An in vitro Raman microspectroscopic study," *Bone*, vol. 47, no. 5, pp. 895–904, 2010.
- [50] F. Errassifi, S. Sarda, A. Barroug, A. Legrouri, H. Sfihi, and C. Rey, "Infrared, Raman and NMR investigations of risedronate adsorption on nanocrystalline apatites," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 420, pp. 101–111, 2014.
- [51] N. Redman-Furey et al., "Structural and analytical characterization of three hydrates and an anhydrate form of risedronate," *J. Pharm. Sci.*, vol.

- 94, no. 4, pp. 893–911, 2005.
- [52] T. Zhang, Q. Li, H. Xiao, H. Lu, and Y. Zhou, "Synthesis of Li-Al layered double hydroxides (LDHs) for efficient fluoride removal," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 51, no. 35, pp. 11490–11498, 2012.
- [53] Y. You, G. F. Vance, and H. Zhao, "Selenium adsorption on Mg-Al and Zn-Al layered double hydroxides," *Appl. Clay Sci.*, vol. 20, no. 1–2, pp. 13–25, 2001.
- [54] D. R. Martínez and G. G. Carbajal, "Hidróxidos dobles laminares: Arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología," *Av. en Quim.*, vol. 7, no. 1, pp. 87–99, 2012.
- [55] J. He, M. Wei, B. Li, Y. Kang, D. G. Evans, and X. Duan, "Preparation of Layered Double Hydroxides," in *Layered Double Hydroxides*, vol. 22, no. 11, pp. 89–119, 2006.
- [56] R. Rojas Delgado, M. Arandigoyen Vidaurre, C. P. De Pauli, M. A. Ulibarri, and M. J. Avena, "Surface-charging behavior of Zn-Cr layered double hydroxide," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 280, no. 2, pp. 431–441, 2004.
- [57] S. Özgümüş, M. K. Gök, A. Bal, and G. Güçlü, "Study on novel exfoliated polyampholyte nanocomposite hydrogels based on acrylic monomers and Mg-Al-Cl layered double hydroxide: Synthesis and characterization," *Chem. Eng. J.*, vol. 223, pp. 277–286, 2013.
- [58] J. Oh, S. Hwang, and J. Choy, "The effect of synthetic conditions on tailoring the size of hydrotalcite particles," vol. 151, pp. 285–291, 2002.
- [59] T. Hibino, "Acid treatment of layered double hydroxides containing carbonate," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2014, no. 31, pp. 5311–5321, 2014.
- [60] J. W. Boclair and P. S. Braterman, "Layered Double Hydroxide Stability. 1. Relative Stabilities of Layered Double Hydroxides and Their Simple Counterparts," *Chem. Mater.*, vol. 11, no. 2, pp. 298–302, 1999.
- [61] T. L. Moore *et al.*, "Nanoparticle colloidal stability in cell culture media



and impact on cellular interactions," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 17, pp. 6287–6305, 2015.

- [62] M. S. Grunér, U. Kauscher, M. B. Linder, and M. P. Monopoli, "An environmental route of exposure affects the formation of nanoparticle coronas in blood plasma," *J. Proteomics*, vol. 137, pp. 52–58, 2016.
- [63] M. L. Parello, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Journal of Colloid and Interface Science Dissolution kinetics and mechanism of Mg – Al layered double hydroxides : A simple approach to describe drug release in acid media," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 351, no. 1, pp. 134–139, 2010.
- [64] F. Errassifi, S. Sarda, A. Barroug, A. Legrouri, H. Sfihi, and C. Rey, "Journal of Colloid and Interface Science Infrared , Raman and NMR investigations of risedronate adsorption on nanocrystalline apatites," vol. 420, pp. 101–111, 2014.



Capítulo 4

**nanoLDH-MTX y
nanoLDH-MTX@Ris**

Capítulo 4: nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris

4.1 Introducción

Aunque la quimioterapia es uno de los tratamientos más empleados contra el cáncer, presentan numerosas complicaciones [1, 2]. En la mayoría de los casos, las respuestas clínicas muestran que su eficacia disminuye cuando se suministra durante largos periodos de tiempo, ya que las células cancerosas desarrollan resistencia a múltiples fármacos. En consecuencia, se requieren mayores dosis de agentes anticancerígenos, los cuales también son citotóxicos para células sanas y provocan efectos secundarios adversos en órganos sanos [3].

El metotrexato (MTX), es uno de los quimioterapéuticos más ampliamente usados. Su eficacia ha sido demostrada en el tratamiento de desórdenes neoplásicos, tales como leucemia linfocítica, linfoma non-Hodgkin, carcinomas de mama, lengua, faringe, tumores de vejiga urinaria, tumores de cerebro, neoplasmas cutáneos, coriocarcinoma, sarcoma osteogénico y osteosarcoma [4, 5]. Además, es el principal fármaco empleado para el tratamiento de la artritis reumatoidea [6]. El MTX es un principio activo perteneciente al grupo de los antifolatos. Este fármaco actúa inhibiendo competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), lo que impide la formación de tetrahidrofolato, necesario para la síntesis de purinas y pirimidinas y la consecuente formación de DNA y RNA. Este mecanismo evita la proliferación celular, propia de las enfermedades cancerosas [7].

En la figura 4.1 se presenta la estructura del MTX y sus equilibrios ácido base. El MTX contiene un ácido glutámico y, por lo tanto, tiene dos grupos carboxilatos en su estructura química. Para valores de pH por debajo de 2, el compuesto presenta una carga positiva sobre un átomo de nitrógeno del anillo de pteridina. El MTX puede disociar hasta tres protones a medida que el pH aumenta, dos protones de los grupos carboxilatos ($pK_{a1} = 2,9$ y $pK_{a2} = 4,6$) y un protón unido al átomo de nitrógeno del anillo pteridina ($pK_{a3} = 6,6$) [8].

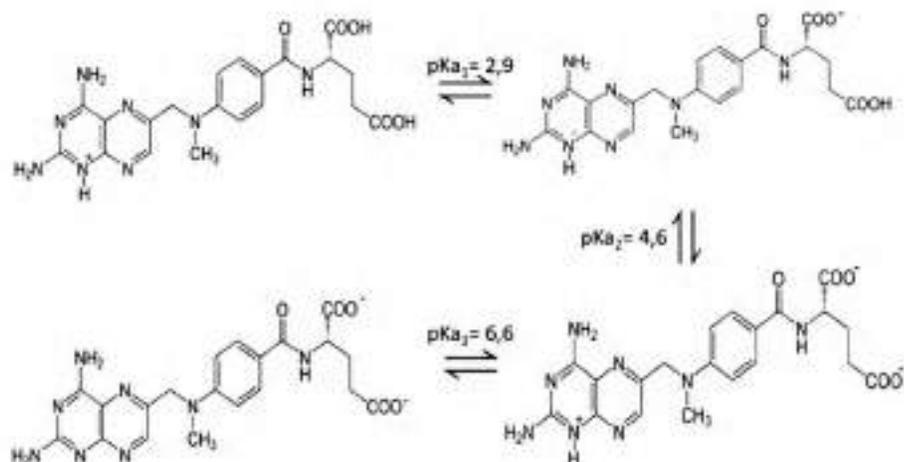


Figura 4.1: Estructura química y equilibrios ácido-base del Metotrexato, modificado de la referencia [8].

Los mayores obstáculos para el uso del MTX como agente quimioterapéutico son su pobre solubilidad, escasa biodisponibilidad y estrecho índice terapéutico [9]. Dicho índice se refiere a la relación entre la dosis del fármaco que causa la muerte (dosis letal o DL) y la dosis que produce el efecto terapéutico deseado (dosis efectiva o DE). Según el sistema de clasificación biofarmacéutica, el MTX es un fármaco clase IV, por tener baja solubilidad acuosa y baja permeabilidad [10] [11]. Desafortunadamente, las pocas alternativas de tratamientos efectivos contra el

cáncer, hacen necesario el uso del MTX a pesar de todas las contraindicaciones que éste produce. Para que el tratamiento clínico sea efectivo, la mayoría de los médicos prescriben dosis altas de MTX ($\geq 500 \text{ mg/m}^2$), que podrían conducir a resistencia a medicamentos y toxicidades no específicas en células de proliferación normal. Asimismo, genera niveles elevados de transaminasas séricas e insuficiencia renal en los pacientes [12, 13].

En este contexto, la vehiculización de estos agentes quimioterapéuticos es una estrategia que permitiría, no sólo mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer, sino también minimizar los efectos citotóxicos que causa la quimioterapia en tejidos normales [14]. En los últimos años, se ha presentado un incremento notable en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos nanométricos y se encuentran cientos de publicaciones donde se combinan nanomateriales con agentes quimioterapéuticos [15-17].

Estudios recientes han demostrado que los LDHs son portadores eficientes para la vehiculización de fármacos anticancerígenos aniónicos [18]. Por ejemplo, se ha estudiado la intercalación y el efecto farmacológico de camptotecina [19, 20], 5-fluorouracilo [21, 22], doxorubicina [23], floxuridina [24], doxifluridina [25], metotrexato, [7, 13, 26] entre otros. En todos los casos, se ha informado mayor eficiencia del agente quimioterapéutico cuando se encuentra intercalado entre las láminas de los LDHs. Principalmente debido a que, al vehiculizar el agente quimioterapéutico, los tiempos de circulación en sangre aumentan. Además, se observó mayor internalización del fármaco en las células tumorales. En consecuencia, se requieren dosis más bajas y los efectos citotóxicos en células sanas son menores. No obstante, ninguno de estos estudios contempla la intercalación de MTX en los LDHs funcionalizados con Ris y así lograr mayor efecto terapéutico en enfermedades como osteosarcoma o cáncer de hueso.



En este capítulo, se describen las diferentes estrategias de síntesis empleadas para obtener nanohíbridos; es decir, nanoLDH con MTX intercalado entre sus láminas (nanoLDH-MTX) y su posterior funcionalización con Ris (nanoLDH-MTX@Ris). Asimismo, se muestra la caracterización química, estructural, morfológica e interfacial, tanto de los nanohíbridos como de los nanohíbridos funcionalizados. Por último, se presentan los estudios de liberación del fármaco (MTX) desde los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris mediante métodos que permitieron estudiar la liberación por intercambio aniónico, la disolución y la desorción.

4.2 Metodología experimental

4.2.1 Síntesis de nanoLDH-MTX

Se estudiaron distintos métodos de síntesis para obtener nanoLDH-MTX los cuales debían cumplir ciertas características: a) máxima intercalación del MTX (determinada mediante espectroscopia UV-Vis y DRX), b) partículas monodispersas, con diámetro hidrodinámico aparente (d) de alrededor de 100 nm (determinada mediante DLS) y c) potencial zeta (ζ) mayores a 30 mV (determinado mediante ELS).

4.2.1.1 Síntesis por intercambio aniónico

Para evaluar la obtención de nanoLDH-MTX mediante intercambio aniónico se realizaron dos experimentos por separado utilizando los nanoLDH y nanoLDH@Ris como precursores. (La síntesis de los precursores se describió previamente en el capítulo 3).

Se estudió la cantidad de MTX incorporado mediante este método utilizando dispersiones 1,0 g/L del precursor correspondiente con concentraciones crecientes (0,6 - 1,3 mM, correspondiente a 5 -100 % CIA) de MTX a pH 9,0, las cuales se equilibraron durante 24 horas. Una porción de la dispersión fue centrifugada y filtrada para determinar la concentración de MTX libre mediante espectrofotometría UV-Vis a 370 nm (Γ_{MTX} , mmol/ g), mientras que en la dispersión restante se determinaron los valores de d y ζ de las partículas en suspensión. Este procedimiento se describe a continuación en la figura 4.2.

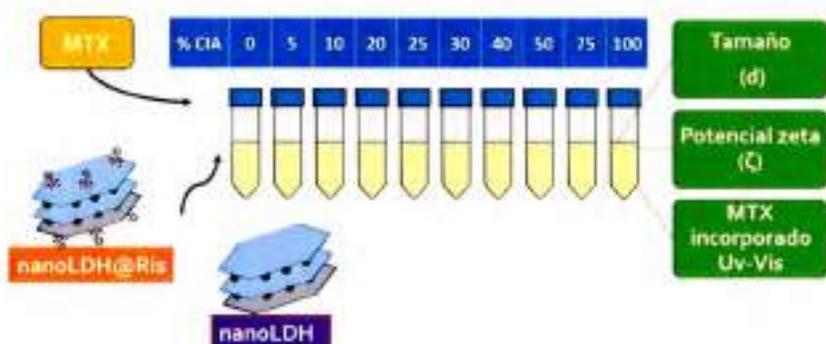


Figura 4.2: Esquema de preparación de nanoLDH-MTX@Ris.

4.2.1.2 Síntesis por coprecipitación

Otro de los métodos de síntesis evaluados para la obtención de nanoLDH-MTX fue la síntesis directa por coprecipitación, tanto a pH constante como a pH variable.

4.2.1.2.1 Síntesis por coprecipitación a pH constante

La síntesis por coprecipitación a pH constante es el método de síntesis por el cual se obtuvieron previamente los nanoLDH y LDH-Ris (descrito en el ítem 3.2.1 del capítulo 3). Para la obtención de LDH, intercalado con MTX, se empleó este método de síntesis reemplazando la solución de NaCl por una solución de MTX 2,2 mM. Se determinaron los valores de d y ζ (ver figura 4.3) como una primera aproximación para optimizar las condiciones de síntesis.

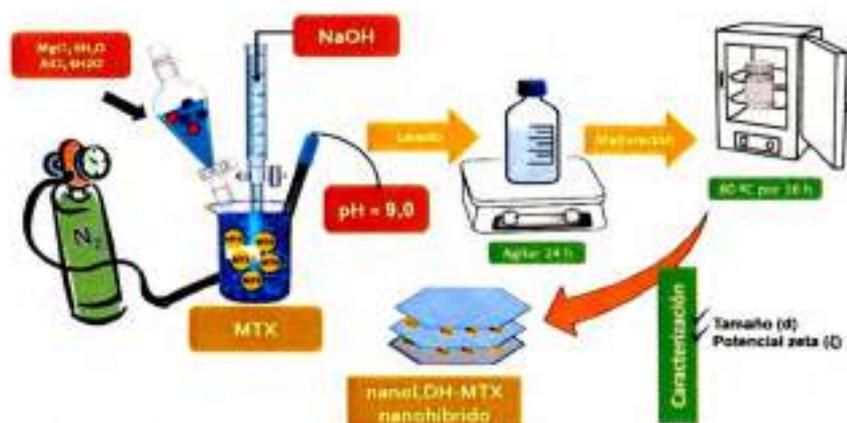


Figura 4.3: Esquema de síntesis de nanoLDH-MTX por coprecipitación a pH constante.

4.2.1.2.2 Síntesis por coprecipitación a pH variable

Con el propósito de determinar las condiciones óptimas para preparar nanoLDH-MTX, se sintetizaron LDH-MTX por coprecipitación a pH variable en diferentes condiciones, de tal manera que fuera posible estudiar variables de síntesis, tales como la relación Mg/Al, aniones de las sales de Al y Mg y la concentración de MTX, expresado % CIA (tabla 4.1)

Tabla 4.1. Condiciones de síntesis evaluadas para preparar nanoLDH-MTX.

| Mg/Al | Aniones de las sales de cationes | MTX % CIA |
|-------|----------------------------------|-----------|
| 2:1 | Cl ⁻ | 50% |
| 3:1 | NO ₃ ⁻ | 100% |

El método de síntesis consiste, como se describió anteriormente, en la adición de una solución que contiene el MTX y la cantidad estequiométrica de NaOH, necesaria para la precipitación de los cationes metálicos, a una solución de los cationes que conforman las láminas. Con el objetivo de determinar las condiciones adecuadas para la síntesis, en cuanto a la relación entre los cationes metálicos y los HO^- , se realizaron titulaciones potenciométricas ácido-base con NaOH 1,0 M como titulante de las soluciones (50 mL) que contenían tanto los cationes metálicos, como el fármaco que participa en la síntesis. Las soluciones tituladas mediante este método contenían 0,6 mmol Al^{3+} en todos los casos, ensayándose relaciones Mg/Al 2:1 o 3:1 y contenidos de MTX correspondientes a 50 y 100 % CIA (0,15 y 0,30 mmol, respectivamente).

Una vez determinada la cantidad estequiometría de NaOH necesaria para la formación de los sólidos (titulaciones potenciométricas ácido-base), se procedió a realizar la síntesis de nanoLDH-MTX por coprecipitación a pH variable, bajo las diferentes condiciones como se describe a continuación en la figura 4.4.



Figura 4.4: Esquema de síntesis de nanoLDH-MTX por coprecipitación a pH variable.

Se agregó rápidamente una solución alcalina a 6,0 mL de una solución que contenía las sales de cationes metálicos ($[Mg^{2+}] = 0,3M$, $[Al^{3+}] = 0,1M$) y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen total de 50mL, bajo una fuerte agitación, generada por un agitador Ultraturax T18 BASIC a 20000 rpm durante 30 segundos. La solución alcalina contenía la cantidad estequiométrica de: a) NaOH para precipitar los cationes, dependiendo de la relación Mg/Al empleada (3,9 mmol para una relación 2:1 y 5,1 mmol para una relación 3:1), y b) la cantidad de MTX correspondiente al 50 o 100% de la CIA.

El sólido obtenido fue separado inmediatamente del medio de síntesis mediante centrifugación. Se realizaron una serie de lavados con agua descarbonatada, hasta que se observó turbidez en el sobrenadante. Finalmente, el sólido se dispersó en 50 mL de agua descarbonatada. Esta dispersión, se dejó en agitación toda la noche y se realizó su maduración bajo condiciones hidrotérmicas (a 90 °C por 4 horas). Se determinaron los valores de Γ_{MTX} , d y ζ de las partículas en suspensión. Una porción del sólido fue liofilizado para realizar la caracterización estructural de la misma mediante DRX.

Este procedimiento permitió obtener las condiciones de síntesis óptimas para preparar LDHs con las propiedades adecuadas en cuanto a contenido de MTX y distribución de tamaño de partícula. Las muestras así obtenidas se utilizaron para determinar la estabilidad frente a la agregación de los nanoLDH-MTX en el tiempo, mediante la determinación de los valores de d , ζ y MTX libre a distintos tiempos (durante 14 días luego de la síntesis).

Finalmente, la muestra de nanoLDH-MTX que presentó mayor estabilidad coloidal en el tiempo, se utilizó para determinar su composición química y realizar la caracterización estructural y morfológica.

4.2.2 Funcionalización de nanoLDH-MTX con Ris

La funcionalización de los nanoLDH-MTX se realizó mediante la dispersión de los nanohíbridos en una solución que contenía el anión HRis^{3-} . Para elegir las condiciones adecuadas de funcionalización, se realizó el estudio de la interacción de Ris con nanoLDH-MTX. Con este objetivo, se prepararon dispersiones (10,0 mL) conteniendo 0,08 mmol de nanoLDH-MTX y concentraciones crecientes (hasta 1,2 mM, correspondiente al 50% de CIA) de Ris a pH 9,0. Estas dispersiones se equilibraron durante 24 horas, trascurrido el tiempo una porción de la muestra se centrifugó y filtró para determinar la concentración de MTX desplazado de los nanoLDH-MTX. Es decir, la concentración de MTX que se libera desde los nanoLDH-MTX, luego de la incorporación de Ris, en el sobrenadante. Con el volumen restante, se determinaron los valores de d y ζ de las partículas en suspensión. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas para proceder a la obtención de los patrones de DRX.

De acuerdo a los resultados del experimento anterior, se eligieron las condiciones óptimas para realizar la funcionalización: se agregó 0,02 L de solución de Ris (6,0 mM a pH 9,0), correspondiente al 40% de la CIA, a 0,07 L de dispersión de nanoLDH-MTX (5,0 g/L) y se equilibró durante 24 horas. Finalmente, se determinó la composición química y se realizó la caracterización estructural, morfológica e interfacial de la muestra final (ver figura 4.5).

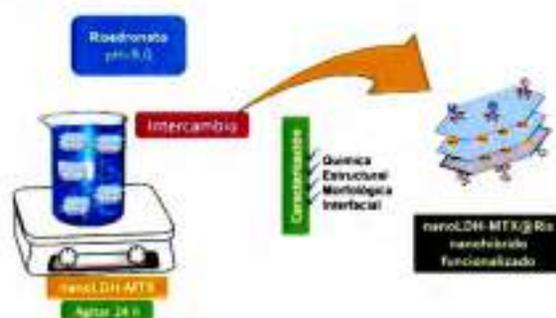


Figura 4.5: Esquema de preparación de nanoLDH@Ris.

4.2.3 Caracterización

La caracterización química, estructural, morfológica e interfacial de los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris se realizó según lo descrito en el capítulo 2.

4.2.4 Liberación del Fármaco (MTX)

Se realizaron experimentos para estudiar los dos principales procesos de liberación desde los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris: intercambio aniónico y disolución del nanoportador.

4.2.4.1 Intercambio aniónico

Se realizaron cinéticas de liberación en dispersiones de 0,5 g/L de nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris en NaCl (1,50 mM a pH 9,0), buffer fosfato (0,05 M a pH 7,4) y buffer acetato (0,05 M a pH 4,7). A tiempos predeterminados hasta 8 horas se sacaron volúmenes fijos de muestras, que se centrifugaron y filtraron para determinar la cantidad de MTX liberado en función del tiempo.

4.2.4.2 Disolución

La cinética de disolución en medio ácido, de los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris, se estudió en una solución de HCl de pH 2,9, a la que se le agregó la muestra correspondiente, de tal forma que la concentración y volumen final fueran 0,1g/L y 0,1L, respectivamente. La disolución de la matriz fue determinada mediante medidas continuas de pH, utilizando un titulador automático (905 Metrohm) acoplado a un electrodo de vidrio (Metrohm 9.0262.100).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Síntesis de nanoLDH-MTX

Con el objetivo de obtener nanoLDH-MTX con una máxima intercalación de MTX sin perder su tamaño nanométrico, se estudiaron diferentes métodos de síntesis tales como: intercambio aniónico y síntesis por coprecipitación tanto a pH constante, como a pH variable. Los resultados obtenidos con cada uno de estos métodos de síntesis se presentan a continuación.

4.3.1.1 Síntesis por intercambio aniónico

La dependencia de la incorporación de MTX a los nanoLDH y nanoLDH@Ris con la concentración del fármaco, así como la variación de los valores de ζ y d de las dispersiones resultantes se presentan en la figura 4.6.

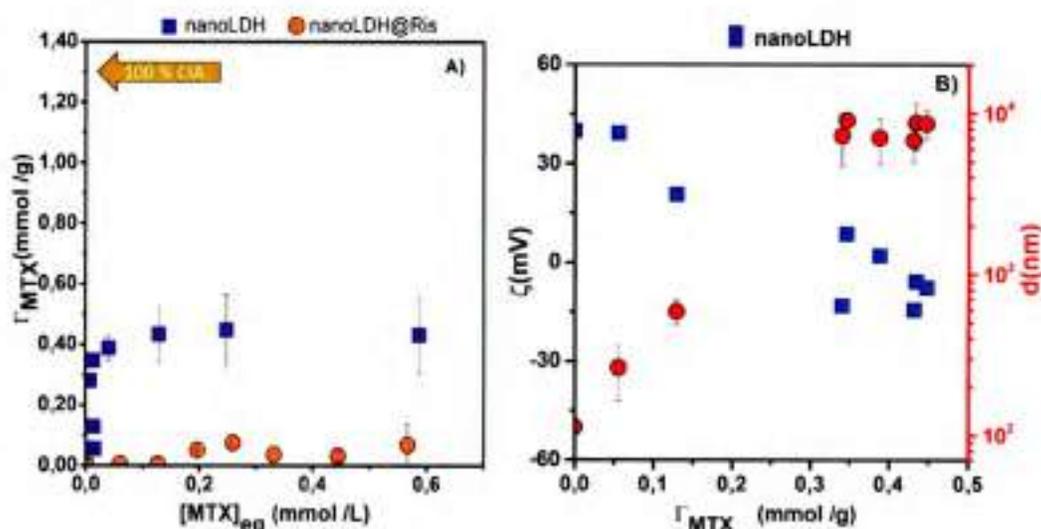


Figura 4.6: (A) Incorporación de MTX (Γ_{Ris}) a los nanoLDH y nanoLDH@Ris en función de la concentración en equilibrio de MTX $[\text{MTX}]_{\text{eq}}$, (B) en el eje de la izquierda ζ (cuadros) y en el eje de la derecha d (círculos) en función de Γ_{MTX} .

En la figura 4.6A se representa la cantidad de MTX incorporado (Γ_{MTX}) en función de su concentración en equilibrio ($[\text{MTX}]_{\text{eq}}$) tanto para los nanoLDH como para los nanoLDH@Ris. Además, se estudió la variación de los valores de d y ζ con Γ_{MTX} para ambas muestras, sólo se muestran, en la figura 4.6 B, las correspondientes a los nanoLDH.

La incorporación de MTX se produjo en dos pasos consecutivos. A bajas concentraciones de MTX ($[\text{MTX}]_{\text{eq}} < 0,1$ mmol/L) se presentó un marcado incremento en Γ_{MTX} , hasta valores de $\Gamma_{\text{MTX}} = 0,4$ mmol/g. Luego, para valores de $[\text{MTX}]_{\text{eq}} > 0,2$ mmol/L se produce una disminución de la pendiente, hasta alcanzar un plateau a Γ_{MTX} alrededor de 0,4 mmol/g, correspondiente a un 31% de la CIA.

Este comportamiento también se vió reflejado en los valores de d y ζ como se observa en la figura 4.6 B. A medida que aumento Γ_{MTX} hasta 0,4 mmol/g, se observa una disminución continua en los valores de ζ de 40,0 mV hasta valores alrededor de los -10,0 mV (Figura 4.6 B), donde se alcanza un valor constante. Como consecuencia, los valores de d aumentaron desde 100 nm (nanoLDH) hasta unos μm .

Por otra parte, los valores de Γ_{MTX} para los nanoLDH@Ris fueron prácticamente despreciables, esto no permitió el trazado de las curvas en función de Γ_{MTX} . No obstante, se pudo comprobar que los valores de ζ se mantuvieron constantes alrededor de -20,0mV, sin embargo no permitió mantener los valores de d de 100 nm de los nanoLDH@Ris, aumentando el orden de los μm .

El incremento de Γ_{MTX} a bajas $[\text{MTX}]_{\text{eq}}$ y la disminución de los valores de ζ , que presentan los nanoLDH, indican que el MTX se incorpora preferentemente en la superficie de las láminas por interacciones



electrostáticas. Es así como, en los nanoLDH@Ris, al estar ocupada su superficie por el Ris la incorporación de MTX es mínima, si bien suficiente para producir una variación en el tamaño de partícula.

Estos resultados indican que el método de síntesis por intercambio aniónico no es adecuado para obtener nanoLDH-MTX. El MTX, a pesar de tener mayor densidad de carga que el Cl^- , presentes entre las láminas de los nanoLDHs precursores, también es más voluminoso y se dificulta su intercalación en el espacio interlamilar. Debido a esto se estudió otro método de síntesis, donde el proceso de formación de las láminas e intercalación del anión se den en conjunto, como es el caso de las síntesis por coprecipitación [27].

4.3.1.2 Síntesis por coprecipitación

4.3.1.2.1 Síntesis por coprecipitación a pH constante

Se sintetizó LDH-MTX por coprecipitación a pH constante, empleando el método previamente descrito para la síntesis de nanoLDH y con la cantidad de MTX necesaria para ocupar el 100% de los sitios disponibles. En la figura 4.7 se presentan la distribución de tamaño y el valor de ζ correspondientes a las partículas en dispersión después del tratamiento hidrotérmal.

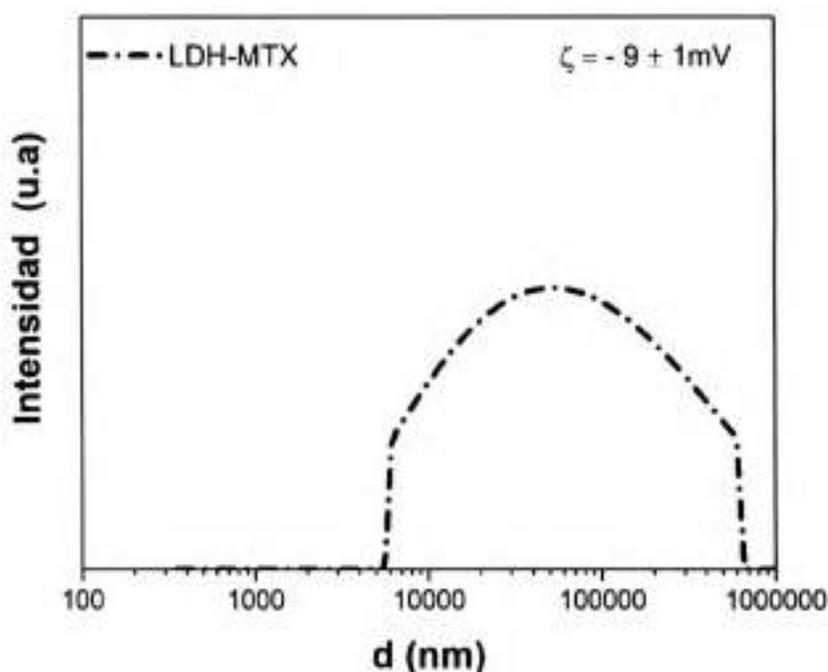


Figura 4.7: Distribución de tamaño y valores de ζ para LDH-MTX sintetizado por coprecipitación a pH constante.

En la figura 4.7 se observa que las partículas sintetizadas bajo estas condiciones presentan un valor de $\zeta = -9,0 \text{ mV}$, insuficiente para lograr partículas monodispersas, incluso después del tratamiento hidrotérmico, se observan la formación de agregados con valores de d del orden de los μm . Como las partículas obtenidas por este método de síntesis no cumplían con las características de tamaño y potencial zeta, no se continuó con la caracterización de éstas y se procedió a estudiar la síntesis por coprecipitación a pH variable, combinando una serie de variables como se describe a continuación.

4.3.1.2.2 Síntesis por coprecipitación a pH variable

Antes de proceder con la síntesis se determinó la cantidad estequiométrica de NaOH necesaria para la formación de los LDH-MTX bajo las diferentes composiciones estudiadas. Con este propósito, se realizaron titulaciones de los reactantes con NaOH. A modo de ejemplo se presentan las curvas resultantes de la titulación de soluciones con una relación de Mg/Al 3:1 y MTX correspondiente al 50% de la CIA (figura 4.8).

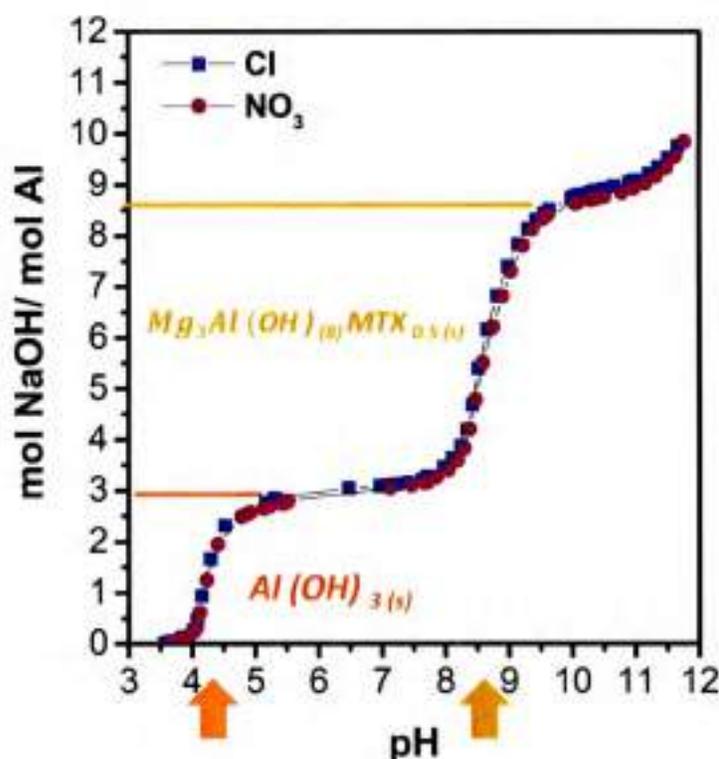
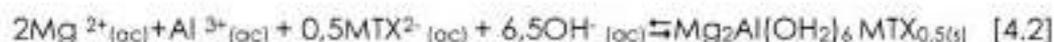
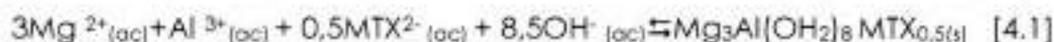


Figura 4.8: Curvas de titulación correspondientes a las soluciones de metales con sales de nitrato y cloruro en una relación de Mg/Al 3:1, y MTX correspondiente al 50% de la CIA.

Todas las curvas de titulación obtenidas presentan un perfil similar, característico para la formación de LDHs de Mg y Al, éstas presentan dos grandes consumos de OH. En el primero, correspondiente a la formación de $\text{Al}(\text{OH})_3$, se consumen 3 moles de OH por cada mol Al^{3+} y se presenta entre valores de pH de 4 y 5. En el segundo, atribuido a la formación de LDH-MTX, se presenta entre valores de pH de 8 y 10, el consumo de OH depende de la relación de Mg/Al utilizada; para una relación 3:1 se consumen 5 moles de OH por cada mol de Al^{3+} , mientras que para la relación de Mg/Al 2:1 se consumen 3 moles de OH por cada mol de Al. Igualmente, el MTX presenta un consumo de OH de 1,0 y 0,5 mol de OH por mol de Al cuando se emplea el 100% y 50% de la CIA, respectivamente. Este consumo es debido a la deprotonación de los dos ácidos carboxílicos presentes en la molécula. A continuación, se presentan las reacciones que describen la formación de LDH-MTX:



La reacción 4.1 es la correspondiente para una relación de Mg/Al 3:1 y la ecuación 4.2 para una relación de Mg/Al de 2:1, en ambas reacciones se utiliza MTX correspondiente al 100% de la capacidad de intercambio.

Obtenidas las cantidades estequiométrica de NaOH necesarias para la formación de los LDH-MTX, se procedió con las síntesis bajo las diferentes condiciones. Como criterio para elegir las mejores condiciones para obtener nanoLDH-MTX, se utilizaron los valores de d y ζ obtenidos, estos resultados se presentan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Valores de d y ζ determinados con los LDH-MTX sintetizados en las diferentes condiciones, después del tratamiento hidrotérmal (TH).

| | | Mg/Al 3:1 | | | Mg/Al 2:1 | | |
|------|-------|-----------|-------------------|--------------|-----------|----------|------------------------------|
| | | | d (nm) | ζ (mV) | | d (nm) | ζ (mV) |
| 100% | SALES | Cloruro | $> 1 \times 10^4$ | * | SALES | Cloruro | $> 1 \times 10^3$ 18 ± 1 |
| | | Nitrato | $> 1 \times 10^4$ | * | | Nitrato | $> 1 \times 10^3$ 23 ± 1 |
| 50% | SALES | Cloruro | 574 ± 1 | 23 ± 2 | SALES | Cloruro | 108 ± 4 41 ± 1 |
| | | Nitrato | $> 1 \times 10^3$ | 31 ± 1 | | Nitrato | 137 ± 2 44 ± 1 |

(*) Por las características que presentó la muestra no fue posible determinar los valores de ζ .

Como se observa en la tabla 4.2, el valor de ζ , a pesar de ser positivo, fue insuficiente para estabilizar electrostáticamente las dispersiones de los nanoLDH-MTX cuando se emplea una cantidad de MTX correspondiente al 100% de CIA, en consecuencia, se observa la formación de agregados con valores de d por el orden de los μm .

Por otra parte, en la figura 4.9 se presentan los difractogramas correspondientes a las muestras sintetizadas bajo una cantidad de MTX correspondiente al 50% de CIA, con relaciones de Mg/Al 2:1 y 3:1 utilizando tanto sales de cloruro como de nitrato. Además, se presentan los difractogramas de LDHs intercalados con aniones Cl^- y NO_3^- , los cuales son utilizados como referencia para ver el desplazamiento del espaciado interlaminaar causado por la intercalación de MTX.

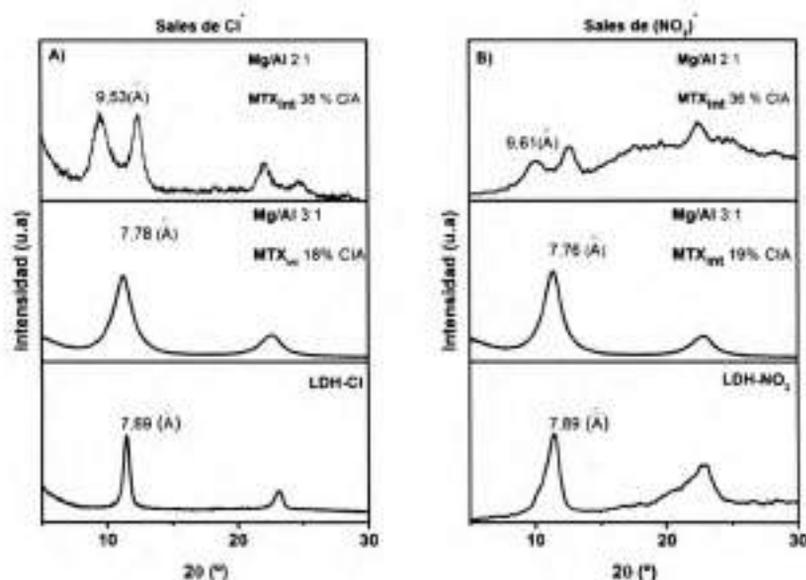


Figura 4.9: Difractogramas de rayos X de LDH-MTX sintetizados con una cantidad de MTX inicial correspondiente al 50% de CIA y con relaciones de Mg/Al 2:1 y 3:1. A) Utilizando sales de cloruro y B) sales de nitrato. Además, se presentan los difractogramas de LDHs intercalados con Cl⁻ y NO₃⁻ que son utilizados como referencia

Los difractogramas obtenidos para los LDH-MTX sintetizados bajo las mismas condiciones, empleando tanto sales de cloruro como de nitrato, presentaron series de picos al mismo valor de 2θ . Asimismo, se observó una diferencia muy marcada entre los difractogramas correspondientes a los LDH-MTX sintetizados bajo una relación de Mg/Al 3:1 y 2:1. Cuando la relación de Mg / Al es 2: 1, las muestras presentaron picos a un ángulo inferior de 2θ , evidenciando la presencia de una fase de LDH con espaciado interlaminaar mayor, correspondiente a la intercalación de MTX, como se explicará más detalladamente en ítem 4.3.3 correspondiente a la caracterización estructural de los nanoLDH-MTX. En cambio, para la relación de Mg / Al 3: 1, no se observaron estos picos, pero sí picos análogos a los de la muestra de

referencia, lo que indica que no se produjo la intercalación de MTX entre las láminas de LDH.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Fenglin Qi y colaboradores, ellos estudiaron el efecto de la relación de Mg/Al sobre la obtención de LDHs intercalados con MTX. Estos autores encontraron que la intercalación de MTX correspondió a 41% CIA para una relación de Mg/Al 2:1 mientras que para una relación de 3:1 no se presentó intercalación significativa [28]. Este hecho se debe a la intensa competencia entre los aniones provenientes de la sal y el MTX dentro de las láminas de LDH durante la síntesis. Por tanto, la formación del LDH intercalado con el anión proveniente de la sal da lugar a una fase LDH energéticamente más favorable que a la formada con MTX [29]. Principalmente, hay dos factores que pueden afectar la estabilidad del LDH: cuanto más cationes Mg^{2+} se sustituyen por cationes Al^{3+} , más cargas positivas se producen en las láminas de LDH, lo que conlleva a una unión más fuerte entre las láminas y el anión interlaminaar y, por lo tanto, a una fase LDH con estructura más estable; por otro lado, en la sustitución de cationes, se introduciría energía adicional debida a la distorsión creada por la diferencia de tamaño entre los dos cationes. Es así que se espera que la fase LDH más estable sea la que tenga una relación Mg/Al que compense mejor estos los dos factores [30].

Los resultados obtenidos nos indican que para obtener nanoLDH-MTX con las características adecuadas para este estudio, la síntesis se debe realizar por coprecipitación a pH variable, utilizando una solución de metales, ya sea con sales de nitrato o cloruro en una relación de Mg/Al 2:1, y MTX correspondiente al 50% de la CIA.

Los nanoLDH-MTX que presentaron las mejores características de tamaño y potencial zeta fueron seleccionadas para determinar el MTX incorporado (Γ_{MTX}).

estos resultados se presentan en la tabla 4.3. Además, se realizó el estudio de estabilidad en cuanto a tamaño y potencial zeta en función del tiempo como se describe más adelante.

Tabla 4.3. Valores de d , ζ y Γ_{MTX} determinados con los nanoLDH-MTX sintetizados empleando una solución de metales de relación de Mg/Al 2:1 con MTX al 50%, después del tratamiento hidrotérmal (TH).

| Sales | Lavados | d (nm) | ζ (mV) | MTX | |
|---------|---------|-------------|--------------|----------------|------|
| | | | | (mmol/ g LDH) | %CIA |
| Cloruro | 6 | 108 ± 4 | 41 ± 1 | 0,69 | 38% |
| Nitrato | 3 | 137 ± 2 | 44 ± 1 | 0,65 | 37% |

Los nanoLDH-MTX sintetizados bajo una relación de Mg/Al 2:1, y cantidad de MTX inicial correspondiente al 50% de la CIA, empleando tanto sales de cloruro como de nitrato, presentan valores de d y ζ similares. Asimismo, el MTX incorporado en ambos casos es cerca del 40% de la CIA. Sin embargo, cuando se emplean sales de nitrato se necesitan menos lavados para alcanzar estos valores. Esto se debe a la menor afinidad de los iones NO_3^- por las láminas de LDH comparados a los iones Cl^- [31], por lo que se eliminan de la superficie de los LDHs con menor número de lavados.

Aunque se observó que los nanoLDH-MTX se mantenían dispersos al momento de la síntesis, se pudo constatar la agregación de las partículas con el tiempo. Se realizaron medidas de los valores de d y ζ así como la determinación de la

concentración de MTX libre en función del tiempo en las dispersiones de los nanoLDH-MTX (figura 4.10).

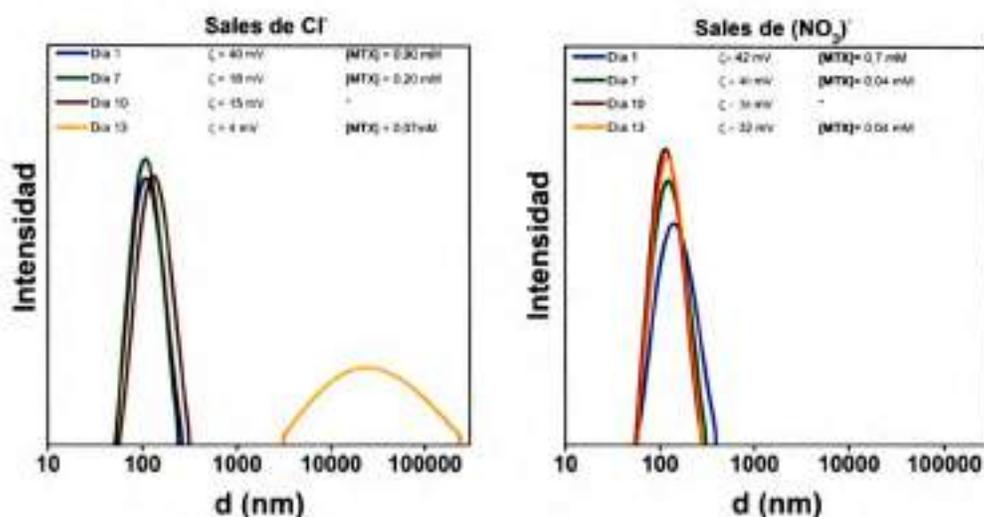


Figura 4.10: Distribución de tamaño, valores de ζ y concentraciones de MTX libre en función del tiempo, correspondientes a las dispersiones de nanoLDH-MTX sintetizadas utilizando sales de cloruro y nitrato.

En los resultados obtenidos se presenta una disminución tanto de la concentración de MTX libre como en los valores de ζ , este hecho nos indica que el MTX libre se está incorporando en la superficie de los nanoLDH-MTX. Sin embargo, cuando se emplean sales de cloruro la disminución de los valores de ζ es más drástica, se alcanzan valores de ζ de 4mV luego de 14 días de mantener la dispersión y en consecuencia las partículas tienden a agregarse. Por el contrario, cuando se utilizan sales de nitrato, la disminución de los valores de ζ es más paulatina y el efecto sobre las dispersiones de nanoLDH-MTX es menor, se observan valores de d entorno a 100nm después de 13 días. Por lo tanto, la síntesis de nanoLDH-MTX se realizará empleado sales de nitrato bajo las condiciones ya establecidas.

4.3.2 Funcionalización de nanoLDH-MTX con Ris

Con el propósito de establecer las condiciones óptimas para realizar la funcionalización de los nanoLDH-MTX, se estudió la interacción del Ris con los nanoLDH-MTX. Los resultados obtenidos en estudio de la interacción de Ris con los nanoLDH, descrito en el capítulo anterior (ítem 3.3.2.2), nos indicaron que la funcionalización de la superficie de los nanoLDH se logra a bajas concentraciones de Ris. Es así como el presente estudio se realizó empleando bajas concentraciones de Ris inicial (10 - 50%), expresado como el % de CIA.

En este experimento no fue posible determinar la cantidad de Ris incorporada mediante espectroscopia UV-Vis. Ya que el valor de coeficiente de absorptividad molar correspondiente al MTX (7183 l/M/cm) es mucho más alto que el correspondiente al Ris (3536 l/M/cm), en consecuencia, no se observó la curva espectral correspondiente para el Ris. No obstante, la incorporación de Ris se evidenció indirectamente mediante los valores de ζ .

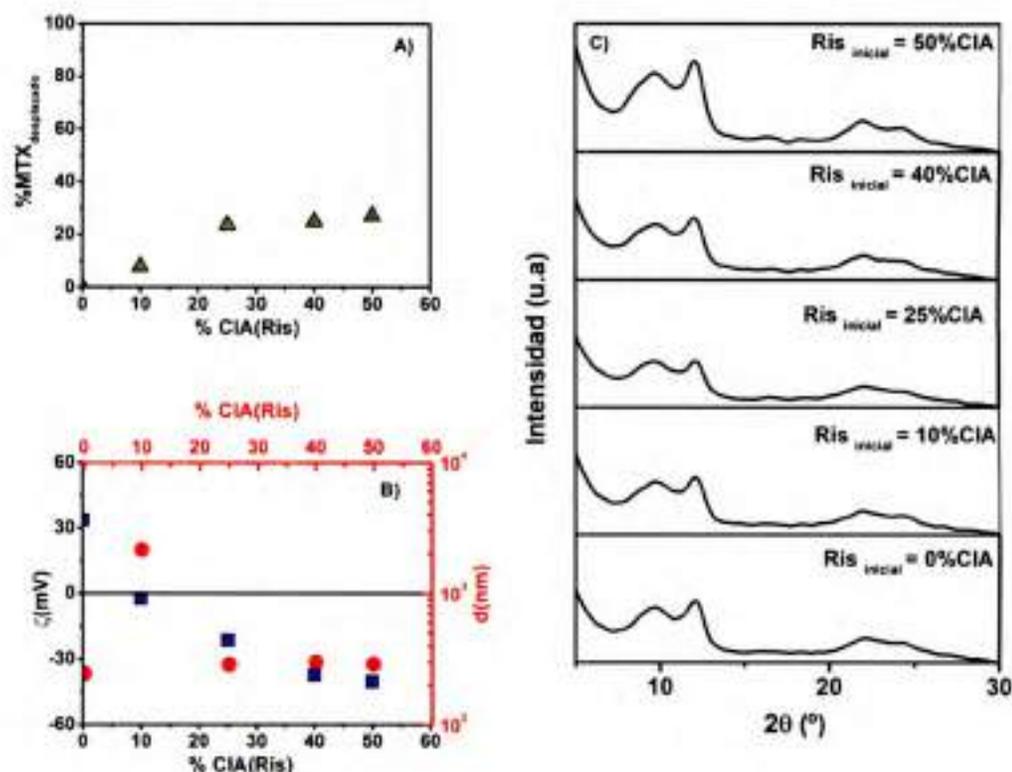


Figura 4.11: (A) % MTX desplazado, (B) en el eje de la izquierda ζ (cuadros) y en el eje de la derecha d (círculos) y (C) patrones de DRX de muestras en función de la concentración de Ris inicial (%CIA).

Se determinó el % MTX desplazado en función del Ris agregado inicialmente, como se muestra en la figura 4.10. Además, se determinaron los valores de d y ζ (figura 4.11 B) y los patrones de DRX (figura 4.11 C) a medida que se incorpora Ris en los nanoLDH-MTX.

Se observó que a medida que se aumentó la concentración inicial de Ris, el desplazamiento de MTX aumentó hasta alcanzar un valor constante cerca del 25% de MTX intercalado inicialmente (figura 4.11 A). El cambio que sufre la superficie de los nanoLDH-MTX se ve reflejado en los valores de d y ζ . Cuando se agregó el 10% de

CIA de Ris el valor del ζ disminuyó a un valor cercano a 0 mV, lo que produjo la agregación de las partículas, en consecuencia se observó el aumento del valor de d hasta unos pocos μm . Una vez que la concentración de Ris inicial aumenta los valores de ζ disminuyen hasta alcanzar un valor cerca de -40 mV y el valor de d descendió hasta un valor de 200 nm (figura 4.11 B).

Por último, para las concentraciones de Ris empleadas no se observaron cambios en los patrones de DRX (figura 4.11 C). La intensidad de los picos (001), correspondientes a la fase de LDH-MTX (se explicará más adelante) no se ve afectada por el aumento de la concentración de Ris.

A partir de los resultados obtenidos, la funcionalización de los nanoLDH-MTX se logra empleando una concentración de Ris entre el 30 y 40 % CIA. De esta manera se mantiene la mayoría de la carga de MTX, las características estructurales de los nanoLDH-MTX y se obtienen partículas con valores de d y ζ de 200 nm y $\zeta = -40 \pm 1$ mV, respectivamente. Por otra parte, se observó que los nanoLDH-MTX@Ris se mantenían en dispersión durante más tiempo que las partículas sin funcionalizar con Ris.

4.3.3 Caracterización

Al obtener tanto los nanoLDH-MTX como los nanoLDH-MTX@Ris, se realizó el estudio comparativo de su composición, estructura y morfología. Cabe resaltar, que para la optimización de la síntesis se realizaron varias síntesis y una vez obtenidas las condiciones, se preparó un stock con el cual se procedió a realizar toda la caracterización y demás experimentos.

Se realizó el análisis termogravimétrico de los nanohíbridos, los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris, así como, el del fármaco MTX. Las curvas de TGA, fueron de utilidad para determinar la composición de los nanohíbridos, mientras que las curvas de DTA se emplearon para identificar los procesos involucrados en la degradación térmica de las diferentes muestras, estos resultados se muestran a continuación en la figura 4.12.

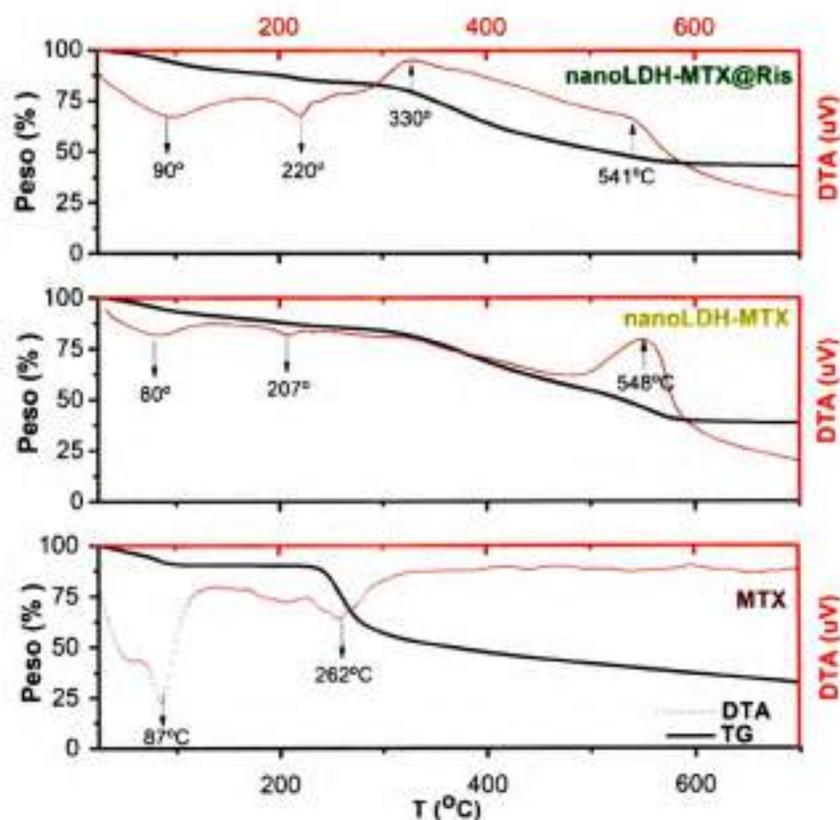


Figura 4.12: Curvas de TGA/DTA correspondientes a los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris.

Las curvas de los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris, mostraron los tres procesos principales involucrados en la degradación térmica de los LDH, deshidratación, deshidroxilación y descomposición del anión [32]. Mientras que, el perfil térmico del MTX libre, mostró dos procesos, el primero con un pico

centrado en los 87°C aproximadamente, de carácter endotérmico, asociado a la descarboxilación y el segundo en los 262°C debido a la descomposición del metotrexato [33].

En el caso de los nanohíbridos, se observó una pérdida de masa total del 38% para los nanoLDH-MTX y 44% para los nanoLDH-MTX@Ris al calentar hasta 800 °C. En las curvas TGA/DTA se exhibieron los procesos de deshidratación hasta los 200°C aproximadamente, con un pico asociado a un efecto endotérmico. Mientras que, la pérdida de peso debida a la deshidroxilación y la descomposición del anión se produjo entre los 300°C y los 580°C, donde el pico principal se registró alrededor de los 540°C y fue de carácter exotérmico [12]. La temperatura de descomposición del MTX libre (262°C), se desplaza a una temperatura más alta 540°C en los nanohíbridos, esto indica la intercalación del MTX entre las láminas de los nanoLDH, debido a que la interacción electrostática del MTX con las láminas mejora su estabilidad térmica [34].

Por otra parte, se utilizaron los resultados del análisis químico y elemental conjuntamente con los datos obtenidos por otras técnicas, tales como, espectroscopia de energía dispersiva, análisis termogravimétrico y espectroscopia Uv-Vis para determinar la composición de los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris. De este modo, se determinó la fórmula química para cada uno de ellos. Estos resultados se recopilan en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Análisis químico y elemental de los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris.

| | %Mg | %Al | Mg/Al | %C | %N | %H ₂ O | %MTX | Fórmula Química |
|-----------------|------|------|-------|------|-----|-------------------|------|--|
| nanoLDH-MTX | 17,0 | 11,1 | 1,7 | 17,0 | 7,2 | 12,3 | 22,9 | Mg _{0,44} Al _{0,26} (OH) ₂ (MTX) _{0,14} (NO ₃) _{0,26} · 0,79 H ₂ O |
| nanoLDH-MTX@Ris | 15,8 | 10,2 | 1,7 | 15,7 | 6,1 | 13,7 | 17,3 | Mg _{0,45} Al _{0,27} (OH) ₂ (MTX) _{0,14} (NO ₃) _{0,27} Ris _{0,17} · 0,88 H ₂ O |

La fórmula química de los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris se calculó considerando la presencia de dos aniones (MTX^{2-} y NO_3^-) entre las láminas de LDHs.

De acuerdo a la composición química se observó que el MTX presente en los nanoLDH-MTX ocupa el 32 % de la CIA. Este valor es menor al obtenido previamente en la optimización de la síntesis, ya que son síntesis diferentes, sin embargo el MTX incorporado en las diferentes síntesis siempre ocupó valores entre 30 y 40 % de la CIA. Además, el valor positivo de ζ (44,0 mV) medido para los nanoLDH-MTX indica que el MTX se encuentra intercalado entre las láminas. El resto de los sitios intercambiables se suponen ocupados ya sea por aniones NO_3^- o aniones CO_3^{2-} . Por otra parte, se observó que el contenido de MTX en los nanoLDH-MTX@Ris fue menor que en los nanoLDH-MTX, ocupando 22 % de los sitios disponibles. La incorporación de Ris en la superficie de los nanoLDH-MTX produce el desplazamiento de una pequeña cantidad del MTX presente en las láminas.

La fórmula química establecida para ambas muestras indicó que tan solo el 18 % de los sitios disponibles para el intercambio son ocupados por Ris, lo que indica, junto con el valor negativo de ζ (-40,0 mV) y el pequeño desplazamiento de MTX, que el Ris se incorpora principalmente en la superficie de los nanoLDH-MTX@Ris.

En la figura 4.13 se presentan los difractogramas de rayos X para los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris. Además, se incluyen los difractogramas de MTX y nanoLDH intercalado con el anión NO_3^- , utilizados como referencia.

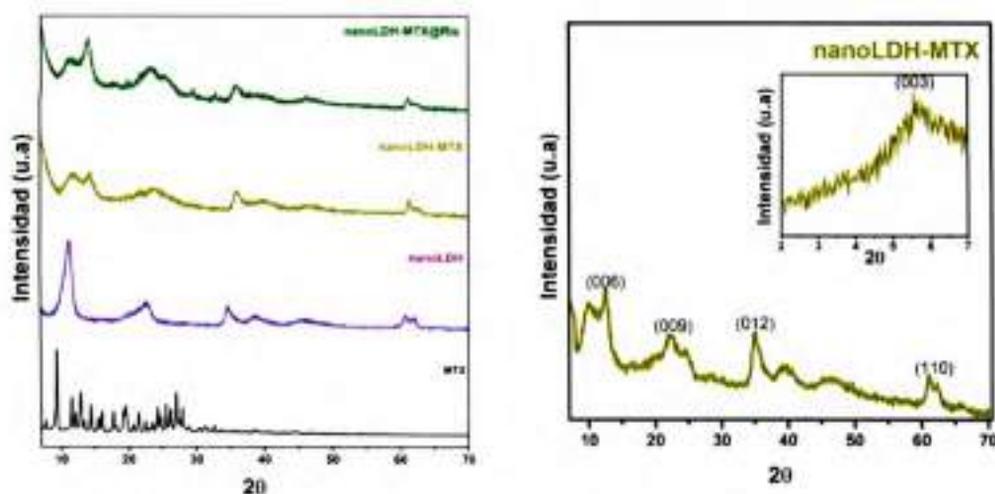


Figura 4.13: Difractogramas de rayos X de (A) nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris y muestras de referencia y (B) nanoLDH-MTX empleando un escala más amplia de 2θ .

Como se discutió previamente, los difractogramas de los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris no presentan diferencia entre sí. Estos difractogramas, en conjunto con el correspondiente a nanoLDH, presentan las señales características para los LDHs, con picos de mayor intensidad a bajos valores 2θ (menor a 35°), correspondientes a las reflexiones (00l), mientras que las (hk0), menos intensas, aparecen a valores de 2θ mayores [35]. Sin embargo, para las muestras intercaladas con MTX se observó un desplazamiento de los picos (00l) a valores de menor ángulo respecto a las intercaladas con NO_3^- , así como una disminución en la intensidad. Este comportamiento es característico para la intercalación de aniones orgánicos en las láminas de LDHs. Este tipo de aniones presentan mayor tamaño y en consecuencia, producen el aumento de la distancia entre las láminas, así como la disminución del ordenamiento de las láminas debido a una menor interacción entre ellas [36]. Otros eventos que respaldan la intercalación del MTX en los nanoLDH, es la ausencia de picos correspondientes al MTX puro en estos

difractogramas, además del cambio que presentan los valores correspondientes al espaciado basal y el parámetro de celda c , como se describe a continuación.

La muestra de referencia intercalada con el anión NO_3^- (nanoLDH) presentó un espacio basal alrededor de $7,8 \text{ \AA}$ y sus parámetros de celda fueron de $c = 23,4 \text{ \AA}$ y $a = 3,04 \text{ \AA}$. Mientras, que para las muestras intercaladas con MTX el espacio basal fue de $16,0 \text{ \AA}$ y sus parámetros de celda fueron de $c = 48,0 \text{ \AA}$ y $a = 3,04 \text{ \AA}$. Si se sustrae el valor del espesor de la lámina de LDH ($4,8 \text{ \AA}$) de los espacios basales calculados para ambas muestras, se obtienen los valores de espaciado interlamina: $3,0 \text{ \AA}$ para nanoLDH y $11,2 \text{ \AA}$ para nanoLDH-MTX. Por otra parte, no se observaron cambios entre los valores del parámetro a ($=d(110)$), ya que está relacionado con los radios de los cationes laminares (Mg^{2+} y Al^{3+} [37]).

De acuerdo al tamaño molecular del MTX, $21,7 \text{ \AA}$ de largo y $6,5 \text{ \AA}$ de ancho [38] [13], el espacio basal esperado para los nanoLDH intercalados con MTX sería mucho más grande que el obtenido experimentalmente ($16,0 \text{ \AA}$). Sin embargo, en la literatura se han registrado LDH-MTX con una gran variedad de valores correspondientes al espacio basal desde $14,9 \text{ \AA}$ hasta $28,9 \text{ \AA}$ [28, 34, 37, 39-41]. Debido al gran tamaño y la compleja estructura que presenta el MTX, esta molécula puede adoptar diferentes conformaciones dentro de las láminas de LDH y dar como resultado diferentes espacios basales. Por ejemplo, Latterini propone que esta molécula se puede acomodar en el espacio interlamina con sus anillos aromáticos en forma perpendicular o inclinada con respecto a las láminas de LDH y con sus grupos carboxílicos apuntando alternativamente hacia las capas superior e inferior formando una monocapa [42]. Otros autores [43, 44, 45], sugieren que los aniones se localizan formando bicapas que adoptan diferentes orientaciones

y distinto grado de inclinación entre las capas, siempre con sus grupos carboxílicos apuntando hacia las láminas de LDH [40]. De acuerdo al espacio basal obtenido en este caso, el MTX adopta una conformación de bicapa entre las láminas de nanoLDH (figura 4.14). En esta conformación, los grupos carboxílicos apuntan hacia las láminas, y los anillos aromáticos se encuentran próximos, lo que conlleva a un apilamiento $\pi - \pi$, con un consecuente aumento de la densidad electrónica [39, 40].

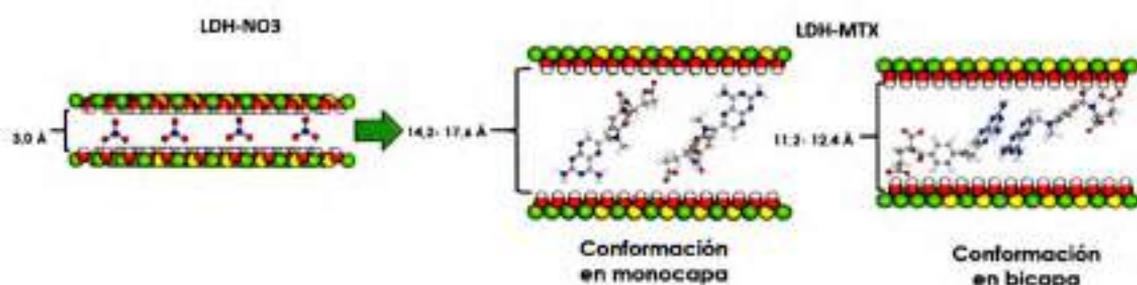


Figura 4.14: Posibles configuraciones del anión MTX entre las lamina de LDHs, modificado de la referencia [41].

En la figura 4.15, se presentan los espectros infrarrojo para los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris, así como los espectros correspondientes al MTX y nanoLDH intercalado con el anión NO_3^- , utilizados como referencia. Los espectros de nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris son muy similares entre sí, y coinciden con los reportados en bibliografía para LDHs intercalados con MTX [13, 12, 37].

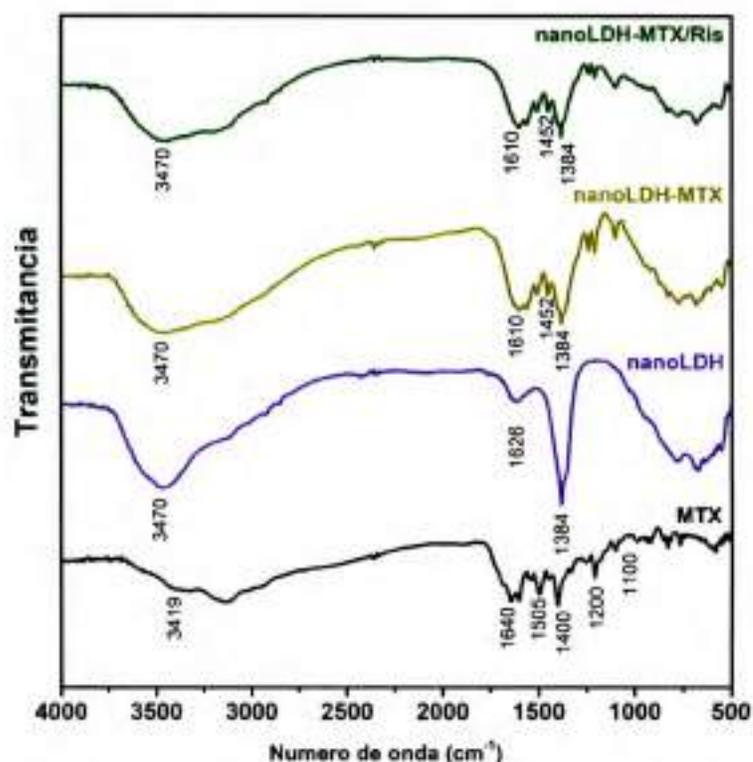


Figura 4.15: Espectros infrarrojo para los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris.

Para los espectros de nanoLDH ya sea con o sin fármaco intercalado, se observaron las bandas características de los LDHs, éstas ya fueron discutidas en el capítulo 3 (ítem 3.2.3) [46]. El espectro correspondiente a MTX libre se distingue por la presencia de una banda intensa a 3419 cm^{-1} , atribuida a la vibración de estiramiento de los grupos NH. Mientras que en los espectros de los nanoLDH-MTX y los nanoLDH@Ris, esta banda es substituida por la observada a 3460 cm^{-1} , atribuida a los modos vibracionales de los grupos OH presentes, tanto en las láminas de LDH como en las moléculas de agua interlamina [12]. De igual manera, en el espectro de MTX se presentan las bandas a 1640 y 1505 cm^{-1} pertenecientes al modo de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo COO^- . Por su parte en los espectros de los nanohíbridos se observó el desplazamiento de estas bandas hacia 1610 y

1452 cm^{-1} [28, 34]. Lo que es atribuido a la ionización del MTX y la fuerte interacción electrostática entre los oxígenos terminales del MTX y las láminas de LDH [28]. Además, en el espectro de MTX libre se presentan bandas a 1200 y 1100 cm^{-1} correspondientes a la frecuencia de estiramiento C-N de los grupos amina primaria y terciarias presentes en la estructura del MTX. En los espectros de los nanohíbridos la intensidad de estas bandas disminuye drásticamente [37]. Finalmente, la intercalación del MTX tanto en los nanoLDH-MTX como en los nanoLDH-MTX@Ris, también se corroboró por la reducción de banda de absorción de alta intensidad a 1384 cm^{-1} , correspondiente a la vibración asimétrica del anión NO_3^- presente en el espectro de los nanoLDH [39].

Mediante microscopía electrónica de barrido [SEM], se estudió la morfología de las muestras sintetizadas, tal como se presenta en la figura 4.16 para los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris.



Figura 4.16: Imágenes SEM de nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris.

Los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris exhiben una forma de láminas hexagonales, con tamaños menores a los 200 nm. Se aprecia que las láminas, tanto de los nanoLDH-MTX como de los nanoLDH-MTX@Ris son más irregulares y con bordes menos definidos que los nanoLDHs intercalados [47]. Este hecho se debe a la menor cristalinidad de las muestras de nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris. La



morfología encontrada para los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris es similar a la informada por otros autores para LDHs intercaladas con MTX [28].

4.3.4 Liberación del Fármaco (MTX)

4.3.4.1 Intercambio aniónico

Se realizaron cinéticas de liberación de MTX (Figura 4.16) desde los nanohíbridos (nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris) en los siguientes medios: NaCl 150 mM, buffer fosfato 50 mM (pH=7,4) y buffer acetato 50 mM (pH=4,7). En estos medios los LDHs no presentan disolución causada por el pH ácido (pH < 4,0 las láminas comienzan a disolverse), esto permite estudiar el proceso de liberación del MTX por intercambio aniónico. Además, la distinta composición de los medios permite estudiar el efecto de aniones de diversa afinidad por las láminas de los LDHs. Asimismo, estos medios representan situaciones modelo de diferentes condiciones fisiológicas. Finalmente, se determinaron los valores de ζ de las dispersiones de nanoLDH-MTX@Ris al final de la cinética para evaluar el estado de la funcionalización con Ris.

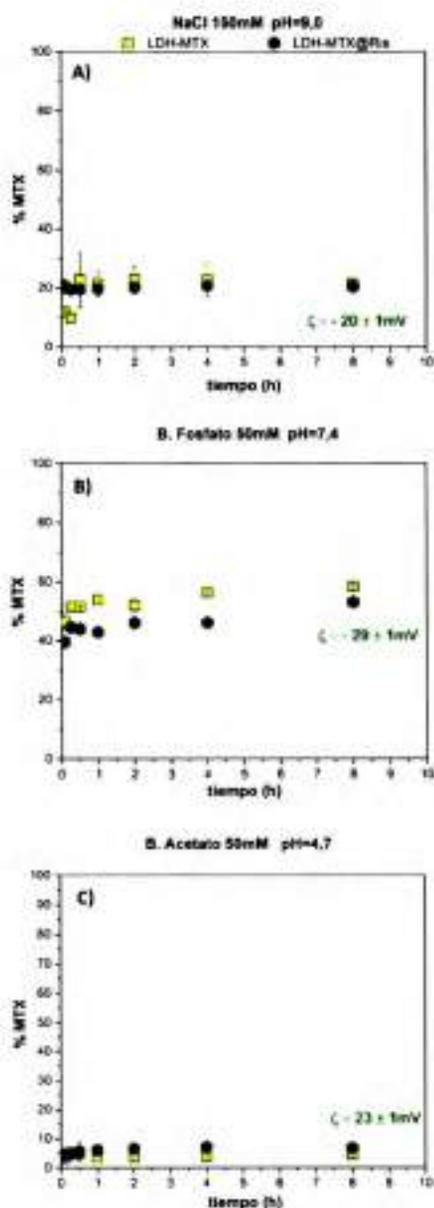


Figura 4.17: Cinéticas de liberación de MTX para los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris dispersos en (A) NaCl 150 mM (pH=9,0), (B) buffer fosfato 50 mM (pH=7,4) y (C) buffer acetato 50 mM (pH=4,7). Se indican los valores de ζ correspondientes a las dispersiones de nanoLDH-MTX@Ris en los diferentes medios al finalizar las cinéticas.

El perfil de liberación de MTX desde ambos nanohíbridos (nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris) es similar. Sin embargo, se observó que este perfil cambia en presencia de los diferentes medios de liberación. En la tabla 4.5 se presentan los valores de ζ de las dispersiones de los nanoLDH-MTX@Ris, en agua (previo a las cinéticas) y en los diferentes medios en que se realizaron las cinéticas (al finalizar las cinéticas).

Tabla 4.5. Valores de ζ correspondientes a los nanoLDH-MTX@Ris dispersos en los diferentes medios.

| Medio de dispersión | ζ (mV) |
|----------------------|--------------|
| Agua | -37 ± 1 |
| NaCl 150mM | -20 ± 1 |
| Buffer fosfato 50 mM | -29 ± 1 |
| Buffer acetato 50 mM | 23 ± 1 |

La liberación de MTX en NaCl 150 mM alcanzó el 20% transcurridos los 30 minutos y se mantuvo constante hasta las 8 horas. La baja liberación de MTX se debe a la poca afinidad del anión cloruro por las láminas de los LDHs.

En cambio, la liberación de MTX en buffer fosfato alcanzó el 50% transcurridos 5 minutos (al realizar la primera medición) y se mantuvo constante al transcurrir el tiempo, no superó el 60% luego de 8 horas. El aumento de la liberación, con respecto a lo obtenido para NaCl 150 mM se debe a la mayor afinidad de los aniones fosfatos por las láminas de los LDHs, relacionada con su elevada carga y su capacidad para generar puentes de hidrógeno con las láminas.

En ambos casos se obtuvo sólo un pequeño aumento de los valores de ζ , lo que indica que la funcionalización de la partícula no se desorbió

completamente. Este cambio de los valores de ζ es causado por la desorción parcial del anión Ris de la superficie de las láminas, debida a la dilución de los nanoLDH-MTX@Ris para realizar el experimento, su concentración se llevó hasta 0,5g/L. En el capítulo anterior (ítem 3.3.4) se estudió el efecto de la concentración del nanoportador y la fuerza iónica frente a la desorción de la funcionalización, los resultados indicaron que la fuerza iónica no causaba cambios significativos en los valores de ζ , pero estos valores sí se ven afectados por la dilución de los nanoLDH-MTX@Ris.

Finalmente, la liberación de MTX en buffer acético acetato fue la menor de las tres, no superó el 10% trascurridas 8 horas. Esto se debe a la falta de afinidad del anión acetato por las láminas de los LDHs. Además, el pH del medio no es suficiente para la disolución de los LDHs, pero sí para disminuir la solubilidad del MTX ($pK_{a1} = 2,9$; $pK_{a2} = 4,6$ y $pK_{a3} = 6,6$), que en este rango de valores de pH presenta reacciones de protonación. Similares resultados se han obtenido para la liberación de fármacos ácidos con pK_a similares, como el ibuprofeno, el cual presentó baja liberación en buffer acético acetato lo que se asignó, además de los factores anteriormente propuestos, a la protonación de las láminas de los LDHs que incrementa la carga de las láminas la capacidad de retener el fármaco [48]. En este caso, se produjo una reversión del valor de ζ [23 mV luego de las 8 horas] lo que indicó la pérdida de la funcionalización con Ris. Como se explicó en el capítulo anterior en el ítem 3.3.4.3, la funcionalización depende del pH, cuando el pH del medio es menor que 5 se produce la protonación de Ris y la consecuente desorción desde los nanoLDH-MTX@Ris.

4.3.4.2 Disolución

Para estudiar la liberación por disolución del nanoportador, se realizaron cinéticas de disolución de los nanoLDH-MTX y nanoLDH-MTX@Ris en medio ácido (figura 4.18).

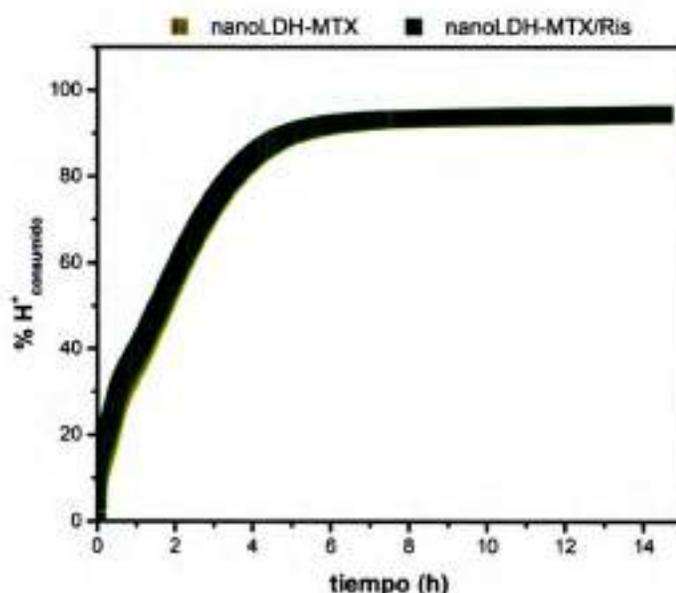
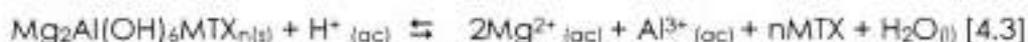


Figura 4.18: Cinéticas de disolución para los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris.

Las cinéticas de disolución para los nanoLDH-MTX y los nanoLDH-MTX@Ris fueron muy similares. Ambas curvas presentaron una disolución lenta, que llega a 90 % al cabo de más de 4 horas, esto se relaciona con la intercalación de un anión hidrofóbico como el MTX.

Los LDHs, al igual que otros hidróxidos de cationes metálicos, presentan grupos hidroxilo superficiales capaces de sufrir reacciones de protonación y deprotonación [49]. La protonación de los hidroxilo superficiales aumenta la velocidad de disolución de las láminas, como consecuencia de la alta polarización que conduce a un debilitamiento del enlace M-O.

La liberación del MTX desde los nanoLDH-MTX en medio ácido puede describirse mediante los siguientes pasos: 1) una rápida formación de sitios reactivos superficiales, producto de la protonación de los grupos hidroxilo de las láminas y, 2) un desacoplamiento lento de los cationes metálicos de la superficie (ecuación 4.3).



Trabajos previos indican que los aniones en la superficie e interlámina de los LDHs determinan su velocidad de disolución [20]. Así, la disolución de los LDHs intercalados con aniones hidrofílicos es más rápida, que la de los intercalados con aniones hidrofóbicos [22]. En el caso de los nanoLDH-MTX@Ris, en medio ácido, se produce la protonación y rápida desorción del Ris presente en los nanoLDH-MTX@Ris, por lo que ambas muestras se comportan de igual manera. En general, con los resultados obtenidos y los informados en bibliografía, se puede deducir que los procesos de liberación de fármacos desde los LDHs son por medio de intercambio aniónico en medios básicos, ya que en este rango de pH no hay disolución de las láminas y la liberación está dirigida por los aniones del medio y la afinidad que estos presenten por los LDHs. En cambio, a valores de pH ácido la liberación del fármaco es por disolución del nanohíbrido. Específicamente, para este estudio se encontró que la vehiculización de MTX en los nanoLDH permitiría modular su liberación. Por ejemplo, en un medio neutro que simula el pH del



plasma sanguíneo como es el buffer fosfato (7,4), se lograron liberaciones rápidas. Mientras que, en medios ácidos, por ejemplo en buffer acetato (4,7) que simula el pH de organelos intracelulares, o incluso en medios con pH más bajos se obtienen liberaciones sostenidas en el tiempo, debido a la disolución de la matrix. En este sentido, es de resaltar que la disolución ácida de LDHs en los lisosomas (pH = 4,7–5,0) se propone como el mecanismo de liberación para la vehiculización intracelular de ADN y fármacos anticancerosos por vía parenteral [50].

4.4 Conclusiones

Se logró sintetizar nanoLDH intercalado con MTX de tamaño, composición y morfología adecuada. Los nanohíbridos se prepararon mediante síntesis por coprecipitación a pH variable, con una relación Mg/Al 2:1 y cantidad de MTX inicial correspondiente al 50% de la CIA. Además, se encontró que, cuando se utilizaban sales de nitrato para la síntesis de los nanoLDH-MTX, estos se mantuvieron en dispersión durante periodos de tiempo más largos que los nanoLDH-MTX sintetizados con sales de cloruro.

La funcionalización de los nanoLDH-MTX con Ris, se logró incorporando una baja cantidad (18 % CIA) en la superficie de las láminas. De esta manera, no se afectaron las características estructurales de los nanoLDH-MTX y se obtuvieron partículas que cumplen con los requerimientos de tamaño y cargado de fármaco, con valores de d y ζ de 200 nm y $\zeta = -40 \pm 1$ mV, respectivamente.

Los estudios de liberación indican que la vehiculización de MTX en los nanoLDH permite modular su liberación dependiendo del pH y de los aniones del medio. Los principales procesos de liberación son la liberación por intercambio aniónico o la disolución del nanoportador. En el primer proceso la velocidad de liberación dependió de la afinidad que presenten los aniones del medio por las láminas de los nanoLDH. Mientras que en el segundo, la velocidad de liberación depende del pH del medio y la hidrofiliidad de la superficie de los LDHs. En consecuencia, la liberación del MTX desde los nanoLDH-MTX en medio ácido fue más lenta. Este perfil de liberación indica que la vehiculización de MTX en los nanoLDH produciría una acción terapéutica del MTX más prolongada en el tiempo.

4.5 Referencias bibliográficas

- [1] G. Gasparini, "Metronomic scheduling: The future of chemotherapy?," *Lancet Oncol.*, vol. 2, no. 12, pp. 733–740, 2001.
- [2] O. G. Scharovsky, L. E. Mainetti, and V. R. Rozados, "MEDICAL ONCOLOGY Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better," *Curr. Oncol.*, vol. 16, no. 2, pp. 7–15, 2009.
- [3] R. De Souza, P. Zahedi, C. J. Allen, and M. Piquette-Miller, "Polymeric drug delivery systems for localized cancer chemotherapy," *Drug Deliv.*, vol. 17, no. 6, pp. 365–375, 2010.
- [4] N. M. Teruo Murakami, "Involvement of Multiple Transporters-mediated Transports in Mizoribine and Methotrexate Pharmacokinetics," *Pharmaceuticals*, vol. 5, pp. 802–836, 2012.
- [5] D. W. ARCHIEB LEYERM, "THE CLINICAL PHARMACOLOGY OF METHOTREXATE New Applications of an Old Drug," *Am. Cancer Soc.*, vol. 41, pp. 36–51, Aug. 1978.
- [6] C. G. García, "Farmacología del metotrexato," *Reumatol Clin Supl.*, vol. 11, no. 1, pp. 3–7, 2016.
- [7] J.-M. Oh, M. Park, S.-T. Kim, J.-Y. Jung, Y.-G. Kang, and J.-H. Choy, "Efficient delivery of anticancer drug MTX through MTX-LDH nanohybrid system," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 67, no. 5–6, pp. 1024–1027, 2006.
- [8] K. Mioduszewska *et al.*, "Trends in Analytical Chemistry Overview of experimental and computational methods for the determination of the pKa values of 5- fluorouracil , cyclophosphamide , ifosfamide , imatinib and methotrexate," vol. 97, 2017.

- [9] S. Ray, M. Joy, B. Sa, S. Ghosh, and J. Chakraborty, "pH dependent chemical stability and release of methotrexate from a novel nanoceramic carrier," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 49, pp. 39482–39494, 2015.
- [10] C. J. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.," *Pharm. Res.*, vol. 12(3), p. 413–20., 1995.
- [11] S. Ray, A. Mishra, T. K. Mandal, B. Sa, and J. Chakraborty, "Optimization of the process parameters for the fabrication of a polymer coated layered double hydroxide-methotrexate nanohybrid for the possible treatment of osteosarcoma," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 124, pp. 102574–102592, 2015.
- [12] S. Ray, M. Joy, B. Sa, S. Ghosh, and J. Chakraborty, "pH dependent chemical stability and release of methotrexate from a novel nanoceramic carrier," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 49, pp. 39482–39494, 2015.
- [13] J. H. Choy *et al.*, "Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives," *Biomaterials*, vol. 25, no. 15, pp. 3059–3064, 2004.
- [14] S.-J. Choi, J.-M. Oh, H.-E. Chung, S.-H. Hong, and I.-H. Kim, "In vivo anticancer activity of methotrexate-loaded layered double hydroxide nanoparticles.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, no. 41, pp. 7196–7202, 2013.
- [15] M. Mahmood *et al.*, "Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 30, no. 1, pp. 74–83, 2010.
- [16] H. Bae, Kii, J. Chung, Hyun, and G. Park, Tae, "Nanomaterials for cancer therapy and imaging.," *Mol. Cells*, vol. 31, no. 4, pp. 295–302, 2011.

- 
- [17] A. Fernandez-Fernandez, R. Manchanda, and A. J. McGoron, "Theranostic applications of nanomaterials in cancer: Drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 165, no. 7–8, pp. 1628–1651, 2011.
- [18] L. Li, W. Gu, J. Chen, W. Chen, and Z. P. Xu, "Co-delivery of siRNAs and anti-cancer drugs using layered double hydroxide nanoparticles.," *Biomaterials*, vol. 35, no. 10, pp. 3331–9, 2014.
- [19] K. M. Tyner, S. R. Schiffman, and E. P. Giannelis, "Nanobiohybrids as delivery vehicles for camptothecin.," *J. Control. Release*, vol. 95, no. 3, pp. 501–14, 2004.
- [20] C. X. Liu, W. G. Hou, Y. Li, and L. F. Li, "Synthesis and Characterization of Camptothecin Intercalated into Mg/Al Layered Double Hydroxide," *Chinese J. Chem.*, vol. 26, no. 10, pp. 1806–1810, 2008.
- [21] Z. Wang, E. Wang, L. Gao, and L. Xu, "Synthesis and properties of Mg₂Al layered double hydroxides containing 5-fluorouracil," *J. Solid State Chem.*, vol. 178, no. 3, pp. 736–741, 2005.
- [22] S.-J. Choi, J.-M. Oh, and J.-H. Choy, "Biocompatible Nanoparticles Intercalated with Anticancer Drug for Target Delivery: Pharmacokinetic and Biodistribution Study," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 4, pp. 2913–2916, 2010.
- [23] S.-J. Choi, J.-M. Oh, and J.-H. Choy, "Anticancer drug-layered hydroxide nanohybrids as potent cancer chemotherapy agents," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 69, no. 5–6, pp. 1528–1532, 2008.
- [24] X. Bi, H. Zhang, and L. Dou, "Layered Double Hydroxide-Based Nanocarriers for Drug Delivery," *Pharmaceutics*, vol. 6, no. 2, pp. 298–332, 2014.

- [25] D. Pan, H. Zhang, T. Zhang, and X. Duan, "A novel organic-inorganic microhybrids containing anticancer agent doxorubicin and layered double hydroxides: Structure and controlled release properties," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 65, no. 12, pp. 3762–3771, 2010.
- [26] T. H. Kim, G. J. Lee, J. H. Kang, H. J. Kim, T. H. Kim, and J. M. Oh, "Anticancer drug-incorporated layered double hydroxide nanohybrids and their enhanced anticancer therapeutic efficacy in combination cancer treatment," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 11, 2014.
- [27] V. Rives, M. del Arco, and C. Martín, "Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review," *Appl. Clay Sci.*, vol. 88–89, pp. 239–269, 2014.
- [28] F. Qi, X. Zhang, and S. Li, "A novel method to get methotrexatum/layered double hydroxides intercalation compounds and their release properties," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 74, no. 8, pp. 1101–1108, 2013.
- [29] X. Zhang, F. Qi, S. Li, S. Wei, and J. Zhou, "A mechanochemical approach to get stunningly uniform particles of magnesium-aluminum-layered double hydroxides," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 259, pp. 245–251, 2012.
- [30] Y. Wang and H. Gao, "Compositional and structural control on anion sorption capability of layered double hydroxides (LDHs)," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 301, no. 1, pp. 19–26, 2006.
- [31] S. Saha, S. Ray, R. Acharya, T. K. Chatterjee, and J. Chakraborty, "Magnesium, zinc and calcium aluminium layered double hydroxide-drug nanohybrids: A comprehensive study," *Appl. Clay Sci.*, vol. 135, pp. 493–509, 2017.
- [32] T. Zhang, Q. Li, H. Xiao, H. Lu, and Y. Zhou, "Synthesis of Li-Al layered



double hydroxides (LDHs) for efficient fluoride removal," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 51, no. 35, pp. 11490–11498, 2012.

- [33] M. Chakraborty *et al.*, "A facile synthetic strategy for Mg–Al layered double hydroxide material as nanocarrier for methotrexate," *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 2, pp. 941–949, 2012.
- [34] M. Chakraborty *et al.*, "Methotrexate intercalated ZnAl-layered double hydroxide," *J. Solid State Chem.*, vol. 184, no. 9, pp. 2439–2445, 2011.
- [35] V. Rives (Ed.), *Layered double hydroxides: present and future* - Nova Science Publishers, Inc., New York, IX+439 pp, 2001.
- [36] Z.-L. Liu, D.-Y. Tian, S.-P. Li, X.-D. Li, and T.-H. Lu, "MTX/LDHs hybrids synthesized from reverse microemulsions: particle control and bioassay study.," *Int. J. Pharm.*, vol. 473, no. 1–2, pp. 414–25, 2014.
- [37] X.-Q. Zhang, M.-G. Zeng, S.-P. Li, and X.-D. Li, "Methotrexate intercalated layered double hydroxides with different particle sizes: structural study and controlled release properties.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 117, pp. 98–106, 2014.
- [38] G. Choi, S. Y. Kim, J. Oh, and J. Choy, "Drug-Ceramic 2-Dimensional Nanoassemblies for Drug Delivery System in Physiological Condition," vol. 2765, no. 30422, pp. 2758–2765, 2012.
- [39] J. Chakraborty, S. Roychowdhury, S. Sengupta, and S. Ghosh, "Mg-Al layered double hydroxide-methotrexate nanohybrid drug delivery system: evaluation of efficacy.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 4, pp. 2168–74, 2013.
- [40] D. Y. Tian, Y. Wang, S. P. Li, and X. D. Li, "Synthesis of methotrexatum intercalated layered double hydroxides by different methods: Biodegradation process and bioassay explore," *Appl. Clay Sci.*, vol. 118,

pp. 87–98, 2015.

- [41] X. F. Wang, S. Q. Liu, and S. P. Li, "Methotrexatum intercalated layered double hydroxides: Statistical design, mechanism explore and bioassay study," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 330–337, 2015.
- [42] L. Latterini, M. Nocchetti, G. G. Aloisi, U. Costantino, and F. Elisei, "Organized chromophores in layered inorganic matrices," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 360, no. 3, pp. 728–740, 2007.
- [43] M. del Arco, S. Gutiérrez, C. Martín, V. Rives, and J. Rocha, "Synthesis and characterization of layered double hydroxides (LDH) intercalated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)," *J. Solid State Chem.*, vol. 177, no. 11, pp. 3954–3962, 2004.
- [44] A. I. Khan, L. Lei, A. L. Norquist, and D. O'Hare, "Intercalation and controlled release of pharmaceutically active compounds from a layered double hydroxide.," *Chem. Commun. (Camb)*, pp. 2342–2343, 2001.
- [45] G. Zhang, L. Fang, L. Zhu, Y. Zhong, P. G. Wang, and D. Sun, "Syntheses and biological activities of 3-azido disaccharide analogues of daunorubicin against drug-resistant leukemia," *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 5, pp. 1792–1799, 2006.
- [46] J. He, M. Wei, B. Li, Y. Kang, D. G. Evans, and X. Duan, "Preparation of Layered Double Hydroxides," in *Layered Double Hydroxides*, vol. 22, no. 11, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 89–119, 2006.
- [47] J. Oh, S. Hwang, and J. Choy, "The effect of synthetic conditions on tailoring the size of hydrotalcite particles," vol. 151, pp. 285–291, 2002.
- [48] R. Rojas, M. C. Palena, A. F. Jimenez-Kairuz, R. H. Manzo, and C. E.



Giacomelli, "Modeling drug release from a layered double hydroxide-ibuprofen complex," *Appl. Clay Sci.*, vol. 62–63, pp. 15–20, 2012.

- [49] R. Rojas Delgado, M. Arandigoyen Vidaurre, C. P. De Pauli, M. A. Ulibarri, and M. J. Avena, "Surface-charging behavior of Zn-Cr layered double hydroxide," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 280, no. 2, pp. 431–441, 2004.
- [50] Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu, and A. B. Yu, "Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 61, no. 3, pp. 1027–1040, 2006.



Capítulo 5

Interacción con fluidos biológicos

Capítulo 5: Interacción con fluidos biológicos

5.1 Introducción

A lo largo del presente trabajo de tesis, se ha destacado el avance en los estudios sobre los nanomateriales y sus aplicaciones biomédicas, principalmente como nanoportadores de fármacos. En este contexto, se ha establecido que los nanoportadores de fármacos deben cumplir con ciertas propiedades para interactuar adecuadamente con los sistemas biológicos, alcanzar el lugar de acción y así aumentar la eficiencia terapéutica del fármaco [1]. Principalmente, la hidrofobicidad, el tamaño y la carga de los nanoportadores son los factores determinantes de su biocompatibilidad *in-vivo* y de su respuesta farmacológica [2]. Los nanoportadores con tamaños entre los 50 y 250 nm, con superficies hidrofílicas y carga negativa tienen la mayor probabilidad de presentar largos tiempos de circulación en sangre y, por ejemplo, acumularse en tejidos tumorales a través del efecto EPR [3-6].

La mayoría de los estudios de caracterización de los nanoportadores, se han realizado en condiciones *in-vitro*, utilizando soluciones acuosas que no representan completamente la interacción con fluidos biológicos. No obstante, recientemente se ha demostrado que cuando los nanoportadores ingresan a los fluidos biológicos, las proteínas y otras biomoléculas, como lípidos, se adsorben a su superficie conduciendo a la formación de la corona proteica (Figura 5.1) [7-9]. Por lo tanto, se pueden estudiar unas características que están vinculadas a los nanoportadores en ausencia de componentes de fluidos biológicos, que dan lugar a su identidad sintética. Por otro lado, y como consecuencia de la interacción con fluidos biológicos,

la identidad sintética de los nanoportadores se pierde y adquieren una identidad biológica con características interfaciales diferentes. Esta nueva identidad gobierna el modo de interacción entre los nanoportadores y, en consecuencia el mecanismo de liberación de fármacos en un determinado tipo celular [10].

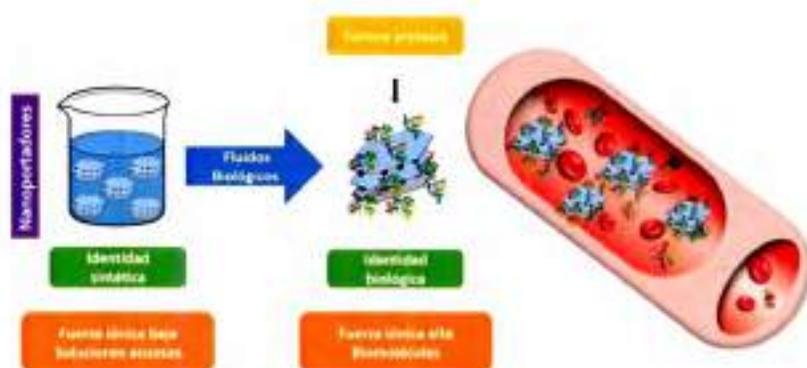


Figura 5.1: Los nanoportadores en condiciones *in-vitro* representan la Identidad sintética, mientras que el nanoportador en contacto con fluidos biológicos adsorbe proteínas (corona de proteínas) que determinan su identidad biológica[1].

La composición de la corona proteica es variable y depende en gran medida del entorno biológico inicial, de la química superficial de los nanoportadores y de la afinidad que las biomoléculas presenten por ellos [11]. Es así como la inmensa diversidad de nanoportadores que existe hoy en día, puede producir igual número de identidades biológicas. Por lo tanto, la caracterización, y control de esta identidad biológica se ha convertido en uno de los desafíos más importantes para la administración de fármacos [12-14].

Si bien la adsorción de biomoléculas altera muchas propiedades fisicoquímicas de los nanoportadores, como el tamaño, la forma y la composición de la superficie, los nanoportadores también pueden modificar las propiedades de las biomoléculas adsorbidas. Por ejemplo, la interacción nanoportador-proteínas puede inducir cambios conformacionales en las estructuras secundarias de las biomoléculas y alterar su actividad biológica [8]. En muchos casos, la adsorción de proteínas en los nanoportadores puede inducir fibrilación, inmunosensibilización y plegamiento incorrecto, alterando sustancialmente propiedades como la biodistribución, la circulación, la captación celular, la localización intracelular y la toxicidad [15-17]. Contrariamente, otros casos han demostrado que la adsorción de biomoléculas otorga protección frente a la toxicidad, facilita las interacciones mediadas por receptores y mejora los perfiles farmacocinéticos [18].

La formación de la corona proteica está mediada por interacciones físicas no específicas, comunes a todos los sistemas proteína-nanoportador (van der Waals, electrostática, etc.) [19,20]. Sin embargo, las interacciones proteína-proteína (PPI), que involucran dominios (de 35 a 150 residuos de aminoácidos organizados en plegamientos de estructuras secundarias específicas [25]) que reconocen específicamente sitios o secuencias en otro polipéptido [21-23], también juegan un papel importante en la composición de la corona proteica [24]. Las PPI que se generan en la corona proteica, se pueden estudiar usando herramientas bioinformáticas, y especialmente bases de datos de interacción proteína-proteína, que permiten construir las redes de interacción [24-26]. Por lo tanto, la formación y composición de la corona proteica puede estar mediada por interacciones físicas no

específicas entre los nanoportadores y las proteínas y por interacciones biológicamente específica entre las proteínas de la corona [27].

En este capítulo, se aborda el estudio de la interacción de los nanoLDH y nanoLDH@Ris con fluidos biológicos y la relación entre sus identidades sintéticas y biológicas. En primer lugar, se explora el efecto de la adsorción de albúmina (Alb) como un sistema sencillo para comprender el efecto de la formación de la corona proteica sobre las características superficiales de los nanoportadores. En segundo lugar, se analiza la interacción de los nanoportadores con las múltiples proteínas presentes en el suero, como el suero fetal bovino (SFB). Con este propósito, se realiza la identificación de las proteínas de las coronas proteicas formadas sobre los nanoLDH y nanoLDH@Ris y se evalúan las interacciones involucradas en este proceso.

5.2 Metodología experimental

5.2.1 Interacción con medios biológicos

Se evaluó el efecto del medio en los valores de d y ζ de las dispersiones tanto de los nanoLDH como los nanoLDH@Ris después de equilibrar toda la noche [28]. Con este propósito, se realizaron dispersiones 1 g/L de nanoLDH y nanoLDH@Ris en diferentes medios de relevancia fisiológica: **a)** NaCl 5 mmol/L, **b)** solución fisiológica (NaCl 150 mmol/L), **c)** solución Ringer (NaCl 110 mmol/L; KCl 5,6 mmol/L; CaCl₂ 2,25 mmol/L; NaHCO₃ 2,4 mmol/L) y **d)** plasma simulado (solución Ringer, suplementada con 40 g/L de Alb).

5.2.2 Adsorción de albúmina (Alb)

Se estudió la capacidad de adsorción de Alb por los nanoLDH y nanoLDH@Ris además de su efecto sobre la funcionalización en los nanoLDH@Ris. Por otro lado, se evaluó el efecto de la adsorción de proteínas en los valores de d y ζ tanto en los nanoLDH como nanoLDH@Ris. Para ello, se prepararon dispersiones 1,0 g/L de los nanoLDH y los nanoLDH@Ris en NaCl 150 Mm con concentraciones crecientes de Alb a pH 9,0 (0 – 0,6 g/L). Después de equilibrar toda la noche se determinaron los valores de d , ζ y la concentración de Alb y Ris en los sobrenadantes, luego por diferencia se calculó el Ris desorbido y Alb adsorbida, expresado como %Ris y r_{Alb} , g/g, respectivamente.

Una vez que se determinó la máxima cantidad de albúmina adsorbida ($r_{Alb\ max}$), la adsorción de albúmina se expresó como grado de cubrimiento $r_{Alb}/r_{Alb\ max}$.

5.2.3 Formación de corona proteica y determinación de la identidad Biológica

La formación de la corona proteica en nanoLDH y nanoLDH@Ris se estudió agregando la dispersión correspondiente a una solución 30% (V/V) de Suero Fetal Bovino (SFB) y volumen final de 10mL, de tal manera que la concentración de las dispersiones fuera 1,0 g/L. Después de agitar las suspensiones durante 1 hora se determinaron los valores de d y ζ . Posteriormente se realizó la identificación de las proteínas presentes en la corona proteica, como se describe a continuación (figura 5.2).

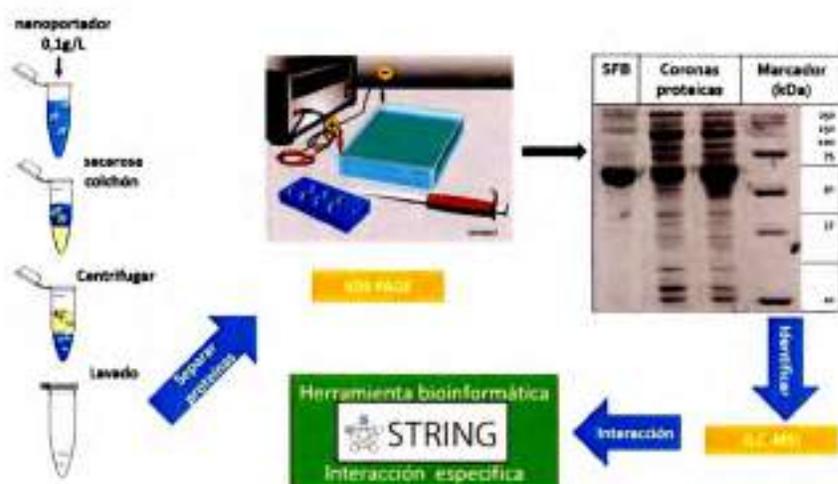


Figura 5.2: Metodología experimental para realizar la identificación y caracterización de las proteínas constituyentes de las coronas proteicas de los nanoLDH y nanoLDH@Ris. (* El perfil SDS-PAGE mastrado en la figura es a modo de ejemplo).

5.2.3.1 Identificación de proteínas

Con el propósito de identificar las proteínas que hacen parte de la corona proteica adsorbida sobre los nanoLDH y nanoLDH@Ris se realizaron los siguientes pasos previos: **a)** separar el complejo nanoportador/corona de las proteínas del SFB que no se adsorbieron, **b)** eluir la corona proteica formada sobre los nanoportadores, **c)** separar las proteínas constituyentes de la corona y finalmente, **d)** análisis e identificación de las proteínas. Esta serie de pasos se detallan a continuación [27]:

- a)** La separación del complejo nanoportador/corona de las proteínas del SFB que no se adsorbieron, se logró utilizando disoluciones con una concentración final de 0,1 g/L en agua, se agregaron a un

colchón de sacarosa (0,7 M) y se centrifugaron (19000 g). Los precipitados formados se lavaron tres veces con agua.

- b)** Las proteínas que formaron parte de la corona proteica de los nanoportadores se eluyeron añadiendo a los precipitados obtenidos, buffer de muestra para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Este buffer contiene: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% P/V SDS, 10% glicerol, 50 mM 2-mercaptoetanol y 0,01% P/V azul de bromofenol. Finalmente se incubaron a 95 °C durante 5 min.
- c)** La separación de proteínas se realizó mediante SDS-PAGE de la siguiente manera: 20 µl de la suspensión obtenida en b), se corrieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 6% durante 2 min a 200V y las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie G-250. Las bandas se cortaron, se lavaron, se redujeron y se S-alquilaron. Se realizó la digestión de los trozos de gel cubiertos con 2 ng/µL de tripsina en 5 mM de NH_4HCO_3 y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Después de eliminar las sales con una punta de pipeta ZipTip C18 (Merck Millipore), la muestra se liofilizó y se suspendió en una solución de ácido fórmico al 0,1%.
- d)** El análisis e identificación de las proteínas constituyentes de la corona proteica de las muestras nanoLDH y nanoLDH@Ris fue realizada mediante nano LC-MS/MS en un espectrómetro de masas Q-Thermo Schermo y se ionizaron por electropulverización con EASY-SPRAY (CEQUIBIEM, Bs Aires, Argentina). La cromatografía líquida capilar de péptidos tripticos se realizó con Thermo Scientific, sistema



EASY-nLC 1000. (estas técnicas y la metodología empleada se detallan en el capítulo 2). Las proteínas identificadas se asignaron a la especie *Bos Taurus* (vaca) mediante la búsqueda en la base de datos UniProtKB. Las proteínas identificadas se clasificaron según sus funciones utilizando la base de datos (DAVID) v6.8.

5.2.3.2 Interacción proteína-proteína

Con las proteínas identificadas en cada una de las coronas proteicas (nanoLDH y nanoLDH@Ris) se construyó una red PPI utilizando la base de datos STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) versión 10.0 (<http://string-db.org/>). Para la construcción de esta red, STRING usa información de bases de datos públicas que incluyen datos experimentales y predicciones computacionales (interacción dominio-dominio). La red PPI resume las asociaciones predichas para un grupo particular de proteínas. Los nodos de la red son proteínas, los bordes representan las asociaciones funcionales predichas, y el grosor de los bordes indica el grado de confianza en la predicción de la interacción, la puntuación de interacción mínima requerida es 0,7. Los parámetros estadísticos que caracterizan la red incluyen el número de nodos y bordes, el grado promedio de nodos (representa la cantidad de interacciones que tiene una proteína de la red en promedio), el coeficiente de agrupamiento (mide la conexión de los nodos en la red), el número esperado de bordes (indica cuántos bordes se esperan si los nodos se seleccionaron al azar) y el p-valor de enriquecimiento PPI (indica si los nodos no son aleatorios y si el número observado de bordes es significativo). El coeficiente de agrupamiento de la red se calcula como el promedio de los coeficientes de agrupamiento de todos los nodos. Por ejemplo, si un nodo interactúa con todos sus vecinos, tendría un coeficiente de 1 y si no interactúa con ninguno, tendría un coeficiente de 0.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Interacción con medios biológicos

El tamaño es una de las características principales que afecta el rendimiento de los nanoportadores de fármacos; se espera que los medios fisiológicos induzcan cierto grado de agregación debido a su alta fuerza iónica y composición compleja [29]. En la figura 5.3 se presentan los valores de d y ζ de los nanoLDH y nanoLDH@Ris dispersos en medios de relevancia fisiológica: solución fisiológica, solución Ringer y plasma simulado. De esta manera, se estudió el efecto de parámetros como la fuerza iónica o la presencia de proteína sobre los valores de d y ζ , como un primer análisis para comprender las diferencias entre las identidades sintéticas y biológicas.

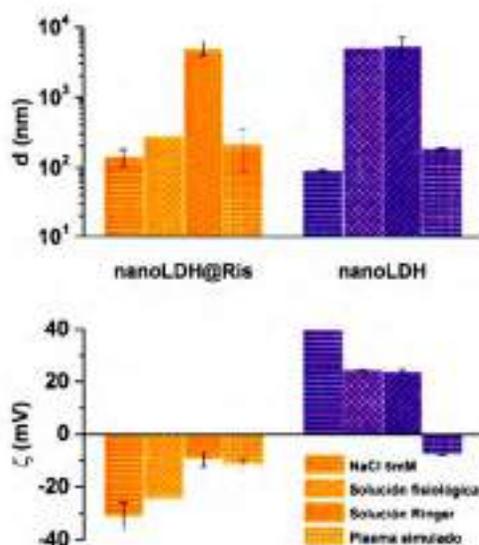


Figura 5.3: Valores de d y ζ para los nanoLDH@Ris y nanoLDH dispersos en diferentes medios de relevancia fisiológica.



Los nanoLDH y nanoLDH@Ris dispersos en la solución NaCl 5mM se utilizaron como referencia de identidad sintética para comparar los cambios que presentaron los valores de d y ζ con respecto a los medios fisiológicos, representativos de identidades biológicas de creciente complejidad. La solución fisiológica contiene sólo NaCl, mientras que la solución Ringer incluye los tres principales cationes presentes en los medios fisiológicos (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}). Finalmente, el plasma simulado difiere con la solución Ringer en la presencia de Alb en una concentración similar a la del plasma humano (40 g/L).

El valor de d de los nanoLDH en solución fisiológica aumentó considerablemente, mientras que los valores de d para los nanoLDH@Ris no se vieron afectados por la alta fuerza iónica de la solución fisiológica. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado en el capítulo 3 ítem 3.2.4.2, donde se estudió el efecto de la fuerza iónica sobre el tamaño de los nanoportadores funcionalizados con Ris. Este efecto puede atribuirse principalmente al cambio en los valores de ζ con un aumento de la fuerza iónica, que se minimiza con la funcionalización con Ris.

Por el contrario, los valores de d medidos para ambas dispersiones aumentaron considerablemente en solución Ringer, debido a la fuerte disminución de los valores de ζ . En este caso, la presencia de cationes como el Ca^{2+} inhibe el efecto estabilizante de la funcionalización, ya que interacciona con el anión HRis^{3-} provocando la agregación, como se estableció en el estudio de la especificidad de la funcionalización por la hidroxiapatita [capítulo 3 ítem 3.3.5]. Finalmente, se observó que los valores de d en plasma simulado fueron de alrededor de 100 nm y los valores de ζ fueron aproximadamente de -10 mV, para ambas dispersiones. Este valor negativo de ζ indica que la adsorción de Alb sobre los nanoportadores

genera un efecto estabilizador frente a la agregación. Por lo tanto, también se analizó el efecto de la concentración de Alb en los nanoportadores como se explica a continuación. Estos resultados muestran claramente que aún la presencia de una sola proteína en esta solución modifica drásticamente las propiedades interfaciales de los nanoportadores.

5.3.2 Adsorción de albúmina (Alb)

Con el propósito de iniciar el análisis del efecto de la formación de la corona proteica sobre los valores de d y ζ , se estudió el proceso de adsorción de Alb en los nanoLDH y nanoLDH@Ris en soluciones fisiológicas, tal como se presenta en la figura 5.4.

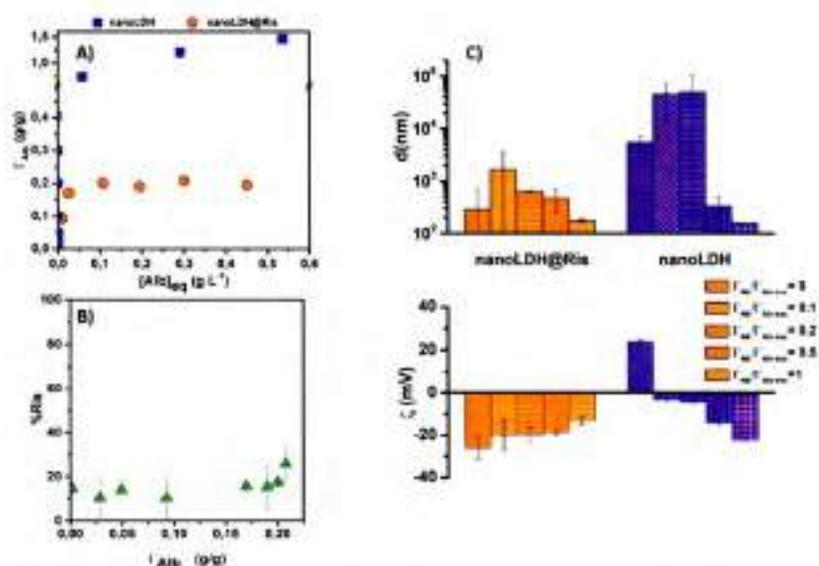


Figura 5.4: (A) Cantidad de Alb adsorbida (r) vs. concentración en el equilibrio, (B) desorción de Ris (%Ris) y (C) valores de d y ζ para los nanoLDH@Ris y nanoLDH en función de la relación $r_{Alb} / r_{Alb, max}$.

En la figura 5.4 A se presenta la adsorción de Alb tanto en los nanoLDH como en los nanoLDH@Ris. Para los nanoLDH, se observó un marcado incremento en Γ_{Alb} a bajas concentraciones $[\text{Alb}]_{\text{eq}}$, este comportamiento indica una alta afinidad de Alb sobre los nanoLDH. Es decir, que esta proteína con carga negativa en solución fisiológica (su punto isoeléctrico es 4,7 [30]) presenta una fuerte interacción electrostática por la superficie de estos nanoportadores cargados positivamente. Para valores de Γ_{Alb} cercanos a 1g/g, se presenta una disminución de la pendiente hasta valores de $\Gamma_{\text{Alb}} = 1,5$ g/g que corresponde a la cantidad máxima adsorbida. Por el contrario, para los nanoLDH@Ris no se presentó un incremento inicial tan marcado de Γ_{Alb} y la máxima cantidad adsorbida fue de 0,2 g/g. Esta baja adsorción, se debe principalmente a la repulsión electrostática entre los nanoLDH@Ris cargados negativamente y la Alb, así como a la alta afinidad del anión HRis³⁻, por la superficie de los nanoLDH@Ris. Así, el desplazamiento de Ris es menor al 25% en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

En la figura 5.4 C se presentan los valores de d y ζ para los nanoLDH y nanoLDH@Ris en función del grado de cubrimiento $\Gamma_{\text{Alb}}/\Gamma_{\text{Alb max}}$. Al aumentar esta relación, se observó que los valores de ζ para los nanoLDH@Ris se tornaron ligeramente menos negativos, mientras que para los nanoLDH se observó una inversión del potencial positivo hasta un valor de -23 mV. Ambas muestras presentaron valores convergentes de ζ cuando $\Gamma_{\text{Alb}}/\Gamma_{\text{Alb max}} = 1$, lo que indica que la Alb es la que determina este valor, de forma similar a lo encontrado para otros LDHs y para óxidos metálicos [1,31]. Por otro lado, la dependencia de los valores de d con el grado de cubrimiento $\Gamma_{\text{Alb}}/\Gamma_{\text{Alb max}}$ fue similar para ambas muestras: aumentaron cuando la relación $\Gamma_{\text{Alb}}/\Gamma_{\text{Alb max}}$ fue baja y disminuyeron al aumentar esta relación, hasta alcanzar aproximadamente 100nm cuando $\Gamma_{\text{Alb}}/\Gamma_{\text{Alb max}} = 1$. Ese comportamiento, se

debe principalmente a los cambios observados en los valores de ζ . Por lo tanto, la formación de la corona proteica (aun con sólo una proteína) cuando $r_{Alb}/r_{Alb\ max} = 1$ en este experimento, y en el caso del plasma simulado, inhibió la formación de agregados. Esta estabilidad frente a la agregación no se debe a interacciones electrostáticas, sino al impedimento estérico causado por la proteína, ya que los valores de ζ no fueron lo suficientemente altos como para causar la repulsión electrostática.

Por otra parte, cabe destacar que los nanoportadores pueden causar que la proteína adsorbidas pierda su estructura nativa, previamente se ha estudiado la adsorción de albumina sobre LDH intercalados con aniones de diferentes naturaleza como, Cl^- , CO_3^{2-} y dodecilsulfato [1]. Mediante espectroscopia IR determinaron que la Alb adsorbida en los LDHs intercalados con Cl^- y CO_3^{2-} no sufrió cambios en su estructura, caso contrario ocurrió con la Alb adsorbida en el LDH intercalado con dodecilsulfato.

5.3.3 Formación de corona proteica y determinación de la identidad Biológica

Se estudió la formación de la corona proteica incubando los nanoLDH y nanoLDH@Ris en una solución de SFB. Asimismo, se comparó la identidad sintética e identidad biológica de estos nanoportadores mediante determinaciones de los valores de d y ζ antes y después de la formación de la corona (tabla 5.1).

Tabla 5.1. Valores de d y ζ medidos para nanoLDH y nanoLDH@Ris dispersos en agua (identidad sintética) y SFB (identidad biológica).

| | nanoLDH | | nanoLDH@Ris | |
|---------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | d (nm) | ζ (mV) | d (nm) | ζ (mV) |
| Identidad sintética | 82 ± 3 | 45 ± 1 | 182 ± 10 | -28 ± 2 |
| Identidad biológica | 130 ± 3 | -14 ± 1 | 240 ± 10 | -10 ± 1 |

Tal como se observó con Alb, la formación de la corona proteica produce cambios en los valores de d y ζ , dando lugar a nanoportadores con características interfaciales diferentes a las de las partículas recién sintetizadas. Tanto para los nanoLDH como para los nanoLDH@Ris se presentó un pequeño incremento en los valores de d , sin embargo, estos valores se mantuvieron cercanos a los 200 nm, dentro del rango óptimo para ser utilizados como nanoportadores. En cuanto a los valores de ζ , estos convergieron a valores cercanos a -10 mV. Este potencial negativo es consistente con el hecho de que la Alb y la mayoría de las proteínas del suero tienen un punto isoeléctrico entre pH 6 y 7, y, por lo tanto, tienen una carga negativa a pH 7.4. La adsorción de las proteínas aniónicas del SFB enmascara la carga positiva de los nanotransportadores, lo que podría dificultar su interacción con la membrana celular y la internalización mediada por clatrina, mecanismo propuesto para los LDHs [32, 33]. No obstante, la célula cuenta con otros mecanismos que permiten la internalización, se ha reportado que la formación de la corona proteica sobre otro tipo de nanopartículas como sílice, poliestireno [34], oro [35] y óxidos metálicos [36], también genera esta carga negativa e igual muestran

una transfección de la membrana celular, incluso en algunos caso más eficaz que la transfección de partículas sin la corona [34].

Para continuar con la caracterización de la identidad biológica, se identificaron las proteínas constituyentes de las coronas proteicas de los nanoLDH y nanoLDH@Ris como se describe a continuación.

5.3.3.1 Identificación de proteínas

Primero, se separan las proteínas que no hacían parte de la corona proteica, utilizando un colchón de sacarosa y realizando una serie de centrifugados y lavados. Luego, se separaron las proteínas de acuerdo a su tamaño mediante SDS-PAGE, los fragmentos obtenidos se identificaron mediante LC-MS y finalmente con las proteínas identificadas se construyó la red de interacción proteína-proteína, esta se explica con mayor detalle en el ítem 5.3.4.2.

Una vez identificadas las proteínas adsorbidas sobre los nanoportadores se utilizó la herramienta bioinformática DAVID para clasificarlas de acuerdo a su función biológica, punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (PM). En la tabla 5.2 se presentan cinco grupos de proteínas según la función biológica que cumplen.

Tabla 5.2. Proteínas séricas constituyentes de las coronas proteicas de los nanoLDH y nanoLDH@Ris.

| Descripción | pI | PM (KDa) | nanoLDH | nanoLDH@Ris |
|--|------|----------|---------|-------------|
| 1) Proteínas estructurales | | | | |
| Serum albumin | 6,18 | 69,2 | X | X |
| Gelsolin | 6,21 | 85,6 | X | X |
| Cartilage oligomeric matrix protein | 4,83 | 81,8 | X | X |
| Hemoglobin subunit alpha | 8,44 | 15,2 | X | X |
| Keratin, type II cytoskeletal 5 | 7,81 | 60,6 | X | |
| Neural cell adhesion molecule 1 (fragment) | 4,96 | 92,7 | X | |
| Lumican | 6,35 | 38,7 | X | |
| 2) Lipoproteínas | | | | |
| Apollipoprotein E | 5,67 | 36,0 | X | |
| Apollipoprotein A-I | 5,97 | 30,3 | X | X |
| Alpha-2-HS-glycoprotein | 5,50 | 38,4 | X | |
| 3) Vías de complemento | | | | |
| Complement C3 | 7,02 | 187,0 | X | X |
| Complement factor H | 6,81 | 140,3 | X | X |
| Complement factor B | 7,68 | 85,3 | X | X |
| Complement C1s subcomponent | 5,08 | 76,6 | X | |
| Complement component C7 | 7,20 | 92,9 | X | X |
| Complement C5a | 6,47 | 188,9 | X | |
| 4) Proteínas de fase aguda | | | | |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 | 7,94 | 106,1 | X | X |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 | 5,90 | 99,5 | X | X |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 | 6,68 | 101,5 | X | X |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 | 7,20 | 101,2 | X | X |
| Adiponectin | 5,74 | 26,1 | X | |

Continúa siguiente página.

Tabla 5.2. Continuación

| 5) Factores de coagulación | pI | PM (kDa) | nanLDH | nanLDH@Ris |
|--|------|----------|--------|------------|
| Alpha-2-macroglobulin | 6,02 | 167,5 | X | X |
| Kininogen-1 | 6,62 | 68,8 | X | X |
| Kininogen-2 | 6,57 | 68,7 | X | X |
| Plasminogen | 7,64 | 91,2 | X | X |
| Embryo-specific fibronectin 1 transcript variant | 5,74 | 262,3 | X | X |
| von Willebrand factor (Fragment) | 5,60 | 102,5 | X | |
| Antithrombin-III | 6,80 | 52,4 | X | |
| Plasma serine protease inhibitor | 9,36 | 45,3 | | X |
| Thrombospondin-1 | 4,94 | 129,3 | X | X |
| protein AMBP precursor | 7,78 | 39,3 | X | X |
| Alpha-1-antiproteinase | 6,52 | 46,1 | X | X |
| Serpin A3-2 | 5,99 | 46,2 | X | X |
| SERPIND1 protein | 6,86 | 55,2 | X | |

El SFB está constituido por más de 200 proteínas de diferente naturaleza, no obstante, se encontró que tan sólo un pequeño número de estas proteínas constituían la corona proteica de los nanoLDH y nanoLDH@Ris, 32 y 22, respectivamente. Para diferenciar las proteínas que formaron parte de las diferentes coronas se utiliza una X en las dos últimas columnas de la tabla 5.2. La clasificación realizada para estas proteínas mostró un enriquecimiento significativo de proteínas plasmáticas con bajo peso molecular (PM <120 kDa) y cargadas negativamente para ambas coronas. Las proteínas se adsorben sobre los nanoportadores indistintamente de la carga que estos presenten, provocando que la identidad biológica presente valores de ζ negativos (tabla 5.1). Estos resultados indican que la formación de la corona proteica no está dada solo por interacciones electrostáticas, sino también por otro tipo de interacción, además los sistemas biológicos se

enfrentarían con nanoportadores cargados negativamente sin importar su identidad sintética [35].

En la figura 5.5 se presenta los porcentajes de proteínas que constituyen las coronas proteicas de los nanoLDH y nanoLDH@Ris, de acuerdo a su función biológica. Este porcentaje se determina en base al número de proteínas totales que forman la respectiva corona proteica, por ejemplo: de las 32 proteínas que formaron la corona de los nanoLDH@Ris el 5% son lipoproteínas. Las proteínas identificadas están relacionadas con diferentes procesos biológicos (coagulación, respuesta de fase aguda, metabolismo de los lípidos y otras proteínas relacionadas con las estructuras de las células), este análisis reveló un enriquecimiento significativo de proteínas implicadas en la coagulación, para ambos casos.

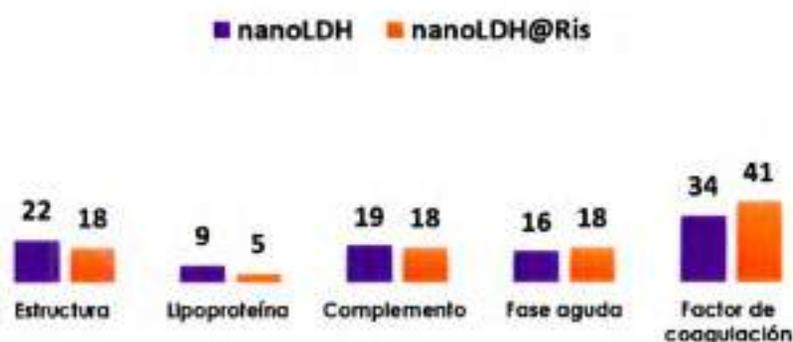


Figura 5.5: Porcentaje de número de proteínas que forman parte de las coronas proteicas de los nanoLDH y nanoLDH@Ris clasificadas de acuerdo a su función biológica.

Se observó que las proteínas implicadas en la coagulación eran predominantes tanto en la corona de los nanoLDH como en la de los nanoLDH@Ris estas conformaron el 34 % y 41% de la corona respectivamente. En particular, la ausencia de fibrinógeno en la corona los nanoportadores,

sugiere que estos nanoportadores serían más hemocompatibles, ya que la presencia de esta proteína puede causar trombosis como efecto secundario, al estar relacionada con la activación del factor de coagulación FXII [37] [38]. También se encontró que el 22% de las proteínas de la corona de los nanoLDH y el 18% de los nanoLDH@Ris pertenecían a las proteínas estructurales, grupo al que pertenece la Alb, la cual como vimos anteriormente, presenta una alta afinidad por la superficie de los LDHs. Esta es una proteína del grupo de las disopsoninas, que inhibe la captación por macrófagos, asegurando largos tiempos de circulación [10]. Las proteínas de fase aguda es otro grupo representativo: el 16% de las proteínas en la corona de los nanoLDH y el 18% en los nanoLDH@Ris forman parte de este grupo. Las proteínas en fase aguda son una clase de proteínas cuyas concentraciones en plasma aumentan o disminuye en respuesta a la inflamación [39]. Por otra parte, el 19% y el 18% de las proteínas en la corona de los nanoLDH y nanoLDH@Ris, respectivamente, se encontraron en el grupo de proteínas de complemento, una parte clave de la respuesta inmune innata. Las opsoninas incluidas en este grupo promueven la fagocitosis y una rápida eliminación de los nanoportadores del torrente sanguíneo [40,41]. Finalmente, las proteínas involucradas en el transporte de lípidos y colesterol en el torrente sanguíneo [42] y, como tal, relacionadas con el tráfico intracelular, el destino y el transporte de nanoportadores, tan solo conformaban el 9% de la corona de los nanoLDH y el 5% de los nanoLDH@Ris. Este grupo incluye las apolipoproteínas, que promueven la circulación prolongada de la circulación sanguínea [41].

5.3.3.2 Interacción proteína-proteína

Finalmente, se construyó una red PPI con las proteínas que conformaron tanto la corona proteica de los nanoLDH como de los nanoLDH@Ris utilizando la herramienta bioinformática STRING [43,44], como se indica en la Fig. 5.6 (los parámetros estadísticos de la red se especifican en la Tabla 5.3).

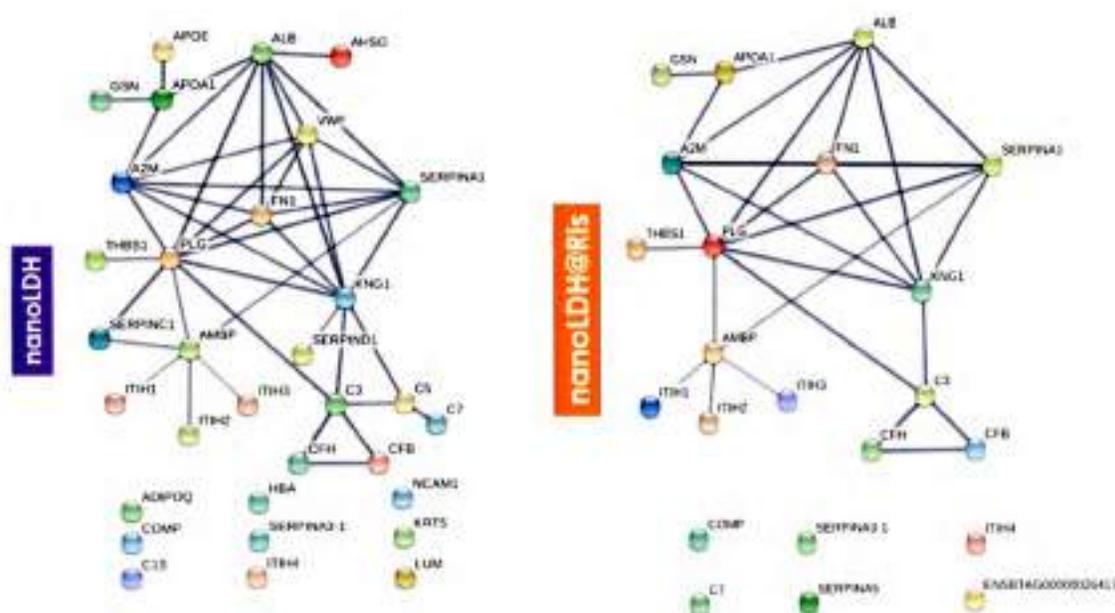


Figura 5.6: Red PPI de las coronas proteicas formadas en los nanoLDH y nanoLDH@Ris.

El p-valor del enriquecimiento de PPI y el número esperado de interacciones indicaron que los nodos no se distribuyeron al azar y que el número observado de interacciones fue significativo para ambos casos.

Tabla 5.3. Parámetros estadísticos de la red PPI.

| | nanoLDH | nanoLDH@Ris |
|---|---------|-------------|
| Numero de nodos | 32 | 22 |
| Numero de interacciones | 43 | 22 |
| Grado medio del nodo | 2,69 | 2 |
| Coefficiente de agrupamiento | 0,84 | 0,48 |
| Numero esperado de interacciones | 2 | 0 |
| p-value del enriquecimiento de PPI | 0 | 0 |

De las 32 proteínas identificadas en los nanoLDH, 23 [coeficiente de agrupamiento de 0,84] participaron en la red con un número global de interacciones de 43 y un grado medio del nodo 2,69. Por otra parte, para la red correspondiente a la corona de los nanoLDH@Ris se observaron 22 solo 16 (coeficiente de agrupamiento de 0,48) participaron en la red con un número global de interacciones de 22 y un grado medio del nodo 2.

Las redes muestran un recubrimiento de proteínas con un alto grado de interconexiones entre ellas, es decir, cada nodo interactúa con casi todos sus vecinos. Además, la Alb aparece como un nodo central del cual emergen todas las interacciones, que puede estar relacionado con que la Alb es la proteína que se encuentra en mayor proporción en el SFB, además de que la Alb presenta múltiples dominios de interacción, debido a su principal función biológica como proteína transportadora en la circulación sanguínea[45].

Estos resultados permiten verificar que la red PPI juega un papel importante en la conformación de la corona proteica. Las proteínas no sólo se incorporan por interacciones inespecíficas con la superficie de los nanoportadores, sino también por interacciones específicas entre las proteínas. Esta observación está claramente relacionada con los resultados



informados en varios trabajos donde la abundancia relativa de proteínas en la corona en general, no refleja, su abundancia relativa en el suero [12,46,47].

5.4 Conclusiones

Se logró comprobar que los nanoLDH y los nanoLDH@Ris dispersos en agua (identidad sintética) cambian enormemente sus propiedades interfaciales al ingresar a un fluido biológico debido a su interacción con los componentes biológicos (identidad biológica). Incluso en la formación de la corona con una sola proteína como la Alb, se observó que tanto para los nanoLDH como para los nanoLDH@Ris los valores de ζ convergieron aproximadamente a -10 mV. Además, la formación de la corona proteica sobre los nanoportadores inhibió la formación de agregados a pesar de la alta fuerza iónica presente en la solución. Lo cual se debe al impedimento estérico causado por las proteínas adsorbidas. Estos resultados indican que los nanoLDH y nanoLDH@Ris conservan sus propiedades como nanoportadores de fármacos después de interactuar con los medios biológicos.

La composición de la corona proteica formada sobre los nanoportadores depende fuertemente de su química superficial. Luego de la interacción de los nanoportadores con el SFB, se encontró que tan solo un pequeño número de proteínas constituían la corona proteica de los nanoLDH y nanoLDH@Ris, 32 y 21 respectivamente, en su mayoría eran proteínas de bajo peso molecular y carga negativa. Las coronas proteicas en nanoLDH y nanoLDH@Ris difieren en su composición ya que la funcionalización con Ris causó que menor número de proteínas se adsorbieran sobre los nanoLDH@Ris y en algunos casos de naturaleza diferente en comparación con las adsorbidas en los nanoLDH.

La red PPI jugó un papel importante en la determinación de la composición de la corona proteica, ya que permitió caracterizar el grupo de



proteínas adsorbidas sobre la superficie de los nanoportadores y como estas interaccionan entre sí. Este estudio permitiría entender como interaccionan los nanoportadores, las proteínas y las células, ya que se ha reportado que las interacciones electrostáticas no parecen ser el único factor determinante, sino que el reconocimiento biológico específico también desempeña un papel fundamental.

5.5 Referencias bibliográficas

- [1] C. Vasti, D. A. Bedoya, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Effect of the protein corona on the colloidal stability and reactivity of LDH-based nanocarriers," *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 11, pp. 2008–2016, 2016.
- [2] S. E. McNeil, "Nanoparticle therapeutics: a personal perspective," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 1, no. 3, pp. 264–271, 2009.
- [3] M. Ferrari, "Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 161–171, 2005.
- [4] K. Ladewig, M. Niebert, Z. P. Xu, P. P. Gray, and G. Q. M. Lu, "Efficient siRNA delivery to mammalian cells using layered double hydroxide nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 31, no. 7, pp. 1821–9, 2010.
- [5] Z. P. Xu *et al.*, "Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles," *J. Control. Release*, vol. 130, no. 1, pp. 86–94, 2008.
- [6] S. Choi and J. Choy, "Review Layered double hydroxide nanoparticles as target-specific delivery carriers : uptake mechanism and toxicity Review," vol. 6, pp. 803–814, 2011.
- [7] A. E. Nel *et al.*, "Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface," *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 7, pp. 543–557, 2009.
- [8] M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati, and K. A. Dawson, "Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 12, pp. 779–786, 2012.
- [9] S. S.R., D. A., and L. A.L., "Interaction of nanoparticles with proteins: Relation to bio-reactivity of the nanoparticle," *J. Nanobiotechnology*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2013.

- 
- [10] R. M. Pearson, V. V. Juettner, and S. Hong, "Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery," *Front. Chem.*, vol. 2, no. November, pp. 1–7, 2014.
- [11] S. Milani, F. Baldelli Bombelli, A. S. Pitek, K. A. Dawson, and J. Rädler, "Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona," *ACS Nano*, vol. 6, no. 3, pp. 2532–2541, 2012.
- [12] T. Cedervall *et al.*, "Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 46, no. 30, pp. 5754–5756, 2007.
- [13] V. P. Chauhan and R. K. Jain, "Strategies for advancing cancer nanomedicine," *Nat. Mater.*, vol. 12, no. 11, pp. 958–962, 2013.
- [14] R. M. Pearson, H. J. Hsu, J. Bugno, and S. Hong, "Understanding nano-bio interactions to improve nanocarriers for drug delivery," *MRS Bull.*, vol. 39, no. 3, pp. 227–237, 2014.
- [15] S. Linse *et al.*, "Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 21, pp. 8691–8696, 2007.
- [16] P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, and S. E. McNeil, "Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 6, pp. 428–437, 2009.
- [17] P. P. Karmali and D. Simberg, "Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 8, no. 3, pp. 343–357, 2011.
- [18] Q. Peng *et al.*, "Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system," *Biomaterials*, vol. 34, no. 33, pp. 8521–8530, 2013.

- [19] C. D. Walkey and W. C. W. Chan, "Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2780–2799, 2012.
- [20] S. T. Yang, Y. Liu, Y. W. Wang, and A. Cao, "Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein-nanoparticle interactions," *Small*, vol. 9, no. 9–10, pp. 1635–1653, 2013.
- [21] T. M. Cafarelli, A. Desbuleux, Y. Wang, S. G. Choi, D. De Ridder, and M. Vidal, "Mapping, modeling, and characterization of protein–protein interactions on a proteomic scale," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 44, pp. 201–210, 2017.
- [22] W. Lai, Q. Wang, L. Li, Z. Hu, J. Chen, and Q. Fang, "Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: Analysis of protein corona reveals specific binding patterns," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 152, pp. 317–325, 2017.
- [23] C. Pisani *et al.*, "The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome," *Nanoscale*, vol. 9, no. 5, pp. 1840–1851, 2017.
- [24] S. Vlaic *et al.*, "ModuleDiscoverer: Identification of regulatory modules in protein-protein interaction networks," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 2–12, 2018.
- [25] K. Luck *et al.*, "Network-based prediction of protein interactions," *bioRxiv*, 2018.
- [26] B. K. Stöcker, J. Köster, E. Zamir, and S. Rahmann, "Modeling and Simulating Constrained Protein Interaction Networks," vol. 4, no. 4, pp. 1–2, 2017.
- [27] C. Vasti, L. V. Bonnet, M. R. Galiano, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Relevance of protein–protein interactions on the biological identity of nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 166, pp. 330–338,



2018.

- [28] D. A. Bedoya, C. Vasti, R. Rojas, and C. E. Giacomelli, "Risedronate functionalized layered double hydroxides nanoparticles with bone targeting capabilities," *Appl. Clay Sci.*, vol. 141, pp. 257–264, 2017.
- [29] S. Lazzari, D. Moscatelli, F. Codari, M. Salmona, M. Morbidelli, and L. Diomede, "Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, no. 6, 2012.
- [30] T. Vermonden, C. E. Giacomelli, and W. Norde, "Reversibility of structural rearrangements in bovine serum albumin during homomolecular exchange from AgI particles," *Langmuir*, vol. 17, no. 12, pp. 3734–3740, 2002.
- [31] R. Tantra, J. Tompkins, and P. Quincey, "Characterisation of the de-agglomeration effects of bovine serum albumin on nanoparticles in aqueous suspension," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 275–281, 2010.
- [32] Y. Wong *et al.*, "Efficient delivery of siRNA to cortical neurons using layered double hydroxide nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 31, no. 33, pp. 8770–9, 2010.
- [33] J.-M. Oh, S.-J. Choi, S.-T. Kim, and J.-H. Choy, "Cellular uptake mechanism of an inorganic nanovehicle and its drug conjugates: Enhanced efficacy due to clathrin-mediated endocytosis," *Bioconjug. Chem.*, vol. 17, no. 6, pp. 1411–7, 2006.
- [34] S. Tenzer *et al.*, "Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 10, pp. 772–781, 2013.
- [35] M. A. Dobrovolskaia *et al.*, "Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 5, no.

2, pp. 106–117, 2009.

- [36] Z. J. Deng, G. Mortimer, T. Schiller, A. Musumeci, D. Martin, and R. F. Minchin, "Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 45, 2009.
- [37] C. Sperling, M. Fischer, M. F. Maitz, and C. Werner, "Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes," *Biomaterials*, vol. 30, no. 27, pp. 4447–4456, 2009.
- [38] M. B. Gorbet and M. V. Sefton, "Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes," *Biomater. Silver Jubil. Compend.*, vol. 25, pp. 219–241, 2006.
- [39] C. Gabay and I. Kushner, "Acute-phase Proteins," *Encycl. Life Sci.*, pp. 587–643, 2001.
- [40] M. P. Monopoli *et al.*, "Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 8, pp. 2525–2534, 2011.
- [41] A. L. Barrán-Berdón, G. Caruso, C. Cavaliere, A. Riccioli, S. Palchetti, and A. Lagana, "Time Evolution of Nanoparticle – Protein Corona in Human Plasma: Relevance for Targeted Drug Delivery," *Langmuir*, vol. 29, pp. 6485–6494, 2013.
- [42] N. L. Anderson and N. G. Anderson, "The Human Plasma Proteome," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 1, no. 11, pp. 845–867, 2002.
- [43] D. Szklarczyk *et al.*, "The STRING database in 2011: Functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. SUPPL. 1, pp. 561–568, 2011.
- [44] A. Franceschini *et al.*, "STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. D1, pp. 808–815, 2013.
- [45] X. M. He and D. C. Carter, "Atomic structure and chemistry of human



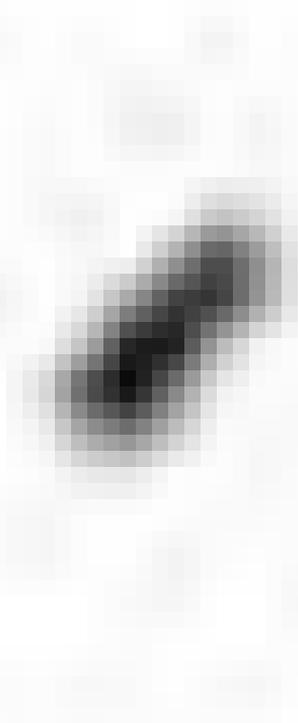
serum albumin," *Nature*, vol. 358, no. 6383, pp. 209–215, 1992.

- [46] S. Tenzer *et al.*, "Nanoparticle Size Is a Critical Physicochemical Determinant of the Human Blood Plasma Corona: A Comprehensive Quantitative Proteomic Analysis," *ACS Nano*, vol. 5, no. 9, pp. 7155–7167, 2011.
- [47] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, and K. A. Dawson, "Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 38, pp. 14265–14270, 2008.



Capítulo 6

Conclusiones y perspectivas



Capítulo 6: Conclusiones y perspectivas futuras

6.1 Conclusiones

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral, se realizó una contribución en el desarrollo de nuevos sistemas portadores para el tratamiento del cáncer en huesos, mediante el estudio fundamental relacionado con la síntesis y optimización de nanoportadores de fármacos. Específicamente, en este trabajo se sintetizaron nanoportadores de fármacos basados en LDHs (nanoLDH) para la administración sitio-específica de metotrexato (MTX) en tejido óseo. Este objetivo se alcanzó a través de una serie de etapas, que incluyen la síntesis, funcionalización con risedronato (Ris), incorporación del agente anticancerígeno y su evaluación en medios de relevancia fisiológica.

En primer lugar, se obtuvieron nanoLDH mediante síntesis por coprecipitación a pH constante, que se funcionalizaron con Ris (nanoLDH@Ris) sin perder su tamaño nanométrico. Luego, estos nanoportadores se caracterizaron en diferentes condiciones de relevancia fisiológica. Se determinó que la funcionalización presentaba alta estabilidad frente a la desorción en condiciones de fuerza iónica alta y en presencia de aniones de diferente naturaleza. El Ris sólo se desorbió completamente a bajas concentraciones de nanoLDH@Ris o cuando los valores de pH del medio fueron menores a 4,0. Además, la funcionalización actuó como estabilizante frente a la agregación. Finalmente, se corroboró la

osteoespecificidad de los nanoLDH@Ris, a través de su interacción con hidroxiapatita.

En segundo lugar, se evaluaron diferentes estrategias para incorporar el fármaco oncológico a los nanoportadores (nanoLDH-MTX). En este caso la metodología empleada fue la síntesis por coprecipitación a pH variable, seguida de la funcionalización con Ris por intercambio aniónico (nanoLDH-MTX@Ris). De esta manera, se obtuvieron nanohíbridos que cumplen con los requerimientos adecuados de tamaño (200 nm) y cargado de fármaco (22% P/P). Asimismo, la vehiculización de MTX en los nanoLDH y nanoLDH@Ris permite modular su liberación dependiendo del pH y de los aniones del medio.

Finalmente, se estudió la interacción de los nanoLDH y nanoLDH@Ris con fluidos biológicos [identidad biológica], empezando con la incorporación de albúmina (Alb) hasta fluidos más complejos, como el suero fetal bovino (SFB). En ambos casos, se encontró que la adsorción de proteínas produce la formación de la corona proteica que cambia las características interfaciales e inhibe la formación de agregados. Las interacciones no específicas son las responsables de la interacción nanoportador-proteínas, mientras que las interacciones proteína-proteína determinan la composición de la corona a través de una red de reconocimiento biológico específico. La corona está formada por un pequeño grupo de proteínas, entre las más de 200 que constituyen el SFB, que en su mayoría presentaron carga negativa a pH fisiológico. Debido a esto, la identidad biológica de estos nanoportadores presenta valores de ζ negativos, que conjuntamente con el impedimento estérico causado por las proteínas, inhiben la agregación. Por otro lado, se encontró que la presencia de Ris en la superficie de los nanoportadores

afecta la formación de la corona proteica, tanto en número como en composición.

Por lo tanto, las propiedades más destacables que presentan los nanoLDH-MTX@Ris obtenidos durante este trabajo de tesis doctoral son: la propiedad de responder a los cambios de pH, la afinidad específica por la hidroxiapatita y la capacidad de modular la liberación del fármaco de acuerdo al entorno, a través de diferentes mecanismos. Además, conservan estas propiedades después de interactuar con los medios biológicos. En este contexto, los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis, representan una promisoriosa aplicación de los mismos para el desarrollo como portadores de fármacos anticancerígenos con localización específica en tejido óseo, de una manera más segura y eficiente.

6.2 Perspectivas

En términos generales, el presente trabajo de tesis doctoral representa un aporte a la investigación fundamental, tanto en el desarrollo de nanoportadores de fármacos, como en el conocimiento de los hidróxidos dobles laminares. Sin embargo, se hace necesario profundizar más en este campo de investigación. Particularmente, sería interesante evaluar el efecto de la identidad biológica de los nanoportadores en el transporte y liberación de fármacos, aspecto poco estudiado con nanoLDHs. Asimismo, sería provechoso optimizar las condiciones de liberación *in vitro*, en cuanto a citotoxicidad y efecto terapéutico, con la perspectiva de encontrar formulaciones óptimas para su aplicación en modelos animales. Finalmente, estos híbridos basados en nanoLDHs funcionalizados, para lograr sitio-especificidad en huesos, podrían extenderse hacia otros fármacos. También, podría utilizarse MTX combinado con nanoLDHs con otras funcionalidades para alcanzar otro tipo de tejidos.

El complemento y generalización de estos estudios, permitiría ampliar los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral y fortalecer la idea de la promisoría aplicación que presentan estos nanoportadores para la administración de fármacos con localización específica, en general, y de agentes anticancerígenos para tejido óseo, en particular.