



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FÍSICA "LUIS RIVERA TERRAZAS"

**"EFECTO DE LA MAGNETOHIPERTERMIA
SOBRE LA LIBERACIÓN DE MEDICAMENTOS
CONTENIDOS EN NANOCOMPOSITOS DE
MAGHEMITA FUNCIONALIZADAS CON
MULTICAPAS DE POLIELECTROLITOS"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS
(EN LA ESPECIALIDAD DE CIENCIA DE
MATERIALES)**

PRESENTA:

M.C. ABRAHAM FRANCISCO PALOMEC GARFIAS

ASESOR(ES):

**DR. CÉSAR MÁRQUEZ BELTRÁN
DR. MARCELO HENRIQUE SOUSA**

JUNIO DE 2018

A Dios por guiarme en los momentos más difíciles de mi vida y por darme la fuerza para poder continuar.

A mi madre, por brindarme todo su amor, apoyo y comprensión.

A Katiúscia, mi prometida y mi mejor amiga, por darme todo su apoyo incondicional, por toda tu ayuda en la realización de este trabajo y por estar en los buenos y malos momentos conmigo.

A mi hermano, mis tías (Ana, Virginia y Nelly) y mis tíos (Jesús y José) por su apoyo y cariño.

Agradecimientos

A mis asesores de tesis, el Dr. César Márquez Beltrán y el Dr. Marcelo Henrique Sousa por el apoyo que me han brindado en todo momento, por sus enseñanzas y la ayuda recibida para la conclusión de este trabajo de Tesis.

A los miembros del comité revisor: Dr. Jaime Ruiz García, Dr. Umapada Pal, Dr. Julio Villanueva Cab y Dr. Enrique Sánchez Mora por sus observaciones y comentarios en este trabajo.

A los profesores del Instituto de Física “Luis Rivera Terraza” y al personal que labora en él.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

Al Dr. José Coaquira del Laboratorio de Magnetismo aplicado de la Universidad de Brasilia por la colaboración, disponibilidad y ayuda en los pruebas de magnetización.

Al Dr. Alexandre Luís Parize de la Universidad Federal de Santa Catarina por la colaboración, disponibilidad y ayuda en los experimentos de liberación del fármaco.

Al Dr. Andris Figueiroa del Instituto de Física de la Universidad Federal de Goiás por la colaboración, disponibilidad y ayuda en las pruebas de magnetohipertermia.

A la Dra. Sônia Bao y a su estudiante Yasmin Garcia del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Brasilia por la colaboración, disponibilidad y ayuda en los análisis de citotoxicidad.

A la Dra. Eliane Ferreira y a su estudiante Alonso Poma del departamento de Biología Celular de la Universidad de Brasilia por la colaboración, disponibilidad y ayuda en los análisis antimicrobianos.

A Marcelo Parise de la Universidad de Brasilia por su apoyo en mi estancia en la Universidad

A Tatiana Oliveira del laboratorio de Microscopía de Alta Resolución del Instituto de Física de la Universidad Federal de Goiás por la colaboración, disponibilidad y ayuda en los análisis de HRTEM.

A Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa II. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017.

Finalmente a mis compañeros Jesús Iván Peña, Jesús Calleja, Marcos Rodriguez y Alonso Poma.

Índice

Resumen	i
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Presentación.....	4
1.2. Objetivo general	5
1.3. Objetivos específicos	5
Capítulo 2. Generalidades	7
2.1. Nanopartículas magnéticas	7
2.2. Polielectrolitos	12
2.3. Liberación controlada de fármacos	14
2.4. Quercetina	17
Capítulo 3. Parte Experimental	19
3.1. Materiales y reactivos.....	19
3.2. Síntesis de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	20
3.3. Recubrimiento de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con multicapas de polielectrolitos mediante la técnica capa por capa (LbL) sin y con fármaco	21
3.3.1. Multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales adsorbidos en nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. 21	
3.3.2. Sistema de multicapas de polielectrolitos sintéticos (y naturales) con fármaco adsorbidas en nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	23
3.4. Técnicas experimentales.....	25
3.4.1. Microscopio electrónico de transmisión (TEM).....	25
3.4.2. Difracción de rayos X (DRX).....	25
3.4.3. Potencial zeta (movilidad electroforética).....	25
3.4.4. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	26
3.4.5. Titulación potenciométrica y conductimétrica	26
3.4.6. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	27
3.4.7. Análisis termogravimétrico (TGA).....	27
3.4.8. Espectroscopia UV-Vis	27

3.4.9. Eficiencia de encapsulación (% EE).....	28
3.4.10. Cinética de la liberación de quercetina a diferentes pH's	28
3.4.11. Estudio de la liberación de la quercetina por magnetohipertermia	29
3.4.12. Evaluación de la citotoxicidad mediante el método de MTT.....	30
3.4.13. Pruebas de actividad antimicrobiana	31
Capítulo 4. Funcionalización nanopartículas de γ-Fe₂O₃ con multicapas de polielectrolito sin fármacos	33
4.1. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	33
4.2. Difracción de rayos X (DRX).....	35
4.3. Determinación del pKa de la nanopartícula y de los polielectrolitos.....	36
4.4. Diagrama de especiación de las nanopartículas y polielectrolitos	41
4.5. Potencial zeta de la nanopartículas magnéticas.....	43
4.6. Potencial zeta de las NpMs @ multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales	44
4.7. Radio hidrodinámico de NpMs dispersas en medios acuosos	46
4.8. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	48
4.9. Análisis termogravimétrico (TGA).....	51
4.10. Propiedades magnéticas de las NpMs @ multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales.	54
4.11. Conclusiones	58
Capítulo 5. Funcionalización nanopartículas de γ-Fe₂O₃ con multicapas de polielectrolito con fármacos	61
5.1. Espectro de absorción de la quercetina	61
5.2 Eficiencia de encapsulación	63
5.3. Efecto del pH sobre el potencial zeta de las NpMs @ multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales con quercetina.....	64
5.4. Dispersión dinámica de luz (DLS)	66
5.5. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier FTIR.....	66
5.6. Análisis termogravimétrico (TGA).....	69
5.7. Propiedades magnéticas de las NpMs @ multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales con fármaco.....	71

5.8. Conclusiones.....	72
Capítulo 6. Evaluacion de las NpMs@multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales con quercetina.....	75
6.1. Efecto del pH sobre la liberación del fármaco de las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina.....	75
6.2. Efecto de la magnetohipertermia sobre la liberación del fármaco de las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina	82
6.3. Estudios de citotoxicidad de las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina	86
6.4. Estudios de actividad microbiana de las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina	88
6.5 Conclusiones.....	90
Capítulo 7. Conclusiones Generales	93
Perspectivas	97
Bibliografía	99

Resumen

Este trabajo se refiere al estudio de nanoplataformas magnéticas como una herramienta para mejorar el suministro / liberación asistida de fármacos hidrofóbicos. En particular se analizó el efecto del pH y de magnetohipertemia sobre la liberación del fármaco en sistemas de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) con polielectrolitos naturales y sintéticos. Usando el método de coprecipitación se sintetizaron nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obteniendo un diámetro de 8.8 nm. Por otro lado, se modificó la carga superficial de las nanopartículas magnéticas (NpMs) mediante la técnica capa por capa de polielectrolitos (LbL, por sus siglas en inglés). Los resultados experimentales del potencial zeta muestran que las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ tienen carga positiva, sin embargo se observó que, cuando los polielectrolitos se adsorben sobre la nanopartícula, se produce una inversión de carga que depende del tipo de carga del polielectrolito. Se utilizaron simultáneamente medidas conductimétricas y potenciométricas con el fin de encontrar el pH óptimo para la deposición de cuatro capas intercaladas por un par de polielectrolito sintéticos de poliestireno sulfonato (PSS) / hidrocloreuro de polialilamina (PAH) o por un par de polielectrolito naturales de carboximetilcelulosa (CMC) / quitosano (CHI) sódico. El potencial zeta se modificó cuando el pH cambió y se debe a la protonación / desprotonación de los grupos iónicos de los polielectrolitos presentes en la superficie. El fármaco fue almacenado dentro de las multicapas de polielectrolitos sintéticos (y naturales) adsorbidas en las NpMs. Se utilizaron técnicas XRD, TEM, DLS, TGA y FTIR para analizar las propiedades estructurales, morfológicas y de superficie de los sistemas nanoestructurados sintetizados. La eficacia de encapsulación de la quercetina se determinó por absorbancia usando espectrofotometría UV-Vis, donde se obtuvo aproximadamente un 43% de quercetina en todas las muestras. El comportamiento magnético de todas las muestras fue superparamagnética, a la temperatura de 300K. se observó por primera vez que el comportamiento de magnetización en sistemas NpMs@polielectrolito no depende solamente de la parte diamagnética (o no magnética) de la multicapa sino también de la cooperatividad entre las cadenas de polielectrolito y la afinidad de estas con la superficie magnética. Asimismo, se observó un efecto antimicrobiano de nanopartículas sobre bacterias Gram (-) (*Escherichia coli*) y bacterias Gram (+) (*Bacillus subtilis*). Además, los resultados experimentales de la liberación de la quercetina muestran que la velocidad de liberación es mayor cuando se utiliza magnetohipertemia (MHT) que en el caso de estimular la liberación por cambios en el pH, la cual afecta la permeabilidad de las multicapas de polielectrolito. Los resultados muestran que cuando se aplica el campo magnético promueve una rápida liberación del fármaco. La citotoxicidad del sistema NpMs@polielectrolito (sin o con almacenamiento de un fármaco) se evaluó en células tumorales ováricas humanas (A2780). Los resultados demuestran que las nanopartículas recubiertas con polielectrolito no afectan a estas células con un tratamiento de dosificación (concentración de NpMs@polielectrolito en solución) siguiente: 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{mol/L}$. Por otro lado, con el sistema NpMs@Polielectrolito-quercetina se observó un proceso citotóxico ya que llevó a una reducción en la viabilidad de las células tumorales.

.

Capítulo 1. Introducción

El estudio del comportamiento de los nanomateriales se debe a su gran versatilidad de potenciales aplicaciones en diferentes áreas del conocimiento ya que las dimensiones que presentan estos materiales (1 a 100 nm) originan propiedades físicas y químicas particulares [1, 2, 3]. Entre las diferentes aplicaciones destacan los circuitos nano-electrónicos, nano-sensores, dispositivos piezoeléctricos, pilas de combustible, catalizadores, encapsulación y liberación de fármacos, entre otros [4, 5, 6].

En la última década se han empleado materiales nano-estructurados en medicina lo que ha sido beneficioso para la salud, por ejemplo esto ha permitido mejorar los diagnósticos de enfermedades como el cáncer [7, 8], o la obtención de imágenes con mayor precisión de un sitio orgánico específico [9, 10, 11], así como llevar a cabo novedosas terapias no invasivas para el cáncer [12, 13], VIH [14, 15], neurodegenerativas [16, 17, 18], oculares [19, 20], respiratorias [21, 22], etc. Los nanomateriales, prometen brindar a la medicina herramientas sin precedentes para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, hasta ahora no se comprende del todo bien los mecanismos de interacción en la nano-biointerfase, por lo que se debe involucrar, para un mejor entendimiento, una investigación interdisciplinaria que abarque diferentes campos como la física, la ingeniería o ciencias de los materiales, nanomedicina, biología, química, entre otras.

Entre los diferentes tipos de materiales que se utilizan para sintetizar nanopartículas se encuentran los óxidos tales como el dióxido de titanio (TiO_2), dióxido de silicio (SiO_2), óxido férrico (Fe_2O_3) u óxido ferroso férrico (Fe_3O_4); y muy recientemente los nitruros, metales y sus aleaciones, polímeros orgánicos y diferentes materiales compuestos [23, 24, 25].

Un tipo de nanopartícula que ha suscitado un elevado interés es aquella que tiene propiedad magnética, ya que al aplicar un campo magnético externo se pueden obtener diferentes comportamientos, de los cuales se pueden mencionar: 1) la manipulación del movimiento de las nanopartículas magnéticas (NpMs) por dicho campo y ser guiadas a un

blanco celular específico, particularmente es de gran utilidad para aplicaciones en la liberación controlada de fármacos; igualmente la liberación del fármaco se hace aún más alta si utilizamos nanopartículas cada vez más pequeñas ya que tendremos un incremento en la superficie efectiva [26, 27], 2) Pueden ser generadores locales de calor para la aniquilación de células-tumorales utilizando la técnica que se conoce como magnetohipertermia [28, 29], esta técnica consiste en aplicar campos magnéticos oscilantes externos sobre las nanopartículas magnéticas lo que eventualmente produce el fenómeno de hipertermia y 3) Por tener un alto contraste en imágenes de resonancia magnética, entre otras [30].

Los requerimientos específicos que se exigen a las NpMs para aplicaciones en medicina son tanto la estabilidad estructural como la dispersión coloidal en medios acuosos con características fisiológicas. Una vez que se cumplan dichos requerimientos es necesario que tengan una excelente biocompatibilidad. En este sentido, las nanopartículas deben ser funcionalizadas con materiales biocompatibles, durante o después del proceso de síntesis de la NpMs; así la superficie funcionalizada de estos óxidos puede mitigar la formación de agregados, evitar cambios de estructura y preservar su composición cuando se exponen a un medio biológico. Algunas investigaciones encontraron que cuando las nanopartículas son recubiertas, o funcionalizadas por moléculas orgánicas tales como polímeros y/o anticuerpos, aumenta su cooperativa con el organismo [31, 32]. La versatilidad del proceso de funcionalización es que permite a las nanopartículas especificarlas en una región o blanco celular determinado. Además, una superficie funcionalizada puede tener una carga neta diferente de cero permitiendo así interacciones electrostáticas en un medio acuoso [33]; entre algunas biomoléculas iónicas que se pueden utilizar para la funcionalización de las NpMs se encuentran cierto grupos de fármacos con carga, tales como los antineoplásicos, sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento o proliferación de células tumorales malignas. Algunos ejemplos pueden ser el tamoxifeno que es un medicamento para el tratamiento de cáncer de seno y/o la cisplatina fármaco basado en el platino usado en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer, entre los que se incluyen sarcomas, algunos carcinomas (cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de ovario), linfomas y tumor de células germinales. Ciertas proteínas también son utilizadas para propósitos biomédicos, en particular la albúmina ya que se ha demostrado que se acumulan en tumores sólidos [34]. En este contexto, ciertos trabajos de investigación han aprovechado las propiedades

electrostáticas de polielectrolitos sintéticos y/o naturales para el recubrimiento de superficies de diferentes tipos de materiales. Para lograr este fin de una forma sencilla, Decher et al. [35, 36] desarrollaron en 1996 una técnica experimental que en la actualidad es ampliamente utilizada y se conoce como técnica capa-por-capo o LbL (por sus siglas en inglés) de polielectrolitos. Una ventaja de la técnica LbL es que permite la fabricación de dispositivos con características biofuncionales, ya que existen estudios que muestran que tales dispositivos mantienen sus propiedades de actividad biológica cuando péptidos o proteínas se han adsorbido o inclusive enlazados en películas de multicapas de polielectrolitos [37, 38, 39].

Por otra parte, técnicas usando hipertermia ya han sido utilizadas para la aniquilación de células tumorales, en particular por medio de microondas establecida en protocolos oncológicos como terapia complementaria de otros tratamientos (radioterapia, etc.) [40]. Los procesos de hipertermia consisten en el aumento de la temperatura (hasta 45° C) o muerte celular inducida ($T > 46^{\circ} \text{C}$). Existen otras técnicas para lograr hipertermia que involucran radiaciones láser, ionizantes y microondas. Aunque dichas técnicas son capaces de elevar la temperatura celular, tienen efectos colaterales indeseados, como ionización del material genético (radiaciones) o falta de selectividad (microondas) por lo que afectan regiones saludables del organismo (células, tejidos, u órganos). La utilización de nanopartículas magnéticas como sustratos en la técnica LbL provee materiales compositos que pueden ser utilizados en magnetohipertemía (MHT) aumentando así la liberación de fármacos o aniquilación de células cancerosas [41].

La magnetohipertermia, que es la hipertermia con fluidos magnéticos, se basa en la disipación de energía en forma de calor de las propias nanopartículas magnéticas cuando son sometidas a un campo magnético oscilante externo. Esta técnica es mucho más eficiente que las descritas anteriormente ya que solamente el calentamiento está dirigido a blancos específicos por lo que en principio no afectarían regiones saludables del organismo. El logro de esta metodología dependerá de la funcionalización de los nanocompositos magnéticos para calentar así exclusivamente aquellas células tumorales que fueron alcanzadas previamente. La magnetohipertemia aplicado a estos nanocompositos permitiría también el control de la cantidad de fármaco liberado en función del campo magnético oscilante externo.

En este trabajo se analiza las propiedades de composites fabricados con NpMs-LbL-fármaco que tienen potencial aplicación en hipertermia (magnetohipertermia) mediante la caracterización de los composites y evaluando el comportamiento respecto a diferentes variables para optimizar la liberación de medicamentos. Por otra parte, es necesario entender el efecto y la interacción de NpMs sobre los sistemas biológicos, en particular los efectos citotóxicos para evitar riesgos de un aumento de toxinas en el organismo que puedan ser contraproducentes con el tratamiento de enfermedades y visiblemente estas condiciones pueden estar relacionados con la exposición de las nanopartículas, polielectrolitos y dosificación de medicamentos en contacto con las entidades biológicas.

1.1. Presentación

El manuscrito de tesis se desglosa de la siguiente manera:

En el capítulo 2 se describe los conceptos generales de las propiedades magnéticas de óxidos de hierro, se explica la técnica experimental magnetohipertermia así como los mecanismos de liberación de fármacos. Además, brevemente se muestran las propiedades físico-químicas de los polielectrolitos y del fármaco quercetina.

En el capítulo 3 describimos los materiales utilizados así como la metodología de síntesis de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (NpMs). Se hace énfasis en la técnica capa-por-capas de polielectrolito (LbL) como método de encapsulación y/o formación de multicapas sobre NpMs, de hecho esto genera la alteración de la carga superficial de las nanopartículas. También se discute la metodología utilizada para la “*encapsulación*” o “*almacenamiento*” del fármaco dentro de las multicapas de polielectrolitos. Por último, se describe de manera general las técnicas experimentales utilizadas en este trabajo.

En los capítulos 4, 5 y 6 presentamos los análisis y las discusiones del trabajo.

Finalmente, en el último capítulo se muestran las conclusiones y con el objetivo de dar continuidad a esta investigación se muestran las perspectivas del trabajo de investigación

1.2. Objetivo general

Fabricar y caracterizar nanosistemas magnéticos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ funcionalizados con polielectrolitos para la liberación controlada del fármaco (quercetina).

1.3. Objetivos específicos

1.- Sintetizar nanopartículas magnéticas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de tamaños menores a 20 nm por medio de la co-precipitación de sales de hierro.

2.- Encapsulación y funcionalización de las nanopartículas usando la técnica de deposición capa-por-capas (LbL) de polielectrolitos de carga opuesta. Se utilizarán en el proceso de esta técnica tanto polielectrolitos naturales (quitano y carboximetilcelulosa) como sintéticos (hidrocloruro de polialilamina y sulfonato de sodio de poliestireno).

3.- Evaluar la carga superficial de las nanopartículas magnéticas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sin y con polielectrolitos por medio de mediciones de movilidad electroforética (potencial zeta).

4.- Caracterizar morfológica y estructuralmente las nanopartículas magnéticas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con y sin polielectrolitos.

5.- Analizar la influencia de las multicapas de polielectrolitos sobre las propiedades magnéticas de nanopartículas.

6.- Realizar estudios de adsorción del fármaco en multicapas de polielectrolitos previamente adsorbidos sobre las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

7.- Estudiar la cinética de la liberación del fármaco en el sistema NpMs con multicapas de polielectrolito (NpMs-LbL-fármaco) en soluciones a diferentes valores de pH.

8.- Utilizar la técnica de magnetohipertermia para observar el efecto de la liberación del fármaco de los sistemas NpMs-LbL-fármaco.

9.- Estudiar el efecto de la liberación del fármaco sobre el crecimiento bacteriano.

10.- Evaluar la citotoxicidad del sistema NpMs-LbL-fármaco en células cancerosas (Ovario)

Capítulo 2. Generalidades

2.1. Nanopartículas magnéticas

El estudio de las nanopartículas magnéticas tiene una gran importancia en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, facilidad de modificación de la superficie y liberación de medicamento asistido por campos magnéticos externos [26], y es el tema que concierne en este trabajo de tesis. El tipo de magnetización depende del tamaño, forma, estructura, cristalinidad, método de síntesis entre los cuales se pueden encontrar sistemas core(magnetic-dielectric)@shell(dielectric-magnetic) [42, 27].

La naturaleza de las propiedades magnéticas da origen a una clasificación de los materiales, los cuales son: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos y antiferromagnéticos, y esta relacionado en la forma como se alinean los dipolos magnéticos en presencia de un campo magnético $\mathbf{B}$, ver figura 1.

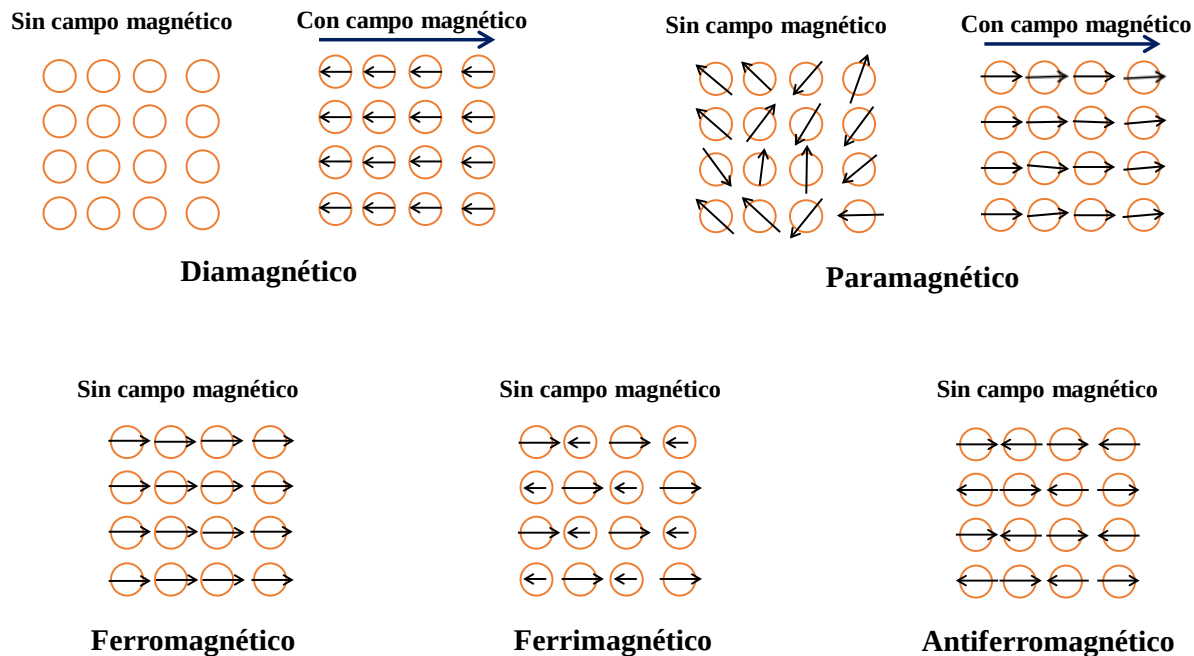


Figura 1. Alineación y la respuesta de los dipolos magnéticos en un campo magnético externo [43].

Los materiales diamagnéticos tienen una propiedad que consiste en repeler campos magnéticos, es decir, se magnetizan débilmente en sentido opuesto a un campo magnético (dipolos magnéticos se orientan opuesto al campo aplicado). Otra forma de explicar el

diamagnetismo es a partir de la configuración electrónica de los átomos o de los sistemas moleculares que contengan todos sus electrones apareados y los sistemas atómicos o iónicos que contengan orbitales completamente llenos. Es decir los espines de los electrones del último nivel se encontrarán apareados (por tanto el momento magnético de los espines es prácticamente nulo). Ahora bien, el hecho de que la magnetización del material se oponga al campo magnético aplicado puede explicarse de forma sencilla si se considera una consecuencia de aplicar la Ley de Lenz a nivel molecular. Según la teoría electromagnética, siempre que varía el flujo magnético se genera una corriente inducida y, según esta Ley, "el sentido de las corrientes inducidas es tal que con sus acciones electromagnéticas tienden a oponerse a la causa que las produce". Todos los átomos contienen electrones que se mueven libremente y cuando se aplica un campo magnético exterior se induce una corriente superpuesta cuyo efecto magnético es opuesto al campo aplicado. Los materiales diamagnéticos tienen una susceptibilidad negativa ($\chi < 0$), línea negra de la figura 3.

En los materiales paramagnéticos, existen dipolos magnéticos que están alineados solo después de la aplicación de un campo magnético externo, las dos propiedades que definen el paramagnetismo son: una susceptibilidad ligeramente positiva ($\chi > 0$) que es directamente proporcional al campo magnético y una magnetización nula en la ausencia del campo magnético, línea azul de la figura 3. Los materiales que poseen propiedades ferromagnéticas contienen momentos dipolares magnéticos netos en ausencia de un campo magnético externo presentando una magnetización espontánea, la figura 3 (línea roja) muestra una curva típica de magnetización en ella se observa un ciclo de histéresis debido a la existencia de dominios magnéticos dentro del material y a partir de la curva se puede encontrar la magnetización de saturación (M_s , valor máximo de magnetización), el campo coercitivo (H_c , campo externo necesario para reducir la magnetización a cero) y magnetización remanente (M_r , la magnetización residual cuando el campo aplicado es cero). Los ferrimagnéticos contienen momentos magnéticos antiparalelos con diferente magnitud, de modo que no hay magnetización espontánea, sino más bien una magnetización resultante. Y por último, en los materiales antiferromagnéticos, los momentos dipolares magnéticos son iguales en magnitud pero antiparalelos, de manera que el momento magnético neto es nulo [44].

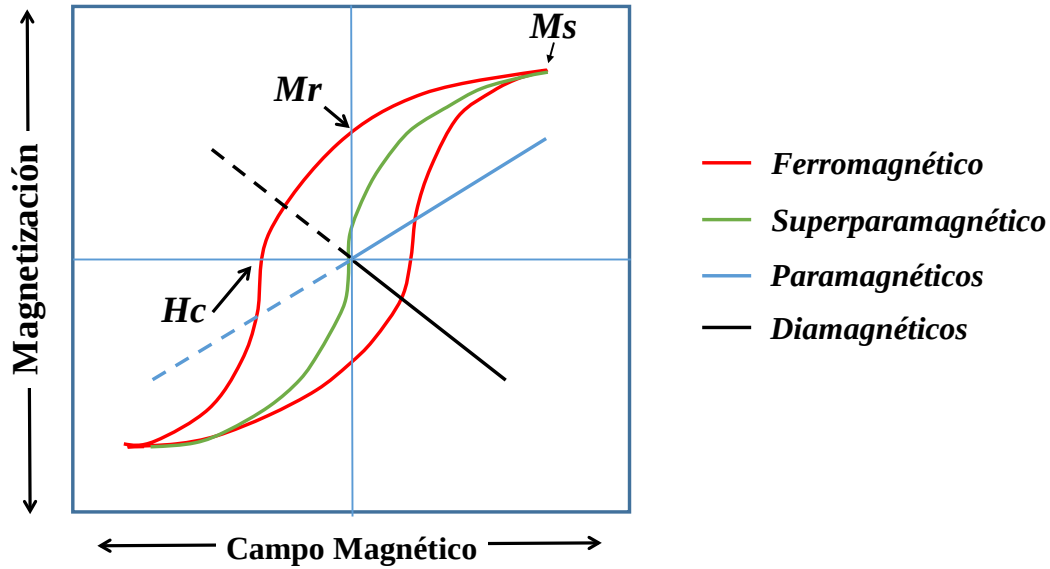


Figura 2. Comportamiento magnético bajo la influencia de un campo aplicado [45]

La reducción de tamaño de los materiales ferromagnéticos a una escala nanométrica origina propiedades magnéticas particulares que son diferentes a sus pares en bulto. Para que un material ferromagnético tenga los espines alineados necesita minimizar su energía magnetostática formando dominios magnéticos, es decir, regiones de magnetización uniforme, al reducir el volumen del material por debajo de un valor crítico, la forma de estos dominios se vuelve energéticamente desfavorable. Es entonces cuando se puede considerar un momento magnético “gigante” único, que es la suma de todos los momentos magnéticos individuales de los átomos que contiene la nanopartícula (este modelo es conocido como “macro-spin-approximation”) cuyo comportamiento magnético es dependiente de la temperatura [46], presentando además una transición magnética de un material ferro a uno superparamagnético. En esta transición se observa que en ausencia de campo magnético externo los dipolos son orientados aleatoriamente debido que la energía térmica es superior a la energía de anisotropía por partícula (que es la energía responsable de mantener los momentos magnéticos de una partícula en una determinada dirección) y en consecuencia el momento magnético neto se anula. Aplicando un campo magnético externo las nanopartículas se magnetizan, orientándose en dirección al campo externo, además presenta una susceptibilidad magnética mucho mayor que los materiales paramagnéticos y no tiene campo coercitivo (H_c) ni magnetización remanente (M_r), tal como se observa en la figura 2 línea verde [42].

En medicina, las nanopartículas magnéticas pueden tener un potencial para resolver problemas del transporte de fármacos en áreas específicas del cuerpo. Al mismo tiempo, mediante técnicas como magnetohipertermia se pueden utilizar las NpMs para calentar y destruir localmente un tumor cancerígeno, este tipo de tratamiento lo podemos llamar como *magnetoterapia*.

La característica esencial de la magnetohipertermia es que la energía que es absorbida por la nanopartículas cuando un campo magnético B oscila en en tiempo t con una frecuencia f , y esta energía magnética se transforma en calor mediante diferentes mecanismos [47, 48]:

a) Generación de corrientes parásitas (Eddy currents) en un material de baja resistividad eléctrica expuesto a campo magnético alternado. La pérdida energética que se manifiesta en forma de calor se debe a corrientes parasitas (ED) esta dada por la ecuación 1.

$$ED = \frac{(\mu \cdot \pi \cdot d \cdot f \cdot H)^2}{20\rho} \quad (1)$$

donde μ es la permeabilidad magnética del material, d es el diámetro de la partícula, f es la frecuencia, H es la amplitud de la intensidad del campo magnético y ρ la resistividad del material. Sin embargo, el calor inducido por las corrientes parasitas de partículas magnéticas en la escala nanométrica es pequeña como para tomarla en consideración.

b) Generación de calor por la inversión de la magnetización dentro de un material magnético, es decir la rotación del momento dentro de la partícula (relajación de Neel)

c) Generación de calor por medio de la rotación del material magnético respecto del eje del campo aplicado cuando se encuentra en un medio líquido (relajación Brown o Browniana)

d) Procesos de magnetización y desmagnetización originado por la alineación de los dominios magnéticos dentro de un campo magnético alterno. Cuando el campo externo cambia de dirección dominios que previamente estaban alineados pierden su magnetización en un tiempo muy pequeño (tiempo de relajación del sistema), es decir sufren un desmagnetización, seguida de una magnetización en una nueva dirección, esta transición provoca pérdidas de energía conocidas como las pérdidas de histéresis. La cantidad de calor generado por unidad de volumen (P_F), está dada por la frecuencia (f) multiplicada por el área del ciclo de histéresis en las coordenadas M-H tal como se muestra en la ecuación 2:

$$P_F = \mu_0 f \oint H dM \quad (2)$$

donde $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} (\text{TmA})^{-1}$

La cantidad de calor generado (potencia) por las nanopartículas magnéticas puede determinarse por diferentes cantidades físicas como son el momento y el campo magnético, la frecuencia y el volumen de partículas. La generación de calor de nanopartículas (P), se puede expresar como [49, 50].

$$P = \mu_0 \pi \cdot f \chi |H|^2 \quad (3)$$

donde χ es la susceptibilidad, H es la amplitud de la intensidad del campo magnético. La ecuación 3 muestra que a un campo magnético constante la generación de calor de las nanopartículas es linealmente dependiente de la frecuencia. Claramente se observa de la ecuación 3 que la susceptibilidad magnética del material es un parámetro importante para la generación de calor cuando la intensidad del campo magnético (H) y la frecuencia (f) son constante.

Tabla 1. Propiedades generales de los óxidos de hierro [51].

Propiedades	Magnetita $\text{Fe}_3(\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+})\text{O}_4$	Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)
Estructura cristalina	Cubico	Cubico o tetragonal
Dimensiones de la celda	a=0.8396 nm	a=0.83474 nm
Tipo de magnetismo	Ferrimagnético	Ferrimagnético
Densidad	5.26 g/cm ³	4.87 g/cm ³
Magnetización de saturación a 298 K	~90 a 100 emu/g	~ 60 a 80 emu/g
Color	Negro	Marrón rojizo

Por otro lado, las nanopartículas magnéticas compuestas por óxidos de hierro, en particular la magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), son utilizados en magnetohipertermia; además pequeñas dosis de nanopartículas de hierro que se suministra al organismo ayudan a biodegradarse más fácilmente, aportando los iones de hierro y oxígeno a la hemoglobina [52, 53]. Estos óxidos de hierro tienen propiedades físicas y cristalinas

similares, tabla 1. En la estructura cristalina de la magnetita, los átomos de oxígeno forman la red cubica de caras centradas, los cationes de hierro están alojados en los espacios intersticiales; las posiciones tetraédricas corresponden a cationes Fe^{3+} y en las posiciones octaédricas se alojan cationes Fe^{3+} y Fe^{2+} por igual. La maghemita se obtiene por oxidación de magnetita por eso tiene una estructura cristalina similar, la única diferencia con respecto a la magnetita es que contiene cationes de Fe^{3+} en las posiciones tetraédricas y en las posiciones octaédricas, con ausencia de cationes Fe^{2+} .

2.2. Polielectrolitos

Los polielectrolitos son polímeros que tienen grupos ionizables, es decir, son polímeros cargados [54]. Los polielectrolitos se disocian en especies cargadas en solución acuosa por medio de un polión (monómero cargado) y un contraión, como se observa en la figura 3. Dependiendo de la naturaleza de la carga, los polielectrolitos pueden ser catiónicos o aniónicos. Aquellos cuya disociación (polión – contraión) es independiente del pH del medio se denominan polielectrolitos fuertes, y débiles cuando su disociación depende del pH del solvente.

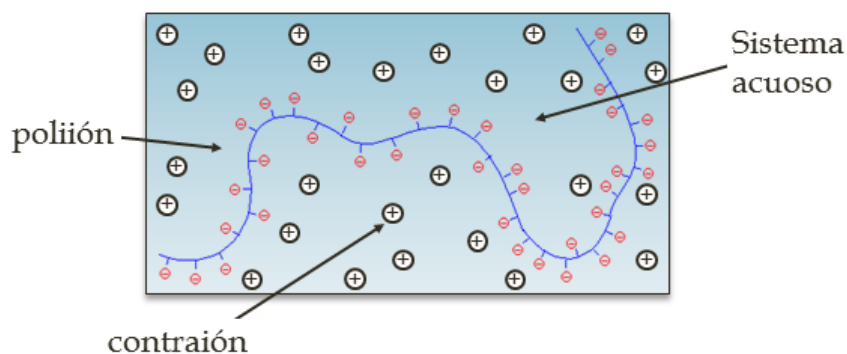


Figura 3. Representación esquemática de un sistema solvente-polielectrolito.

Unas de las principales características de los polielectrolitos son el bajo coeficiente de actividad de los contraiones (altamente solvatados en soluciones polares) y el estiramiento de la cadena de polímero en soluciones acuosas debido a la repulsión electrostática entre los monómeros cargados [55]. Además, las propiedades de los polielectrolitos en solución dependen del grado de disociación de sus grupos iónicos, del disolvente, del pH de la solución y de la concentración de sal (fuerza iónica en la solución).

Los polielectrolitos se han utilizados en diversas aplicaciones, como la estabilización o floculación de suspensiones que son muy útiles en la purificación del agua o en la industria alimentaria y cosmética. Además, se pueden utilizar en la formación de multicapas y la inversión de carga del sustrato mediante la atracción electrostática entre el sustrato de carga opuesta y la cadena cargada del polielectrolito mediante técnica de capa por capa (LbL) de polielectrolito sobre sustratos cargados [56, 57].

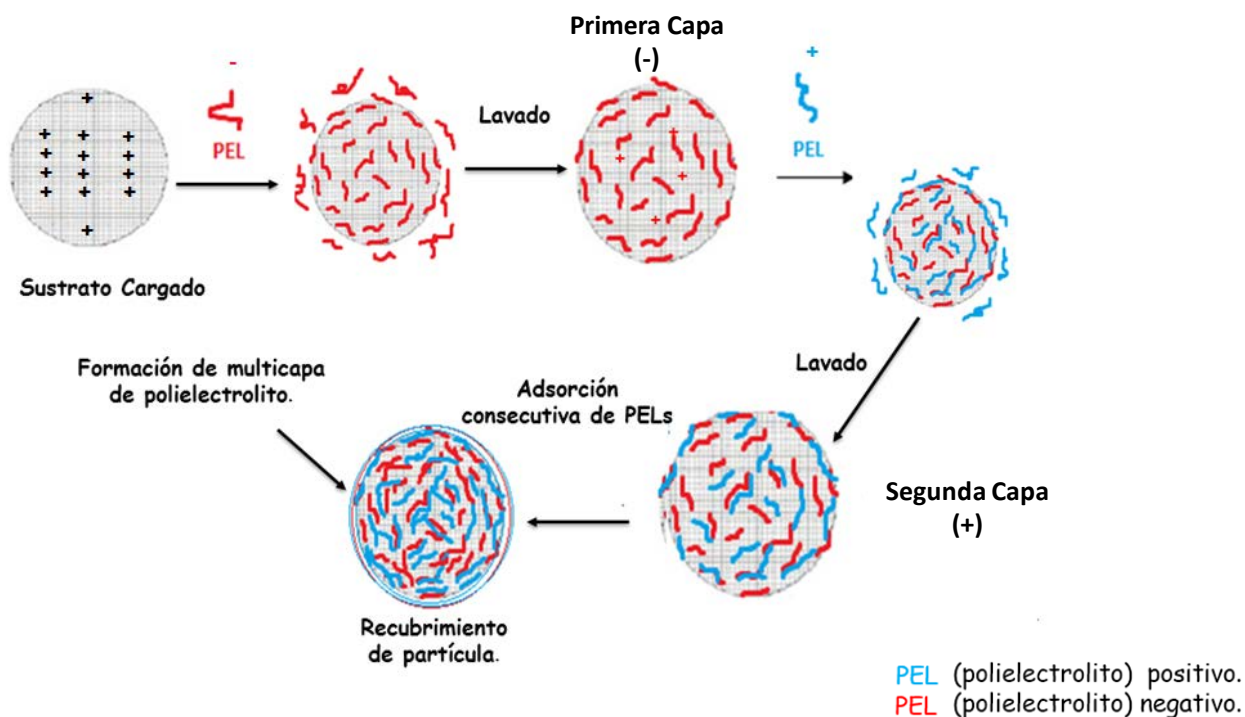


Figura 4. Representación esquemática de la formación de una multicapa de polielectrolito sobre un sustrato cargado [58].

La técnica LbL consiste en sumergir un sustrato cargado en una solución que contiene un polielectrolito de carga opuesta. Este procedimiento permite la adsorción del polielectrolito sobre el sustrato debido a la fuerte atracción entre las cadenas del polielectrolito y la superficie del sustrato. La repetición de este proceso permite la formación de multicapas de polielectrolitos como se muestra en la figura 4. Una de las consecuencias de esta metodología es la de invertir el signo de la carga superficial del sustrato o coloide.

Posteriormente, se realizan procesos de lavados de las soluciones que contienen los polielectrolitos para eliminar los polielectrolitos no adsorbidos en el sustrato y así evitar la formación de complejos de polielectrolitos en la solución [57].

La morfología, el grosor, porosidad, degradación y la carga de la multicapa formada depende de la naturaleza de los polímeros cargados (sintéticos y/o naturales) así como diferentes parámetros experimentales como pueden ser [59, 60]: a) el pH de la solución acuosa, b) la concentración iónica de la solución, c) la concentración del polielectrolito, y d) temperatura.

Una posible aplicación de multicapas de polielectrolitos adsorbidos en coloides cargados es la liberación controlada de fármacos [61, 62], ya que en principio se conserva la estabilidad de los medicamentos debido que no hay enlaces covalentes que estén involucrados [41] en la multicapa de polielectrolitos, es decir, que la técnica LbL puede servir en principio como excipiente para el principio activo. Por lo tanto, el fármaco y las NPMs con multicapas de polielectrolito no son una nueva entidad química ya que preservan sus propiedades químicas intactas. Otra ventaja es que al modificar el pH altera la estructura de las capas de polielectrolito llevándolas a cambios de permeabilidad de las multicapas lo que produciría cambios de difusión de un fármaco al liberarse del sistema, también puede modificar la densidad de carga superficial de las cadenas de los polielectrolitos relajando la unión intermolecular entre las multicapas [35,63].

2.3. Liberación controlada de fármacos

La liberación de un fármaco se puede definir como una entidad capaz de administrar un fármaco a una velocidad predeterminada (constante o no) durante un período prolongado. Este fármaco debe ser selectivo para un blanco biológico y que además sea fácilmente eliminado a través del metabolismo del cuerpo [63] para evitar efectos secundarios relacionados con la toxicidad.

La liberación controlada del fármaco no depende únicamente de las propiedades fisicoquímicas del fármaco sino también de la interacción del vehículo que contiene al fármaco (excipiente) y el entorno de disolución [64]. Por ejemplo cuando el fármaco se encuentra en sistemas poliméricos, su difusión hacia fluidos fisiológicos (medios de disolución) depende de la concentración y el grado de hinchamiento “*swelling*” de la red polimerica o una combinación de ambos mecanismos [63, 65]. Sin embargo una estrategia para controlar la liberación de fármaco es mediante estímulos externos que pueden modificar

las propiedades fisicoquímicas del excipiente, red polimérica en este caso, lo que permite diferentes formas de liberación del fármaco; de hecho parámetros tales como pH, temperatura, concentración iónica, masa molecular, fracción de carga, entre otros [66], influyen fuertemente en la estructura de una red polimérica. Además, si el vehículo que transporta al fármaco tiene características magnéticas, ópticas (plasmónica en particular) y porosas puede también provocar la liberación mediante estímulos externos tales como campos magnéticos, luz y ultrasonido.

En este trabajo se utilizaron dos modelos matemáticos *Korsmeyer-Peppas* [67] y *Gallagher-Corrigan* [68] con el fin de analizar la liberación controlada en nanoplataformas compuesta por nanopartículas magnéticas con multicapas de polielectrolitos que contiene al fármaco.

a) *Modelo matemático Korsmeyer-Peppas*

Este es un modelo empírico que describe la liberación de fármaco con respecto al tiempo t elevado a una potencia n , empleando para ello datos de liberación inferiores al 60%, y es descrita mediante la siguiente ecuación [69].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4)$$

donde M_t es la cantidad de fármaco liberado al tiempo t , M_∞ es la cantidad de fármaco que se libera en un tiempo infinito; M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado a un tiempo t , k es una constante de velocidad que depende del sistema y n es el exponente difusional en el sistema. Los valores de n en la ecuación 4 depende del tipo de geometría del sistema de encapsulación (películas delgadas, cilindros o esferas). En la tabla 2 se muestran los rangos del valor de n .

En general este modelo se utiliza para describir el mecanismo de liberación de un agente activo (fármaco) a partir de una matriz polimérica [67].

Tabla 2. Mecanismos de liberación del principio activo el cual depende del exponente difusional n para diferentes sistemas.

Exponente difusional (n)			Mecanismo de liberación
<i>Películas delgadas</i>	<i>Cilindros</i>	<i>Esferas</i>	
0.5	0.45	0.43	<i>Difusión Fickiana</i>
$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	<i>Transporte anómalo</i>
1.0	0.89	0.85	<i>Transporte Caso II</i>
>1.0	>0.89	>0.85	<i>Transporte Supercaso II</i>

El fenómeno de hinchamiento de una red polimérica genera cambios estructurales considerables modificando así la movilidad de las cadenas moleculares; por ejemplo se pueden generar diferentes tamaños de poros que originan cambios en la permeabilidad y tortuosidad de la red polimérica. En el caso de que cadenas poliméricas contengan fármacos, pueden ocurrir diferentes mecanismos de difusión y/o liberación del fármaco durante la evolución de hinchamiento. Una liberación a través de poros llenos de agua sin que otro mecanismo influya tendrá una difusividad de característica fickiana (con $n \sim 0.5$). Por otro lado, puede ocurrir una difusión anómala (con $n > 0.5$) que dependerá de la estructura física de los polímeros, densidad de enlace cruzado (red polimérica) o permeabilidad, del grado de cristalinidad, solubilidad del sistema, así como la interacciones entre el polímero-fármaco y solvente.

Por otro lado, se han propuesto ciertos valores en el exponente n que depende de la geometría del sistema. Por ejemplo, en el caso de esferas poliméricas tenemos una $n = 0.43$ y un principio activo se propaga de la capa de la matriz polimérica hacia el soluto mediante una difusión típica, es decir, un mecanismo de liberación Fickiana o “Caso I”. Valores de n entre 0.43 y 0.89, se denomina transporte anómalo (no Fickiana), donde ocurre la superposición de dos fenómenos; una liberación que es controlada por difusión y por la relajación de las cadenas de polímeros (evolución de hinchamiento o estrechamiento de la red polimérica). Un valor de n igual a 0.85 trata de una liberación llamada de orden cero y significa que la cinética del soluto es controlada solamente por el tiempo de relajación de la cadena polimérica en un proceso de hinchamiento (equilibrio termodinámico). En este caso

el mecanismo de transporte se debe a que la liberación presenta una velocidad constante, si no cambia la geometría del sistema durante el proceso de liberación (Transporte Caso II). Valores de $n > 0.85$ se tiene un transporte Supercaso II y este se asocia a la contribución simultánea de procesos como difusión, hinchamiento, relajación y erosión de la matriz polimérica [70, 71]. Por último, para valores de $n < 0.43$ no se contempla en la Tabla 2, según Peppas (1985), pero se reporta que puede tratarse como difusión de Fickiana. En este caso el mecanismo es debido a la difusión a través de la matriz polimérica hinchada (presencia de poros en la matriz polimérica) [72].

b) *Modelo matemático Gallagher-Corrigan*

Este modelo explica la liberación de un fármaco mediante dos mecanismos, el primero es una fase de liberación inicial de primer orden y una fase de liberación de fármaco controlada por degradación de polímero (ecuación 5). La fracción de fármaco liberada en la primera etapa se debe a una descarga inicial (f_{∞}) y esta se atribuye a la disolución del fármaco que este situado en la superficie del polímero. La segunda etapa describe la velocidad de liberación del fármaco y depende de la degradación del polímero.

$$f_t = f_{\infty} \cdot (1 - e^{-k_1 t}) + (1 - f_{\infty}) \cdot \left(\frac{e^{k_2 t - k_2 t_{\max}}}{1 + e^{k_2 t - k_2 t_{\max}}} \right) \quad (5)$$

Donde, f_t = Fracción de fármaco liberado a tiempo, t

f_{∞} = Fracción máxima de fármaco liberado

k_1 = Constante de liberación durante la fase de liberación de la explosión (ráfaga)

t_m = Tiempo requerido para alcanzar la razón máxima

k_2 = Constante de liberación durante la fase de degradación del polímero

2.4. Quercetina

Quercetina es un flavonoide natural presente en nuestra dieta y se encuentra en concentraciones variables en una variedad de frutas y verduras, tales como cebollas, manzanas, bayas, nueces, cereza, té negro, etc [73]. Esta molécula ha adquirido en las últimas décadas un gran interés por sus propiedades benéficas en la salud: *efectos antivirales*,

antibacterianos, antiproliferativas y antiinflamatorios. Además ejerce efectos antiproliferativos en células cancerosas en diversos tipos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*. Muchos estudios *in vitro* demostraron los efectos inhibidores del crecimiento de la quercetina en líneas celulares de leucemia L1210 y P-388, células de cáncer de mama, células de cáncer de colon COLO 20DM, células de cáncer de ovario OVCA 433, células de cáncer de hígado HepG2, células de cáncer epidermoide A431 y células de cáncer gástrico [74].

La estructura química de la quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona) consiste de dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un anillo de γ -pirona (C) y cinco grupos hidroxilos, figura 5. Cuando esta completamente desprotonado se tiene 5 sitios negativos por molécula.

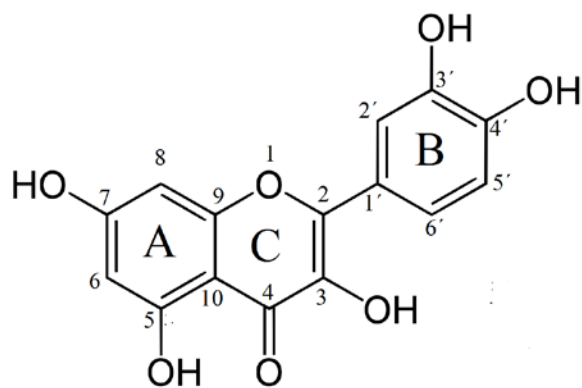


Figura 5. Estructura de la quercetina [75]

El uso clínico de la quercetina es limitado debido a su naturaleza hidrofóbica, mala permeabilidad, inestabilidad en medio fisiológicos y su corta vida media biológica. Sin embargo la encapsulación de la quercetina para su administración es necesaria ya que mejora su solubilidad y por ende se esperaría una mejor liberación controlada de estos compuestos dentro del sistema biológico [76, 77].

Capítulo 3. Parte Experimental

En este capítulo se describe la metodología y síntesis utilizada para la formación de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y la formación de multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales adsorbidos en las nanopartículas sin y con quercetina. Además, se describen las técnicas de caracterización utilizadas en este trabajo.

3.1. Materiales y reactivos

Los reactivos y solventes utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

a) Síntesis de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

1. Cloruro ferroso tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), pureza de $\geq 99.0\%$ - Sigma-Aldrich.
2. Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), pureza de 97% - Sigma-Aldrich.
3. Hidróxido de sodio (NaOH) - Vetec.
4. Ácido clorhídrico (HCl), pureza de $36.5\text{-}38\%$ - J. T. Baker.
5. Ácido nítrico (HNO_3), pureza de 70% - J. T. Baker
6. Nitrato férrico nonahidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), pureza de $\geq 98.0\%$ - Sigma-Aldrich
7. Acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), pureza de $\geq 99.4\%$ - J. T. Baker.

b) Técnica capa por capa sin y con fármaco.

1. Cloruro de Sodio (NaCl), peso molecular 58.44 g/mol y de pureza 99.5% - Sigma-Aldrich.
2. Hidrocloruro de polialilamina (PAH), $M_w \sim 17,500\text{ g/mol}$ - Sigma-Aldrich.
3. Sulfonato de sodio de poliestireno (PSS), $M_w \sim 70,000\text{ g/mol}$ - Sigma-Aldrich.
4. Quitosano (CHI), con peso molecular medio $M_w \sim 190,000\text{-}310,000\text{ g/mol}$ - Sigma-Aldrich.
5. Carboximetilcelulosa de sodio (CMC), $M_w \sim 90,000\text{ g/mol}$ - Sigma-Aldrich.

c) Liberación de fármaco

1. Ácido clorhídrico (HCl), pureza de $36.5\text{-}38\%$ - J. T. Baker.
2. Ácido fosfórico (H_3PO_4), pureza de 85% - J. T. Baker.
3. Hidróxido de amonio (NH_4OH), pureza de 56.6% - Sigma-Aldrich.
4. Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), pureza de 99.5% - J. T. Baker
5. Quercetina, pureza de 95% - Sigma-Aldrich

d) *Pruebas biológicas*

1. Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)- Life Technologies (USA)
2. Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT, $C_{18}H_{16}BrN_5S$) - Life Technologies (USA)
3. Suero fetal bovino (FBS)- Life Technologies (USA)
4. Penicilina- Life Technologies (USA)
5. Estreptomicina- Life Technologies (USA)
6. Linaje de células tumorales de ovario humano (A2780)- Banco de células de Río de Janeiro, Brasil (BCRJ).
7. Dimetil sulfóxido (DMSO)

e) *Pruebas de actividad microbiana*

1. Triptona – Sigma-Aldrich
2. Extracto de levadura - Sigma-Aldrich
3. Cloruro de Sodio (NaCl), pureza de 99.5% - Sigma-Aldrich
4. Escherichia coli (Gram-)
5. Bacillus subtilis (Gram+)

Todos los reactivos fueron usados sin purificación adicional. Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada ($p > 18.2 \text{ M}\Omega$), obtenida de un sistema EASY PURE II.

3.2. Síntesis de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ fueron sintetizadas por co-precipitación acuosa de magnetita (Fe_3O_4), seguida de su oxidación utilizando un procedimiento ligeramente modificado que el reportado por *B. C. P. Coelho et al.* [78], ver figura 6.

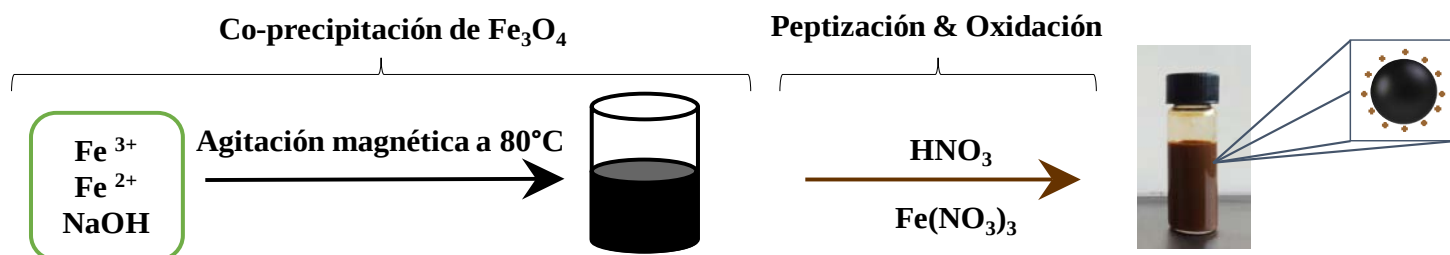


Figura 6. Representación esquemática de la síntesis de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Inicialmente se preparó 50 ml de una solución acuosa que contenía 10 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 5 mmol de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ con una relación molar $\text{Fe}_3^+ / \text{Fe}_2^+$ de 2:1 y ésta se dejó en agitación durante 5 min. Después se preparó 100 ml de una solución 2 M de NaOH y se dejó esta solución en agitación. Posteriormente se mezclaron las soluciones anteriores durante 30 min a temperatura constante (80°C). Este paso permitió la obtención de nanopartículas de magnetita, posteriormente se precipitaron magnéticamente y se lavaron 3 veces con agua. El precipitado se acidificó (peptización) con 300 ml de una solución de HNO_3 (1 M) y se dejó esta solución en agitación durante 30 min, posteriormente los precipitados se decantaron magnéticamente y se descartó el sobrenadante. Después de esta etapa, la oxidación a maghemita se completó mediante la dispersión del precipitado en 250 ml de una solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1 M) en agitación durante 30 min a temperatura constante (80°C). Este proceso estabilizó la superficie de las nanopartículas mediante la formación de un caparazón de hidróxidos férricos amorfos con una alta estabilidad química, creando además una carga positiva en la superficie de las nanopartículas debido a la adsorción de iones H^+ [79, 80]. Por último las nanopartículas se precipitaron por magnetización, se lavaron con acetona y se dispersan en soluciones acuosas para obtener un ferrofluido estable.

3.3. Recubrimiento de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con multicapas de polielectrolitos mediante la técnica capa por capa (LbL) sin y con fármaco

Uno de los objetivos de este trabajo es obtener sistemas de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ encapsuladas por multicapas de polielectrolito (sin y con quercetina). Con el fin de observar el efecto de multicapas sobre las propiedades magnéticas y liberación de fármacos se utilizan polielectrolitos sintéticos (PAH y PSS) y naturales (CMC y CHI). El procedimiento del recubrimiento de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ se describe a continuación.

3.3.1. Multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales adsorbidos en nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Se prepararon soluciones acuosas con polielectrolitos sintéticos a pH 4 manteniendo una concentración constante de PSS (5mM), PAH (10.58 mM) y NaCl (0.1M), y soluciones acuosas que contienen polielectrolitos naturales de CMC (0.25% m/v) y CHI (0.1% m/v, en ácido acético 0.1M) [58].

Polielectrolitos sintéticos

Hidrocloreto de polialilamina
(PAH, $M_w \sim 17,500$)

CC(N)CC.[Cl-]

Sulfonato de sodio de poliestireno
(PSS, $M_w \sim 70,000$)

*Cc1ccc(cc1)S(=O)(=O)[O-].[Na+]

Quitosano
($M_w \sim 190,000-310,000$)

*OC1C(O)C(O)C(N)C(O)C1O

Carboximetilcelulosa de sodio
(CMC, $M_w \sim 90,000$)

*OC1C(OC(=O)C)C(OC(=O)C)C(OC(=O)C)C1O

$R = H \text{ or } \text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na}$

Método de capa por capa

En todos los casos, las soluciones de polielectrolitos se introdujeron a las soluciones acuosas que contienen las nanopartículas, gota a gota usando una bomba peristáltica a 20

ml/min y en agitación usando un dispositivo ultra dispersante (*ULTRA TURRAX*) a 9000 rpm durante 10 minutos.

Una vez que las capas de polielectrolito fueron depositados sobre el sustrato cargado se realizó el proceso de lavado con los pasos siguientes:

- a) Las nanopartículas recubiertas con polielectrolitos se precipitaron magnéticamente y se descartó el sobrenadante.
- b) Después se dispersan en agua desionizada.
- c) Se repite el procedimiento 3 veces con el propósito de eliminar las moléculas del polielectrolito no adsorbidos.

Por último, las nanopartículas encapsuladas con las cadenas de polielectrolito se secan en un desecador y tamizada, con el fin de obtener un polvo de nanopartículas.

3.3.2. Sistema de multicapas de polielectrolitos sintéticos (y naturales) con fármaco adsorbidas en nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Para este caso se procedió de la misma manera que la metodología descrita anteriormente excepto que ahora se empleó una solución de polielectrolitos positivo (PAH o CHI) que contiene 0.3 mg/ml de quercetina (molécula de carga negativa) durante la adsorción de las capas 2 y 4 (figura 8). El procedimiento de la incorporación de la molécula de quercetina en PAH (o CHI) fue por medio de la adición de una solución de quercetina (0.3 % m/v en etanol) a la solución que contenía el polielectrolitos positivo. Por último, la solución final estuvo en agitación magnética durante 40 min.

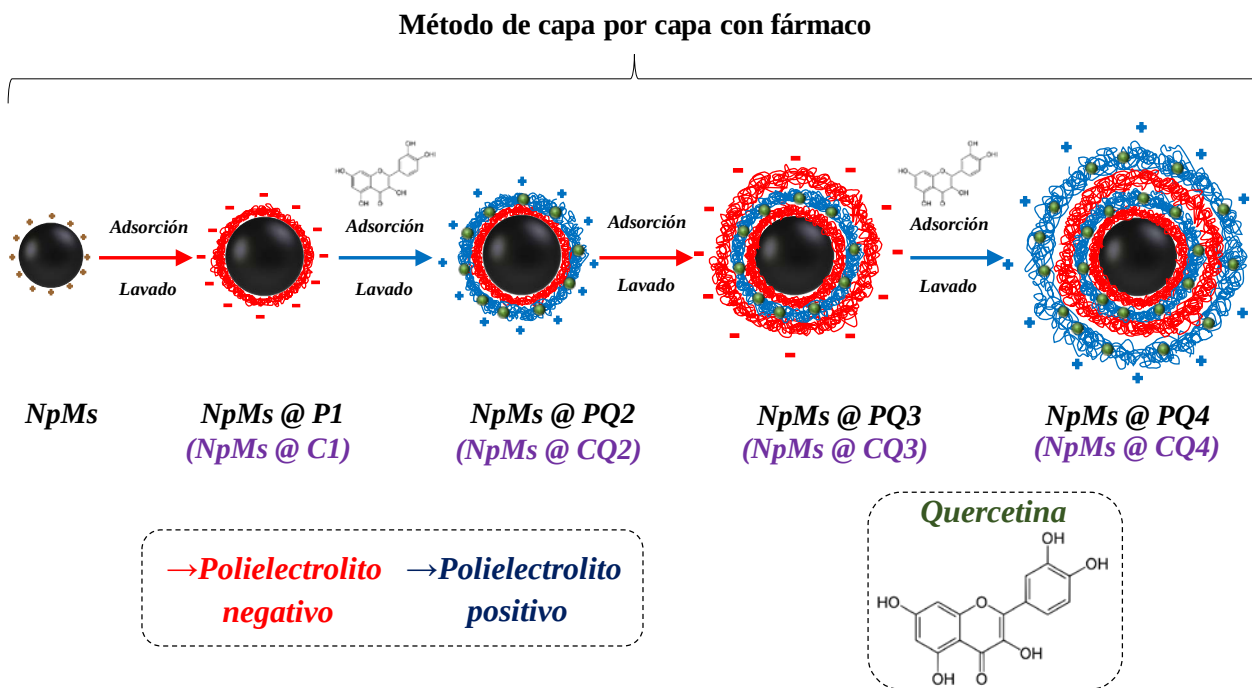


Figura 8 Representación esquemática de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con multicapas de polielectrolitos con fármaco.

Es de suma importancia mencionar que la interacción entre el polielectrolito PAH (o CHI) de carga positiva y la quercetina de carga negativa formará un complejo. La carga residual neta del complejo dependerá de las concentraciones iniciales utilizadas en el sistema. En este trabajo se eligió una concentración de quercetina mucho menor a la del polielectrolito, con el fin de obtener un exceso de carga positiva para poder utilizarlo en la técnica capa por capa de polielectrolito. Además, es conveniente utilizar pequeñas dosis de quercetina para evitar procesos citotóxicos en el organismo. Si suponemos que tanto la quercetina y el PAH están totalmente cargados se obtiene que la razón de carga de sitios positivos del polielectrolito (n^+) entre los sitios negativos de la quercetina (n^-) para las concentraciones usadas aquí son $\alpha = n^+/n^- \sim 477$, es decir un exceso de carga positiva. Como se indicó anteriormente, el grado de protonación de ambas moléculas depende del pH y será discutido en detalle con las curvas experimentales de especiación en el capítulo 4.

3.4. Técnicas experimentales

3.4.1. Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Para el análisis morfológico de las nanopartículas se utilizó TEM y HRTEM. El procedimiento empleado a la muestra para obtener las imágenes por esta técnica experimental fue la siguiente: se prepararon suspensiones coloidales en agua por medio de ultrasonificación durante 15 min. Después, se dispersó una gota (~10µl) de cada solución sobre las rejillas microscópicas de cobre recubiertas con carbón y secadas a temperatura ambiente.

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1100 y de las imágenes obtenidas se obtuvo un histograma de distribución de tamaños de las nanopartículas por medio de análisis de imagen, el programa *Imagen J* fue usado para este propósito. Por otro lado, con el programa *ORIGIN* versión 8.5 se hizo un ajuste al histograma con una función de distribución normal para estimar el diámetro promedio, índice de polidispersidad y desviación estándar de las partículas.

3.4.2. Difracción de rayos X (DRX)

Para el análisis estructural de las nanopartículas se usó un difractómetro de rayos X PANalytical Empyrean operado a 45 kV y 40 mA, con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.5406\text{\AA}$). Los difractogramas se registraron a temperatura ambiente con rango angular de 20° y 80° (valores de 2θ), con paso de 0.48° . Se depositaron las muestras de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en forma de polvo.

3.4.3. Potencial zeta (movilidad electroforética)

Para la estimación del potencial zeta de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con multicapas de polielectrolito sin y con fármaco se utilizó el equipo experimental Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) que hace medidas de distribución de tamaños de sistemas coloidales (usando Dispersión dinámica de luz) y movilidad electroforética (para estimar el potencial Z). Dichas mediciones se hicieron en soluciones acuosas a temperatura ambiente y a diferente pH (de 2 hasta 12). Los valores reportados en este trabajo del potencial zeta corresponden al promedio de 10 mediciones.

Cabe señalar que el equipo mide la movilidad electroforética ($U_E = \frac{v_p}{E}$) y mediante la ecuación de Henry (ecuación 6) se determina el potencial zeta.

$$U_E = \frac{v_p}{E} = \frac{2\varepsilon z f(Ka)}{3\mu} \quad (6)$$

donde U_E es la movilidad electroforética, v_p es la velocidad de la partícula medida experimentalmente, E es el campo eléctrico, ε es la constante dieléctrica, μ es la viscosidad, z es el potencial zeta y $f(Ka)$ es la función de Henry, que adquiere un valor igual a 1.5 (aproximación de Hückel) cuando el sistema se encuentra en un medio polar y 1 (aproximación de Smoluchowski) cuando el sistema se encuentra en un medio no polar [81].

3.4.4. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión de luz dinámica se utilizó con el fin de obtener el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ en soluciones coloidales y compararlo con las obtenidas en imágenes TEM. Esto nos da un análisis sobre el comportamiento de estabilidad coloidal de las nanopartículas en soluciones acuosas, es decir el grado de agregación entre ellas. El equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) fue utilizado en el modo de DLS con una longitud de onda de 633 nm con el detector a un ángulo fijo de dispersión a 90° . Los diámetros reportados en este trabajo corresponden también al promedio de 10 mediciones.

3.4.5. Titulación potenciométrica y conductimétrica

Para los experimentos de titulación se realizaron medidas potenciométricas y conductimétricas de las NpMs y de los polielectrolitos siguiendo las metodologías descritas por A. F. C. Campos *et al.* y S. Farris *et al.*, respectivamente [82, 83]. Para ello se utilizó 50 ml que contienen NpMs (ó polielectrolitos) manteniendo una concentración (0.1% m/v) y un Módulo de conductividad Metrohm 856 con una celda de medición de conductividad de 5 anillos ($c = 0.7 \text{ cm}^{-1}$ con Pt1000) acoplada con un pHmetro de laboratorio de Metrohm 827. En el caso de las NpMs y de los polielectrolitos PSS, CMC y PAH la medidas se realizó añadiendo 0.1 M de NaOH, mientras que para CHI se efectuó con 0.1 M de HCl. La curva

de titulación nos ayudó a determinar el pKa de la superficie de la partícula y de los polielectrolitos y mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Ec. 7) se determinó grado de protonación (α_0) presente a un pH específico, con el objeto de determinar el pH óptimo para maximizar la interacción entre la nanopartícula y los polielectrolitos [84].

$$pK_a = pH + \log \frac{(1 - \alpha_0)}{\alpha_0} \quad (7)$$

3.4.6. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos utilizando un espectrómetro Bruker Vertex 70 en el modo de transmisión usando pastillas de KBr con una resolución de 2 cm^{-1} en un intervalo de los 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} .

3.4.7. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los análisis termogravimétricos se realizaron en dos equipos: un Shimadzu Thermogravimetric Analyzer modelo DTG-60 y TA Instruments modelo TGA Q-500 con una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ (de 35° a 600°C) en un flujo de nitrógeno a $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

3.4.8. Espectroscopia UV-Vis

Los espectros UV-Vis fueron obtenidos en un espectrómetro UV-Vis-U3900H-Hitachi, lo que permitió realizar una curva de calibración de la quercetina. A partir de esta curva se pudo determinar concentraciones de quercetina liberada de los sistemas de nanopartículas/polielectrolitos. Las muestras se analizaron en solución acuosa y se llevaron a cabo en el intervalo de onda de 200 a 600 nm.

La curva de calibración para la quercetina se determinó haciendo diluciones (rango 10 a $30 \mu\text{M}$) de una solución inicial que contenía $100 \mu\text{M}$ quercetina preparada en una solución con un pH constante y etanol en una razón 70:30 (v/v), respectivamente. En la tabla 3 se describen las soluciones usadas.

Tabla 3. Soluciones usadas para la curva de calibración

<i>Nombre</i>	<i>Concentración</i>	<i>pH</i>
<i>HCl / KCl</i>	<i>0.1 mol L⁻¹</i>	<i>1.2</i>
<i>NaH₂PO₄</i>	<i>0.1 mol L⁻¹</i>	<i>7.4</i>
<i>NH₄Cl / NH₄OH</i>	<i>0.1 mol L⁻¹</i>	<i>9.0</i>

3.4.9. Eficiencia de encapsulación (% EE)

La determinación de la cantidad de quercetina encapsulada en las capas 2, 3 y 4 de los sistemas (PSS/PAH) y (CMC/CHI) se realizó por la técnica de filtración/centrifugación [85]. La técnica consiste en dispersar las NPM que contiene el fármaco dentro una solución de 2 ml de 0.1 M NaH₂PO₄/etanol (70:30, v/v). Posteriormente, se centrifuga a 12000 rpm durante 20 min, seguido de una filtración a través de una membrana de PTFE de 0.2 µm por donde pasa el fármaco y la nanopartícula queda atrapada en la membrana. La cantidad de fármaco liberado se determina haciendo medidas de absorbancia de la solución obtenida por la filtración mediante espectroscopia UV-Vis a la longitud de onda de absorción máxima de la quercetina (380 nm). Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se expresaron como la cantidad de quercetina (en mg) por ml de nanopartículas.

De forma similar, la eficacia de encapsulación (% EE) se calculó como la relación entre la cantidad de fármaco encapsulado en las nanopartículas (Cant. Final) y la cantidad inicial de quercetina utilizada para preparar las nanopartículas (Cant. Inicial), ecuación 8.

$$\%EE = \frac{Cant_{Final}}{Cant_{Inicial}} \times 100 \quad (8)$$

3.4.10. Cinética de la liberación de quercetina a diferentes pH's

La cinética de liberación de la quercetina se obtuvo mediante la metodología descrita por Parize [86]. Aproximadamente, 30 mg de las capas 2, 3 y 4 de los sistemas PSS/PAH y CMC/CHI que contiene la quercetina fueron introducidos en 30 ml de una solución acuosa. Las muestras se mantuvieron bajo agitación constante (700 rpm) en un baño termostático a

37.0 $\pm$ 0.1°C. Los análisis de liberación de fármacos fueron realizados bajo condiciones similares a las encontradas en diferentes zonas del organismo, estos es, a 0.1 M de HCl / KCl a pH 1.2 (similar al pH del jugo gástrico), 0.1 M de NaH₂PO₄ a pH 7.4 (similar al pH de la sangre) y 0.1 M de NH₄Cl/NH₄OH a pH 9,0 (similar al pH del jugo pancreático). El análisis se realizó durante 240 h mediante mediciones a intervalos de tiempo predeterminados, donde se analizó una alícuota de 2 ml del sobrenadante en un espectrofotómetro UV-Vis-U3900H-Hitachi. La cantidad de quercetina liberada se determinó usando una curva de calibración estándar, que relaciona la absorbancia con la concentración conocida de quercetina (mg %) en las mismas soluciones donde se realizó la cinética de liberación. Los valores reportados corresponden al promedio de 3 mediciones y están se presentan como porcentaje de liberación de quercetina a lo largo del tiempo.

Posteriormente se realizaron los ajustes de los perfiles de la cinética mediante el modelo matemático Korsmeyer-Peppas (ecuación 4) y modelo matemático Gallagher-Corrigan (ecuación 5) para analizar el mecanismo de liberación.

3.4.11. Estudio de la liberación de la quercetina por magnetohipertermia

El estudio de liberación de la quercetina por magnetohipertermia fue realizado en un equipo Ambrell, modelo Easy Heat LI. Primero se realizaron estudios de perfiles de calentamiento de las nanoparticulas sin recubrimiento (NpMs) y después con recubrimiento (NpMs@PSS/PAH y NpMs@CMC/CHI) a una frecuencia constante de 326 kHz mientras que la amplitud del campo magnético alterno (CMA) se varió de 5Oe a 190 Oe. Los datos del aumento y disminucion de la temperatura fue medida por un termopar que esta inmersa en las soluciones de las muestras. El intervalo de tiempo para el calentamiento fue de 0-900s seguida de un enfriamiento de 900-1400s. Posteriormente se obtienen los perfiles de calentamiento de las muestras que contienen la quercetina a la misma frecuencia de 326 kHz. Después de cada 180 s las muestras fueron decantadas magnéticamente y el sobrenadante fue analizado en un espectrofotómetro UV-Vis-U3900H-Hitachi (λ_{max} 380 nm). Las medidas se repitieron 3 veces y la cantidad de quercetina liberada se determinó utilizando una curva de calibración de la quercetina que relaciona la absorbancia con la concentración conocida de la quercetina contenida en solución acuosa 0.1 M de NaH₂PO₄ a pH 7.4. Los resultados obtenidos se presentaron como porcentaje de la liberación de quercetina a lo largo del tiempo.

3.4.12. Evaluación de la citotoxicidad mediante el método de MTT

El método de MTT ha sido ampliamente utilizado para medir citotoxicidad (viabilidad celular) *in vitro*; su nombre proviene del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Es una prueba colorimétrica que se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial *succinato - deshidrogenasa*, la cual causa la ruptura del anillo de tetrazolio del MTT y origina la formación de cristales azules insolubles en agua (conocidos con el nombre de formazán), pero solubles en dimetil sulfóxido (DMSO) formando una solución purpura. Un aumento o disminución en el número de células resulta en un cambio en la cantidad de formazán formado, indicando así el grado de citotoxicidad causado por las nanopartículas usadas y evaluar la función mitocondrial de la célula [87, 88].

Líneas de células tumorales ováricas humanas (A2780) se mantuvieron en matraces de cultivo celular (75 cm²) en una incubadora 37 °C, 5% de CO₂ y 98% de humedad con 5 ml de medio de cultivo celular DMEM que contiene 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) y 1% (v/v) de antibióticos (10,000 U/ ml de penicilina – 10,000 µg / ml de estreptomicina). Estas fueron retirados a cada 3 o 4 días. Después de alcanzar la etapa de confluencia (cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficiente en una determinada área), las células fueron removidas del frasco de cultivo, utilizando 500 µl de 0.25% de Tripsina-EDTA y recultivadas en una densidad menor.

Para la determinación de la viabilidad celular, las células A2780 fueron transferidas para placas de cultivo de 96 pozos con una densidad de 5x10³ células/pozos e incubadas con diferentes concentraciones (40 a 100 µmol/L) de nanopartículas recubiertas de polielectrolitos, nanopartículas recubiertas de polielectrolitos con quercetina y quercetina libre a 37 °C y 5% de CO₂. El pH de las muestras fue ajustadas para un pH 7.4 con NaOH (1,0 mol L⁻¹) antes de ser depositadas con las células. Después de 72 h de incubación, el tratamiento fue retirado y se añadió 150 µL de solución 0.5 mg/ml de MTT en DMEM a cada pozo y se incubaron durante 3 horas a 37°C (5% de CO₂). Para solubilizar los cristales de formazan fue retirado el medio de cultura y se añadió 200 µl de dimetil sulfóxido (DMSO). Por último, se midió la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro con un lector de microplacas a una longitud de onda de 595 nm (SpectraMax®, modelo M2, Molecular Devices).

La cantidad de cristales formados de formazan es directamente proporcional al número de células viables (viabilidad celular) y esta se obtiene midiendo la absorbancia. La viabilidad de las células no tratadas (grupo control) fue considerada como máxima (100%) y el porcentaje de viabilidad celular fue calculada como a razón entre la absorbancia de las células tratadas y la absorbancia de las células no tratadas, ecuación 9 [89].

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{Abs. Células tratadas}}{\text{Abs. Células control}} \times 100 \quad (9)$$

Todos los resultados fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes y se expresan como la media $\pm$ desviación estándar. La diferencia entre el efecto de las células tratadas en comparación con las células no tratadas (grupo control) se verificó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba *Post Hoc* (Tukey) utilizando el programa GraphPad Prism® 5.0. Los valores que tiene una diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia de $p < 0.05$ (es decir se considera como “estadísticamente significativo”) se indican en la figura 45 con un asterisco.

3.4.13. Pruebas de actividad antimicrobiana

Las pruebas de actividad antimicrobiana de la quercetina se hicieron sobre *Escherichia coli* (Gram negativa) y *Bacillus subtilis* (Gram positiva) en un medio de cultivo LB (Luria-Bertani): triptona 10 g, extracto de levadura 5 g y NaCl 10 g para 1 un litro.

Se hizo un cultivo bacteriano en 24 h a 37 °C y en agitación a 150 rpm en una incubadora. De este cultivo se tomó un volumen y se diluyó en el medio LB hasta alcanzar una medida en la densidad óptica de 0.1 (D.O.₆₀₀), usando un espectrofotómetro con un lector de microplacas a una longitud de onda de 600 nm (SpectraMax®, modelo M2, Molecular Devices, EE. UU.). Una vez que cada microorganismo alcanza la densidad óptica de 0.1 se activa la cinética de crecimiento para cada microorganismo, para realizar esto se mezcla una porción de suspensión bacteriana con una porción de suspensión que contiene nanopartículas recubiertas de polielectrolitos con y sin quercetina a concentraciones de 2.6 mg/ml y 0.2 mg/ml, respectivamente. Para realizar el crecimiento se emplearon matraces Erlenmeyer y una incubadora a 37 °C y en agitación a 150 rpm. De cada suspensión se tomaron 200 μ l

en intervalos de tiempo de 2, 4, 8, 12 y 24 h y se midió el cambio de la densidad óptica. Los valores reportados corresponden a un promedio de 3 medidas. Los experimentos de la cinética de crecimiento se repitieron 3 veces con siguientes parámetros de control: a) La esterilidad del medio de cultivo (Solo el medio de cultivo LB), b) el control de las bacterias con nanopartículas recubiertas de polielectrolitos con quercetina y la quercetina libre (control positivo) y c) el control de crecimiento para cada bacteria (control negativo, es decir medio de cultivo más inóculo bacteriano)

Capítulo 4. Funcionalización nanopartículas de γ - Fe_2O_3 con multicapas de polielectrolito sin fármacos

4.1. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Las nanopartículas de γ - Fe_2O_3 fueron sintetizadas por el método coprecipitación explicado en el capítulo anterior y por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se observó el tamaño y la morfología de la muestra.

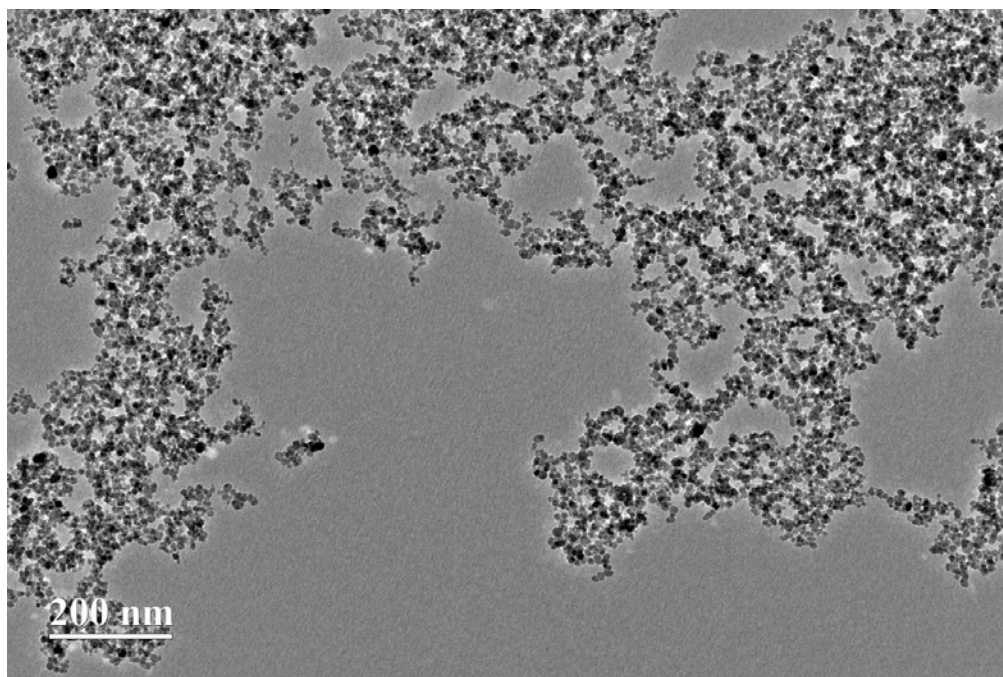


Figura 9. Imágenes TEM de las nanopartículas de γ - Fe_2O_3 .

Las imágenes TEM muestran que las nanopartículas de γ - Fe_2O_3 tienen una morfología esférica (figura 9). Mediante un análisis de imagen, usando Image J, se obtuvo un histograma de distribución de tamaños, y por medio de un ajuste de distribución normal se estimó un diámetro promedio de 8.83 nm con una polidispersidad de alrededor de 0.29 nm, ver figura 10. En el análisis se trataron 686 partículas.

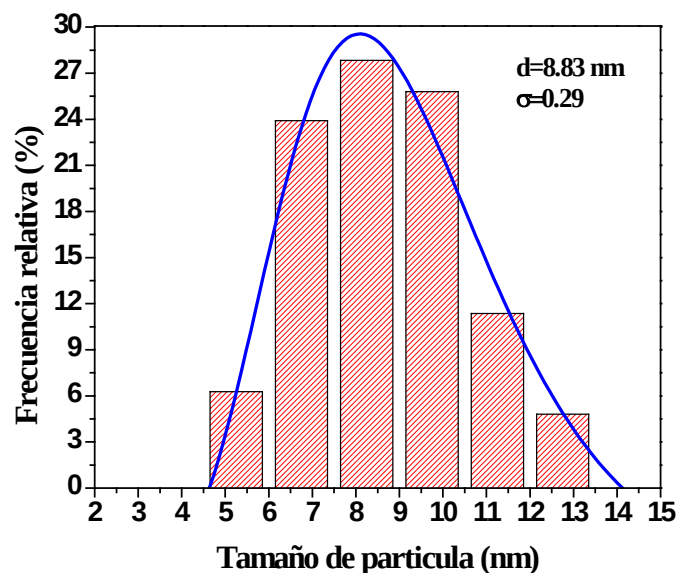


Figura 10. Histograma de distribución de tamaño de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y su ajuste mediante una distribución normal (línea azul).

En la imagen obtenida de HRTEM (figura 11 a) se determinó una distancia interplanar de 0.24 nm y el diagrama de difracción de electrones muestra el plano (311), ver figura 11 b. Este resultado coincide con los reportados en la literatura para $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con estructura de espinela [90, 91].

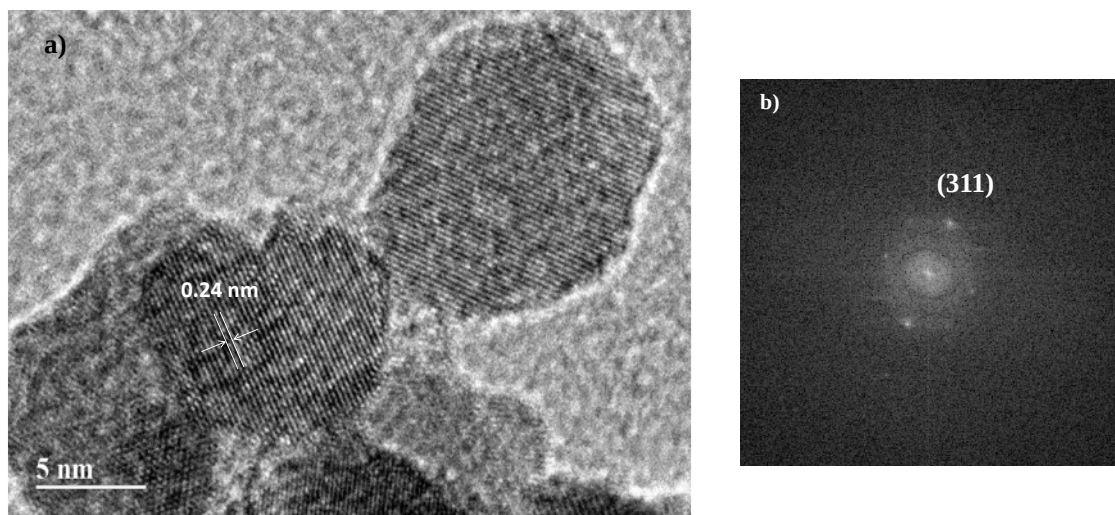


Figura 11. a) HRTEM de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, y b) diagrama de difracción de electrones.

La metodología de síntesis presentada en este trabajo de tesis radica en la formación de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y por medio de un proceso de oxidación se obtienen

la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Con el fin de observar la cristalinidad de ambas nanopartículas obtenidas en el proceso de la síntesis se utilizó difracción de rayos X. La figura 12a) presenta el patrón de difracción de la magnetita (antes de la oxidación) y maghemita (después de la oxidación). Los resultados muestran picos de difracción en 30° , 35° , 43° , 53° , 57° , 63° y 74° , y de acuerdo al patrón de difracción estándar de la magnetita (JCPDS 19-0629) y de maghemita (JCPDS 39-1346), corresponden a los planos (220), (311), (400), (422), (511), (440) y (533), respectivamente. Algunas investigaciones muestran que hay una similitud entre los difractogramas de magnetita y maghemita tal como se muestra en la figura 12a, y se atribuye básicamente a que ambas presentan dos fases con la misma estructura cristalina y parámetros de red casi idénticos. Sin embargo, se ha reportado que hay un ligero desplazamiento hacia ángulos mayores en los picos (400) y (511) de la maghemita con respecto al difractograma de la magnetita [92, 93, 94, 95].

4.2. Difracción de rayos X (DRX)

En las figuras 12 b y c, se muestra la comparación de los picos (400) y (511) antes y después del proceso de oxidación y se puede observar que la maghemita presenta un ligero desplazamiento en ambos picos hacia ángulos mayores ($> 0.20^\circ$), esto concuerdan con lo reportado, donde se observa un ligero desplazamiento en los ángulos debido al cambio estructural de la magnetita y la maghemita. De hecho, la magnetita contiene Fe^{3+} y Fe^{2+} mientras que la maghemita contiene cationes de Fe^{3+} con ausencia de cationes Fe^{2+} .

Por otro lado se estimó que el tamaño promedio del cristalito (después del proceso de oxidación) fue aproximadamente de 9.6 nm usando la ecuación de Debye-Sherrer en el pico más intenso (311).

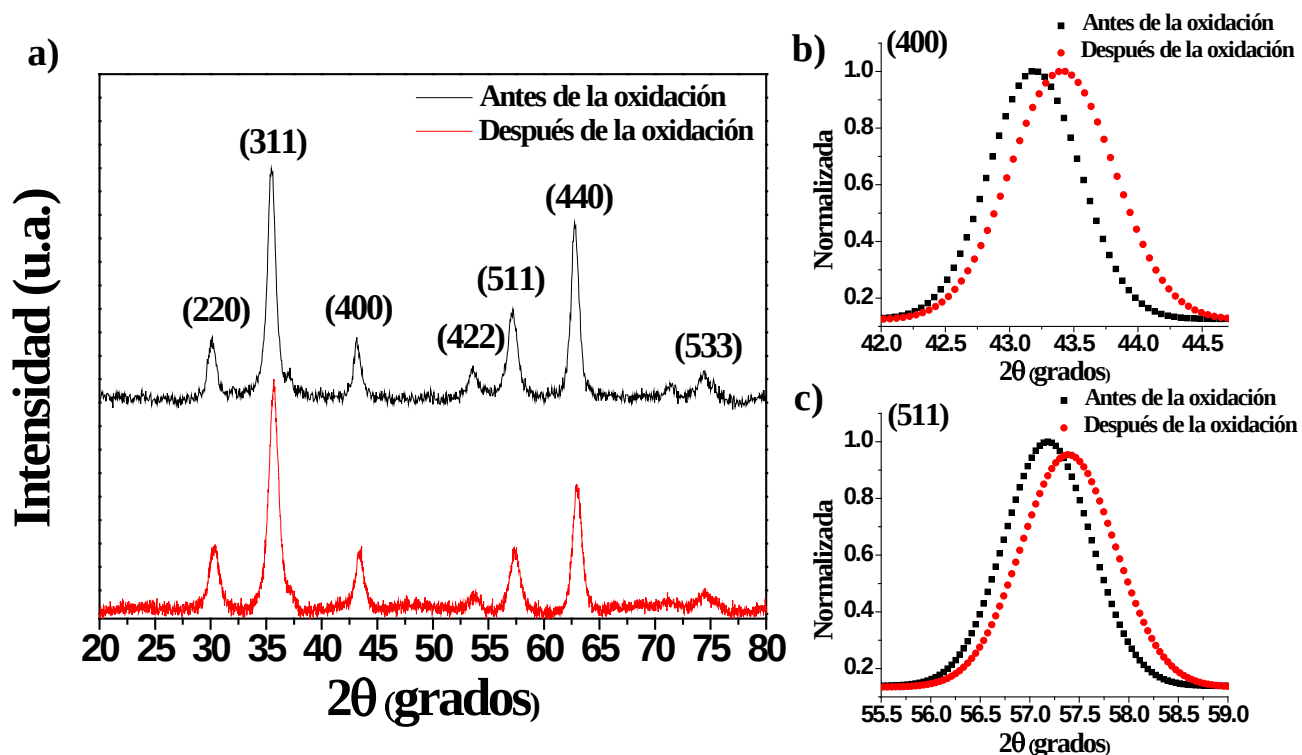


Figura 12. a) Difractograma XRD de Fe_3O_4 (antes de la oxidación) y nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (después de la oxidación). Normalización y ajuste de los picos de XRD para b) (400) y c) (511) de las nanopartículas.

4.3. Determinación del pK_a de la nanopartícula y de los polielectrolitos

Se realizaron experimentos conductimétricos y potenciométricos con el fin de determinar el pH requerido para una interacción atractiva óptima entre los sitios iónicos de la superficie de las nanopartículas magnéticas y los monómeros cargados de los polielectrolitos, con el fin de optimizar el recubrimiento de las nanopartículas mediante la técnica LbL.

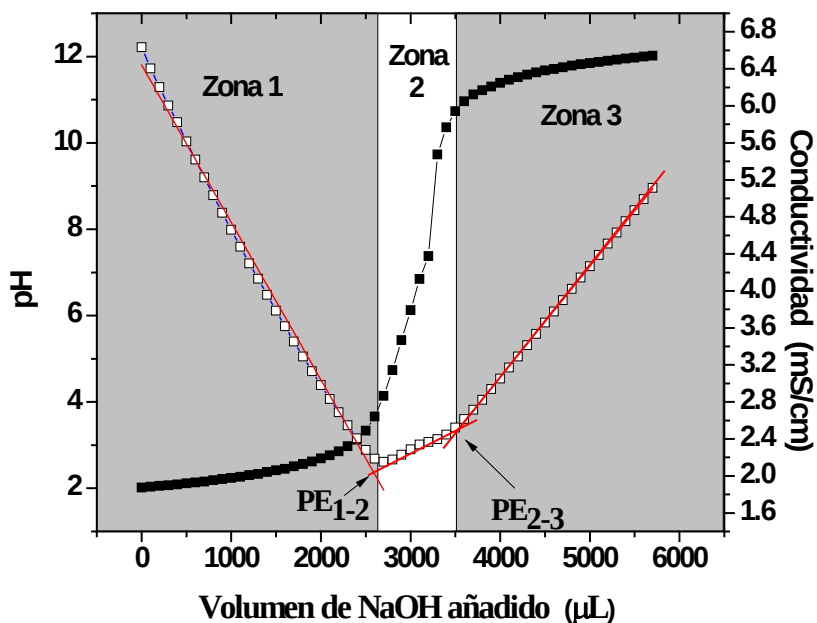


Figura 13. Curva potenciométrica y conductimétrica simultaneas para las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

La figura 13 muestra una curva de titulación potenciométrica y conductimétrica de las nanopartículas de maghemita. La curva de conductividad contiene 3 zonas o regiones distintas separadas por 2 puntos de equivalencias PE_{1-2} y PE_{2-3} los cuales se calculan a través de una extrapolación lineal.

La primera zona corresponde la titulación de un ácido fuerte y al incrementar el volumen del titulante (NaOH) provoca la neutralización del exceso de H_3O^+ en la solución, lo que conduce a que la conductividad decrezca (puntos blancos de la fig. 13). La segunda zona corresponde a la titulación de la superficie de la partícula que se comporta como un ácido diprótico débil, es decir se vuelve principalmente anfótera y neutral (sitios $\equiv\text{MOH}$). En esta zona la conductividad aumenta ligeramente ya que la concentración de iones Na^+ del hidróxido de sodio en la solución aumenta. En la zona 3 está relacionada con el exceso del titulante y esto ocasiona que la conductividad incremente bruscamente. Sin embargo, el cambio de la conductividad respecto al titulante es menor que en la primera zona, y se debe a que la conductividad molar específica de los iones OH^- es ligeramente menor que la de los iones H_3O^+ .

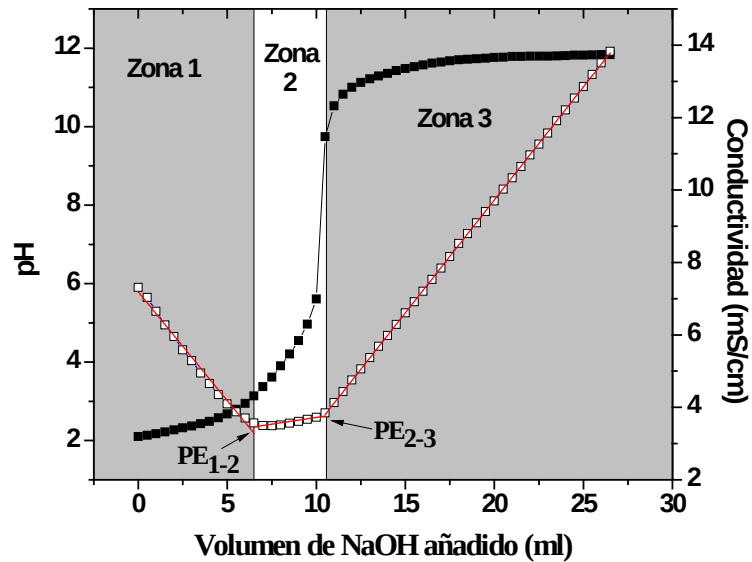


Figura 14. Curva potenciométrica y conductimétrica para la carboximetilcelulosa.

Las curvas de titulación de la carboximetilcelulosa (CMC) tiene también tres regiones distintas, ver figura 14. La primera región se debe a la reducción de la conductividad por la neutralización del exceso de los iones de H_3O^+ en la solución. La disociación de los grupos carboxílicos empieza a presentarse en el primer punto de equivalencia (PE_{1-2}). En esta zona no ocurre cambios en la conductancia debido a neutralización de los iones H^+ asociados al polielectrolito por los iones OH^- , que surge de la adicción del titulante ($\text{CMC-COOH} + \text{NaOH} \leftrightarrow \text{CMC-COO}^- + \text{Na}^+ + \text{H}_2\text{O}$).

Así mismo, el pH de la solución aumenta debido al exceso de los iones OH^- libres en la solución junto con el proceso de la desprotonación de los grupos carboxílicos del CMC, ver puntos negros de la figura 14. Y por último se observa que después del PE_{2-3} (desprotonación total del CMC) la conductancia aumenta conforme se añade NaOH en la solución.

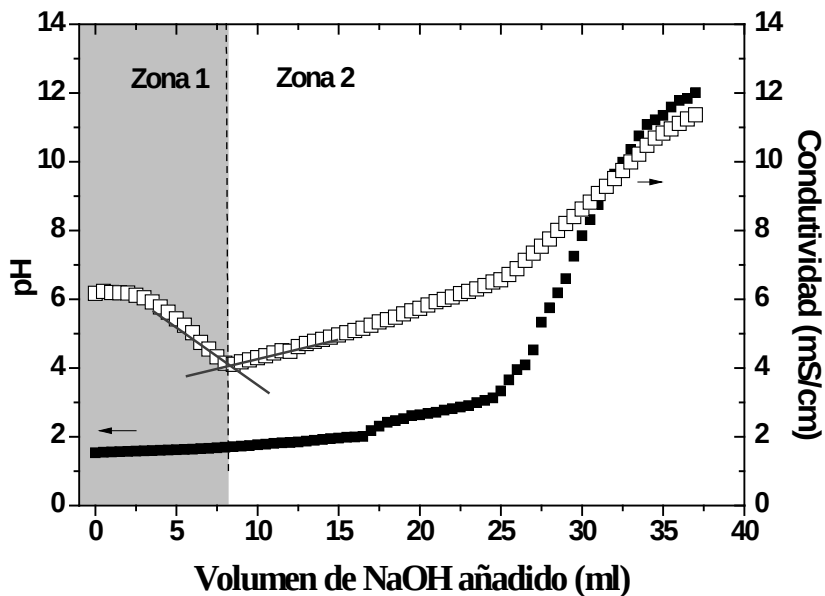


Figura 15. Curva potenciométrica y conductimétrica para el sulfanato de sodio de poliestireno.

En la titulación del PSS (figura 15) se presentan dos regiones que corresponde a dos fenómenos fisicoquímicos distintos. En la primera región ocurre una reducción en la conductividad (puntos blancos de la figura 15), esto se debe a que el exceso de hidronios en la solución comienza a reaccionar con el titulante añadido, reduciendo así la concentración de H_3O^+ , además los grupos sulfónicos comienza a desprotonarse mediante la siguiente reacción química: $\text{PSS- SO}_3\text{H} + \text{NaOH} \leftrightarrow \text{PSS- SO}_3^- + \text{Na}^+ + \text{H}_2\text{O}$. Cuando se desprotona totalmente el polielectrolito, se observa un aumento progresivo en la conductancia así como en el pH (puntos negros de la figura 15) que es resultado del exceso de grupos -OH^- libres en la solución.

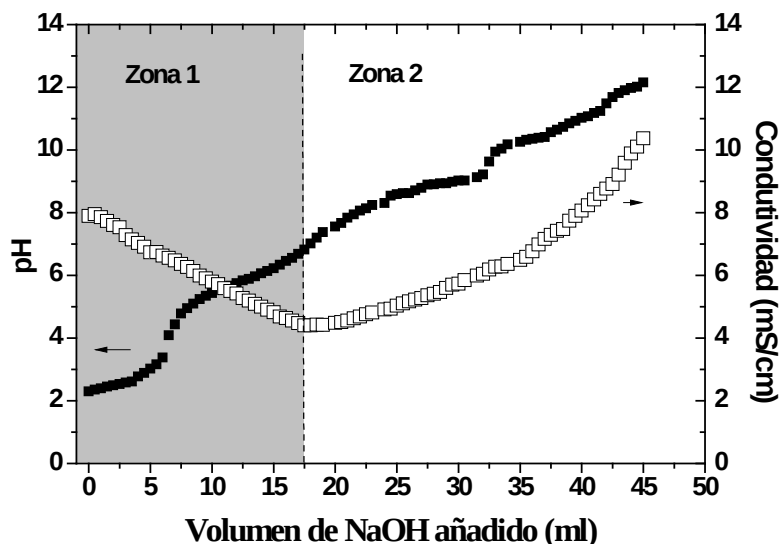


Figura 16. Curva potenciométrica y conductimétrica para hidrocloreto de polialilamina.

La figura 16 muestra las curvas de titulación del PAH donde se encuentran dos zonas distintas. Inicialmente dentro de la primera zona todos los grupos -NH_3^+ del polielectrolito están protonados, a medida que el titulante (NaOH) aumenta se observa una reducción en los valores de la conductividad (puntos blancos de la fig. 16) ya que el grupo hidroxilo desprotona al grupo amino ($\text{PAH-NH}_3^+ + \text{NaOH} \leftrightarrow \text{PAH-NH}_2 + \text{Na}^+ + \text{H}_2\text{O}$). En la segunda zona se observa que conforme aumenta el volumen del titulante tanto la conductividad así como el pH (puntos negros de la figura 16) se incrementan.

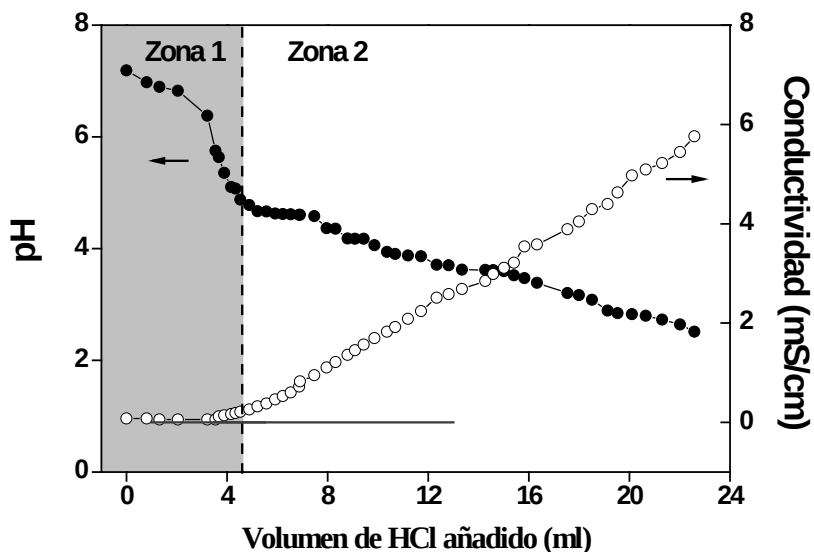


Figura 17. Curva potenciométrica y conductimétrica para quitosano.

Las titulaciones realizadas anteriormente fueron con el objeto de desprotonar al polielectrolito, sin embargo, para el caso de la CHI se realizó una titulación diferente ya que tiene un grado de insolubilidad que depende del solvente y del pH. Los experimentos potenciométrica y conductimétrica, figura 17, se hicieron con HCl como titulante, con pH inicial de 7. En este caso se llevó a cabo una protonación del polielectrolito CHI. A medida que el titulante es adicionado ocurre la protonación de los grupos $-NH_2$, aumentando la solubilidad de la CHI ($CHI-NH_2 + HCl \leftrightarrow CHI-NH_3^+ + Cl^-$). Con la reducción del pH (puntos negros de la figura 17) se verifica un aumento en los valores de la conductividad (puntos blancos de la figura 17) debido a la presencia de mayor cantidad de los iones H_3O^+ en comparación con la cantidad de iones Cl^- .

A partir de los puntos de equivalencia encontrados en las curvas de titulación se calcularon los pKa y la densidad de carga de las nanopartículas y de los polielectrolitos, para ello se utilizó las ecuaciones reportados Campos *et al.* y S. Farris *et al.*, respectivamente [96, 83, 82], tabla 4.

Tabla 4. Valores de pKa y de densidad de carga superficial.

Muestra	Valores de pKa	Densidad de carga (σ_0)
Maghemita	4.8 y 9.5	0.23 C/m ² *
PSS	1.9	2.87 ± 0.04 mmol g ⁻¹ , o 1.44 mmol/0.5 g
PAH	8.6	4.84 ± 0.03 mmol g ⁻¹ , o 2.42 mmol/0.5 g
CHI	6.3	3.60 ± 0.04 mmol g ⁻¹ , o 1.80 mmol/0.5 g
CMC	4.1	3.35 ± 0.05 mmol g ⁻¹ , o 1.67 mmol/0.5 g

* Densidad de carga para NpMs $\sigma_0(pH) = \frac{F}{A} \cdot V \cdot \frac{10^{-2pH} - 10^{-(pKa1+pKa2)}}{10^{-2pH} + 10^{-(pH+pKa1)} + 10^{-(pKa1+pKa2)}} \cdot CT$, donde F es la constante de Faraday, V es el volumen de la dispersión, A es el área total de las nanopartículas y CT es la concentración total de los sitios superficiales.

4.4. Diagrama de especiación de las nanopartículas y polielectrolitos

De la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Ec. 7) y con los valores de pKa se obtiene los diagramas de especiación en función del pH tanto para los polielectrolitos y las nanopartículas. La figura 18 muestra diagramas de especiación de los polielectrolitos usados en esta tesis, donde se observa que se encuentran en dos estados cargados que depende del

pH, es decir protonado (cuadrados) y desprotonado (círculos). Los resultados sugieren que los polielectrolitos utilizados se comportan como un sistemas de ácidos monopróticos y siguen el modelo de un pKa (*one-pKa model*) [97].

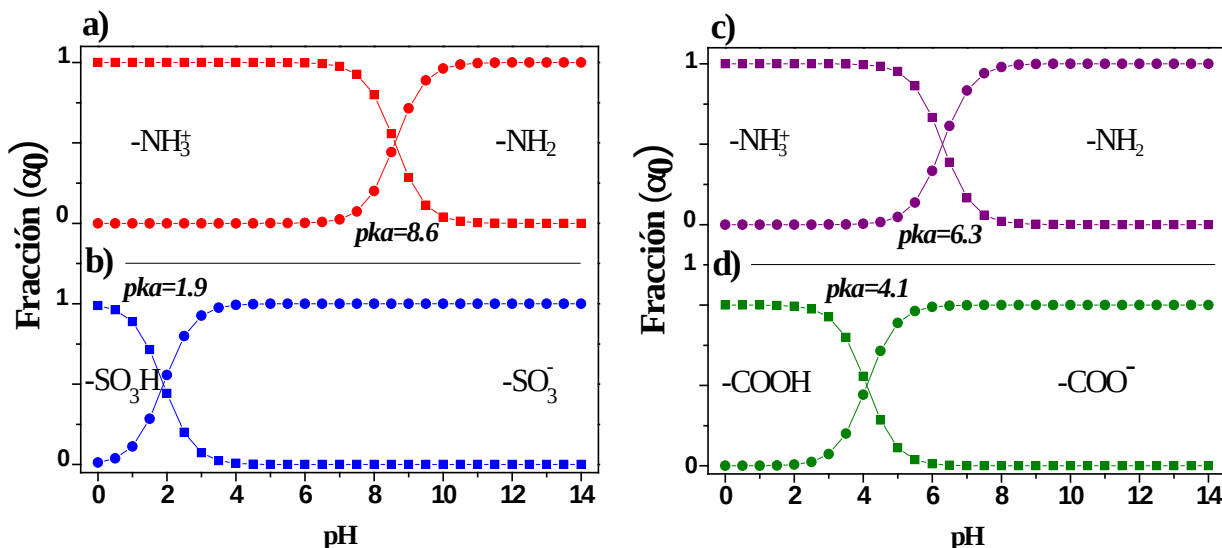
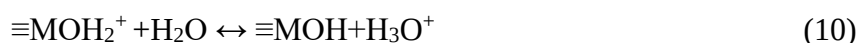


Figura 18. Diagrama de especiación para a) PAH, b) PSS, c) CHI y d) CMC.

Para el caso de las nanopartículas se observa 3 estados: $\equiv\text{MOH}_2^+$ en medio ácido, $\equiv\text{MO}^-$ en medio básico y con $\equiv\text{MOH}$ siendo los sitios anfóteros intermedios (siendo el símbolo M = metal superficial), ver el diagrama de especiación de la figura 19.

Este comportamiento se debe a que en la superficie de la nanopartícula de maghemita en contacto con una solución acuosa, se comporta como un ácido diprótico de acuerdo con el modelo de 2-pKa (*two-pKa model*) [98]. Este resultado está determinado por la cantidad de iones (OH^- o H^+) en la solución, como se muestra en las siguientes reacciones químicas, ecuaciones 10 y 11 [99]



Los resultados de los diagramas de especiación sugieren que para una interacción optima entre la nanopartículas y los polielectrolitos durante la formación de las capas debe de estar a un pH 4 cuando se realicce el procedimiento de LbL. Para el caso del sistema sintetico a pH = 4 tanto el PSS como el PAH están totalmente protonados. Sin embargo, para

los polielectrolitos naturales y al mismo pH la CMC está débilmente protonado (~50%) mientras que la CHI está totalmente protonado, la razón por la cual se mantiene el pH =4 para el caso natural es por el balance entre la solubilidad (caso particular de la chitosan) y la interacción atractiva que se crea en el sistema.

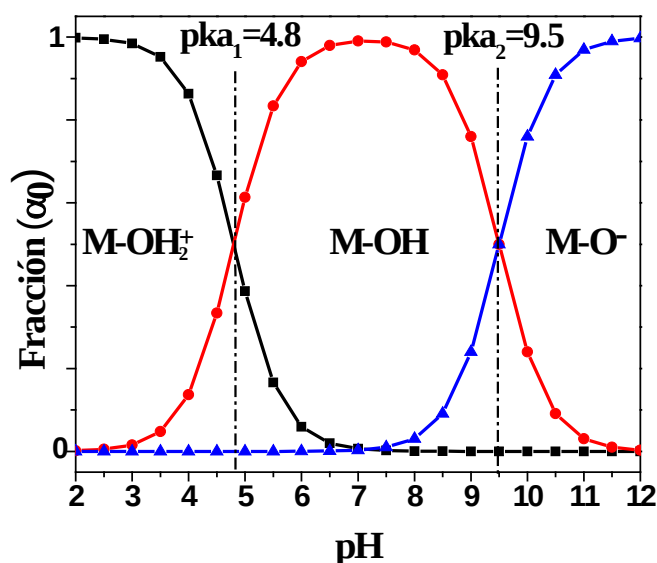


Figura 19. Diagrama de especiación de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ como una función del valor de pH. Los cuadrados negros, círculos rojos y triángulos azules son la fracción de especies protonadas, neutras y desprotonadas de las nanopartículas, respectivamente.

4.5. Potencial zeta de la nanopartículas magnéticas

Se realizaron experimentos de la movilidad electroforética de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ para inferir el potencial zeta por medio de la ecuación de Henry (ecuación 6). La figura 20 describe el comportamiento del potencial zeta de la superficie de la nanopartícula de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ cuando el pH aumenta.

Se observa que a pH ácidos el potencial zeta tiene un valor positivo y a medida que aumenta (hacia pH básicos) el valor del potencial zeta pasa por un punto isoeléctrico y después hay una inversión de carga (valores negativos). El punto isoeléctrico se encuentra alrededor de pH=7. El comportamiento del potencial zeta descrito aquí se relaciona con la carga que adquiere la superficie de las nanopartículas; es positiva debido a la adsorción de protones ($\text{Fe-OH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Fe-OH}_2^+$) a pH ácidos, neutro entre los pH 7-8 ($\equiv \text{MOH}$) y es negativa debido a la disminución de protones, ($\text{Fe-OH} + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{Fe-O}^-$) [100] a pH básicos,

además desde un punto de vista energético cuesta mayor trabajo quitar un segundo protón (H^+) de la superficie lo que confiere un valor de potencial zeta negativo más pequeño respecto al valor del potencial zeta positivo. En el método LbL usamos un $pH = 4$ el cual confiere el máximo valor del potencial zeta en la nanopartícula tal como se muestra en la figura 20 y este resultado se relaciona con el grado de protonación del diagrama de especiación de la figura 19.

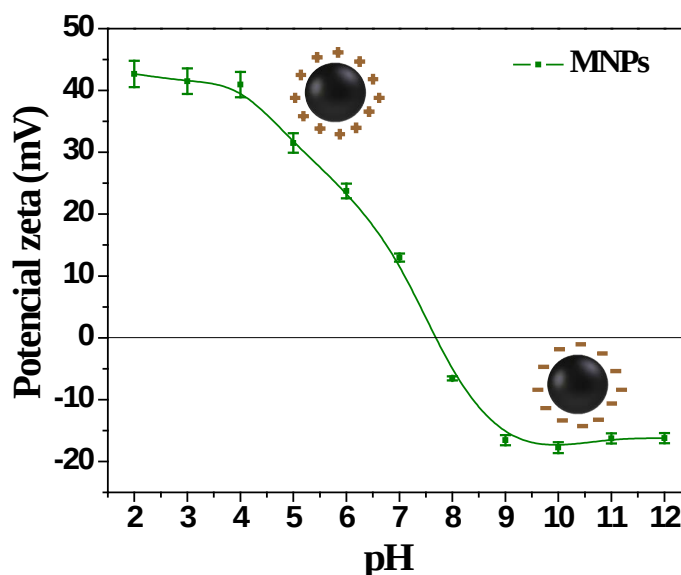


Figura 20. Variación de potencial zeta en función del pH de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

4.6. Potencial zeta de las NpMs @ multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales

En esta sección se discutirá el efecto de las capas de polielectrolito sobre el potencial zeta de las nanopartículas magnéticas cuando se emplea la técnica de LbL como metodología de recubrimiento. La Figura 21 muestra el comportamiento del potencial zeta (a $pH = 4$) para las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sin y con polielectrolito. En el caso de las nanopartículas sin recubrimiento se obtiene una carga superficial positiva mientras que, en las nanopartículas con recubrimiento de polielectrolito, se observó que el potencial zeta cambia de valores negativos y positivos que depende del polielectrolito adsorbido en la superficie de la NpMs. Estos resultados claramente confirman que se llevó a cabo la deposición y formación de multicapas de polielectrolito sobre las NpMs. Los números impares de las capas están asociados con la formación de capas PSS (o CMC) originando un potencial zeta negativo y los números pares de capas están asociados con la formación de capas PAH (o CHI) generando un potencial zeta positivo.

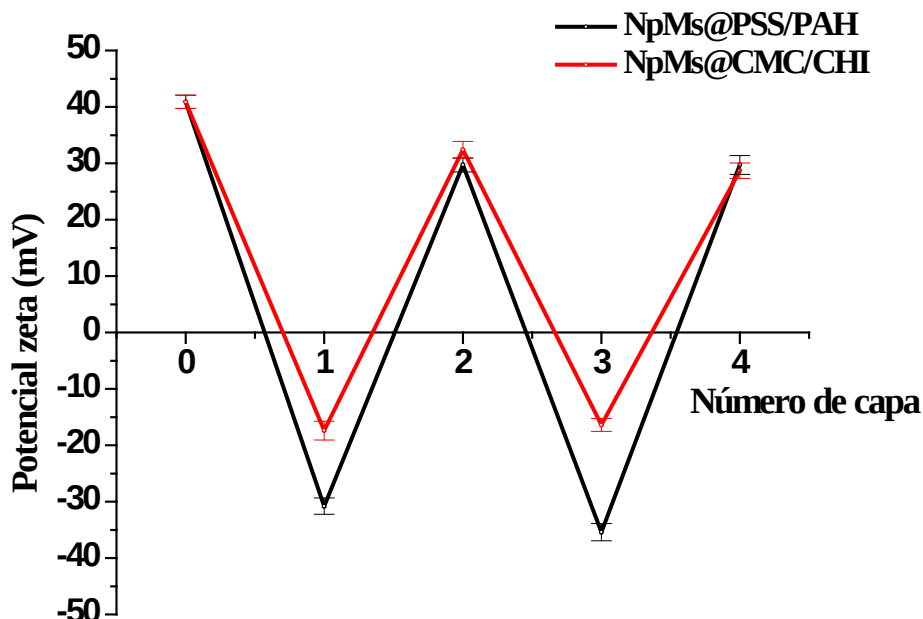


Figura 21 Potencial de zeta en función del número de capa para nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con a) polielectrolitos sintéticos, y b) polielectrolitos naturales. Los números impares corresponden a la adsorción del polianión y los números pares a la adsorción del policación.

Se realizaron medidas para cada capa de polielectrolito, tanto del sistema sintético y natural, con diferentes valores de pH, ver figura 22. Se observa que el potencial zeta tiene diferentes comportamientos dependiendo por un lado del polielectrolito usado y por otro lado por el valor del pH. La variación del potencial zeta de las capas del sistema natural (**CMC/CHI**⁺) es mayor que el sistema **PSS/PAH**⁺ cuando aumenta el pH. Como se había discutido anteriormente los polielectrolitos PAH y CHI se protonan a pH ácidos y se desprotonan a pH básicos [101], esto es una característica típica de los polielectrolitos débiles y fue explicado en la introducción [102, 103, 104, 105]. Además, se observa que el punto isoeléctrico de la última capa compuesta por CHI se encuentra prácticamente en su $\text{pK}_a = 6.3$ mientras que el punto isoeléctrico para el caso donde la última capa es PAH se encuentra en $\text{pH}=10$, es decir cercano a su $\text{pK}_a \sim 9$.

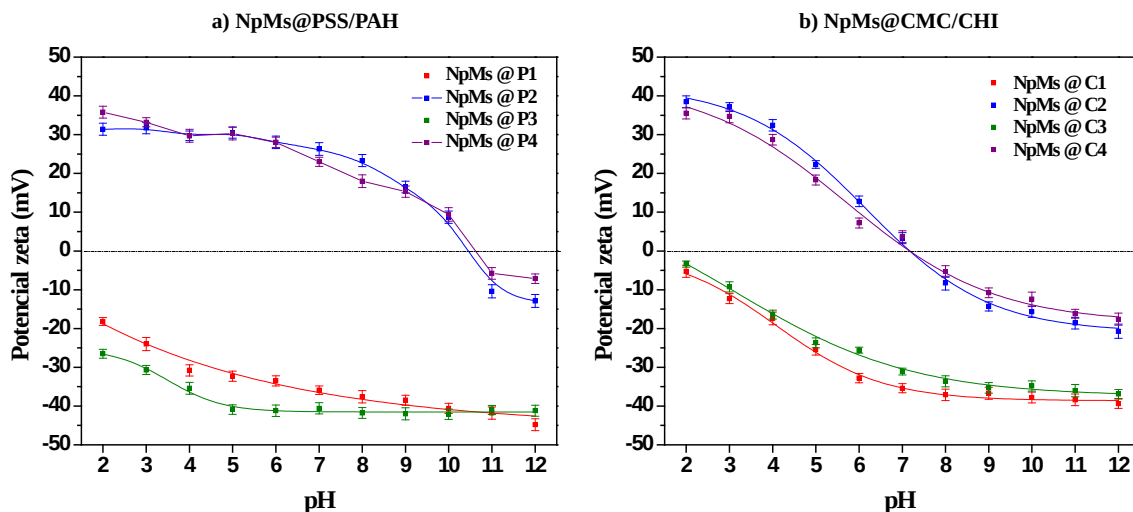


Figura 22. Potencial de zeta en función del pH para nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas de a) polielectrolitos PSS/PAH, y b) polielectrolitos CMC/CHI.

Por otra parte, las nanopartículas recubiertas con polielectrolitos aniónicos presentan un potencial zeta negativo tanto para el sistema sintético como el natural y cuyo valor depende del pH tal como se muestra en la figura 22. Cuando nos encontramos en pH ácidos, el valor del potencial zeta es pequeño y se debe a la protonación de los grupos SO_3^- y COO^- para el sistema sintético y natural respectivamente. El valor del potencial zeta aumenta a medida que el pH se incrementa y está relacionado con el incremento de los sitios cargados negativamente, es decir el polielectrolito se desprotona [106]. Nuevamente se observa de la figura 22 que el polielectrolito natural (CMC) es más afectado por el pH respecto al polielectrolito sintético (PSS), aunque aquí no se presentan puntos isoeléctricos. Por otro lado, se observa que a pH's mayores a 6 el valor del potencial zeta permanece prácticamente constante lo que indica la poca dependencia del pH sobre la carga del PSS y CMC. Esta es una característica típica de polielectrolitos fuertes.

4.7. Radio hidrodinámico de NpMs dispersas en medios acuosos

En esta sección se hace un análisis del comportamiento de las NpMs en medios acuosos por medio de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) con el fin de conocer su diámetro hidrodinámico y observar el grado de agregación o estabilidad coloidal del sistema que es de suma importancia en el proceso de la metodología de recubrimiento vía LbL. Los resultados

del diámetro hidrodinámico de la nanopartícula con y sin recubrimiento se muestran en la figura 23.

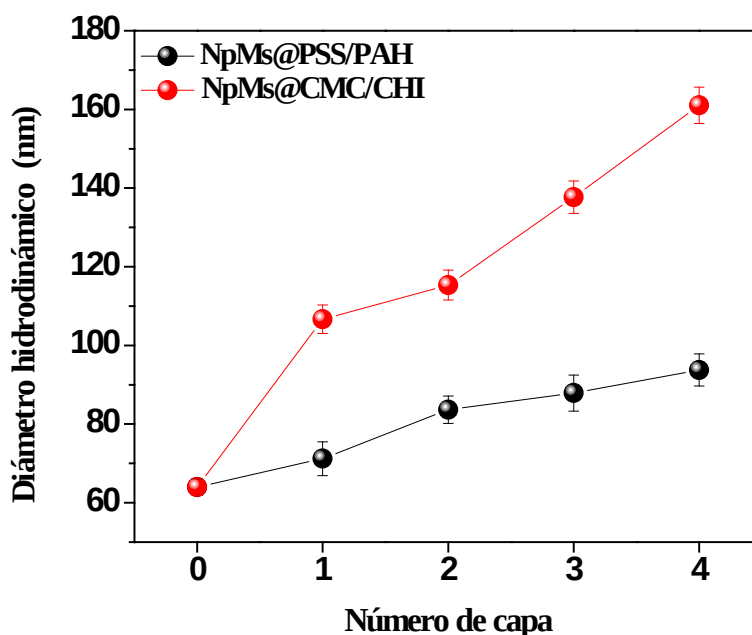


Figura 23. Diámetro hidrodinámico en función del número de capas de polielectrolito.

El diámetro hidrodinámico de la NpMs sin recubrimiento es de ~64 nm, con un índice de polidispersidad de 0.2, mientras que la nanopartícula tiene un diámetro promedio 9 nm (figura 9 y 10), esta diferencia de tamaños sugiere que en una solución acuosa las nanopartículas se están agregando con 7 nanopartículas magnéticas y los agregados son dispersados en la solución acuosa (dispersión coloidal). Este sistema puede ser considerado como nanoplateformas que pueden ser encapsuladas con polielectrolito y fármacos. En ese contexto, la figura 23 también muestra que el diámetro hidrodinámico de las NpMs recubiertas aumenta cuando se incrementa el número de capas tanto del sistema sintético como el natural. Se encontró que el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas recubiertas con los polielectrolitos naturales es mayor que aquellos que fueron recubiertos por los polielectrolitos sintéticos. A partir de estos resultados es posible estimar el espesor del recubrimiento del polielectrolito o número de capa (δh) mediante la sustracción del radio hidrodinámico de las nanoplateformas recubiertas con polielectrolito y radio hidrodinámico de las nanopartículas *desnudas*, ver tabla 5.

Tabla 5. δh de la multicapa de polielectrolito.

	NpMs @PSS/PAH (δh)	NpMs @CMC/CHI (δh)
NpMs @1 ^a Capa	$3.6 \pm 1.6 \text{ nm}$	$21.3 \pm 1.4 \text{ nm}$
NpMs @2 ^a Capa	$9.8 \pm 1.4 \text{ nm}$	$25.7 \pm 1.5 \text{ nm}$
NpMs @3 ^a Capa	$11.9 \pm 1.7 \text{ nm}$	$36.9 \pm 1.6 \text{ nm}$
NpMs @4 ^a Capa	$14.9 \pm 1.6 \text{ nm}$	$48.5 \pm 1.5 \text{ nm}$

Como era de esperarse las multicapas de polielectrolito naturales (CMC/CHI) son gruesas comparadas con las multicapas de los polielectrolitos sintéticos (PSS/PAH). Uno de los parámetros que se relaciona con el incremento de espesor es el peso molecular de cada polielectrolito, que en el sistema natural (CMC/CHI) es de 350,000 g/mol mientras que para el sistema sintético (PSS/PAH) es 87,500 g/mol. Obviamente el espesor puede estar influenciado por el hinchamiento de las multicapas de polielectrolito y no dependen solamente del peso molecular, otros factores se tiene que tomar en cuenta, entre los que podemos numerar: el pH (ya que desprotona o protona al polielectrolito cambiando la estructura de la multicapa), cooperatividad entre las cadenas de polielectrolito, afinidad del sustrato con la multicapa de polielectrolito, procedimiento llevado a cabo en LbL, fuerza iónica, temperatura y solvente.

4.8. Espectroscopia infrarroja con trasformada de Fourier (FTIR)

Experimentos de FTIR fueron realizados a todos las muestras con el objeto de analizar las moléculas que interaccionan en la superficie de las nanopartículas con o sin recubrimiento los cuales son interpretadas por sus bandas correspondientes. El espectro FTIR de la maghemita (figuras 24 a y 25 a, línea roja) exhibe una banda características alrededor de 582 cm^{-1} (N° 1) correspondiente a la vibración de estiramiento de $\nu(\text{Fe-O})$, así como una absorción fuerte alrededores de 1380 cm^{-1} (N° 2) correspondiente a la vibración de estiramiento de $\nu(\text{O-N-O})$ del nitrato usado durante el proceso de síntesis. El pico 1630 cm^{-1} (N° 3) está relacionado a la vibración del flexión de $\nu(\text{O-H})$ y el pico aproximadamente en el rango $3600\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ (N° 4) es asignado a la vibración de estiramiento simétrico y antisimétrico de O-H que puede sugerir la presencia de agua adsorbida en la superficie de la nanopartícula proveniente de la humedad del ambiente [107].

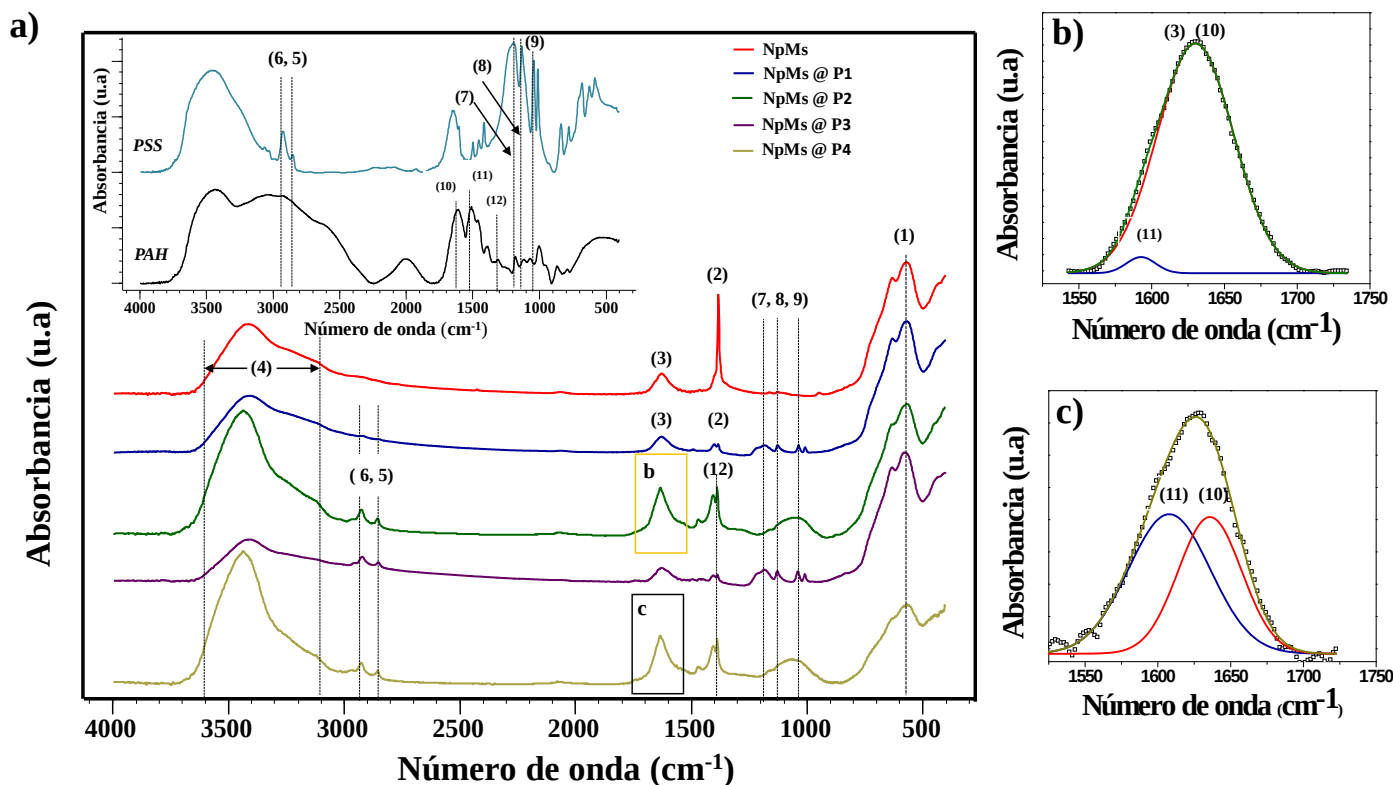


Figura 24. Espectros FTIR de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas de polielectrolito PSS/PAH y con sus polielectrolitos individuales. Deconvolución de los espectros de FT-IR de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con la b) 2ª capa y c) 4ª capa de polielectrolito.

Igualmente, en las figuras 24a y 25a se puede observar la interacción entre los polielectrolitos sintéticos y los polielectrolitos naturales, respectivamente, con las NpMs. En los dos casos (NpMs@P1-4 y NpMs@C1-4) presentan bandas de absorción alrededor de 2850 cm^{-1} (Nº 5) y 2920 cm^{-1} (Nº 6) correspondiente al modo de vibración de estiramiento simétrico y antisimétrico de $-\text{CH}_2$ de las cadenas de los polielectrolito [108]. Por otro lado en las capas impares del sistema NpMs@PSS/PAH (figura 24) aparecen las absorciones en 1184 cm^{-1} (Nº 7) y 1040 cm^{-1} (Nº 9) correspondiente a la vibración antisimétrica y simétrica del enlace S=O del grupo SO_3 , así como la vibración esquelética en el plano del anillo del benceno a 1130 cm^{-1} (Nº 8) [109, 110]. Además, en las capas pares (NpMs@P2 y NpMs@P4) se distingue un incremento en la banda de absorción a 1630 cm^{-1} (Nº 10) del modo de vibración de estiramiento de $\nu(\text{O-H})$ este incremento puede ser debido a la contribución de la banda de estiramiento de C=O del enlace amida lo cual estaría contribuyendo en gran medida al incremento de dicha señal.

En las figuras 24 b y 24 c, se muestra las deconvoluciones del FTIR de las capas pares (NpMs@P2 y NpMs@P4) y en ella existen banda de absorción a 1588 cm^{-1} (N° 11) característica a la vibración de flexión de N-H del monómero de NH_3^+ del PAH y confirmando así la interacción de los polielectrolitos PAH con el PSS. Además se distinguieron bandas de absorción a 1406 y 1384 cm^{-1} (N° 12) relacionados al enlace C-H de las capas pares [111].

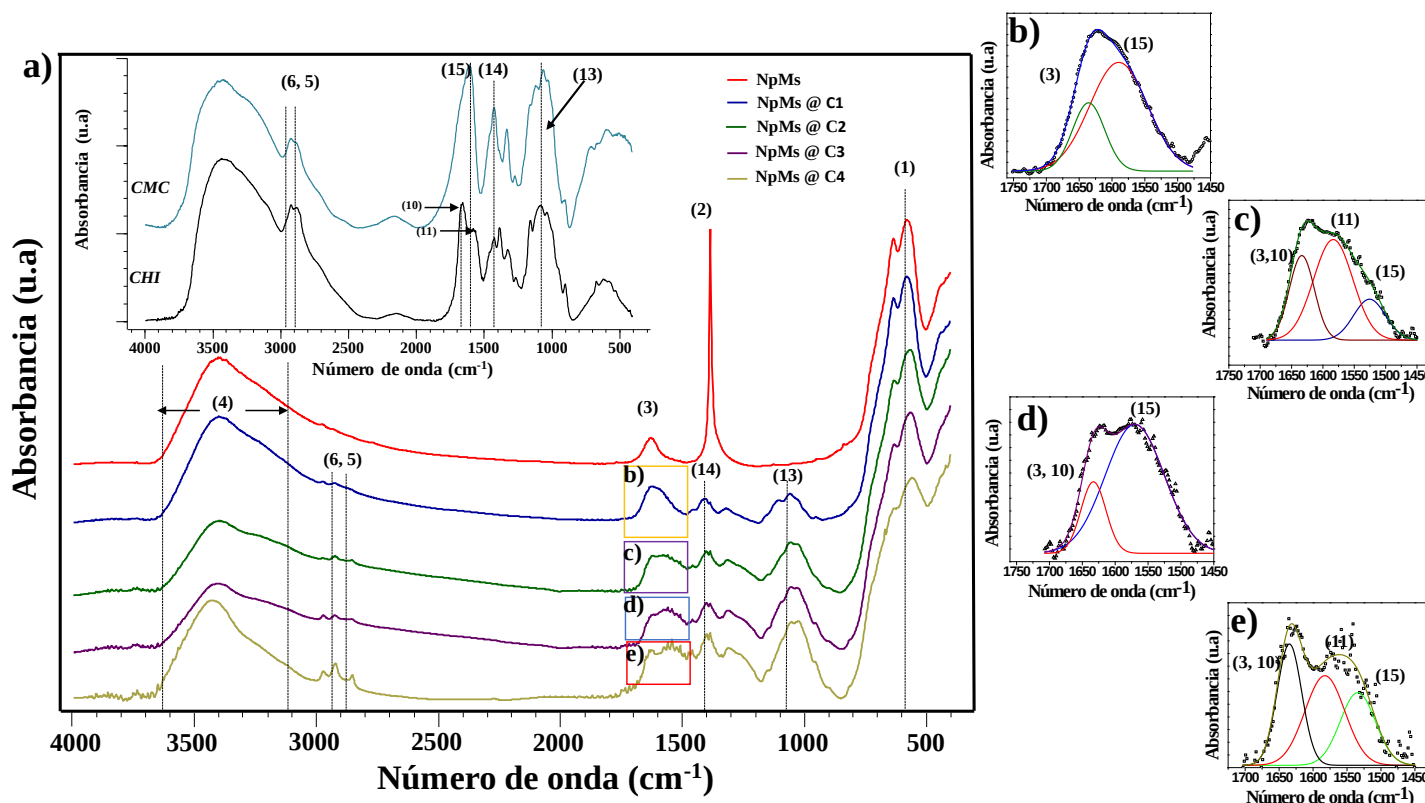


Figura 25. Espectros FTIR de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas polielectrolitos CMC/CHI y con sus polielectrolitos individuales. Deconvolución de los espectros de FT-IR de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con la b) 1ª capa, c) 2ª capa, d) 3ª capa y e) 4ª capa de polielectrolitos.

El FTIR del recubrimiento de las nanopartículas con CMC/CHI se muestra en la figura 25. Se observa que las capas impares presentan algunas bandas alrededor de 1060 cm^{-1} (N° 13) y 1414 cm^{-1} (N° 14) correspondiente a la vibración de flexión C-O-C y a la vibración de estiramiento del grupo COO^- , respectivamente. Así, mismo se observó en la deconvolución del FTIR de las NpMs@C1 (figura 25 b) una banda de absorción a 1550 cm^{-1} (N° 15) que corresponde al ion carboxilato originado por la interacción de los grupos carboxílicos de CMC con los sitios de la superficie de la nanopartículas [112, 113, 114]. En

el caso de las deconvoluciones del FTIR de las capas 2 y 4 (figura 25 c y e) muestra 3 bandas a 1550 cm^{-1} (N° 15), 1630 cm^{-1} (N° 10) y 1588 cm^{-1} (N° 11) estas vibraciones nos indica la interacción del quitosano y la capa de CMC. Los resultados experimentales mostrados aquí confirman la deposición de los polielectrolitos sobre la superficie de las nanopartículas.

4.9. Análisis termogravimétrico (TGA)

Se hicieron medidas termogravimétricas para analizar la pérdida de peso y descomposición de los polielectrolitos sintéticos y naturales, como una medida de estabilidad térmica, así como las pérdidas de peso de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sin y con recubrimiento. Todos los análisis fueron realizados en atmósfera de nitrógeno

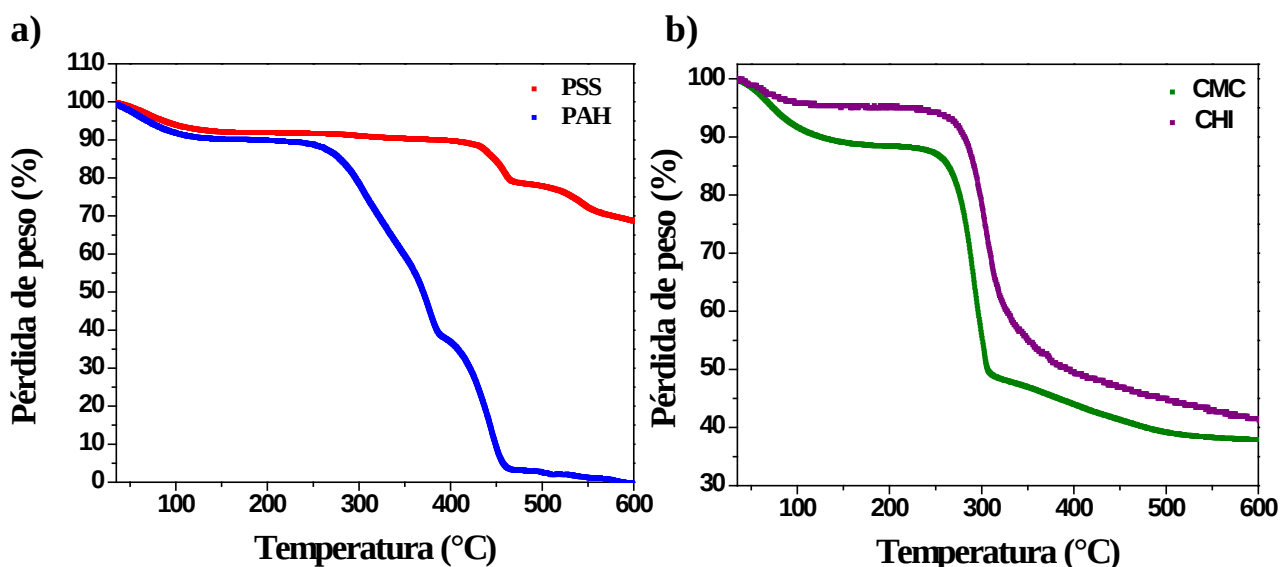


Figura 26. Termogramas de a) polielectrolitos sintéticos, b) polielectrolitos naturales.

En la figura 26a, se presenta los termogramas de los polielectrolitos PSS y PAH. Para el PSS se pueden observar 3 estados de descomposición térmica, el primer estado de descomposición (35-200°C) corresponde a la pérdida de agua. La segunda etapa de degradación esta relacionando a la desulfonación térmica (200-400°C) y la tercera etapa de pérdida de peso observada $>400\text{ °C}$, puede atribuirse a la descomposición de la matriz polimérica [115]. Del mismo modo se observa el primer estado de descomposición térmica del PAH en el intervalo de 35-300°C puede ser atribuida a pérdida de agua. En el segundo estado de descomposición se encuentra en el intervalo de 300-470°C y es atribuido a la eliminación de la cadena lateral $-\text{CH}_2\text{NH}_2\text{Cl}$ y el tercer estado de descomposición se

encuentra en el intervalo de 470-600°C y es causada por la descomposición de las cadenas de polielectrolitos [116, 117].

En el termograma de la CMC y CHI se presentan en la figura 26 b, donde para el caso de CMC se observan 2 estados de descomposición térmica. La primera pérdida de pesos (35-200°C) es la descomposición térmica de segmentos de la cadena del polielectrolito y la segunda pérdida es atribuida a la pérdida de CO₂ del polisacárido. El grupo COO⁻ en la carboximetilcelulosa es *descarboxilado* es este rango de temperatura [118]. Cabe mencionar que para el quitosano presenta también 2 estados de descomposición térmica. El primer estado descomposición (35-200°C) esta dado por la deshidratación y en el segundo estado de descomposición (200-600°C) esta dado por la descomposición de la cadena principal de quitosano, figura 26b [119].

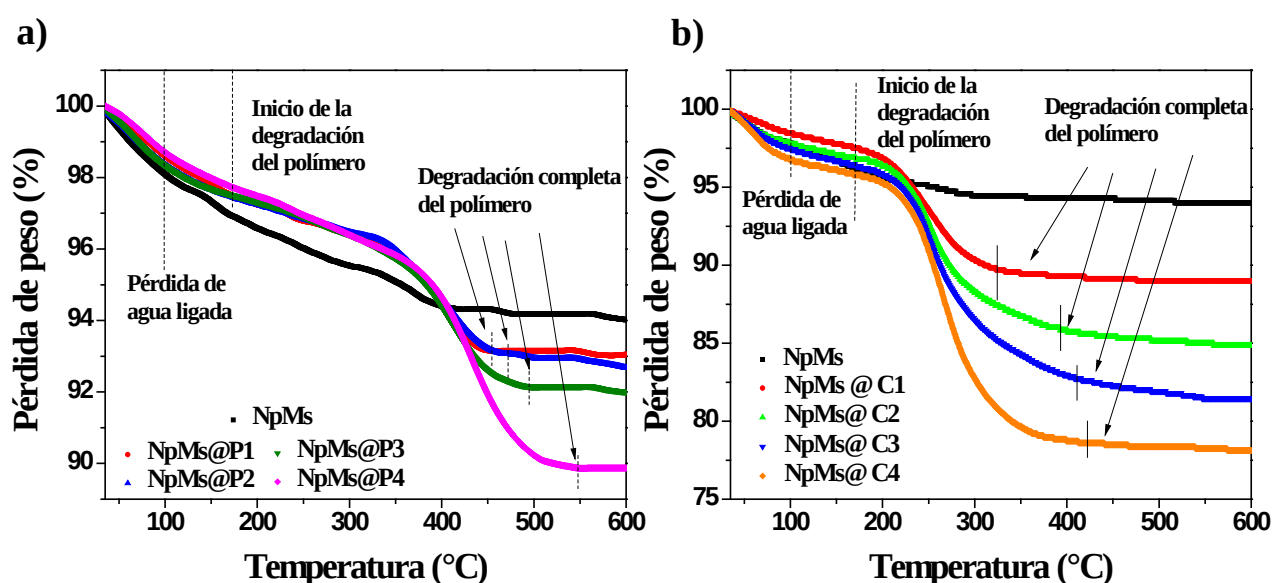


Figura 27. Termogramas de las a) nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas de polielectrolito sintético, y b) nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas de polielectrolito natural.

En los termogramas de las NpMs recubiertas del sistema sintético (PSS/PAH), que se muestran en la figura 27a, existen dos pérdidas de masa, donde en la primera etapa (hasta 150 °C) es la pérdida de agua residual, después se observa una ligera pérdida de peso hasta ~170 °C. La segunda pérdida de peso se refiere a la degradación de las cadenas de polielectrolito. Asimismo, se observa un desplazamiento en la temperatura de la degradación de los polielectrolitos y esto nos confirma que la estabilidad térmica mejora con respecto al

incremento del número de capas, ver también la tabla 6. No hay un cambio de peso significativo entre la temperatura de degradación y 600 °C, lo que implica solamente la presencia de nanopartículas de óxido de hierro. De hecho, se puede apreciar una ligera pérdida de peso de las nanopartículas de óxido de hierro sin recubrimiento (línea negra de la figura 27a y 27b) y se debe principalmente al agua libre y componentes volátiles [60] que se encuentran en la superficie de la nanopartícula. Se observó un comportamiento similar para las NpMs recubiertas con CMC / CHI (Figura 25 b). Los resultados confirman que las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ fueron recubiertas con multicapas de polielectrolitos usando la técnica LbL. Además, la mayor pérdida de masa se encontró con aquellos polielectrolitos que generan multicapas gruesas, que en este caso son los naturales; pero también estos resultados se relacionan con la masa molecular de los polielectrolitos usados en este trabajo de tesis, que es mayor en el caso de los naturales que los sintéticos. La tabla 6 muestra los porcentajes de pérdida de peso de las nanopartículas recubiertas con polielectrolitos sintéticos y naturales, los cuales fueron estimados a partir de termogramas de la figura 27.

Tabla 6. Datos de degradación térmica de muestras.

	Muestra	Etapa 1		Etapa 2		Pérdida de peso total (35-600°C)
		T ₁ (°C) ^a	P ₁ (%) ^b	T ₂ (°C) ^a	P ₂ (%) ^b	
	NpMs					6.00
NpMs @ PSS/PAH	NpMs@P1	35-150	2.19	170-455	4.39	6.96
	NpMs@P2	35-150	2.35	170-470	4.41	7.35
	NpMs@P3	35-150	2.33	170-495	5.38	8.01
	NpMs@P4	35-150	2.02	170-547	7.89	10.14
NpMs@CMC/CHI	NpMs@C1	35-150	2.23	170-324	7.80	11.01
	NpMs@C2	35-150	2.98	170-395	11.05	15.16
	NpMs@C3	35-150	3.29	170-410	13.62	18.55
	NpMs@C4	35-150	3.85	170-422	17.19	21.88

^a Intervalo de temperatura, ^b Porcentaje de pérdida de peso en cada etapa de degradación.

4.10. Propiedades magnéticas de las NpMs @ multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales

Los experimentos de magnetización en función del campo magnético de las nanopartículas fueron realizados a 300K en el intervalo de ± 20 K Oe, ver figura 28. La curva M vs H en la figura 28 exhibe un comportamiento superparamagnético para las nanopartículas sin recubrimiento: *no presentan magnetización remanente ni campo coercitivo*. La línea roja es un ajuste usando la función de Langevin [120].

$$M = N \int_0^{\infty} \mu L\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) f(\mu) d\mu \quad (12)$$

donde $f(\mu)$ es una función de distribución log-normal del momento magnético μ

$$f(\mu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma\mu} \exp\left\{-\frac{\ln^2\left[\frac{\mu}{\langle\mu\rangle}\right]}{2\sigma^2}\right\} \quad (13)$$

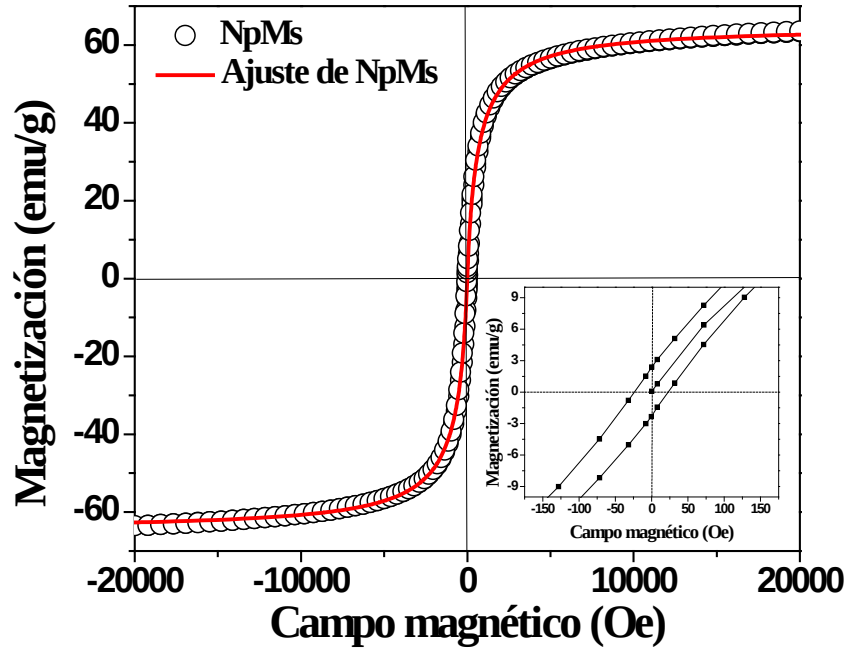


Figura 28. Magnetización en función del campo magnético de la nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. La línea roja es el ajuste usando una suma ponderada de distribución de la función de Langevin.

Se efectuó el ajuste en la curva experimental de magnetización en función de campo magnético aplicado para estimar la magnetización de saturación de la NpMs. A partir de este ajuste se obtuvo un valor estimado de 64.66 emu/g; este valor es menor a la magnetización

de un material macroscopico de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (73.5 emu/g) [121]. Esta disminución es causada comúnmente por los efectos de tamaño finito y superficiales que afectan las propiedades magnéticas de los granos nanométricos [122, 123].

Por otro lado, se observó que las nanopartículas recubiertas con multicapas de polielectrolito también tienen un comportamiento superparamagnético como se muestra en las curvas de M vs H de la figura 29. Se observó además que hay una disminución de la magnetización de saturación cuando aumentó el número de capas de polielectrolito sobre las NpMs, como se observa en la tabla 7, este comportamiento se debe principalmente a la presencia del polímero diamagnético (y no magnético) en la superficie [124, 125], es decir, ahora tenemos un material híbrido (inorgánico-orgánico) tipo *core@shell* donde hay una susceptibilidad magnética efectiva (χ_{eff}) menor que la susceptibilidad magnética de la NpMs (χ_{NpMs}). Estos resultados apoyan la afirmación de que un núcleo magnético está recubierto con una coraza (o capa) diamagnético (o no magnético) creciente. Sin embargo, los resultados también sugieren que hay una interacción de los spines localizados en una región magnéticamente desordenada (en la superficie interna y externa de la maghemita) y spines ubicados en la región ordenada de la cubierta de polielectrolito (o coraza), lo que contribuye a una disminución en sus propiedades magnéticas.

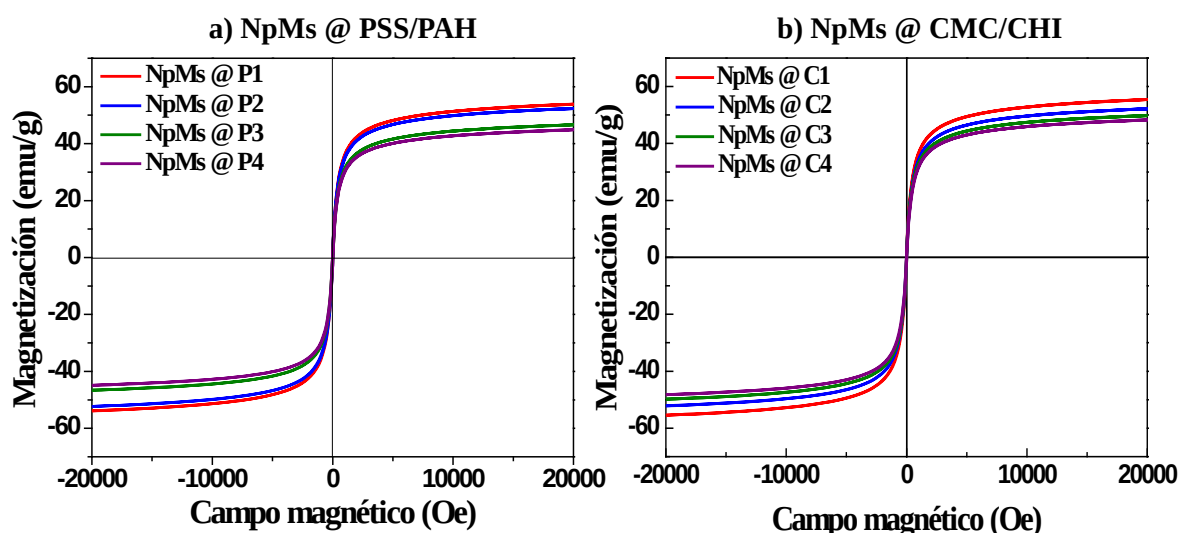


Figura 29. Magnetización en función del campo magnético de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con a) capas de polielectrolito sintético, y b) capas de polielectrolito naturales.

Sorprendentemente, se observó una reducción mas fuerte en la magnetización de saturación de las NpMs recubiertas con polielectrólitos sintéticos que en el sistema de recubrimiento usando polímeros naturales (véanse las Tablas 5 y 7). Es importante tener en cuenta que las muestras con biopolímeros (CMC/CHI) presentan capas más gruesas (en comparación con las sintéticas) y, por lo tanto, una masa de polielectrolito diamagnética mayor, lo que disminuiría la magnetización del sistema mas fuertemente que en el sistema PSS / PAH, pero esto no fue lo que sucedió. Este comportamiento anómalo podría estar relacionado no solo con la presencia de una masa diamagnética en las multicapas de polielectrolito, sino también con la forma en como interactúan las cadenas de polielectrolitos y la superficie de la NpMs. Varios estudios han mostrado que las propiedades magnéticas de las nanopartículas de oxido de hierro se ven afectadas por el tipo del grupo funcional (enlace covalente) que está unido a los átomos en la superficie de las nanopartículas, esto cambian la anisotropía y el momento magnético de los átomos metálicos ubicados en la superficie de las partículas, lo que resulta en la alteración de la magnetización [126, 127]. Particularmente, Zhang et al. encontraron un comportamiento similar [128], lo que demuestra que cuando las nanopartículas de MnFe_2O_4 estaban recubiertas con moléculas de ácido benzoico, su magnetización de saturación aumentaba. Además, los autores han demostrado una correlación entre la naturaleza del ligando de la superficie unida (aceptor π o donante π) y la respuesta magnética: la ganancia máxima de magnetización de saturación se encontró utilizando ligandos que podían evocar a un mayor grado de división en la energía de estabilización del campo cristalino. En este trabajo de tesis hay interacciones electrostáticas durante la construcción de LbL, cuyas fracciones ionizables de los polielectrolitos, SO_3^- (PSS), NH_3^+ (PAH), COO^- (CMC) y NH_3^+ (CHI), son grupos complejos que se unen fácilmente a los átomos Fe^{3+} en la superficie de la maghemita, afectando así las propiedades magnéticas de las nanoplateformas. Además, los polielectrolitos PSS y PAH presentan sitios cargados en las cadenas del polielectrolito, las cuales tienen un mayor entrelazamiento por unidad de masa respecto al entrelazamiento de las cadenas de biopolímeros CMC y CHI. Por lo tanto, se espera que una capa más delgada de polielectrolitos sintéticos induzca alteraciones más significativas en las propiedades magnéticas que las capas más gruesas de polímeros naturales depositados en estas NpMs.

Tabla 7. Valor de la magnetización de saturación de las nanopartículas y nanopartículas recubiertas con multicapas de polielectrolitos

	NpMs @PSS/PAH	NpMs @CMC/CHI
	Magnetización de saturación (emu/g)	Magnetización de saturación (emu/g)
NpMs	64.66	64.66
NpMs @1^a Capa	54.74	56.53
NpMs @2^a Capa	53.33	53.18
NpMs @3^a Capa	47.57	50.85
NpMs @4^a Capa	45.83	49.19

Además, investigaciones recientes encontraron que efectos de cooperatividad permite que poli-iones se puedan adsorber fuertemente sobre superficies de carga opuesta para generar eficientemente la formación de una capa del poliión en la superficie excediendo la carga superficial nominal [129]. Adicionalmente, Marquez et al. [130] analizaron el comportamiento de complejos de polielectrolitos de PSS/PAH, que son autoensambles moleculares de tamaños nano-métricos, donde se observó que la cooperatividad entre las cadenas de polielectrolitos se incrementó cuando el pH aumentó, teniendo este complejo una solubilidad mayor que otros complejos usando polielectrolitos diferentes (CHI, CMC, PAA) en soluciones acuosas. De hecho, la efectividad de la formación de complejos está fuertemente influenciada por el proceso de liberación de contra-iones de la cadena de polielectrolitos, o ganancia de entropía del contra-ion. Usando simulación Dinámica de Partículas Disipativas, Meneses-Juárez et al. [131] estudiaron el mecanismo de interacción en los sistemas PSS/PAH y analizaron el cambio conformacional de las cadenas de polielectrolitos, i. e., un entrecruzamiento extendido de las cadenas de polielectrolito a uno compacto cuando aumenta tanto la concentración de sal y la relación molar entre las moléculas de polielectrolito. Estos hallazgos indican una alta cooperatividad entre las cadenas de cargas opuesta para el caso del polielectrolito sintético usados en ese trabajo de tesis. Por otro lado, varios trabajos muestran que la CHI tiene una baja solubilidad a pH ~ 6 en soluciones acuosas [132], lo que conduce a una cooperatividad débil con el polielectrolito altamente cargado de la CMC cuando se encuentran a este pH.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran por primera vez que el comportamiento de la magnetización en sistemas NpMs@polielectrolitos no solamente depende de la parte diamagnética (no magnética) de la multicapa sino también de la cooperatividad entre las cadenas de polielectrolito y la afinidad con la superficie magnética, Palomec et al [133]. Para los sistemas estudiados en este trabajo de tesis resultó tener una mejor cooperatividad las cadenas de polielectrolitos sintéticos (capa delgada) con una mejor afinidad en la superficie de NpMs que el caso de los polielectrolitos naturales (capa más gruesa), afectando así, en mayor o en menor grado, las interacciones con los espines ubicados en las regiones magnéticamente desordenadas en la superficie de la nanopartícula. Precisamente, el control de propiedades magnéticas (usando polímeros cargados) son de suma importancia en ciertas aplicaciones biomédicas, ya que por ejemplo se pueden diseñar nanoplataformas magneto-receptivas, donde se puede mejorar la entrega / liberación de fármacos hidrofóbicos con estímulos magnéticos externos. De hecho, estudios teóricos y simulaciones sobre estas nanoplataformas son necesarios realizar con el objeto de comprender mejor el efecto y el mecanismo de la interacción de NpMs y multicapas de polielectrolitos sobre las propiedades de magnetización.

4.11. Conclusiones

- Por el método de coprecipitación se obtuvieron partículas esféricas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con tamaño promedio de 8.83 nm y una polidispersidad de alrededor de 0.29 nm.
- Por difracción de rayos X se observó un ligero desplazamiento ($\sim 0.20^\circ$) confirmando el cambio de fase de magnetita (antes del proceso de oxidación) a maghemita (después del proceso de oxidación).
- Los experimentos de titulación conductimétrica y potenciométrica relevó que pH 4 es el pH óptimo para llevar a cabo la técnica LbL.
- Los valores del potencial zeta de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sin y con recubrimiento presentaron inversión de la carga superficial y el signo depende del número de la capa de polielectrolito.
- El potencial zeta de las nanoplataformas se modificó cuando el pH cambió y se debe principalmente a la protonación/desprotonación de los grupos presentes en la

superficie. Este resultado esta relacionado con los diagramas de especiación para cada sistema.

- FTIR mostró la interacción entre moléculas cargadas del polielectrolito y sitios cargados en la superficie de las nanopartículas.
- Los experimentos termogravimétricos de las NpMs recubiertas muestran un pequeño incremento en la estabilidad térmica de las multicapas adsorbidas cuando se compara con los polielectrolitos puros.
- Los resultados experimentales de magnetización muestran que la NpMs y NpMs@polielectrolito presentan propiedades superparamagnéticas.
- La incorporación de polielectrolitos sobre la superficie de la nanopartícula provoca una disminución de la magnetización de saturación, lo cual es similar al comportamiento observado en sistemas nucleo(magnético)@coraza(diamagnético o no magnético).
- La magnetización de saturación en sistemas NpMs@polielectrolitos no solamente depende de la parte diamagnética (no magnética) de la multicapa sino también de la cooperatividad entre las cadenas de polielectrolito y la afinidad de ellas con la superficie magnética.
- Para los sistemas estudiados en este trabajo de tesis resultó tener una mejor cooperatividad las cadenas de los polímeros sintéticos (capa delgada) con una mejor afinidad en la superficie de NpMs que el caso de los polielectrolitos naturales (capa más gruesa), afectando así, fuertemente o débilmente, las interacciones con los espines ubicados en las regiones magnéticamente desordenadas en la superficie de la nanopartícula.

Capítulo 5. Funcionalización nanopartículas de γ - Fe_2O_3 con multicapas de polielectrolito con fármacos

En este capítulo se presenta el análisis del almacenamiento de fármacos así como la caracterización de sistemas $\text{NpMs@polielectrolito-fármaco}$ por medio de mediciones de absorbancia, potencial zeta, diámetro hidrodinámico, termogravimetría y magnetización.

5.1. Espectro de absorción de la quercetina

En la figura 30 a), 31 a) y 32 a) se muestra la absorbancia en función de la concentración de la quercetina a pH 1.2, 7.4 y 9.0, respectivamente. Los espectros de absorbancia que presenta son típicos de los flavonoides (quercetina) que consisten en dos bandas de absorción relacionadas con las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$: una banda en el rango de 300-380 nm, denominada banda I, correspondiente al sistema conjugado entre el anillo B y el sistema carbonilo del anillo C (sistema cinamoil) y otra que cubre el rango de 240-280 nm (banda II) referente al sistema conjugado entre el anillo A y el carbonilo del anillo C (sistema benzoílo); también se ha reportado una banda débil con un máximo de absorción alrededor de 300 nm proveniente únicamente al anillo C [134, 135].

A partir de estos espectros se puede observar un máximo de absorción a 373, 380 y 331 nm cuando la solución de la quercetina tiene un pH 1.2, 7.4 y 9.0, respectivamente. Cabe mencionar que la variación en los espectros de absorción a diferentes pH no son el simple resultado de una desprotonación de los grupos hidroxilo de quercetina. Z. Jurasekova *et al.* estudiaron el comportamiento a pH entre 9.2 y 11.1 de la quercetina, donde se observó un desplazamiento hacia el rojo a medida que incrementaba el pH. Estos resultados sugiere que se produce un cambio químico profundo que afecta al anillo C, lo que conduce a una pérdida de resonancia electrónica entre los anillos A y B. Este comportamiento sugieren la existencia de una correlación entre la estructura molecular y el comportamiento espectral de los flavonoles a diferentes pH [136].

De estos valores de absorción, se realizó una curva de calibración, que se muestra en la figura 30 b), 31 b) y 32 b) lo que permite obtener la absorbancia en función de la concentración.

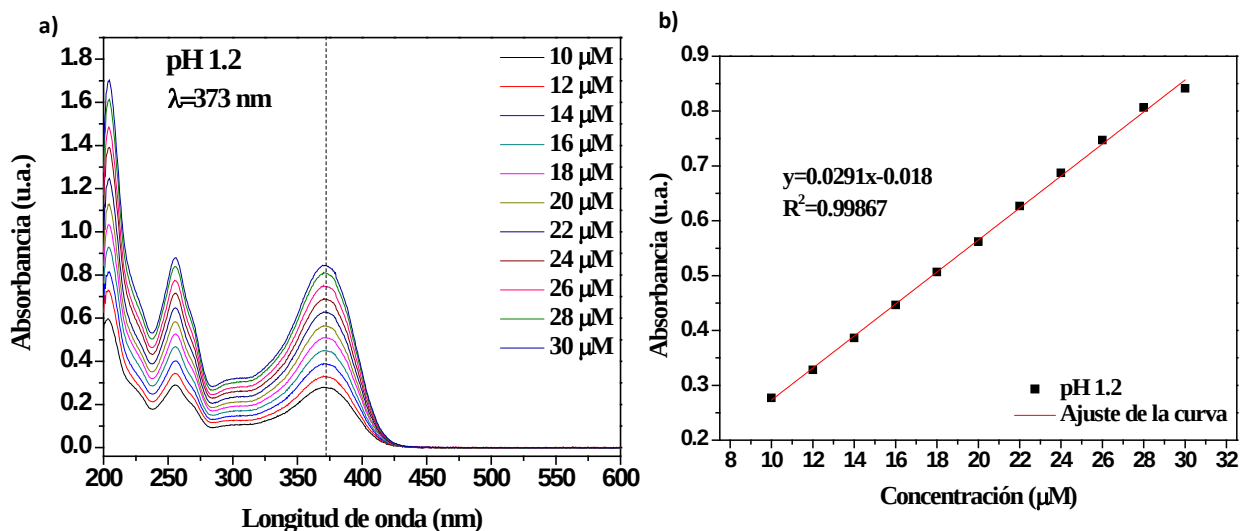


Figura 30. a) Espectro de absorción de una disolución de quercetina a pH 1.2 y b) la absorbancia en función de la concentración.

Cabe señalar que las curvas presentan una buena correlación entre los puntos (linealidad) en el intervalo de las concentraciones usadas, además que cumple con la ley de Beer-Lambert. Los coeficientes de correlación lineal obtenidos fueron 0.9986 (para pH 1.2), 0.9965 (pH 7.4) y 0.9984 (pH 9.0).

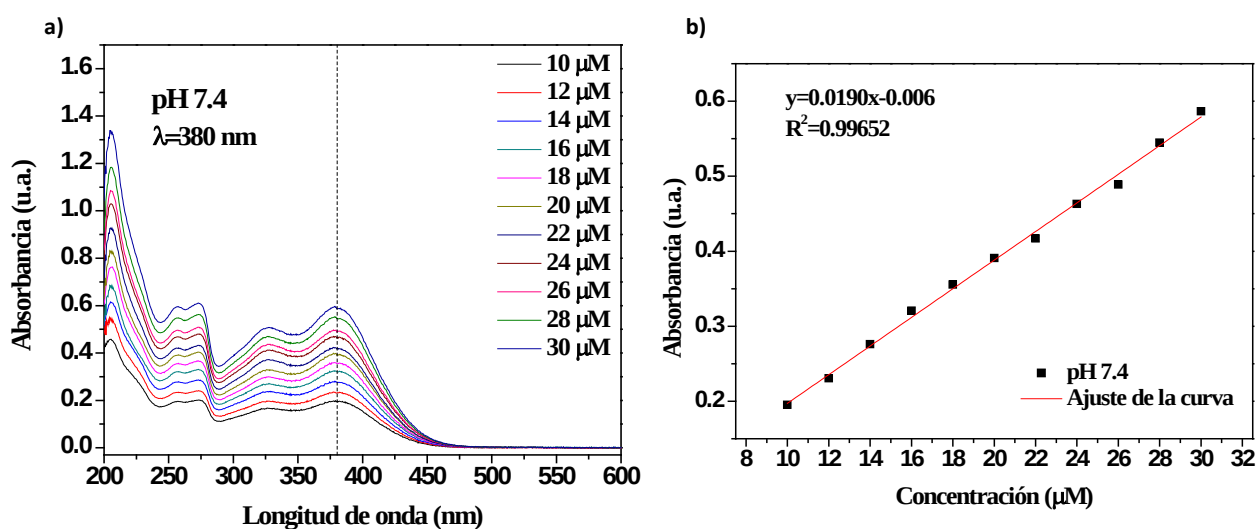


Figura 31. a) Espectro de absorción de una disolución de quercetina a pH 7.4 y b) la absorbancia en función de la concentración.

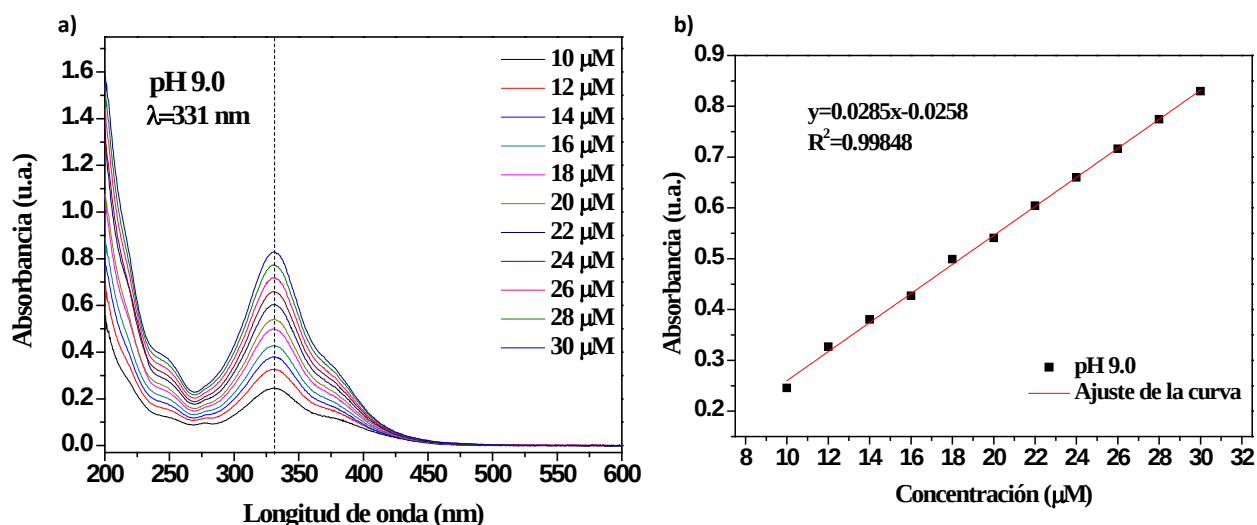


Figura 32. a) Espectro de absorción de una disolución de quercetina a pH 9.0 y b) la absorbancia en función de la concentración.

5.2 Eficiencia de encapsulación

La determinación de la eficacia de encapsulación de la quercetina en las nanoplateformas NpMs@PSS/PAH y NpMs@CMC/CHI se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis y los resultados son mostrados en la tabla 8.

Tabla 8. Cantidad de quercetina en las nanopartículas.

Muestra	Quercetina encapsulada (mg/mL) ^a	Eficiencia de encapsulación (EE %) ^a
NpMs@PQ2	0.154 ± 2.1	51.4 ± 5.4
NpMs@PQ3	0.129 ± 1.2	42.9 ± 3.4
NpMs@PQ4	0.194 ± 3.2	64.7 ± 3.6
NpMs@CQ2	0.218 ± 2.5	72.8 ± 4.7
NpMs@CQ3	0.204 ± 3.5	68.0 ± 1.9
NpMs@CQ4	0.263 ± 1.8	87.8 ± 3.2

^a Análisis realizado por triplicado, n= 3.

Después de la introducción (o almacenamiento) del fármaco en la primera (PSS/PAH)₁ y segunda bicapa (PSS/PAH)₂ de los polielectrolitos sintéticos se procedió analizar la eficiencia de encapsulación de la quercetina, para este sistema fue 51.4 ± 5.4 y 64.7 ± 3.6% , en NPMs@(PSS/PAH)₁ y NPMs@(PSS/PAH)₂, respectivamente; de hecho la primera bicapa corresponde la segunda capa de polielectrolito asociado al complejo PAH-

quercetina (NpMs@PQ2 de la tabla 8) y la segunda bicapa corresponde a la cuarta capa de polielectrolito asociado también al complejo PAH-quercetina (NpMs@PQ4 de la tabla 8). Para el caso natural se obtuvo 72.8 ± 4.7 y $87.7 \pm 3.2\%$ para NpMs@CQ2 (segunda capa asociada al complejo CHI-quercetina) y NpMs@CQ4 (cuarta capa asociada al complejo CHI-quercetina), respectivamente. El incremento en la eficiencia de encapsulación (EE%) cuando aumenta las capas de polielectrolitos es debido a un efecto acumulativo, así como la relación de masa de polímero/NpMs que crece a medida que aumenta el número de capas. Por otro lado, existe una reducción en EE% del fármaco en las muestras NpMs@PQ3 y NpMs@CQ3 respecto a la capa 2 (@PQ2 y @CQ2). Esta reducción en la eficiencia de encapsulación podría deberse a la naturaleza hidrofóbica de la quercetina y pequeñas cantidades de esta molécula podrían estar emigrando fuera de las multicapas en el proceso de lavado. De los resultados obtenidos respecto al almacenamiento del fármaco, se concluye que el sistema de polímeros naturales tiene una mejor aceptación para encapsular la quercetina. Es igualmente interesante mencionar que los grupos NH_3^+ de la CHI y PAH se asocia con la quercetina a través de enlaces de puentes de hidrogeno y esto está relacionado a que presenta una mayor afinidad con el quitosano que con el PAH debido a que el quitosano tiene más grupos NH_3^+ (mayor número de grupos por monómero) [137].

La influencia del pH sobre la modificación química de la quercetina conlleva a cambios estructurales importantes y como puede observarse se tiene una variación compleja de los espectros de absorción lo que indica las especies existen en diferentes pH y no es el simple resultado de una desprotonación de los grupos hidroxilos de la quercetina. De hecho, estos flavonoides experimentan una clara modificación química cuando el pH aumenta, y en soluciones alcalinas consiste de una auto-oxidación que afecta principalmente los anillos C (C-ring). Este proceso se produce a pH superiores a 11, implica la formación de un benzofuranone como un primer paso que puede someterse a una fragmentación que conduce a productos moleculares más simples, que pueden someterse a una posterior polimerización.

5.3. Efecto del pH sobre el potencial zeta de las NpMs @ multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales con quercetina

En la figura 33 se muestra las curvas de potencial zeta en función del pH para los sistemas NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina. Los sistemas con

quercetina presentan comportamientos similares a las NPMs con multicapas de polielectrolito sin fármaco (figura 22) que fueron estudiados en el capítulo anterior. Sin embargo, la adición de la quercetina en la multicapas de polielectrolito provoca una ligera disminución en el valor zeta comparados con el sistema sin quercetina (figura 33 y 22). Además, esta disminución fue más notoria en las NpMs@PQ2 y NpMs@PQ4. Se observa un punto isoeléctrico alrededor de pH 7. El resultado del potencial zeta del sistema NpMs@polielectrolito-fármaco sugiere que la carga nominal del PAH⁺ y CHI⁺, cuando interacciona con la quercetina (negativa), se reduce.

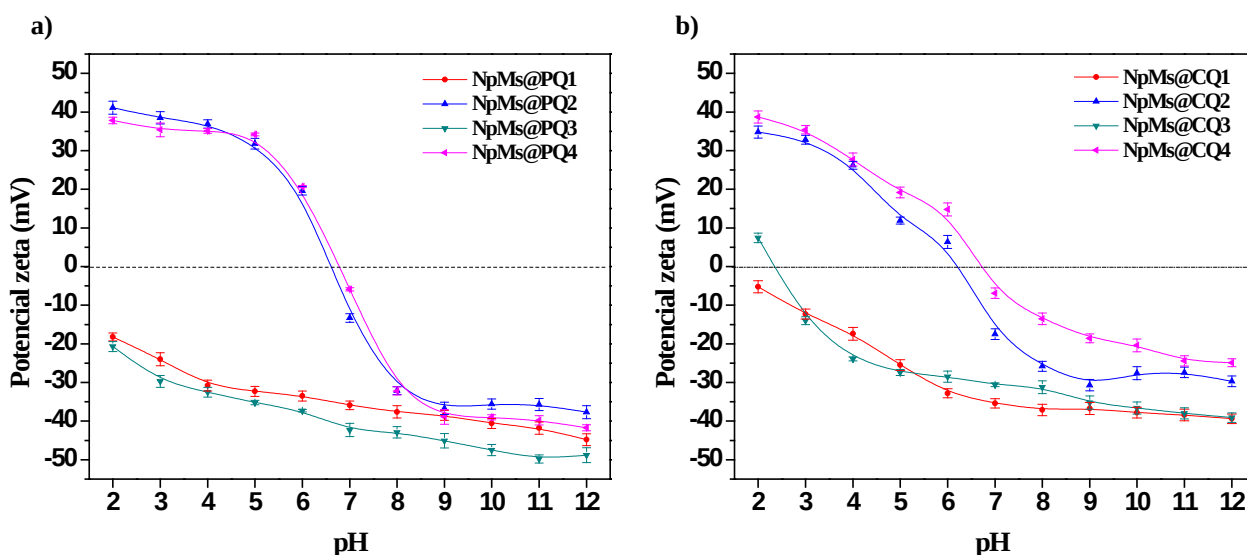


Figura 33. Potencial de zeta en función del pH para nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas de a) polielectrolitos PSS/PAH con quercetina, y b) polielectrolitos CMC/CHI con quercetina.

Como ya se había explicado en el capítulo anterior, el comportamiento del potencial zeta con el pH es resultado del fenómeno de protonación/desprotonación de los grupos carboxilos, hidroxilos, aminas presentes en las cadenas de los polielectrolitos, así como en el fármaco o quercetina.

Por otro lado, se realizaron medidas de dispersión dinámica de luz con el fin de conocer la modificación del espesor de las multicapas cuando se almacena el fármaco en las nanoplateformas magnéticas

5.4. Dispersión dinámica de luz (DLS)

El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas se determinó por DLS. Los resultados se muestran en la figura 34 donde se observa que el diámetro aumenta a medida que aumenta el número de capas. Los resultados muestran que estos diámetros hidrodinámicos son mayores que el sistema sin quercetina (figura 23). Este incremento se debe precisamente al almacenamiento de la quercetina entre las capas de polielectrolito, por lo tanto, una masa de polielectrolito diamagnética mayor, disminuiría la magnetización del sistema. Sin embargo, como ya se mostró en este trabajo las modificaciones de las propiedades magnéticas también pueden depender de la cooperatividad entre las cadenas de polielectrolito y la afinidad de ellas con la superficie magnética. El fármaco incluido en las multicapas podría cambiar dichas interacciones y así tener comportamientos magnéticos diferentes.

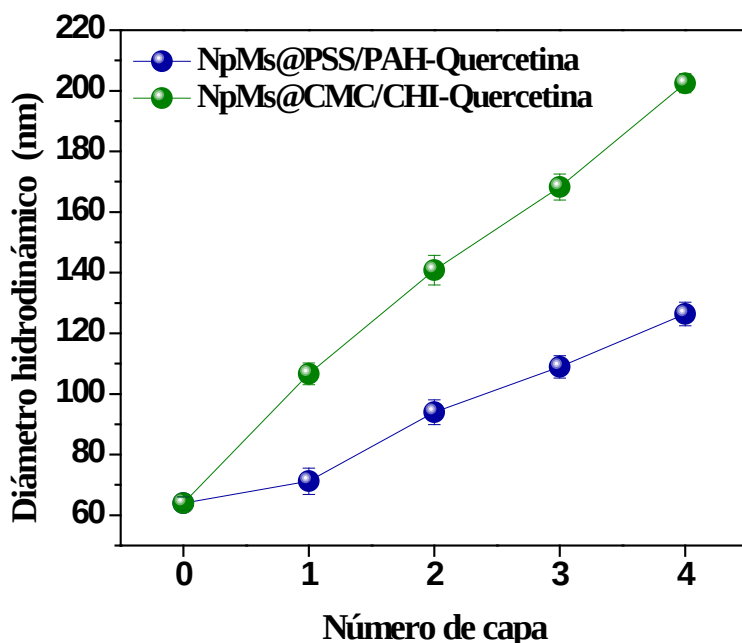


Figura 34. Diámetro hidrodinámico en función del número de capas de polielectrolitos con quercetina.

5.5. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier FTIR

Los espectros de infrarrojo de las nanopartículas recubiertas con multicapas de polielectrolitos con quercetina estudiadas en el rango de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ se muestran en las figuras 35 y 36. para el espectro que corresponde al quercetina pura se aprecian bandas de

absorción que aparece a 1667 (N°5), 1616 (N°4) y 1513(N°3) cm^{-1} corresponde al C=O carbonilo de la cetona, C=C del anillo aromático y estiramiento de los anillos aromáticos, respectivamente y las absorción de las bandas a 1350 (N°2)y 1250 (N°1) cm^{-1} se atribuyen al C–OH y C–O–C [138]. En las muestras cargadas de quercetina (NpMs@PQ2-4 y NpMs@CQ2-4) fue posible observar las bandas características de la quercetina, lo que confirma la presencia de este fármaco en las capas de los polielectrolito.

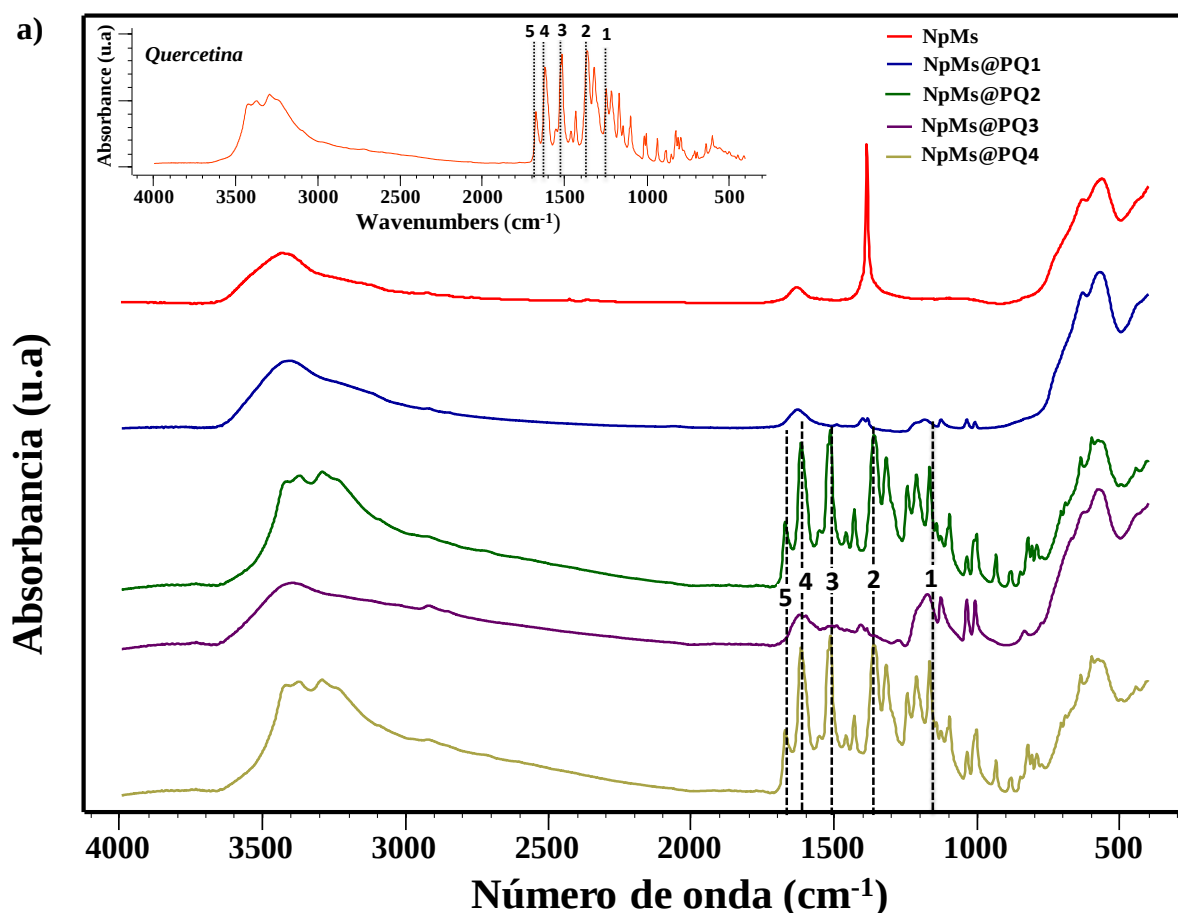


Figura 35. Espectros FTIR de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas de polielectrolitos PSS/PAH con quercetina y la quercetina libre.

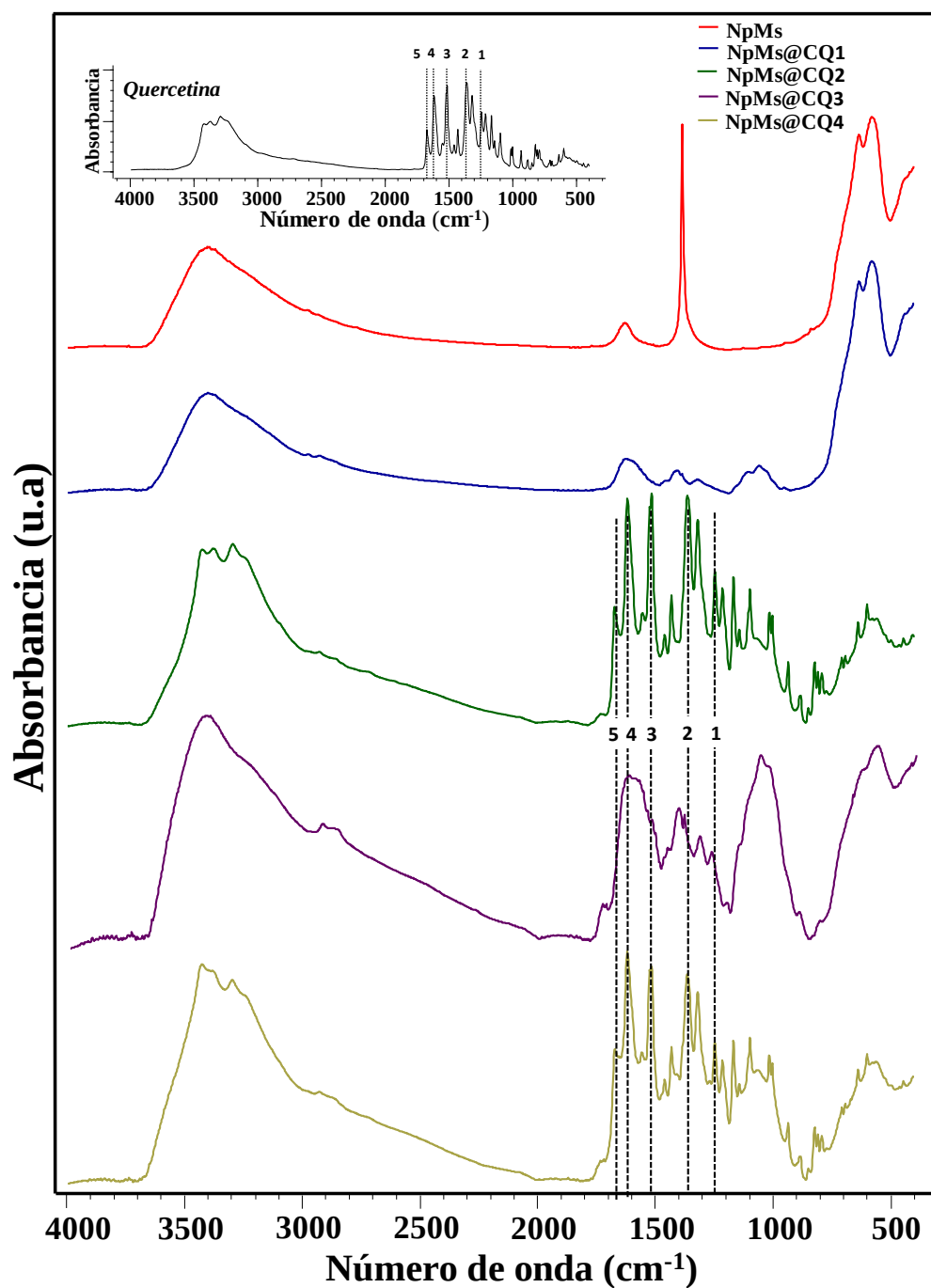


Figura 36. Espectros FTIR de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas de polielectrolitos CMC/CHI con quercetina y la quercetina libre.

De los resultados de FTIR, se puede confirmar que las capas positivas NpMs@PQ2 (NpMs@CQ2) y NpMs@PQ4 (NpMs@CQ4) presenta mayor cantidad de quercetina en la superficie ya que se observa las bandas de la quercetina más intensa que en la capa negativa

NpMs@PQ3 (NpMs@CQ3). Esto es debido a que la quercetina fue incorporada en la solución de polielectrolitos positivo.

5.6. Análisis termogravimétrico (TGA)

En la figura 37 se muestra la descomposición de la quercetina en función de la temperatura. En el termograma se observa que la quercetina presenta una ligera pérdida de peso ($\sim 0.4\%$) en el intervalo de 35-116°C. Igualmente se puede observar que a partir de 260°C presenta un cambio en su pérdida de peso, este cambio puede ser atribuido al inicio de su oxidación térmica. También, se observa que desde 360°C en adelante hay un cambio en pérdida de peso más pronunciada que esta relacionando a la degradación de la quercetina y por último se observa que la quercetina se descompone a 527°C. Este comportamiento térmico es similar a los reportados por Pereira *et al.* y Moreira da Costa *et al* [139, 140].

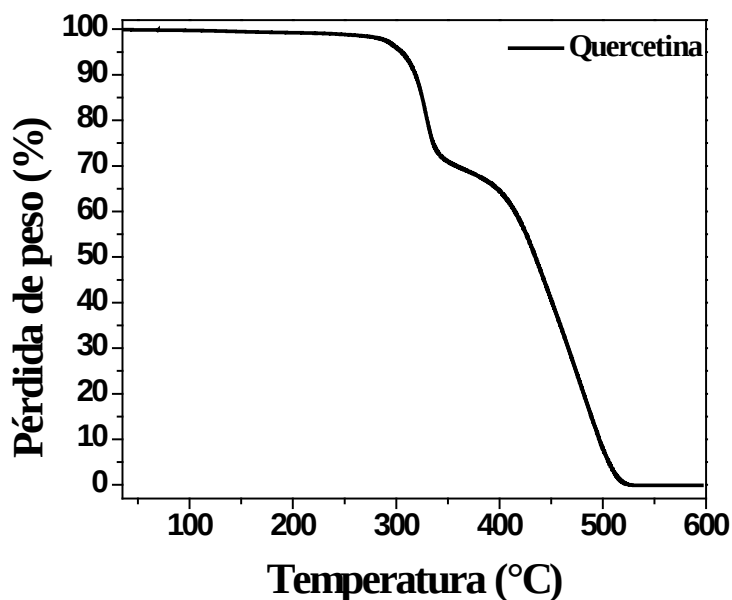


Figura 37. Termograma de la quercetina.

Los termogramas de las NpMs@(polielectrolito/quercetina) presentados en la figura 38 muestra un comportamiento similar a los termogramas realizadas a las NpMs@polielectrolito sin quercetina, es decir presentaron 2 pérdidas de pesos: a) la primera pérdida de peso está relacionada a la evaporación del agua libre y b) la segunda pérdida de

peso esta atribuida a la descomposición del material orgánico. Cabe señalar que la incorporación de la quercetina provoca una mayor pérdida de peso en comparación de los sistemas sin quercetina provocando que reduzca la estabilidad térmica de los polielectrolitos. Esta reducción térmica indica fuertemente la presencia de un material (quercetina) entre las capas.

También se debe mencionar que las muestras NpMs@PQ2-4 presentaron una menor pérdida de peso en comparación a las muestras NpMs@CQ2-4, esto muestra que las nanopartículas recubiertas con polielectrolito sintéticos presentan una mayor estabilidad térmica que los polielectrolitos naturales y puede ser atribuido a la naturaleza de los polielectrolitos y a la cantidad de quercetina encapsulada entre las capas (que es menor en el caso de los sintéticos), como mostraron los resultados de la eficiencia de encapsulación (tabla 8).

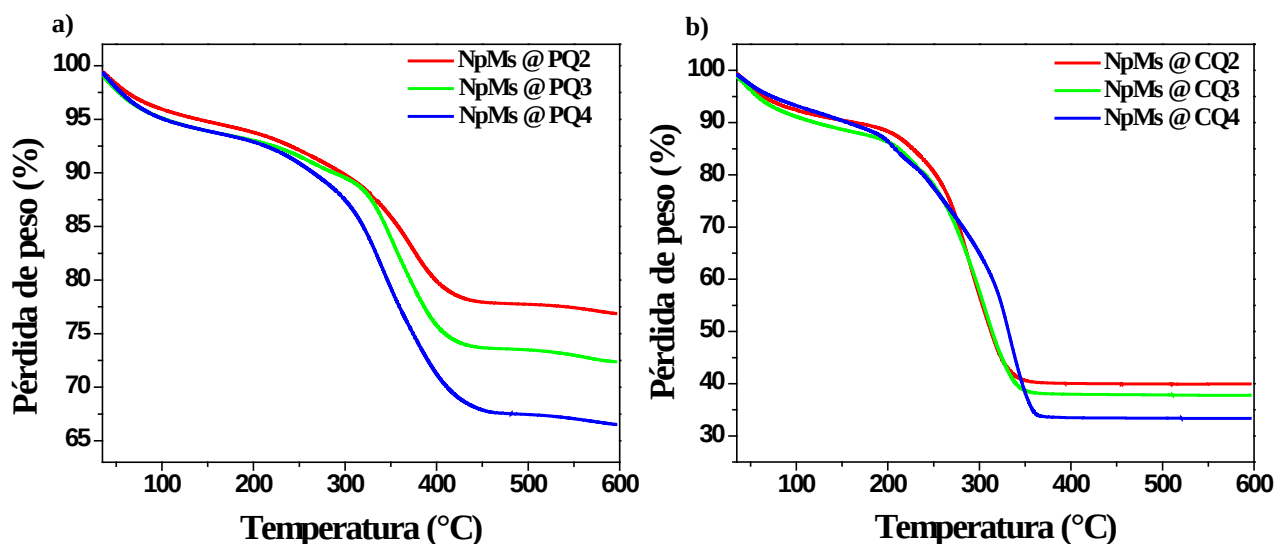


Figura 38. Termogramas de las a) nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas de polielectrolito sintético con quercetina, y b) nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con capas de polielectrolito natural con quercetina.

5.7. Propiedades magnéticas de las NpMs @ multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales con fármaco

En esta sección se presentan resultados sobre las propiedades magnéticas de las nanoplateformas con el fármaco con el fin de compararlos con los sistemas NpMs@polielectrolito sin quercetina.

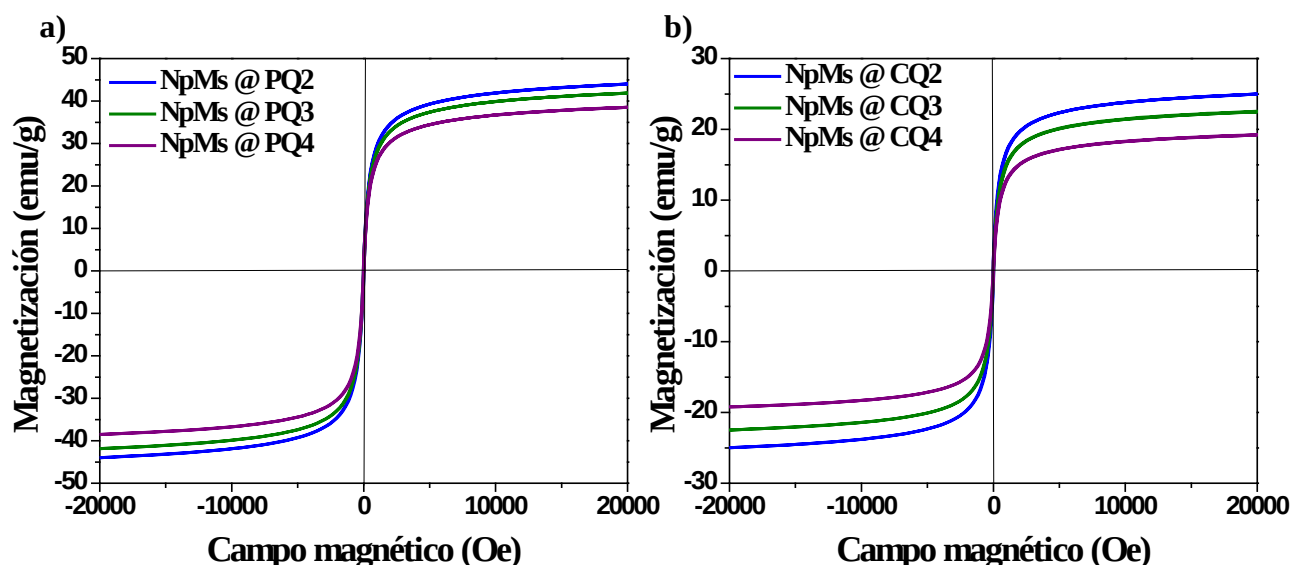


Figura 39. Magnetización en función del campo magnético de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ recubiertas con a) capas de polielectrolito sintético con quercetina, y b) capas de polielectrolito naturales con quercetina.

Las curvas M vs H para NpMs@polielectrolito-quercetina se muestra en la figura 39, donde también presentan un comportamiento superparamagnético. La tabla 9 indica los valores de la magnetización de saturación para los sistemas NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina.

Tabla 9. Valor de la magnetización de saturación de las NpMs recubiertas con multicapas de polielectrolitos con quercetina

	NpMs @PSS/PAH-quercetina	NpMs @CMC/CHI-quercetina
	Magnetización de saturación (emu/g)	Magnetización de saturación (emu/g)
NpMs @2 ^a Capa	44.82	25.57
NpMs @3 ^a Capa	42.71	22.96
NpMs @4 ^a Capa	39.34	19.64

La magnitud de la magnetización de saturación presenta un resultado esperado, las NpMs@PSS/PAH-quercetina (multicapa delgada) presenta una mayor magnetización de saturación en comparación con las NpMs@CMC/CHI-quercetina (multicapas gruesas), esto confirma que una masa de polielectrolito diamagnética mayor, disminuiría la magnetización del sistema. Estos resultados contrastan con los resultados de las NpMs@polielectrolito sin quercetina y puede deberse a una disminución tanto en la cooperatividad de las cadenas de polielectrolito así como en la afinidad con la superficie de las nanopartículas debido al efecto de las moléculas del fármaco. Cabe mencionar que la quercetina tiene una parte hidrofóbica importante y además el complejo (PAH^+ -quercetina) tiene una carga nominal menor respecto al PAH^+ puro, eventualmente estos factores modificarán en gran medida las interacciones entre las cadenas poliméricas y las interacciones con los espines ubicados en las regiones magnéticamente desordenadas en la superficie de la nanopartícula, y según los resultados obtenidos muestra que dichas interacciones en sistema NpMs@PSS/PAH-quercetina son más débiles que en el caso NpMs@polielectrolito sin quercetina.

5.8. Conclusiones

- Los espectros de absorción de la quercetina presentan máximos de absorción (373, 380 y 331) nm que dependen del pH (1.2, 7.4 y 9.0). Esto indica modificaciones químicas que conllevan a cambios estructurales de la molécula.
- La eficiencia de encapsulación de quercetina fue significativamente mayor en las NpMs@CMC/CHI-quercetina, debido a que el CHI presenta mayor cantidad de grupos NH_3^+ que el caso PAH.
- Los estudios de espectroscopia infrarroja mostraron que la quercetina se encuentra en la matriz polimérica de las capas 2, 3 y 4 de los sistemas tanto sintéticos (NpMs@PSS/PAH-quercetina) como naturales (NpMs@CMC/CHI-quercetina).
- Las NPM@polielectrolito-quercetina tiene un diámetro hidrodinámico mayor que las NPM@polielectrolito sin quercetina, indicando un aumento de grosor de la multicapa.
- Se observó una mayor influencia del pH sobre el potencial zeta de las NPM@polielectrolito-quercetina respecto a las NPM@polielectrolito sin quercetina,

lo que indica un fuerte efecto en las propiedades fisicoquímicas de las multicapas **PSS⁻/PAH⁺** y **CMC⁻/CHI⁺**.

- El análisis térmico de las nanopartículas recubiertas con multicapas de polielectrolito con quercetina demostraron una disminución en la estabilidad térmica cuando se compara con las nanopartículas recubiertas con multicapas de polielectrolito sin quercetina.
- A temperatura ambiente las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina poseen comportamiento superparamagnético.

Capítulo 6. Evaluación de las NpMs@multicapas de polielectrolitos sintéticos y naturales con quercetina

En este capítulo se estudia la toxicidad de las nanoplataformas en células cancerosas ováricas, análisis antibacteriano, así como el comportamiento de liberación por estímulos fisicoquímicos (pH) y por campos magnéticos alternos (*magnetohipertermia*). Estos experimentos fueron realizados con el objeto de analizar posibles aplicaciones biomédicas de los sistemas sintetizados en el laboratorio.

6.1. Efecto del pH sobre la liberación del fármaco de las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina

Las figuras 40 y 41, muestran los resultados de las cinéticas de liberación de la quercetina almacenados en los sistemas sintéticos (NpMs@PSS/PAH) y naturales (NpMs@CMC/CH), respectivamente, a diferentes pHs (1.2, 7.4, y 9.0).

El comportamiento de liberación en función del tiempo se presenta en diferentes fases. La primera fase es un efecto de ráfaga inicial, es decir el gradiente de liberación es rápida; en esta fase la liberación está controlada por difusión y por la solubilidad del fármaco. La fase 2 presenta una velocidad de liberación muy lenta y aproximadamente constante, hasta alcanzar una liberación completa del fármaco (fase 3). Los tiempos representados en la figura 40 y 41 son en unidades de horas llegando hasta 240 hr (10 días) por medición. En estos rangos de tiempo puede presentarse degradaciones de las cadenas poliméricas que forman la multicapa, sobre todo en la fase 2 y 3. En ambos sistemas, tanto sintéticos como naturales, se observa que el pH en la solución afecta la velocidad y el mecanismo de liberación [141].

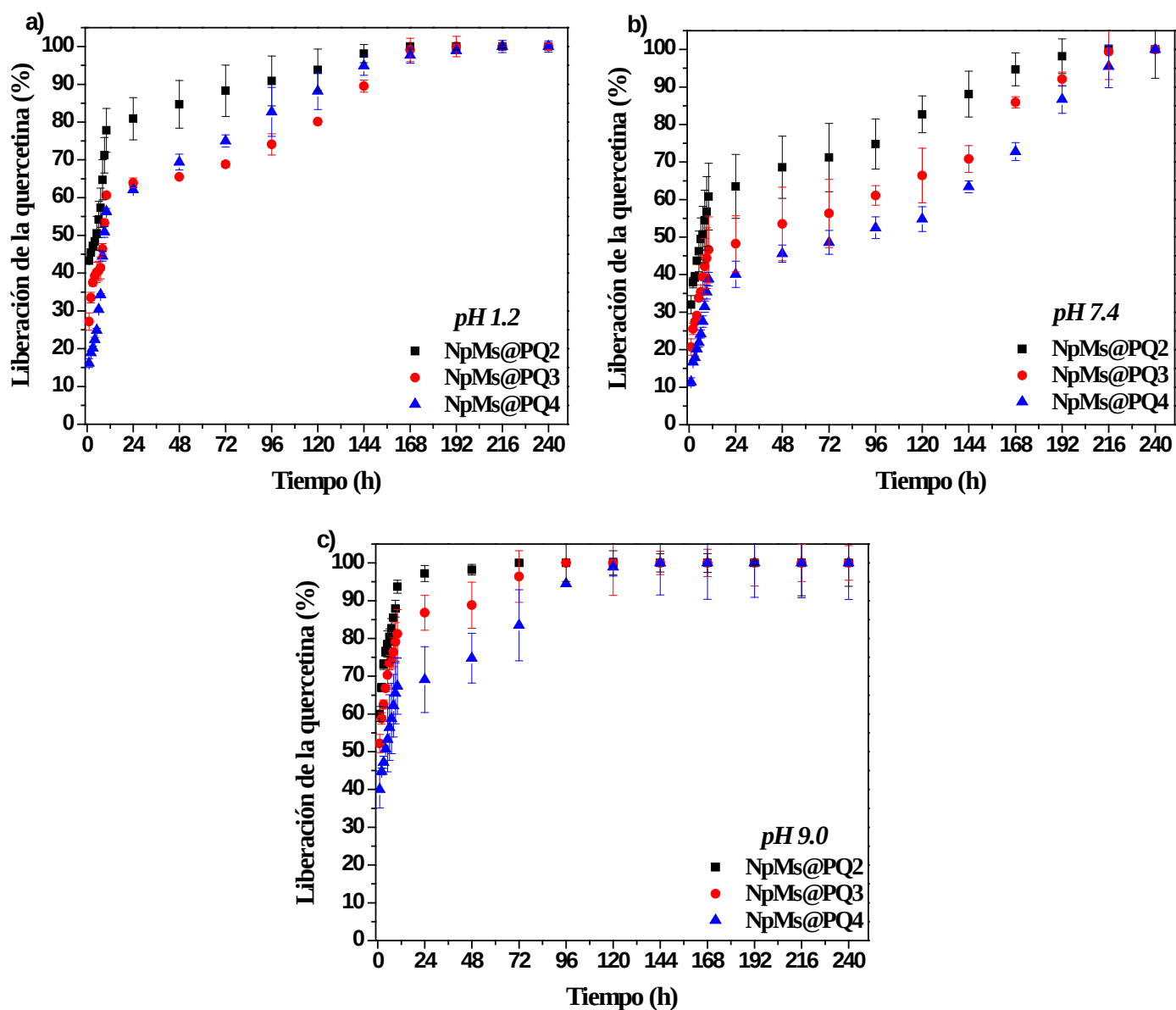


Figura 40. Perfil de liberación de la quercetina por medio de las NpMs@PSS/PAH-quercetina obtenidas a partir del estímulo de a) pH 1.2, b) pH 7.4 y c) pH 9.0.

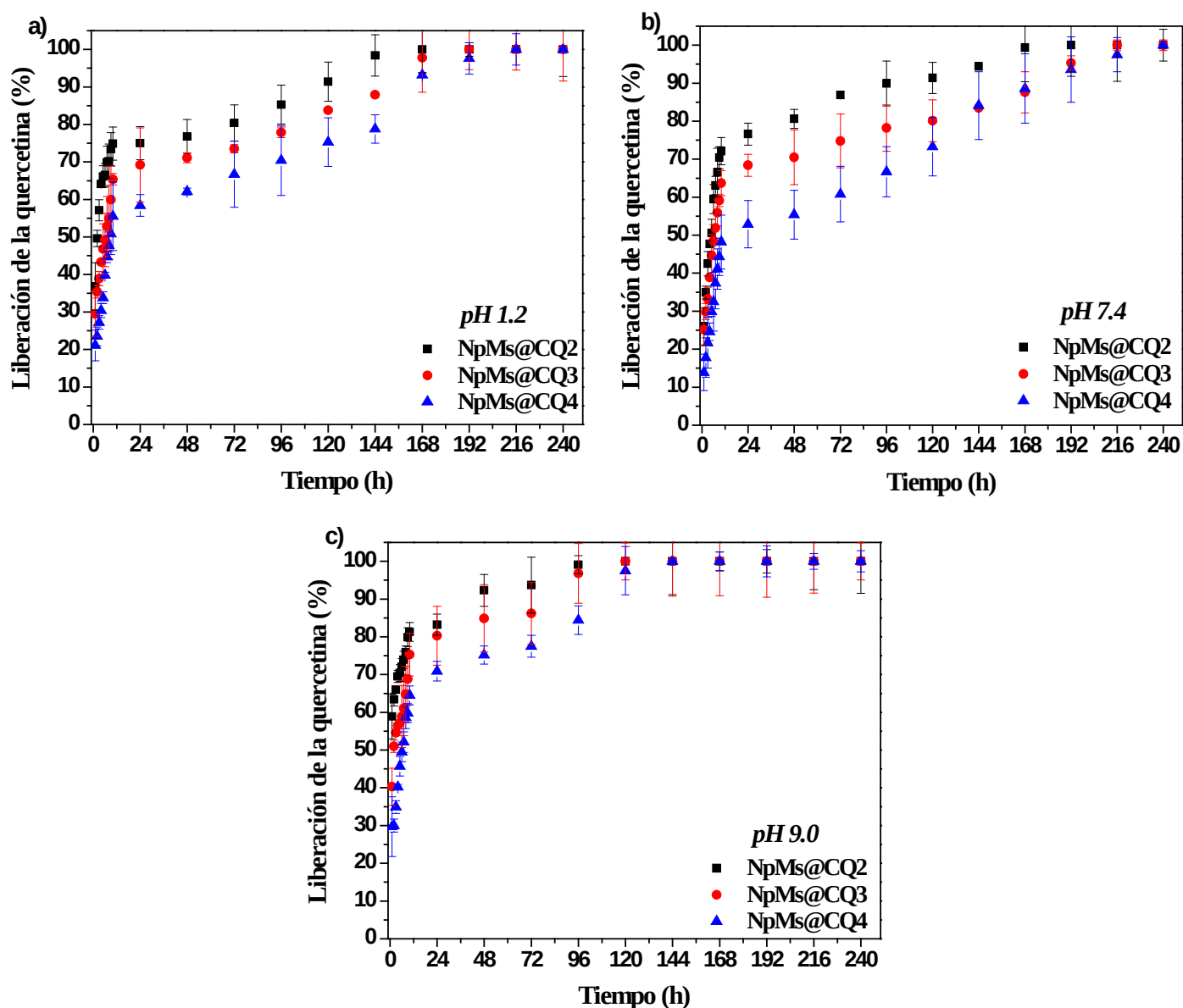


Figura 41. Perfil de liberación de la quercetina por medio de las NpMs@CMC/CHI-quercetina obtenidas a partir del estímulo de a) pH 1.2, b) pH 7.4 y c) pH 9.0.

De los perfiles cinéticos (% de fármaco liberado respecto a tiempo) se deduce el mecanismo de liberación del fármaco de las nanoplateformas magnéticas usadas en este trabajo. A pH 1.2 la degradación de la matriz polimérica gobierna la liberación. Mientras que a pH 7.4 el mecanismo liberación está dado por la difusión del fármaco. Por último, la liberación de pH 9.0 se rige por el proceso de hinchamiento de las capas. De las gráficas de liberación se observa también que las velocidades de liberación son mayor en el sistema NpMs@PSS/PAH-quercetina que en el sistema NpMs@CMC/CHI-quercetina. Esta

característica puede estar relacionada con la baja solubilidad entre la CHI-quercetina respecto a la solubilidad del sistema PAH-quercetina.

La liberación de los sistemas puede ser explicado de la siguiente manera:

a) La liberación de la quercetina a pH 9 (0.1 M de solución de NH_4Cl / NH_4OH) presentó una velocidad de liberación rápida, puede deberse a la desprotonación en las aminas del PAH (CHI), llevando a una fracción de carga del polielectrolito menor [142] reduciendo la interacción electrostática con los grupos carboxílicos de los polielectrolito negativo y los grupos fenólicos de la quercetina (ambos cargados negativamente). Esto provoca una desestabilización entre las capas de los polielectrolitos y como consecuencia las fuerzas de repulsión electrostática entre los grupos COO^- y los grupos fenólicos dominan el proceso de liberación, por lo tanto las moléculas de la quercetina asociadas a las capas de los polímeros adquieren una mayor velocidad de liberación.

b) Para la liberación de la quercetina a pH 7.4 (0.1 M de solución de NaH_2PO_4) presentó una velocidad de liberación baja, esto se puede atribuir a una pequeña protonación de los grupos aminas en la cadena de polielectrolito PAH (CHI) generando una baja fracción de carga (pero mayor que en el caso de pH 9), mientras que los grupos carboxílicos del polielectrolito y los grupos fenólicos de la quercetina tienen un valor de carga negativa mayor. El sistema tendrá por consecuencia multicapas con las cadenas de polielectrolitos de carga opuesta entrelazadas y extendidas, en este proceso la multicapa comenzará a hincharse gradualmente y desarrollará una arquitectura porosa o defectos locales que facilitarán la difusión de moléculas de fármaco hacia la solución [66] y por otro lado la interacción atractiva electrostática entre la quercetina y el polielectrolito podría atenuar la liberación del fármaco.

c) El comportamiento de liberación de la quercetina en valores de pH 1.2 (0.1 M de solución de HCl/KCl), está determinada por una fuerte interacción atractiva entre los grupos aminas del PAH (CHI) totalmente totalmente protonados y los grupos sulfatos (carboxílos) del PSS (CMC) y los grupos fenólicos de la quercetina muy débilmente protonado (prácticamente fracción de carga igual a cero), estas interacciones entre los grupos dan como resultados una liberación rápida de la quercetina. Sin embargo, esto no ocurre debido a que

la quercetina se asocia vía enlace de hidrogeno con el grupo NH_3^+ del polielctrolito [137] ocasionando una velocidad de liberación intermedia.

Asimismo, la velocidad de liberación en la fase inicial de la quercetina en ambos sistemas $\text{NpMs@PSS/PAH-quercetina}$ y $\text{NpMs@CMC/CHI-quercetina}$ disminuyó al aumentar el número de capas. Existe una aparente disminución de permeabilidad de la multicapa de polielectrolito al aumentar el número de capas. Además de los resultados experimentales de termogravimetría se encontró que el porcentaje de la cantidad de agua se reduce cuando aumenta el número de capas. Por lo que podemos concluir que la disminución del contenido de agua en las multicapas disminuye su permeabilidad y la movilidad de la quercetina decrece, lo que contribuye a una velocidad de liberación inicial menor [143]. Sin embargo, conforme pasa el tiempo, el fenómeno de degradación del polímero, así como hinchamiento de las cadenas de polielectrolito puede generar un aumento en la difusión del fármaco en la fase 2 y 3. Con el fin de comprender mejor el mecanismo de liberación (en todas las fases de liberación) se hicieron ajustes en las curvas experimentales de los perfiles de liberación (como se observa en las figuras 42 y 43) utilizando 2 modelos matemáticos *Korsmeyer-Peppas* y *Gallagher-Corrigan*, que toman en cuenta la solubilidad limitada de la quercetina, la degradación del polímero y difusión del soluto (fármaco). Los modelos se describieron en la sección 2.3.

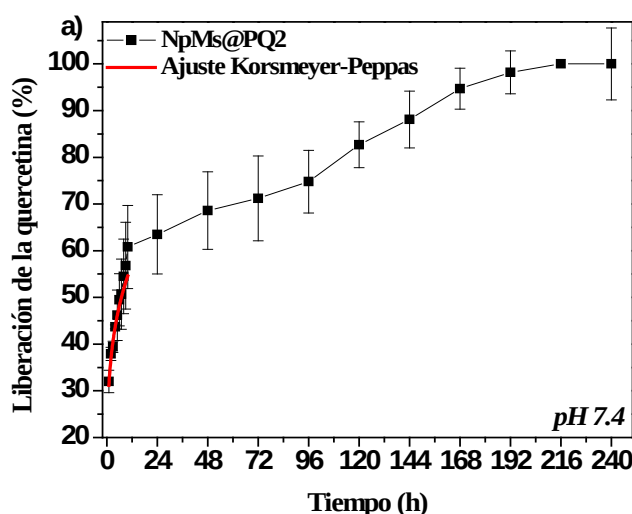


Figura 42. Ajuste del perfil de liberación de la muestra NpMs@PQ2 usando el modelo matemático Korsmeyer-Peppas (La línea de color rojo sólido representa el ajustada de los datos a través de la ecuación (4) de una liberación acumulativa < 60%) .

a) *Modelo matemático Korsmeyer-Peppas*

La tabla 10 indica los parámetros cinéticos obtenidos para la liberación de la quercetina a partir de los sistemas NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina en los pH 1.2, 7.4 y 9.0 a partir del ajuste de liberación presentados usando el modelo de Korsmeyer-Peppas. Se obtuvieron para los tres pH un coeficiente de correlación de alrededor de $R^2 \geq 0.9$, excepto para el sistema NpMs@ PSS/PAH-quercetina a pH 1.2 ($R^2 \geq 0.8$). Para todos los experimentos el valor del exponente n se encontró en un rango de (0.13 a 0.43), la liberación de la quercetina ocurre en algunos casos por el mecanismo de difusión de Fickiana cuando $n \sim 0.45$; sobre todo en la última capa en todos los sistemas. Este comportamiento se debe principalmente por una difusión que pasa a través de poros en la matriz polimérica (relacionada con la longitud de correlación de la red que forman las cadenas de polielectrolito entrelazadas en las multicapas) [72].

Tabla 10. Resultados obtenidos para liberación de la quercetina, utilizando el modelo Korsmeyer-Peppas.

NpMs@PSS/PAH quercetina	Muestra	pH 1.2			pH 7.4			pH 9.0		
		<i>k</i>	<i>n</i>	R^2	<i>k</i>	<i>n</i>	R^2	<i>k</i>	<i>n</i>	R^2
		41.85	0.13	0.8425	30.85	0.27	0.9672	60.00	0.16	0.9722
		26.85	0.29	0.8550	22.69	0.24	0.8901	52.27	0.16	0.9977
NpMs@CMC/CHI quercetina	Muestra	pH 1.2			pH 7.4			pH 9.0		
		<i>k</i>	<i>n</i>	R^2	<i>k</i>	<i>n</i>	R^2	<i>k</i>	<i>n</i>	R^2
		36.99	0.30	0.9941	25.84	0.40	0.9900	58.90	0.14	0.9578
		28.55	0.31	0.9840	23.21	0.31	0.9675	42.31	0.20	0.9067
NpMs@CMC/CHI quercetina	Muestra	pH 1.2			pH 7.4			pH 9.0		
		<i>k</i>	<i>n</i>	R^2	<i>k</i>	<i>n</i>	R^2	<i>k</i>	<i>n</i>	R^2
		18.23	0.34	0.9274	16.25	0.42	0.8673	25.92	0.35	0.9499

R^2 coeficiente de correlación al cuadrado, k (h^{-n}) es la constante del sistema y n es el exponente difusional que depende de la geometría de la partícula

b) Modelo Gallagher–Corrigan.

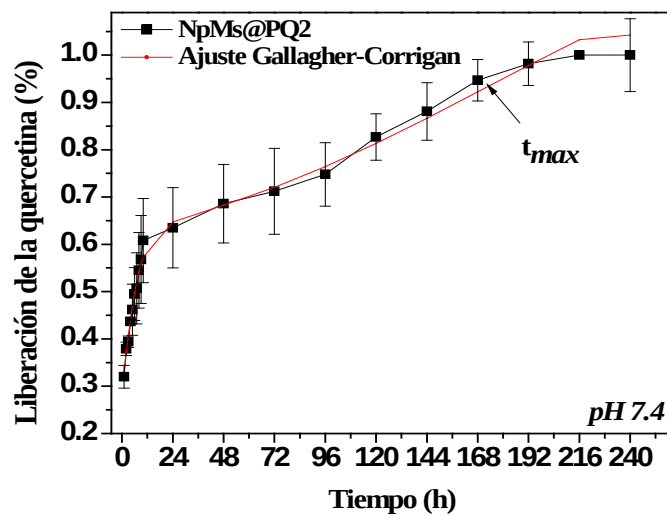


Figura 43. Ajuste del perfil de liberación de la muestra NpMs@PQ2 usando el modelo matemático Gallagher-Corrigan.

Los resultados de los ajustes usando el modelo Gallagher-Corrigan se muestran en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Resultados obtenidos para liberación de la quercetina para el sistema NpMs@PSS/PAH-quercetina, utilizando el modelo Gallagher–Corrigan.

Muestra	<i>pH 1.2</i>					<i>pH 7.4</i>				
	f_B	k_1	k_2	t_{max}	R^2	f_B	k_1	k_2	t_{max}	R^2
NpMs@PQ2	0.27	0.163	0.010	234.3	0.9612	0.19	0.207	0.011	171.8	0.9885
NpMs@PQ3	0.21	0.155	0.015	173.7	0.9531	0.16	0.198	0.016	178.8	0.9618
NpMs@PQ4	0.23	0.074	0.017	191.8	0.9227	0.14	0.131	0.020	187.5	0.9004

Muestra	<i>pH 9.0</i>				
	f_B	k_1	k_2	t_{max}	R^2
NpMs@PQ2	0.23	0.272	0.002	116.5	0.9958
NpMs@PQ3	0.20	0.220	0.010	69.4	0.9983
NpMs@PQ4	0.18	0.242	0.014	94.3	0.9852

Las unidades de k_1 & k_2 son h^{-1}

La cinética de liberación de la quercetina obtenida sugiere que el proceso es por difusión durante la liberación inicial (ráfaga) y luego por una degradación del polímero que alguna veces es el factor de control en la liberación. También se observa que al incrementar

el número de capas disminuye la liberación inicial (k_1), sin embargo, k_2 aumenta con el número de capas y esta relacionado con tiempos largos donde fenómenos de aumento de poros y defectos locales debido al entrelazamiento de polielectrolito pueden generarse facilitando así la difusión de moléculas de la quercetina hacia el solvente.

Tabla 12. Resultados obtenidos para liberación de la quercetina para el sistema NpMs@CMC/CHI-quercetina, utilizando el modelo de Gallagher–Corrigan.

Muestra	pH 1.2					pH 7.4				
	f_B	k_1	k_2	t_{max}	R^2	f_B	k_1	k_2	t_{max}	R^2
NpMs@CQ2	0.25	0.418	0.015	181.0	0.9919	0.28	0.177	0.015	232.2	0.9453
NpMs@CQ3	0.24	0.187	0.016	196.8	0.9842	0.25	0.162	0.017	230.4	0.9587
NpMs@CQ4	0.20	0.153	0.017	189.9	0.9128	0.17	0.131	0.017	171.0	0.8325

Muestra	pH 9.0				
	f_B	k_1	k_2	t_{max}	R^2
NpMs@CQ2	0.15	0.220	0.008	9.429	0.9954
NpMs@CQ3	0.22	0.194	0.011	113.3	0.9800
NpMs@CQ4	0.25	0.168	0.025	150.7	0.9611

Las unidades de k_1 & k_2 son h^{-1}

6.2. Efecto de la magnetohipertermia sobre la liberación del fármaco de las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina

Con el objeto de estimular (y controlar) la liberación del fármaco en células cancerosas por medio de campos magnéticos externos no invasivos se realizaron medidas de magnetohipertermia para evaluar su efecto sobre la liberación del fármaco y calentamiento de las nanoplataformas magnéticas.

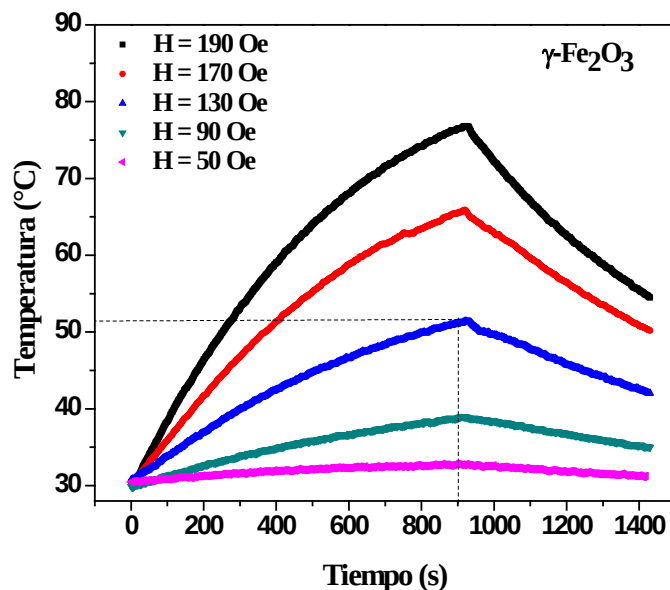


Figura 44. Variación de la temperatura de las nanopartículas de maghemita en función del tiempo en diferentes campos magnéticos alternos.

La figura 44 muestra la variación de la temperatura de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a diferentes campos magnéticos alternos. Se observa que a medida que aumenta el campo magnético también aumenta la temperatura de la solución que contiene las nanoplateformas magnéticas, lo que se deduce que las partículas magnéticas en campos magnéticos alternos se comportan como generadores de calor [47, 48]. La temperatura de las nanopartículas a 50 Oe, 90 Oe, 130 Oe, 170 Oe y 190 Oe del campo magnético alterno alcanzó temperaturas máximas de 33, 39, 51, 67 y 76 °C, respectivamente en un tiempo de 900 segundos.

Basándose en los resultados anteriores, el campo magnético alterno que se utilizó para los análisis de liberación de fármaco en los sistemas NpMs@Polielectrolitos-quercetina fue de 130Oe, la justificación aquí es que el sistema de NpMs produjo una conversión energética (campo magnético a calor) que generó una temperatura razonable de 51 °C (*hipertermia moderada*). Cabe mencionar que diferentes parámetros como aglomeración, material usado para modificar a la superficie de las nanopartículas, solvente, frecuencia, cambian el valor de temperatura del sistema [144, 145, 146].

La figura 45 muestra la variación de la temperatura en función del tiempo de soluciones que contiene las NpMs@PSS/PAH y NpMs@CMC/CHI con quercetina cuando se aplica un campo magnético alterno con magnitud 130Oe y frecuencia de 326kHz. Se observa que la variación de la temperatura en la solución acuosa disminuye a medida que

incrementa el número de capas sobre las nanopartículas. Por otro lado, los resultados muestran que la temperatura del sistema natural (NpMs@CMC/CHI) es ligeramente mayor que en el sistema sintético (NpMs@PSS/PAH).

Además, observamos un efecto de las multicapas de polielectrolitos sobre la temperatura de la solución que contiene solamente las NpMs. La temperatura disminuye de un 27 a 35 % para las multicapas @PSS⁻/PAH⁺ y de un 25 a 33 % para las multicapas @CMC⁻/CHI⁺. El resultado sugiere que la capacidad calorífica efectiva de NpMs@polielectrolito disminuye respecto a la capacidad calorífica de la NpMs sin recubrimiento, es decir, los polielectrolitos contribuyen con un efecto de menor conducción de calor en el sistema. La desventaja de este fenómeno es la prácticamente nula hipertermia en el sistema (la temperatura generada está por encima en ± 1 grado de la temperatura normal del organismo humano), sin embargo, se tiene una ventaja el cual consiste en preservar la biofuncionalidad química del fármaco a estas temperaturas.

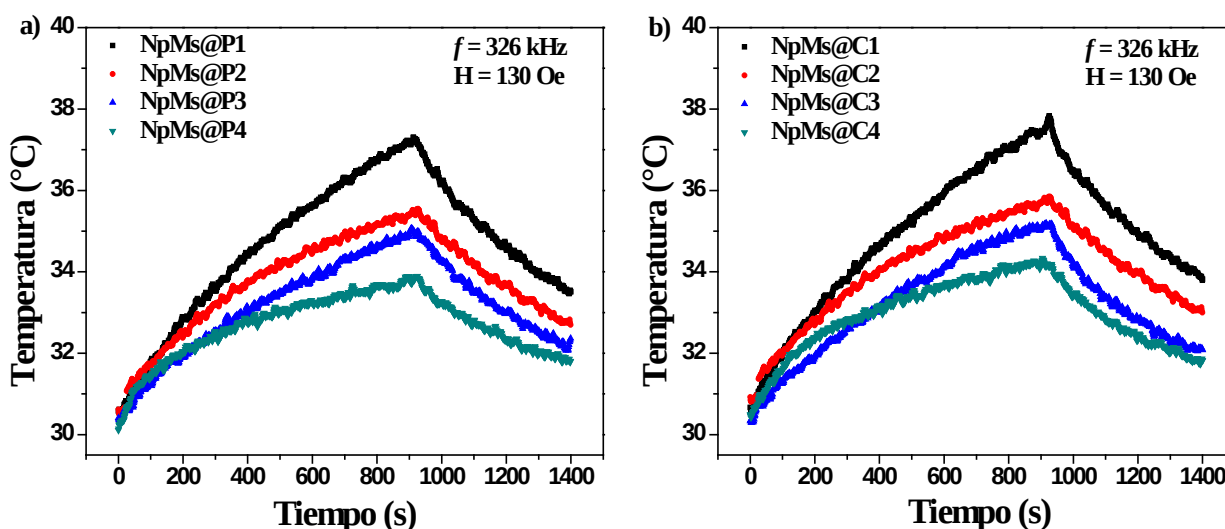


Figura 45. Variación de temperatura en función del tiempo obtenida para a) NpMs@PSS/PAH y b) NpMs@CMC/CHI

En la figura 46 se muestra la eficiencia de la liberación de la quercetina de las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina en 0.1 M de solución de NaH_2PO_4 a pH 7.4, sometida al campo magnético de 130 Oe y con una frecuencia de 326 kHz y posteriormente analizadas por espectroscopia de UV-Vis. En ambos casos se observa que la liberación de la quercetina ocurrió mucho más rápida después de la aplicación del

campo magnético si se compara con la liberación por pH. Por ejemplo la liberación NpMs@P2 fue necesario 10 h para la liberación ~60 % de quercetina (figura 40 b), mientras que este mismo porcentaje de quercetina fue liberado en apenas 180 s después de la aplicación del campo magnético. De esta forma el mecanismo de liberación de la quercetina después de la aplicación del campo magnético se pueda dar por un mayor grado de permeabilidad en la multicapa relacionado con la capacidad del nucleo magnético de transformar la energía magnética en calor, es decir, una movilidad mayor de las cadenas poliméricas al aumentar la temperatura y así obtener una cinética grande de liberación de la quercetina hacia el medio externo [147].

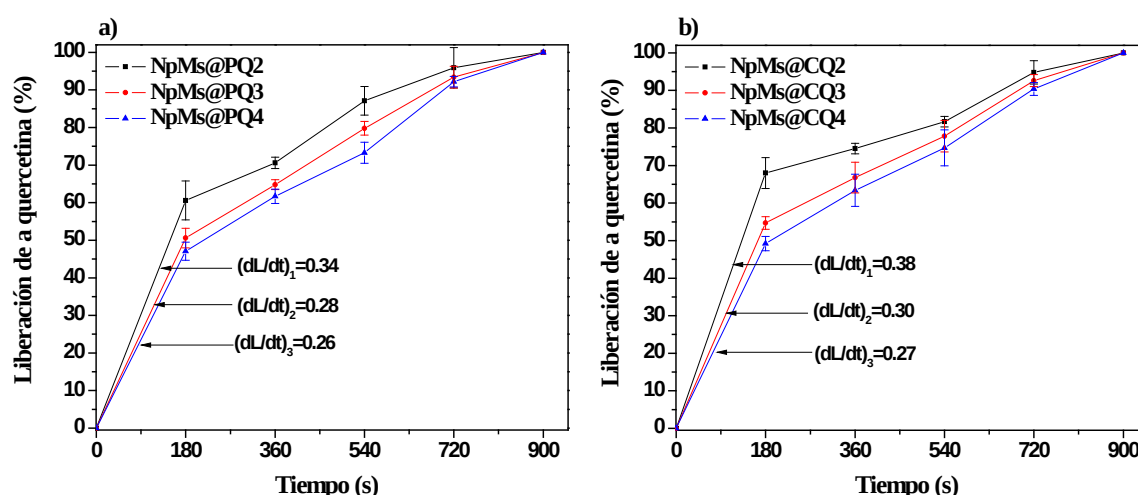


Figura 46. Perfil de liberación de la quercetina a partir de las a) NpMs@PSS/PAH-quercetina, y b) NpMs@CMC/CHI-quercetina obtenidas después de la aplicación del campo magnético 130 Oe en la frecuencia de 326 kHz.

Además de estos resultados podemos observar que el cambio de la liberación con el tiempo (dL/dt) en los primeros 180 s para NpMs@PQ2 (NpMs@QC2) presentan un dL/dt mayor que la muestra NpMs@PQ4 (NpMs@QC4). Este aumento en dL/dt se puede atribuir a una la mayor velocidad de liberación de la quercetina a través de las capas, sin embargo esta disminuye a medida que aumenta el número de capas en las nanopartículas. Se puede establecer que el campo magnético a la que se sometió a las NpMs@CMC/CHI-quercetina genera una mayor liberación de quercetina que las NpMs@PSS/PAH-quercetina y esto se puede asociarse a que los polielectrolito CMC y CHI presenta una menor estabilidad térmica que los polielectrolito PSS y PAH (un ablandamiento de la matriz polimérica más rápida).

6.3. Estudios de citotoxicidad de las *NpMs@PSS/PAH-quercetina* y *NpMs@CMC/CHI-quercetina*

En la figura 47 y 48 se muestra la citotoxicidad de las nanopartículas recubiertas con multicapas de polielectrolito con quercetina (*NpMs@PSS/PAH-quercetina* y *NpMs@CMC/CHI-quercetina*), quercetina libre y los polímeros magnéticos cargados de quercetina, quercetina libre y muestras en blanco (*NpMs@PSS/PAH* y *NpMs@CMC/CHI*) en células tumorales de ovario humano (A2780) después de 72 h de exposición.

En los experimentos realizados para acceder a la citotoxicidad de muestras sin quercetina (Figura 47), se observó que las muestras no mostraron actividad citotóxica significativa en cualquier concentración probada, probablemente debido a la presencia de un recubrimiento biocompatible y para las muestras *NpMs@PSS/PAH-quercetina* y *NpMs@CMC/CHI-quercetina* y la quercetina libre (figura 48), la viabilidad celular se vio comprometida significativamente ($P < 0,0001$) y mostró una actividad dependiente de la dosis a medida que la concentración de quercetina aumentaba de 40 a 100 μmol^{-1} . Estos resultados confirman la biocompatibilidad de los biomateriales CMC y CHI, además del comportamiento observado por Yu Zeng *et al.*, que reportaron que las capsulas de PSS/PAH no son tóxicas y que presentan una buena [148].

Junbo Zhou *et al.* observaron que la quercetina se puede utilizar como terapia antitumoral en el carcinoma ovárico humano mediante la inducción de la apoptosis [149]. Para verificar que nuestro sistema *NpMs@PSS/PAH-quercetina* y *NpMs@CMC/CHI-quercetina* pueda utilizarse como transportador para la administración de fármaco y pueda modular la vida o muerte celular en aplicaciones terapéuticas. Se realizaron experimentos de citotoxicidad de muestras con quercetina y quercetina libre (Figura 48). Los resultados nos permitieron observar que la quercetina libre redujo la viabilidad celular de 22.7% a 10.7%, sin embargo en las nanopartículas recubiertas con multicapas de polielectrolito con quercetina presentó una mayor viabilidad celular cuando se compara con quercetina libre, pero cabe señalar que en todos los casos se observó que a medida que se incrementa la concentración de la nanopartícula se redujo la viabilidad celular. Así mismo se observa que la viabilidad celular aumentó a medida que el número de capas de polielectrolito aumentó. Esto podría ser relacionado a la cantidad cada vez mayor de polielectrolito en cada capa y esto ocasiona que la quercetina quede atrapada entre las capas (menor difusión de la

quercetina) dificultando su pronta disponibilidad para el medio biológico y provocando una disminución en la citotoxicidad, lo cual hace suponer que podría ser bueno para una administración del fármaco lenta y constante en zonas específicas del organismo donde interesa que tengan efecto.

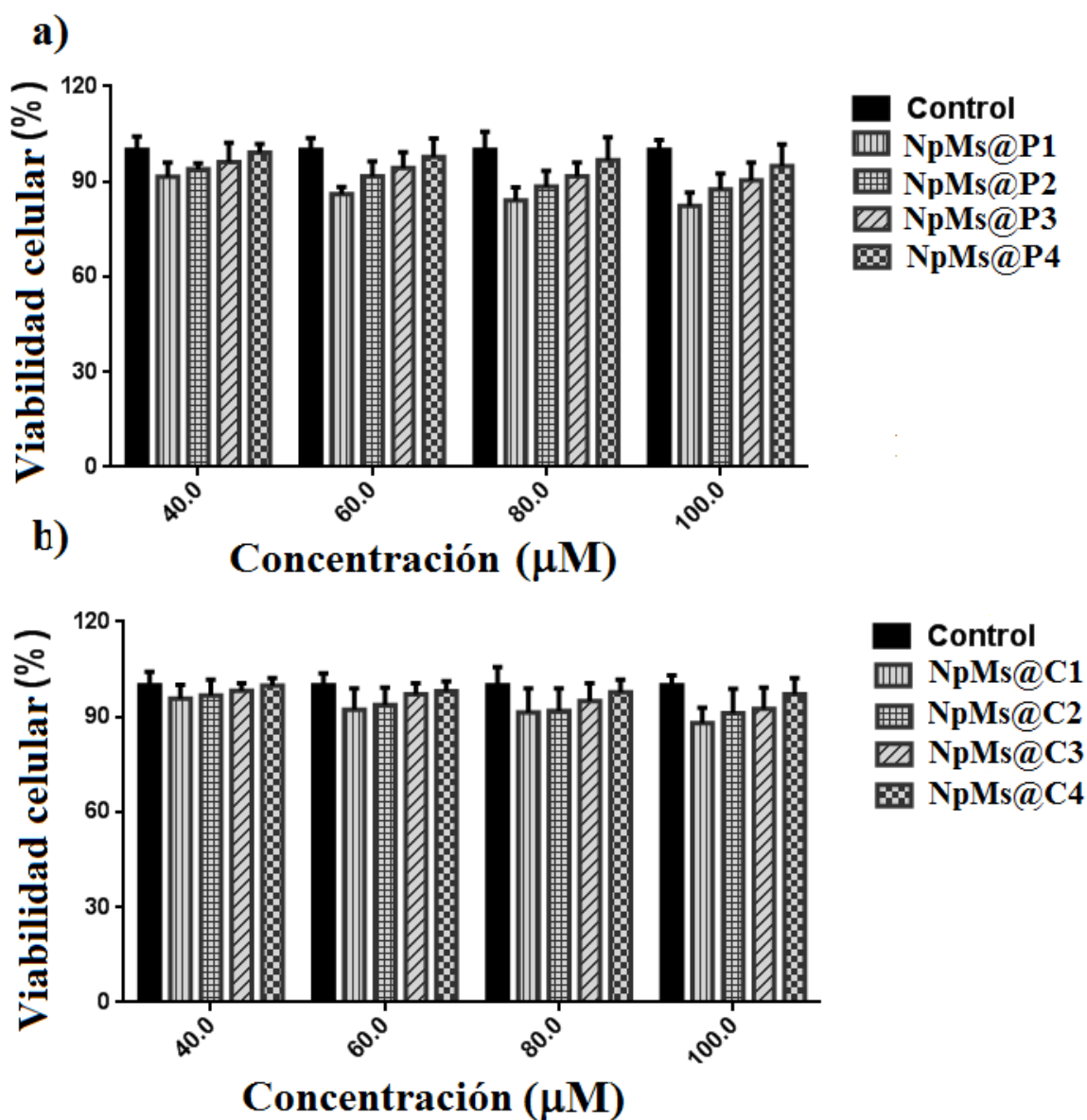


Figura 47. Porcentaje de viabilidad de células de muestras en blanco (sin quercetina): a) NpMs@PSS/PAH y b) NpMs@CHI/CMC después de 72 h de incubación. Ensayo de viabilidad por MTT. El agua ultrapura se usó como control negativo después de 72 h de incubación.

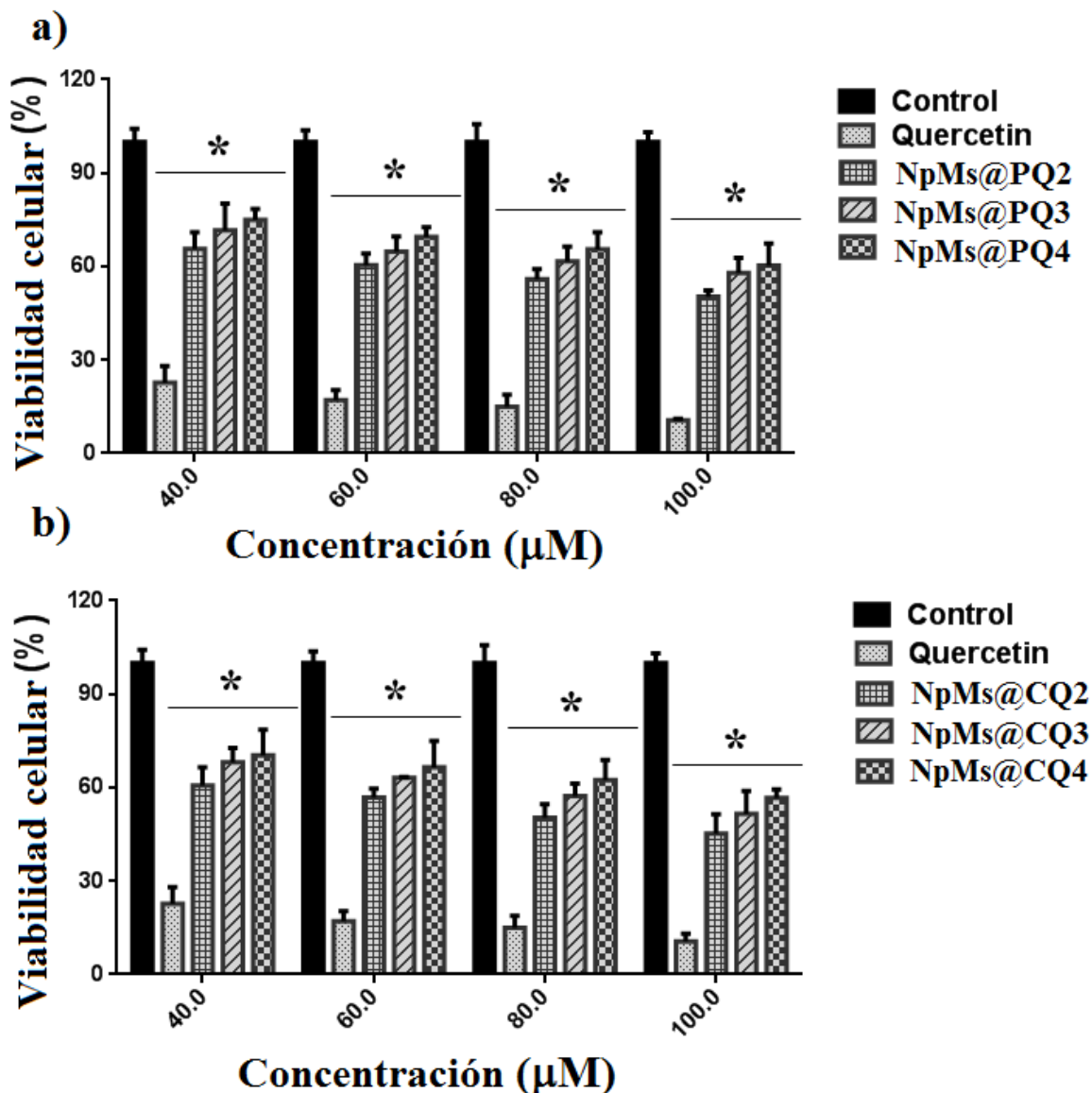


Figura 48. Porcentaje de viabilidad de las células de A2780 en presencia de quercetina libre y muestras cargadas de quercetina: a) NpMs@PSS/PAH-quercetina y b) NpMs@CMC/CHI-quercetina después de 72 h de incubación. Ensayo de viabilidad por MTT. El agua ultrapura se usó como control negativo. Significativamente diferente del control: * $P < 0.0001$.

6.4. Estudios de actividad microbiana de las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina

El efecto inhibitor del crecimiento dependiente del tiempo se realizó durante un período de 24 h con bacterias expuestas a la quercetina y la quercetina encapsuladas en la nanopartícula con multicapas de polielectrolitos. En este estudio, la disminución de la densidad óptica se interpretó como actividad inhibidora del crecimiento o bactericida. En las

figura 49 y 50 se puede observar que la quercetina libre muestra un efecto de inhibición significativo sobre el crecimiento de bacterias de *E. coli* y *B. subtilis* en comparación con el grupo control que contenía bacterias solamente. Además, este resultado indica no sólo la alta actividad antibacteriana de la quercetina libre sino que implica también su selectividad frente a las bacterias Gram-positivas [150].

El sistema PSS/PAH con quercetina presenta una inhibición más rápida en ambos sistemas (*E. coli* y *B. subtilis*) que el sistema CMC/CHI con quercetina. También, se observó que el sistema PSS/PAH exhibió un efecto de inhibición menor a medida que aumenta el número de capa debido a que la difusión y liberación de la quercetina es más lenta

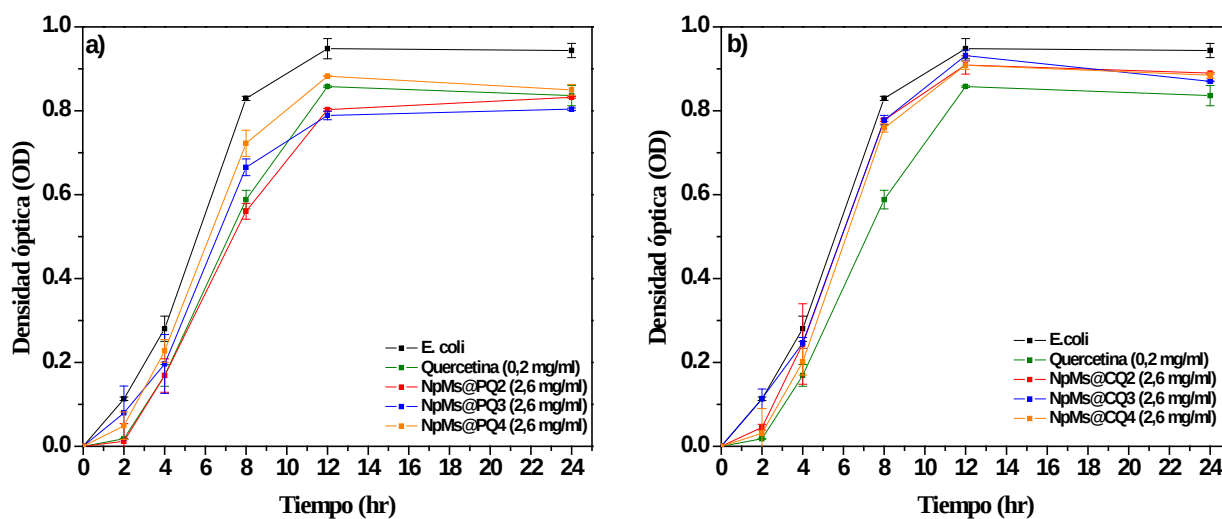


Figure 49. Curvas de crecimiento (densidad óptica) de *E. Coli* con quercetina libre y muestras cargadas de quercetina: a) NpMs@PSS/PAH-quercetina y b) NpMs@CMC/CHI-quercetina.

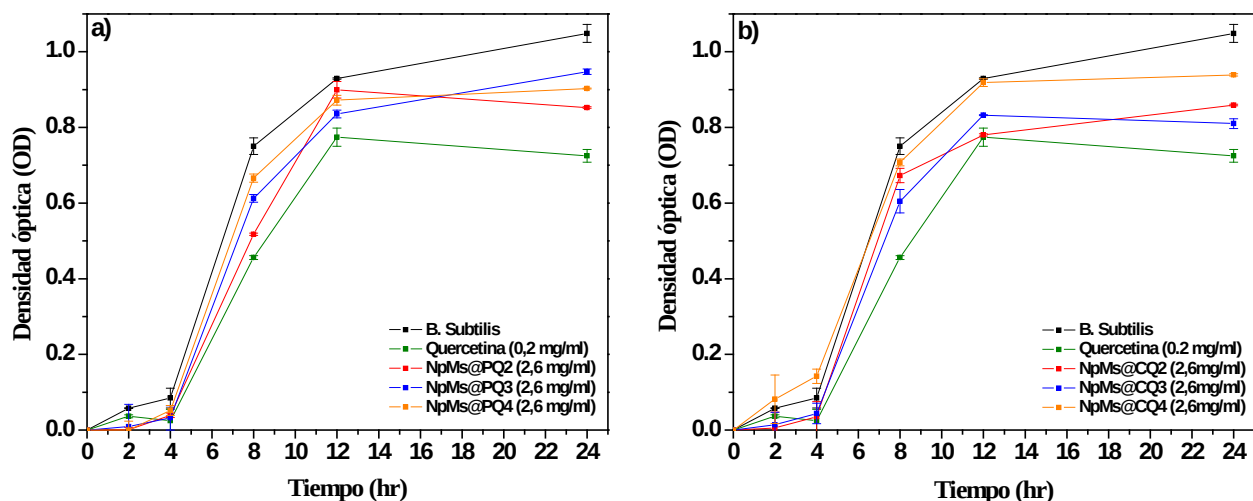


Figure 50. Curvas de crecimiento (densidad optica) de B. Subtilis con quercetina libre y muestras cargadas de quercetina: a) NpMs@PSS/PAH-quercetina y b) NpMs@CMC/CHI-quercetina.

6.5 Conclusiones

- El mecanismo de liberación a partir del modelo matemático Korsmeyer-Peppas y Gallagher-Corrigan sugiere que la quercetina presenta una difusión a través de la matriz polimérica por un el hinchamiento de la multicapa lo que provoca poros en la multicapa.
- Los perfiles de calentamiento de estas partículas expuestas a campos magnéticos alternos de varias intensidades y a frecuencias constante de 326 kHz muestran que las partículas de magnetita son más que capaces de alcanzar las temperaturas necesarias para lograr efectos de liberación y / o hipertermia estimuladas magnéticamente.
- Los estudios de liberación de quercetina por pH y por magnetohipertermia mostraron que la velocidad de liberación disminuye a medida que incrementa el número de capas.
- El efecto del campo magnético provocó una mayor velocidad de liberación de la quercetina respecto a la cinética de liberación obtenida por estímulos de pH (sin campo magnético).
- Las muestras de los sistemas NpMs@PSS/PAH y NpMs@CMC/CHI no mostraron actividad citotóxica.

- Las muestras de los sistemas NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina mostraron actividad citotóxica presentando una reducción de actividad citotóxica a medida que el número de capas de polielectrolito aumentó.
- Las muestras del sistema NpMs@PSS/PAH-quercetina presenta una inhibición más rápida en los sistemas E. coli y B. subtilis que el sistema NpMs@CMC/CHI-quercetina.

Capítulo 7. Conclusiones Generales

- Por el método de coprecipitación se obtuvieron partículas esféricas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con tamaño promedio de 8.83 nm y una polidispersidad de alrededor de 0.29 nm.
- Por difracción de rayos X se observó un ligero desplazamiento hacia ángulos más altos ($\sim 0.20^\circ$) confirmando el cambio de fase de magnetita (antes del proceso de oxidación) a maghemita (después del proceso de oxidación).
- Los experimentos de titulación conductimétrica y potenciométrica relevó que pH 4 es el pH óptimo para llevar a cabo la técnica LbL.
- Los valores del potencial zeta de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sin y con recubrimiento presentaron inversión de la carga superficial y el signo depende del número de la capa de polielectrolito.
- El potencial zeta de las nanoplateformas se modificó cuando el pH cambió y se debe principalmente a la protonación/desprotonación de los grupos presentes en la superficie. Este resultado está relacionado con los diagramas de especiación para cada sistema.
- FTIR mostró la interacción entre moléculas cargadas del polielectrolito y sitios cargados en la superficie de las nanopartículas.
- Los experimentos termogravimétricos de las NpMs recubiertas muestran un pequeño incremento en la estabilidad térmica de las multicapas adsorbidas cuando se compara con los polielectrolitos puros.
- Los resultados experimentales de magnetización muestran que la NpMs y NpMs@polielectrolito presentan propiedades superparamagnéticas.
- La incorporación de polielectrolitos sobre la superficie de la nanopartícula provoca una disminución de la magnetización de saturación, lo cual es similar al comportamiento observado en sistemas núcleo(magnético)@coraza(diamagnético o no magnético).
- La magnetización de saturación en sistemas NpMs@polielectrolitos no solamente depende de la parte diamagnética (no magnética) de la multicapa sino también de la

cooperatividad entre las cadenas de polielectrolito y la afinidad de ellas con la superficie magnética.

- Para los sistemas estudiados en este trabajo de tesis resultó tener una mejor cooperatividad las cadenas de los polímeros sintéticos (capa delgada) con una mejor afinidad en la superficie de NpMs que el caso de los polielectrolitos naturales (capa más gruesa), afectando así, fuertemente o débilmente, las interacciones con los espines ubicados en las regiones magnéticamente desordenadas en la superficie de la nanopartícula.
- Espectros de absorción de la quercetina presentan máximos de absorción (373, 380 y 331) nm que dependen del pH (1.2, 7.4 y 9.0). Esto indica modificaciones químicas que conllevan a cambios estructurales de la molécula.
- La eficiencia de encapsulación de quercetina fue significativamente mayor en las NpMs@CMC/CHI-quercetina, debido a que el CHI presenta mayor cantidad de grupos NH_3^+ que el caso PAH.
- Los estudios de espectroscopia infrarroja mostraron que la quercetina se encuentra en la matriz polimérica de las capas 2, 3 y 4 de los sistemas tanto sintéticos (NpMs@PSS/PAH-quercetina) como naturales (NpMs@CMC/CHI-quercetina).
- Las NpMs@polielectrolito-quercetina tiene un diámetro hidrodinámico mayor que las NpMs @polielectrolito sin quercetina, indicando un aumento de grosor de la multicapa.
- Se observó una mayor influencia del pH sobre el potencial zeta de las NpMs @polielectrolito-quercetina respecto a las NpMs @polielectrolito sin quercetina, lo que indica un fuerte efecto en las propiedades fisicoquímicas de las multicapas **PSS⁻/PAH⁺** y **CMC⁻/CHI⁺**.
- El análisis térmico de las nanopartículas recubiertas con multicapas de polielectrolito con quercetina demostraron una disminución en la estabilidad térmica cuando se compara con las nanopartículas recubiertas con multicapas de polielectrolito sin quercetina.
- A temperatura ambiente las NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina poseen comportamiento superparamagnético.

- El mecanismo de liberación a partir del modelo matemático Korsmeyer-Peppas y Gallagher-Corrigan sugiere que la quercetina presenta una difusión a través de la matriz polimérica por un el hinchamiento de la multicapa lo que provoca poros en la multicapa.
- Los perfiles de calentamiento de estas partículas expuestas a campos magnéticos alternos de varias intensidades y a frecuencias constante de 326 kHz muestran que las partículas de magnetita son más que capaces de alcanzar las temperaturas necesarias para lograr efectos de liberación y / o hipertermia estimuladas magnéticamente.
- Los estudios de liberación de quercetina por pH y por magnetohipertermia mostraron que la velocidad de liberación disminuye a medida que incrementa el número de capas.
- La liberación de quercetina después de la aplicación del campo magnético genera una mayor liberación de quercetina que la liberación por pH.
- Las muestras de los sistemas NpMs@PSS/PAH y NpMs@CMC/CHI no mostraron actividad citotóxica.
- Las muestras de los sistemas NpMs@PSS/PAH-quercetina y NpMs@CMC/CHI-quercetina mostraron actividad citotóxica presentando una reducción de actividad citotóxica a medida que el número de capas de polielectrolito aumentó.
- Las muestras del sistema NpMs@PSS/PAH-quercetina presenta una inhibición más rápida en los sistemas *E. coli* y *B. subtilis* que el sistema NpMs@CMC/CHI-quercetina.

Perspectivas

- Realizar la técnica LbL usando polielectrolitos con capacidades caloríficas mayores al propuesto en este trabajo con el fin de obtener una hipertermia mayor (temperaturas que puedan alcanzar mínimamente 42 °C)
- Investigaciones relacionadas con NpMs@polielectrolitos almacenando diferentes tipos de fármacos.
- Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas post-exposición a campo magnético, para observar la estabilidad química de la nanopartícula.
- Probar la actividad antimicrobiana de las NpMs@multicapas de polielectrolito en otros microorganismos patógenos.
- Realizar un estudio teóricos de los sistemas autoensamblados usados en este trabajo de tesis con simulaciones de dinámica molecular, con el objeto de entender el mecanismo de interacción entre las NpMs y polielectrolitos, cooperatividad entre las cadenas de polielectrolito y sus efectos sobre las propiedades magnéticas y de calor.

Bibliografía

- [1] M. S. Gudiksen, L. J. Lauhon, W. Jianfang, D. C. Smith y C. M. Lieber, «Growth of nanowire superlattice structures for nanoscale photonics and electronics,» *Nature*, vol. **415**, pp. 617-620, 2002.
- [2] P. Kohli, C. C. Harrell, Z. H. Cao, R. Gasparac, W. H. Tan y C. R. Martin, «DNA-functionalized nanotube membranes with single-base mismatch selectivity,» *Science*, vol. **1**, pp. 984-986, 2004.
- [3] C. L. d. Santos, P. Piquini, Y. N. Lima y T. M. Schmidt, «Low hole effective mass in thin InAs nanowires,» *Appl. Phys. Lett.*, vol. **96**, pp. 043111-3, 2010.
- [4] R. Y. Algra, M. A. Verheijen, M. T. Borgström, L.-F. Feiner, G. Immink, W. J. P. v. Enckevort, Y. Vlieg y Y. P. A. M. Bakkers, «Twinning superlattices in indium phosphide nanowires,» *Nature*, vol. **456**, pp. 369-372, 2008.
- [5] Y. J. Doh, J. A. v. Dam, A. L. Roest, Y. P. A. M. Bakkers, L. P. Kouwenhoven y S. D. Franceschi, «Tunable supercurrent through semiconductor nanowires,» *Science*, vol. **309**, pp. 272-5, 2005.
- [6] Q. Yuan, Y. P. Zhao, L. Li y T. Wang, «Ab Initio Study of ZnO-Based Gas-Sensing Mechanisms: Surface Reconstruction and Charge Transfer,» *J. Phys. Chem. C*, vol. **113**, pp. 6107-6113, 2009.
- [7] M. G. Harisinghani, J. Barentsz, P. F. Hahn, W. M. Deserno, S. Tabatabaei, C. H. v. d. Kaa, J. d. I. Rosette y R. Weissleder, «Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer,» *N. Engl. J. Med.*, vol. **348**, pp. 2491-9, 2003.
- [8] Y. M. Huh, Y. W. Jun, H. T. Song, S. Kim, J. S. Choi, J. H. Lee, S. Yoon, K. S. Kim, J. S. Shin, J. S. Suh y J. Cheon, «In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. **127**, pp. 12387-91, 2005.
- [9] M. E. Akerman, W. C. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia y E. Ruoslahti, «Nanocrystal targeting in vivo,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. **99**, pp. 12617-21, 2002.
- [10] X. H. Gao, Y. Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. Chung y S. Nie, «In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots,» *Nat. Biotechnol.*, vol. **22**, pp. 969-76, 2004.
- [11] S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. D. Grand, J. Lee, A. Nakayama, P. JA, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi y J. V. Frangioni, «Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping,» *Nat. Biotechnol.*, vol. **22**, pp. 93-7, 2004.

- [12] R. Duncan, «The dawning era of polymer therapeutics,» *Nat. Rev. Drug. Discov.*, vol.2, pp. 347- 60 , 2003.
- [13] T. M. Allen y P. R. Cullis, «Drug delivery systems: entering the mainstream,» *Science*, vol. **303**, pp. 1818-22 , 2004.
- [14] F. D. Jaeghere, E. Allemann, F. Kubel, B. Galli, R. Cozens, E. Doelker y R. Gurny, «Oral bioavailability of a poorly water soluble HIV-1 protease inhibitor incorporated into pH-sensitive particles: effect of the particle size and nutritional state.,» *J. Control Release*, vol. **68**, pp. 291-8 , 2000.
- [15] C. Olbrich, U. Bakowsky, C. M. Lehr, R. H. Muller y C. Kneuer, «Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA,» *J. Control Release*, vol. **77**, pp. 345-55, 2001.
- [16] E. Garcia-Garcia, K. Andrieux, S. Gil y P. Couvreur, «Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain?,» *Int. J. Pharm.*, vol. **298**, pp. 274-92, 2005.
- [17] F. Schlachetzki, Y. Zhang, R. J. Boado y W. M. Pardridge, «Gene therapy of the brain: The trans-vascular approach,» *Neurology*, vol. **62**, pp. 1275-81, 2004.
- [18] T. Neuberger., B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann y B. v. Rechenberg, «Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. **293**, pp. 483-493, 2005.
- [19] R. Pignatello, C. Bucolo, G. Spedalieri, A. Maltese y G. Puglisi, «Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application,» *Biomaterials*, vol. **23**, pp. 3247-55, 2002.
- [20] A. Ludwig, «The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery,» *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, vol. **57**, pp. 1595- 639, 2005.
- [21] A. E. John, N. W. Lukacs, A. A. Berlin, R. F. B. A. Palecanda, L. M. Stoolman y J. O. Nagy, «Discovery of a potent nanoparticle P-selectin antagonist with anti-inflammatory effects in allergic airway disease,» *FASEB J.*, vol. **17**, pp. 2296-8, 2003.
- [22] M. Kumar, X. Kong, A. K. Behera, G. R. Hellermann, R. F. Lockey y S. S. Mohapatra, «Chitosan IFN- γ -pDNA nanoparticle (CIN) therapy for allergic asthma,» *Genet Vaccines Ther.*, vol. **1**, pp. 1-10, 2003.
- [23] J. A. Rodríguez y M. Fernández-García, *Synthesis, Properties and Applications of Oxide Nanoparticles*, New Jersey: Ed. While, 2007.

- [24] V. V. Mody, R. Siwale, A. Singh y H. R. Mody, «Introduction to metallic nanoparticles,» *J. Pharm. Bioallied. Sci.*, vol. **2**, pp. 282-9, 2010.
- [25] R. M. Navalakhe y T. D. Nandedkar, «Application of nanotechnology in biomedicine,» *Indian J. Exp. Biol.*, vol. **45**, pp. 160-5 , 2007.
- [26] J. Dobson, «Magnetic nanoparticles for drug delivery,» *Drug. Dev. Res.* , vol. **67**, pp. 55-60 , 2006.
- [27] D. L. Huber, «Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles,» *Small*, vol. **1**, pp. 482-501, 2005.
- [28] A. B. Salunkhe, V. M. Khot y S. H. Pawar, « Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review,» *Curr. Top. Med. Chem.* , vol. **14**, pp. 572-94 , 2014.
- [29] I. M. Obaidat, B. Issa y Y. Haik, «Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia,» *Nanomaterials*, vol. **5**, pp. 63-89, 2015.
- [30] M. Ramos y C. Castillo, «Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas,» *Ide@s CONCYTEG*, vol. **6**, pp. 629- 646, 2011.
- [31] N. T. Thanh y L. A. Green, «Functionalization of nanoparticles for biomedical applications,» *Nano Today*, vol. **5**, pp. 213-230, 2010.
- [32] R. Subbiah, M. Veerapandian y K. S. Yun, «Nanoparticles: functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences,» *Curr. Med. Chem.* , vol. **17**, pp. 4559-77 , 2010.
- [33] B. Denizot, G. Tanguy, F. Hindre, E. Rump, J. J. Lejeune y P. Jallet, «Phosphorylcholine coating of iron oxide nanoparticles,» *J. Colloid Interface Sci.* , vol. **209**, pp. 66-77, 1999.
- [34] Y. Takakura, T. Fujita, M. Hashida y H. Sezaki, «Disposition characteristics of macromolecules in tumor-bearing mice,» *Pharm. Res.* , vol. **7**, pp. 339-46, 1990.
- [35] G. Decher, «Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites,» *Science*, vol. **277**, pp. 1232-1237, 1997.
- [36] Z. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo y N. A. Kotov, «Biomedical applications of Layer-by-Layer assembly: From biomimetics to tissue engineering,» *Adv. Mater.*, vol. **18**, pp. 3203-3224, 2006.
- [37] P. R. V. Tassel, «Polyelectrolyte adsorption and layer-by-layer assembly: electrochemical control,» *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. **17**, pp. 106-113, 2012.

- [38] Y. Lvov, K. Ariga y T. Kunitake, «Layer-by-Layer assembly of alternate protein/polyion ultrathin films,» *Chem. Lett.* , vol. **23**, pp. 2323-2326, 1994.
- [39] C. L. Cooper, P. L. Dubin, A. B. Kayitmazer y S. Turksen, «Polyelectrolyte–protein complexes,» *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* , vol. **10**, pp. 52-78, 2005.
- [40] C. S. Kumar y F. Mohammad, « Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery,» *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. **63**, pp. 789-808, 2011.
- [41] M. M. D. Villiers, D. P. OttO y Y. M. Lvov, «Application of electrostatic Layer-by-Layer nanocoating in drug delivery,» *Am. Pharm. Rev.* , vol. **15**, pp. 28-35, 2012.
- [42] A. G. Kolhatkar, A. C. Jamison, D. Litvinov, R. C. Willson y T. R. Lee, «Tuning the magnetic properties of nanoparticles,» *Int. J. Mol. Sci.* , vol. **14**, pp. 15977-16009, 2013.
- [43] U. Jeong, X. Teng, Y. Wang, H. Yang y Y. Xia, «Superparamagnetic colloids: Controlled synthesis and niche applications,» *Adv. Mater.* , vol. **19**, pp. 33-60, 2007.
- [44] D. Sirdeshmukh, L. Sirdeshmukh, K. Subhadra y C. Sunandana, *Electrical, Electronic and Magnetic Properties of Solids*, Springer, 2014.
- [45] M. Arruebo, R. Fernandez-Pacheco, M. Ibarra y J. Santamaria, «Magnetic nanoparticles for drug delivery,» *Nanotoday* , vol. **2**, pp. 22-32, 2007.
- [46] J. O. Márquez, «Estudio del superparamagnetismo: nanomagnetismo en partículas,» 2014.
- [47] A. B. Salunkhe, V. M. Khot y S. H. Pawar, «Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: A status review,» *Curr Top Med Chem*, vol. **14**, pp. 572-94, 2014.
- [48] A. E. Deatsch y B. A. Evans, «Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. **354**, pp. 163-172, 2014.
- [49] Q. A. P. J. Connolly, S. K. Jones y J. Dobson, «Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine,» *J. Appl. Phys D.* , vol. **36**, pp. R167–R181, 2003.
- [50] S. Amiri y H. Shokrollahi, «The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science,» *Mater Sci Eng C*, vol. **33**, pp. 1-8, 2013.
- [51] R. M. Cornell y U. Schwertmann, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Wiley, 2006.

- [52] R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs y J. Lewis, «Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity,» *Am. J. Roentgenol.* , vol. **152**, pp. 167-73, 1989.
- [53] A. G. Roca, R. Costo, A. F. Rebolledo, S. Veintemillas-Verdaguer, P. Tartaj, T. González-Carreño, M. P. Morales y C. J. Serna, «Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine,» *J. Phys. D Appl. Phys.*, vol. **42**, pp. 224002-224011, 2009.
- [54] H. Dautzenberg, W. Jaeger, J. Kötz, B. Philipp, C. Seidel y D. Stscherbina, *Polyelectrolytes - Formation, Characterization and Application*, Hanser/Gardner Publications, 1994.
- [55] J. Kötz, S. Kosmella y T. Beitz, «Self-assembled polyelectrolyte systems,» *Prog. Polym. Sci.*, vol. **26**, pp. 1199-1232, 2001.
- [56] J. Park, Y. Choi, K. Kim, H. Chung y D. Sohn, «Aggregation processes of a weak polyelectrolyte, poly(allylamine) hydrochloride,» *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. **29**, pp. 104, 2008.
- [57] G. Decher y J. B. Schlenoff., *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, Wiley-VCH, 2012.
- [58] T. Mendoza Dorantes, Tesis. Síntesis de nanopartículas de proteína encapsuladas en multicapas de polielectrolito de carga opuesta, Puebla, Pue.: BUAP, 2012.
- [59] U. Han, Y. Seo y J. Hong, «Effect of pH on the structure and drug release profiles of layer-by-layer assembled films containing polyelectrolyte, micelles, and graphene oxide,» *Sci. Rep.*, vol. **6**, pp. 1-10, 2016.
- [60] A. Chung y M. Rubner, «Methods of loading and releasing low molecular weight cationic molecules in weak polyelectrolyte multilayer films,» *Langmuir*, vol. **18**, pp. 1176–1183, 2002.
- [61] B. M. Wohl y J. F. J. Engbersen, «Responsive layer-by-layer materials for drug delivery,» *J. Control. Release*, vol. **158** , pp. 2-14, 2012.
- [62] M. M. D. Villiers y Y. M. Lvov, «Layer-by-layer self-assembled nanoshells for drug delivery,» *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. **63**, pp. 699-700, 2011.
- [63] F. Rossi, G. Perale y M. Masi, *Controlled Drug Delivery Systems*, Springer, 2016.
- [64] K. Pal, A. A. V. K. Singh, G. Thakur y M. K. Bhattacharya, «Hydrogel-based controlled release formulations: Designing considerations, characterization techniques and applications,» *Polym Plast Technol Eng*, vol. **52**, pp. 1391-1422, 2013.

- [65] R. A. Jain, «The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices,» *Biomaterials* , vol. **21**, pp. 2575-2490, 2000.
- [66] Y.-J. Yang, X. Tao, Q. Hou, Y. Ma, X.-L. Chen y J.-F. Chen, «Mesoporous silica nanotubes coated with multilayered polyelectrolytes for pH-controlled drug release,» *Acta Biomater*, vol. **6**, pp. 3092–3100, 2010.
- [67] P. L. Ritger y P. N. A., «A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices,» *J. Control. Release*, vol. **5**, pp. 37-42, 1987.
- [68] K. M. Gallagher y O. I. Corrigan, «Mechanistic aspects of the release of levamisole hydrochloride from biodegradable polymers,» *J Control Release*, vol. **69**, pp. 261–272, 2000.
- [69] T. Ci, L. Chen, L. Yu y J. Ding, «Tumor regression achieved by encapsulating a moderately soluble drug into a polymeric thermogel,» *Sci Rep.*, vol. **4**, pp. 1-13, 2014.
- [70] D. S. Roy y B. D. Rohera, «Comparative evaluation of rate of hydration and matrix erosion of HEC and HPC, and study of drug release from their matrices,» *Eur. J. Pharm. Sci.* , vol. **16**, pp. 193-199, 2002.
- [71] J. Siepmann y N. A. Peppas, «Modeling of drug delivery systems based on hydroxipropyl methycellulose (HPMC) ,» *Adv. Drug Deliv. Rev*, vol. **48**, pp. 139-157, 2001.
- [72] G. F. Gutiérrez Lopez, L. Alamilla Beltrán, M. del Pilar Buera, J. Welti Chanes, E. Parada Arias y G. V. Barbosa Cánovas, *Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems*, Springer , 2015.
- [73] M. Materska, «Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity - a review,» *Pol J Food Nutr Sci*, vol. **58**, pp. 407-413, 2008.
- [74] J.-S. Nam, A. R. Sharma, L. T. Nguyen, C. Chakraborty, G. Sharma y S.-S. Lee, «Application of bioactive quercetin in oncotherapy: From nutrition to nanomedicine,» *Molecules* , vol. **21**, pp. 1-23, 2016.
- [75] M. Buchweitz, P. A. Kroon, G. T. Rich y P. J. Wilde, «Quercetin solubilisation in bile salts: A comparison with sodium dodecyl sulphate,» *Food Chemistry*, vol. **211**, pp. 356–364, 2016.
- [76] E. S. El-Denshary, A. Aljawish, A. A. El-Nekeety, N. S. Hassan, R. H. Saleh, B. H. Rihn y M. A. Abdel-Wahhab, «Possible synergistic effect and antioxidant properties of chitosan nanoparticles and quercetin against carbon tetrachloride-induce hepatotoxicity in rats,» *Soft Nanoscience Letters*, vol. **5**, pp. 36-51 , 2015.

- [77] P. Mukhopadhyay y A. K. Prajapati, «Quercetin in anti-diabetic research and strategies for improved quercetin bioavailability using polymer-based carriers – a review,» *RSC Adv*, vol. **5**, pp. 97547–97562, 2015.
- [78] B. C. P. Coelho, E. R. Siqueira, A. S. Ombredane, G. A. Joanitti, S. B. Chaves, S. W. d. Silva, J. A. Chaker, J. P. F. Longo, R. B. Azevedo, P. C. Morais y M. H. Sousa, «Maghemite–gold core–shell nanostructures (γ -Fe₂O₃@Au) surface-functionalized with aluminium phthalocyanine for multi-task imaging and therapy,» *RSC Adv.*, vol. **7**, pp. 11223–11232, 2017.
- [79] M. H. Sousa, F. A. Tourinho, J. Depeyrot, G. J. d. Silva y M. F. L. Lara, «New electric double-layered magnetic fluids based on Copper, Nickel, and Zinc Ferrite Nanostructures,» *J. Phys. Chem. B*, vol. **105**, pp. 1168, 2001.
- [80] M. H. Sousa, F. A. Tourinho y J. C. Rubim, «Use of Raman micro-spectroscopy in the characterization of MIIFe₂O₄ (M = Fe, Zn) electric double layer ferrofluids,» *J. Raman Spectrosc.*, vol. **31**, pp. 185-191, 2000.
- [81] M. INSTRUMENTS. [En línea]. Available: http://malvern.com/LabEng/products/iwtm/zeta_potential.htm.
- [82] A. F. C. Campos, F. A. Tourinho, G. J. d. Silva, M. C. F. L. Lara y J. Depeyrot, «Nanoparticles superficial density of charge in electric double layered magnetic fluid: A conductimetric and potentiometric approach,» *Eur. Phys. J. E*, vol. **6**, pp. 29-35, 2001.
- [83] S. Farris, L. Mora, G. Capretti y L. Piergiovanni, «Charge density quantification of polyelectrolyte polysaccharides by conductometric titration: an analytical chemistry experiment,» *J. Chem. Educ.*, vol. **89**, pp. 121-124, 2012.
- [84] Francis Mark, Herman, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Consise.
- [85] Chen Sun, Qinglai Tian, Yuchun Xie y H Liu, «Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction,» *Colloids Surf. A*, vol. **305**, pp. 42-47, 2007.
- [86] A. Luis Parize, Tese. Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma, Florianópolis – SC : Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- [87] P. Sylvester, « Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability,» *Methods Mol. Biol.*, vol. **716**, pp. 157-168, 2011.
- [88] T. Mosmann, «Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays,» *J. Immunol. Methods*, vol. **65**, pp. 55-63, 1983.

- [89] H. Sun y G. T. Liu, «Inhibitory effect of anti-hepatitis drug bicyclol on invasion of human hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells with high metastasis potential and its relative mechanisms,» *J. Asian Nat. Prod. Res.*, vol. **11**, pp. 576-583 , 2009.
- [90] Junshe Zhang, Ayeong Byeon y Jae W. Lee, «Boron-doped carbon–iron nanocomposites as efficient oxygen reduction electrocatalysts derived from carbon dioxide,» *Chem. Commun.*, vol. **50**, pp. 6349, 2014.
- [91] D. Predoi, E. Andronescu, M. Radu, M. C. Munteanu y A. Dinischiotu, «Synthesis and characterization of bio-compatible maghemite nanoparticles,» *Dig J Nanomater Biostruct*, vol. **5**, pp. 779, 2010.
- [92] Ramos Guivar, J. A.; Isaías Martínez, A.; Osorio Anaya, A.; De Los Santos Valladares, L.; León Félix, L.; Bustamante Dominguez, A., «Structural and magnetic properties of monophasic maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanocrystalline powder,» *Advances in Nanoparticles*, vol. **3**, pp. 114, 2014.
- [93] Drummond , A. L. ; Feitoza, N. C. ; Duarte, G. C. ; Sales, M. J. A. ; Silva, L. P. ; Bakuzis, A. F. ; Sousa, M. H., «Reducing size-dispersion in one-pot aqueous synthesis of maghemite nanoparticles,» *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. **12**, pp. 1, 2012.
- [94] Wonbaek Kim; Chang-Yul Suh; Sung-Wook Cho; Ki-Min Roh; Hanjung Kwon; Kyungsun Song; In-Jin Shon, «A new method for the identification and quantification of magnetite–maghemite mixture using conventional X-ray diffraction technique,» *Talanta*, vol. **94**, pp. 348, 2012.
- [95] M. P. Silva, A. L. Drummond, V. R. R. Aquino, L. P. Silva, R. B. Azevedo, M. J. A. Sales, P. C. Morais, A. F. Bakuzis y M. H. Sousa, «Facile green synthesis of nanomagnets for modulating magnetohyperthermia: tailoring size, shape and phase,» *RSC Adv.*, vol. **7**, pp. 47669–47680, 2017.
- [96] Lucas, I.; Durand-Vidal, S.; Dubois, E.; Chevalet, J.; Turq, P., «Surface charge density of maghemite nanoparticles: Role of electrostatics in the proton exchange,» *J. Phys. Chem. C*, vol. **111**, pp. 18568, 2007.
- [97] Visakh, P. M. ; Bayraktar, O.; Picó, G. A., *Polyelectrolytes Thermodynamics and Rheology*, Springer, 2014.
- [98] N. C. Feitoza, T. D. Goncalves, J. J. Mesquita, J. S. Menegucci, M. K. M. S. Santos, J. A. Chaker, R. B. Cunha, A. M. M. Medeiros, J. C. Rubim y M. H. Sousa, «Fabrication of glycine-functionalized maghemite nanoparticles for magnetic removal of copper from wastewater,» *J. Haz. Mat.*, vol. **264**, pp. 153-160, 2014.

- [99] Campos, A.F.C. ; Tourinho, F.A. ; da Silva, G.J. ; Lara, M.C.F.L. ; Depeyrot, J., «Nanoparticles superficial density of charge in electric double layered magnetic fluid: A conductimetric and potentiometric approach,» *Eur. Phys. J. E*, vol. **6**, pp. 29, 2001.
- [100] E. Illés y E. Tombácz, «The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles,» *J Colloid Interface Sci*, vol. **295**, pp. 115, 006.
- [101] F. P. Ramanery, A. A. Mansur y H. S. Mansur, «One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates,» *Nanoscale Res Lett* , vol. **8**, pp. 512, 2013.
- [102] Fu, J; Ji, J.; Yuan, W.; Shen, J., «Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan,» *Biomaterials*, vol. **26**, pp. 6684, 2005.
- [103] Radeva, T.; Kamburova, K.; Petkanchin, I., «Radeva, T., Kamburova, K., Petkanchin, I., «Formation of polyelectrolyte multilayers from polysaccharides at low ionic strength,» *J. Colloid Interface Sci*, vol. **298**, pp. 59, 2006.
- [104] Yoo, D.; Shiratori, S.S., S. S.; Rubner, M. F., «Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes,» *Macromolecules*, vol. **31**, pp. 4309, 1998.
- [105] Choi, J.; Rubner, M. F., «Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly,» *Macromolecules*, vol. **38**, pp. 116, 2005.
- [106] J. S. Fritz, D. T. Gjerde, *Ion Chromatography*, Wiley-VCH, 2009.
- [107] Mousa Nazari; Nahid Ghasemi; Heydar Maddah; Mohammad Mousavi Motlagh, «Synthesis and characterization of maghemite nanopowders by chemical precipitation method,» *Nanostruct Chem*, vol. **4**, pp. 99, 2014.
- [108] Snyder, R. G. ; Hsut, S. L. ; Krimm, S., «Vibrational spectp in the C-H stretching region and the structure of the polymethylene chain,» *Spectrochim. Acta Mol*, vol. **34**, pp. 395, 1978.
- [109] Lu Yue; Suqing Wang; Xinyue Zhao; Lingzhi Zhang, «Nano-silicon composites using poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrenesulfonate) as elastic polymer matrix and carbon source for lithium-ion battery anode,» *J. Mater. Chem.*, vol. **22**, pp. 1094, 2012.
- [110] Chakkarapani, P; Subbiah, L.; Palanisamy, S.; Bibiana, A.; Ahrentorp, F.; Jonasson, C.; Johansson, C, «Encapsulation of methotrexate loaded magnetic microcapsules for magnetic drug targeting and controlled drug release,» *J. Magn. Magn. Mater*, vol. **380**, pp. 285, 2015.

- [111] Theophile Theophanides, «Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites,» de *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, InTech, 2012.
- [112] Pasqui, Daniela ; De Cagna, Milena ; Barbucci, Rolando, «Polysaccharide-based hydrogels: the key role of water in affecting mechanical properties,» *Polymers*, vol. **4**, pp. 1517, 2012.
- [113] Jing Wang; P. Somasundaran, «Adsorption and conformation of carboxymethyl cellulose at solid–liquid interfaces using spectroscopic, AFM and allied techniques,» *J. Colloid Interface Sci*, vol. **291**, pp. 75, 2005.
- [114] Bakandritsos, A.; Mattheolabakis, G.; Chatzikyriakos, G.; Szabo, T.; Tzitzios, V.; Kouzoudis, D.; Couris, S.; Avgoustakis, K., «Doxorubicin nanocarriers based on magnetic colloids with a bio-polyelectrolyte corona and high non-linear optical response: synthesis, characterization, and properties,» *Adv. Funct. Mater.*, vol. **21**, pp. 1465, 2011.
- [115] I. Korus, «Heavy metals complexes of poly(sodium 4-styrenesulfonate) — thermogravimetric studies,» *Polimery* , vol. **57**, pp. 290, 2012.
- [116] Jinglong Bu, Zhengyi Jiang y Sihai Jiao , «Synthesis and Thermal Property of Poly(Allylamine Hydrochloride),» *Adv. Mat. Res.*, vol. **150-15**, pp. 1480-1483, 2011.
- [117] Lin Shao y Jodie L. Lutkenhaus, «Thermochemical properties of free-standing electrostatic layer-by-layer assemblies containing poly(allylamine hydrochloride) and poly(acrylic acid),» *Soft Matter*, vol. **6**, pp. 3363, 2010.
- [118] Jinhui Pang, Xin Liu , Xueming Zhang, Yuying Wu y Runcang Sun, «Fabrication of cellulose film with enhanced mechanical properties in ionic liquid 1-Allyl-3-methylimidazolium chloride (AmimCl),» *Materials*, vol. **6**, pp. 1270, 2013.
- [119] Yuting Ye, Xiaohua Zhang, Fancheng Meng, Jingna Zhao y Qingwen Li, «Enhancing interfacial adhesion and functionality of carbon nanotube fibers with depolymerized chitosan,» *J. Mater. Chem. C*, vol. **1**, pp. 2009, 2013.
- [120] E. F. Ferrari, F. C. S. da Silva, M. Knobel, «Influence of the distribution of magnetic moments on the magnetization and magnetoresistance in granular alloys,» *Phys. Rev. B*, vol. **56**, p. 6086, 1997.
- [121] C. Kittel, *Introduction to Solid State Physics* 8th Edition, New York: Wiley, 2004.
- [122] J. Gomes, M. Sousa, G. d. Silva, F. Tourinho, J. Mestnik-Filho, R. Itri, G. M. Azevedo y J. Depeyrot, «Cation distribution in copper ferrite nanoparticles of ferrofluids: A synchrotron XRD and EXAFS investigation,» *J. Magn. Magn. Mater*, vol. **300**, pp. e213-e216, 2006.

- [123] E. C. Sousa, C. R. Alves, R. Aquino, M. H. Sousa, G. F. Goya, H. R. Rechenberg, F. A. Tourinho y J. Depeyrot, «Experimental evidence of surface effects in the magnetic dynamics behavior of ferrite nanoparticles,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. **289**, p. 118–121, 2005.
- [124] J. d. S. Menegucci, M. K. M. S. Santos, D. J. S. Dias, J. A. Chaker y M. H. Sousa, «One-step synthesis of magnetic chitosan for controlled release of 5-hydroxytryptophan,» *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. **380**, pp. 117–124, 2015.
- [125] Wong, John E.; Gaharwar, Akhilesh K. ; Schulte, Detlef M.; Bahadur, Dharendra ; Richtering, Walter, «Magnetic Nanoparticle–Polyelectrolyte Interaction: A Layered Approach for Biomedical Applications,» *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. **8**, pp. 4033, 2008.
- [126] Ganeshlenin Kandasamy; Dipak Maity, «Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics,» *Int. J. Pharm.*, vol. **496**, pp. 191, 2015.
- [127] Lu; An-Hui, Salabas; E.L., Schüth; Ferdi, «Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application,» *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. **46**, pp. 1222 – 1244, 2007.
- [128] C. R. Vestal y Z. J. Zhang, «Effects of surface coordination chemistry on the magnetic properties of MnFe₂O₄ spinel ferrite nanoparticles,» *J. Am. Chem. Soc.*, vol. **125**, pp. 9828-9833, 2003.
- [129] Martin Turesson, Clifford E. Woodward, Torbjörn Åkesson, Jan Forsman, «Simulations of Surface Forces in Polyelectrolyte Solutions,» *J. Phys. Chem. B*, vol. **112**, pp. 5116-5125, 2008.
- [130] C. Márquez-Beltrán, L. Castañeda, M. Enciso-Aguilar, G. Paredes-Quijada, H. Acuña-Campa, A. Maldonado-Arce y J.-F. Argillier, «Structure and mechanism formation of polyelectrolyte complex obtained from PSS/PAH system: effect of molar mixing ratio, base-acid conditions, and ionic strength,» *Colloid Polym. Sci.*, vol. **291**, p. 683–690, 2013.
- [131] E. Meneses-Juárez, C. Márquez-Beltrán, J. F. Rivas-Silva, U. Pal y M. González-Melchor, «The structure and interaction mechanism of a polyelectrolyte complex: a dissipative particle dynamics study,» *Soft Matter*, vol. **11**, pp. 5889-5897, 2015.
- [132] C. Pillai, W. Paul y C. P. Sharma, «Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation,» *Prog. Polym. Sci.*, vol. **34**, p. 641–678, 2009.
- [133] Palomec-Garfias A., Jardim Vieira K, M. Henrique Sousa y C. Márquez Beltrán, «Influence of polyelectrolyte chains on surface charge and magnetization of iron oxide nanostructures,» *Colloids Surf. A*, vol. **549**, pp. 13-24, 2018.

- [134] Ø. M. Andersen y K. R. Markham, *Flavonoids : Chemistry, Biochemistry, and Applications*, CRC Press, 2006.
- [135] D. D. Joshi, *Herbal Drugs and Fingerprints*, Springer, 2012.
- [136] Z. Jurasekova, C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos y S. Sanchez-Cortes, «Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy,» *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. **16**, pp. 12802- 12811, 2014.
- [137] K. E. AbouAitah, A. A. Farghali, A. Swiderska-Sroda, W. Lojkowski, A. M. Razin y M. H. Khedr, «Mesoporous silica materials in drug delivery system: pH/glutathione responsive release of poorly water-soluble pro-drug quercetin from two and three-dimensional pore-structure nanoparticles,» *J. Nanomed. Nanotechnol.*, vol. **7**, pp. 1-12, 2016.
- [138] G. S. Borghetti, I. S. Lula, R. D. Sinisterra y V. L. Bassani, «Quercetin/ β -Cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture,» *AAPS PharmSciTech*, vol. **10**, pp. 235–242, 2009 .
- [139] A. B. Pereira, A. M. d. Silva, M. J. Barroca., M. P. M. Marques y S. S. Braga, «Physicochemical properties, antioxidant action and practical application in fresh cheese of the solid inclusion compound γ -cyclodextrin·quercetin, in comparison with β -cyclodextrin·quercetin,» *Arab. J. Chem.*, 2017.
- [140] E. M. d. Costa, J. M. B. Filho, T. G. d. Nascimento y R. O. Macêdo, «Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids,» *Thermochim Acta* , vol. **392**–393, pp. 79-84, 2002.
- [141] N. Faisant, J. Akiki, F. Siepmann, J. P. Benoit y J. Siepmann, «Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory,» *Int. J. Pharm.*, vol. **314**, pp. 189–197, 2006.
- [142] X. Luo, D. L. Berlin, J. Betz, G. F. Payne, W. E. Bentley y G. W. Rubloff, « In situ generation of pH gradients in microfluidic devices for biofabrication of freestanding, semi-permeable chitosan membranes,» *Lab Chip*, vol. **10**, pp. 59-65, 2010.
- [143] A. A. Antipov, G. B. Sukhorukov, E. Donath y H. Möhwald, «Sustained release properties of polyelectrolyte multilayer capsules,» *J. Phys. Chem. B*, vol. **105**, pp. 2281 - 2284, 2001.
- [144] A. E. Deatsch y B. A. Evans, «Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia,» *J. Magn. Magn. Mater*, vol. **354**, p. 163–172, 2014.

- [145] E. Lima Jr, E. De Biasi, M. Vasquez Mansilla, M. E. Saleta, M. Granada, H. E. Troiani, F. B. Effenberger, L. M. Rossi, H. R. Rechenberg, R D Zysler, «Heat generation in agglomerated ferrite nanoparticles in an alternating magnetic field,» *J. Phys. D: Appl. Phys.* , vol. **46**, p. 045002, 2013.
- [146] J. E. Wong, A. K. Gaharwar, D. Müller-Schulte, D. Bahadur y W. Richtering, «Dual-stimuli responsive PNiPAM microgel achieved via layer-by-layer assembly: Magnetic and thermoresponsive,» *J. Colloid Interface Sci*, vol. **324**, p. 47–54, 2008.
- [147] C. S. S. R. Kumar y F. Mohammad, «Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery,» *Adv. Drug Deliv. Rev*, vol. **63**, p. 789–808, 2011.
- [148] Yu Zeng, Xiao-Lei Wang, Yun-Jie Yang, Jian-Feng Chen, Jiwen Fu, Xia Tao, «Assembling photosensitive capsules by phthalocyanines and polyelectrolytes for photodynamic therapy,» *Polymer*, vol. **52**, pp. 1766-1771, 2011.
- [149] J. Zhou, J. Gong, C. Ding y G. Chen, «Quercetin induces the apoptosis of human ovarian carcinoma cells by upregulating the expression of microRNA-145,» *Mol. Med. Rep.*, vol. **12**, pp. 3127-3131, 2015.
- [150] S. Wang, J. Yao, B. Zhou, J. Yang, M. Chaudry, M. Wang, F. Xiao, Y. Li y W. Yin, «Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative In Vivo and its antibacterial mechanism In Vitro.,» *J Food Prot.* , vol. **81**, pp. 68-78, 2018.



BUAP

MEMORANDUM

Para:	Dr. Jaime Ruiz García.	Presidente
	Dr. Umapada Pal	Secretario
	Dr. Enrique Sánchez Mora	Vocal
	Dr. Julio Villanueva Cab	Vocal
	Dr. César Márquez Beltrán	Vocal
De:	Dra. Lilia Meza Montes, Coordinadora del programa de Ciencia de Materiales	
Asunto:	Se cita al Examen de Grado de Doctorado en Ciencias (en la especialidad de Ciencia de Materiales) del M.C. Abraham Francisco Palomec Garfias.	
Fecha:	12 de junio, 2018	

Me permito informarles que el Comité Académico del IFUAP, los ha designado integrantes del Comité Examinador de la Tesis de Doctorado en Ciencias (en la especialidad de Ciencia de Materiales) del M.C. Abraham Francisco Palomec Garfias, que se llevará a cabo el viernes 22 de junio, 2018 a las 10hrs. en el auditorio del IFUAP.

Dra. Lilia Meza Montes
COORDINADORA

Instituto de Física
"Ing. Luis Rivera
Terrazas"

Av. San Claudio esq. 18 sur, edif 110 A, B y C.
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01(222) 2295610, Fax: ext. 5611

/LAEmhr