

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Diseño y estudio de nanocompuestos magnéticos
funcionalizados con ácido fólico para encapsulamiento de
fármacos antitumorales**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Helena Areli Chávez Duarte

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Helena Areli Chávez Duarte

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes
Codirector de tesis

Dra. Karla Josefina Santacruz Gómez
Codirectora de tesis

Dra. Diana Garibo Ruiz

Dr. José Manuel Romo Herrera

Dr. Humberto Lobato Morales



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Helena Areli Chávez Duarte** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Diseño y estudio de nanocompuestos magnéticos funcionalizados con ácido fólico para el encapsulamiento de fármacos antitumorales

Resumen aprobado por:

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes
Codirector de tesis

Dra. Karla Josefina Santacruz Gómez
Codirectora de tesis

En esta tesis se aborda la síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas (MNPs) basadas en nanopartículas de ferrita de manganeso ($\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn}$) para aplicaciones en la entrega de fármacos antitumorales. Estas MNPs son objeto de investigación debido a su baja toxicidad y su potencial uso como agentes de contraste en la terapia de hipertermia, así como para la entrega dirigida de fármacos. Además, se ha demostrado que la funcionalización superficial de las MNPs usando polietilenglicol (PEG) proporciona una plataforma estable para la unión de agentes terapéuticos, dirigidos y potenciadores de la permeación dentro de las células. En este estudio, se obtuvieron MNPs cúbicas de aproximadamente 40 nm por el método de síntesis hidrotérmica. La incubación de doxorubicina (DOX) fue ejecutada para examinar su liberación mediante variaciones de pH. Las muestras fueron analizadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) confirmando la conjugación con PEG, DOX y ácido fólico (FA). Las medidas de magnetización por medio del Magnetómetro de Fuerza Vibrante (MVV) confirman sus propiedades superparamagnéticas. Además, se logró una eficiencia de encapsulación de DOX de hasta 35.78% en las nanopartículas, con una liberación del 43.3% en 24 horas, mediada por pH. Adicionalmente, se exploró preliminarmente la funcionalización de las MNPs-DOX con FA para su potencial uso en células de cáncer de mama. En conclusión, este estudio demuestra el potencial de las MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn}$ funcionalizadas con PEG y FA para la entrega dirigida de DOX.

Palabras clave: Nanopartículas magnéticas, nanopartículas de ferrita de manganeso, polietilenglicol, doxorubicina y ácido fólico.

Abstract of the thesis presented by **Helena Areli Chávez Duarte** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience

Desing and study of magnetic nanocomposites functionalized with folic acid for antitumoral drugs encapsulation

Abstract approved by:

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes
Thesis Co-director

Dra. Karla Josefina Santacruz Gómez
Thesis Co-director

This thesis addresses the synthesis and characterization of magnetic nanoparticles (MNPs) based on manganese ferrite nanoparticles ($\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$) for applications in the delivery of antitumor drugs. These MNPs are the focus of the research due to their low toxicity and potential use as contrast agents in hyperthermia therapy, as well as for targeted drug delivery. Additionally, it has been demonstrated that the surface functionalization of MNPs using polyethylene glycol (PEG) provides a stable surface for the binding of therapeutic agents, targeting moieties, and permeation enhancers in cells. In this study, cubic MNPs approximately 40 nm in size were obtained using a hydrothermal synthesis method. Doxorubicin (DOX) loading was performed to examine its release through pH variation. The samples were analyzed using Transmission Electron Microscopy (TEM), confirming conjugation with PEG, DOX, and folic acid (FA). Magnetization measurements using a Vibrating Sample Magnetometer (VSM) confirm their superparamagnetic properties. Additionally, a DOX encapsulation efficiency of up to 35.78% in the nanoparticles was reported, with a 43.3% release over 24 hours, pH mediated. Furthermore, preliminary exploration of the functionalization of MNPs-DOX with FA was conducted for potential use in breast cancer cells. In conclusion, this study demonstrates the potential of $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ MNPs functionalized with PEG and FA for targeted delivery of DOX.

Keywords: Magnetic nanoparticles, ferrite of manganese nanoparticles, polyethylene glycol, doxorubicin, folic acid.

Dedicatoria

A mi tía Griselda quien falleció a causa de cáncer meses antes de iniciar mi maestría, a quien siempre recordé en todo mi proceso de realización de este proyecto tan importante, así como también pensando en la atribución que tendrá para mejorar las terapias que los pacientes de cáncer reciben diariamente.

"Mi familia siempre unida" - Griselda Duarte.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM (CNyN) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado con sus excelentes instalaciones y buenos profesores.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

Al proyecto A1-S-202257 por parte de mi codirectora de tesis la Dra. Karla Josefina Santacruz Gómez por su apoyo en infraestructura y materiales.

A mis estimados codirectores de tesis, la Dra. Karla Santacruz por aceptarme como su tesista y apoyarme en llevar a cabo la realización de esta tesis, y al Dr. Sergio Águila por recibirme en CNyN con su grupo de investigación: el grupo Águila Lab, el cual está conformado por estudiantes e investigadores con los que compartí momentos muy amables y conocimientos acerca de sus investigaciones dentro del ámbito de la nanotecnología.

A mi comité de tesis quienes me asesoraron y revisaron mi trabajo durante la realización de mi tesis: Dra. Diana Garibo, Dr. Humberto Lobato y Dr. José Romo.

A los doctores Javier López Medina y el Dr. Óscar Ruiz Galindo, agradezco sus esfuerzos por ayudarme a obtener los primeros resultados de mi tesis los cuales fueron esenciales para alcanzar los objetivos de esta tesis.

Al Dr. Francisco Alejandro Pedroza por su invaluable apoyo durante mi maestría. Su guía experta en el laboratorio y su asesoramiento en la redacción de mi tesis fueron fundamentales para el éxito de mi proyecto. Estoy muy agradecida por su compromiso y por haber sido un mentor excepcional en este proceso.

A mis papás por su respaldo constante, quienes con su amor, comprensión y palabras de aliento fueron el pilar que me permitió superar cada desafío para alcanzar mis metas. Este logro es tanto mío como de ustedes, y no hay palabras suficientes para expresar mi gratitud por siempre estar a mi lado. A mis hermanas por su apoyo y cariño, su presencia me ayudó a mantenerme motivada y enfocada. Y a toda mi familia, mis abuelos, mis primos y tíos, quienes junto conmigo festejan mis logros.

A Ana, quien me demostró el significado de una amistad y nunca me dejó sola en momentos difíciles estando lejos de casa. A Marielos, por ser mi mamá ensenadense, por siempre demostrarme su cariño y apoyo, se volvieron mi parte de familia, y me quisieron tanto como yo a ellas.

A mi novio Alan, cuya paciencia y amor han sido una fuente constante de fortaleza para la finalización de mi maestría. Este logro también es un reflejo de su apoyo y cariño, me siento muy agradecida por tener a alguien tan maravilloso en mi vida. A su familia, mis suegros Lauro y Consuelo por hacerme parte de su familia y demostrarme su cariño, y mi cuñada Layla por ser como mi hermana y demostrarme que el único límite que tenemos somos nosotros mismos.

Quiero dedicar un agradecimiento especial a mi compañero más leal, a mi perro, Blacky. Adoptarlo durante mi estancia en Ensenada ha sido una de las mejores decisiones de mi vida. Su lealtad y compañía han sido de apoyo incondicional en cada paso de este camino. Gracias por ser mi mejor amigo y por hacer de esta experiencia algo aún más especial.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Nanocompuestos magnéticos funcionalizados con ácido fólico para encapsulamiento de fármaco antitumoral.....	3
1.2.1 Nanocompuestos	3
1.2.2 Nanopartículas magnéticas.....	4
1.2.3 Nanopartículas biocompatibles funcionalizados con ácido fólico (FA) y recubiertas con polietilenglicol (PEG).....	5
1.3 Antecedentes	6
1.4 Hipótesis	9
1.5 Objetivos	9
1.5.1 Objetivo general.....	9
1.5.2 Objetivos específicos	9
Capítulo 2. Metodología.....	10
2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas por método hidrotermal.....	10
2.2 Preparación de PEG en superficie.....	11
2.3 Encapsulación de DOX en MNPs de Fe ₂ O ₄ :Mn-PEG.....	12

2.4	Recubrimiento de FA en MNPs de Fe ₂ O ₄ :Mn-PEG-DOX	13
2.5	Técnicas de caracterización de nanopartículas	14
2.5.1	Potencial zeta (Z) y dispersión dinámica de luz (DLS)	14
2.5.2	Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	14
2.5.3	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	15
2.5.4	Magnetómetro de muestra vibrante (MMV).....	15
2.5.5	Espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS)	15
2.6	Cinética de encapsulación y liberación de DOX.....	16
Capítulo 3. Resultados y discusión		18
3.1	Síntesis de sistema de nanocompuesto de ferrita de manganeso (Fe ₂ O ₄ :Mn-PEG-DOX-FA).....	18
3.2	Caracterización del tamaño y forma de las Fe ₂ O ₄ :Mn-PEG-DOX-FA.....	19
3.2.1	Caracterización física TEM	19
3.2.2	Análisis superficial con FTIR	21
3.2.3	Caracterización magnética de Fe ₂ O ₄ :Mn y Fe ₂ O ₄ :Mn-PEG	23
3.3	Evaluación de la eficiencia de encapsulación y la cinética de liberación de DOX en las Fe ₂ O ₄ :Mn-PEG-DOX-FA	25
Capítulo 4. Conclusiones.....		28
Capítulo 5. Perspectivas		29
Literatura citada		30

Lista de figuras

Figura	Página
1. Representación esquemática de la administración de fármacos.	2
2. Nanocompuesto polimérico.....	4
3. Representación esquemática de MNPs funcionalizados con FA en la entrega de orientación activa (Namari, et al., 2019).	6
4. Esquema de reacción para la preparación de I-MMA-DOX-PEG-OCH ₃ /FA (Rajkumar & Parabaharan, 2018).....	8
5. Representación esquemática de síntesis hidrotérmal de MNPs de Fe ₂ O ₄ :Mn.....	10
6. Representación esquemática de la síntesis de recubrimiento de Fe ₂ O ₄ :Mn con PEG.....	11
7. Representación esquemática de encapsulación de DOX en MNPs de Fe ₂ O ₄ :Mn-PEG.	12
8. Representación esquemática funcionalización de FA.....	13
9. Síntesis de nanocompuesto de ferrita de manganeso y encapsulamiento de DOX en Fe ₂ O ₄ :Mn-PEG-DOX-FA.	18
10. Micrografías TEM de las MNPs de Fe ₂ O ₄ :Mn. A) Imagen amplia mostrando distintas morfologías de las MNPs en aglomeración. Inset: Magnificación a un nanocubo de 35 nm de longitud. Nanocubos de B) 70 nm y C) 40 nm de tamaño.	20
11. A) Micrografías obtenida por microscopia electrónica de transmisión para nanocubos de ferrita de manganeso recubiertas con PEG y B) dispersión de tamaños de partículas por dispersión dinámica.....	21
12. FTIR de nanocompuesto en los distintos pasos de la síntesis.....	22
13. Curva de magnetización de ferritas de manganeso sin recubrir y recubiertas con PEG.	25

Lista de tablas

Tabla

Página

1. Asignación de grupos funcionales asociados a las bandas vibracionales de FTIR para los distintos pasos de la funcionalización del nanocomplejo de Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX-FA..... 23

Capítulo 1. Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la cual las células presentan un crecimiento descontrolado, lo que produce una formación de agregados que crecen dañando tejidos vecinos, se nutren del organismo y alteran su fisiología (N. Catherine Sánchez, 2013). Esta malignidad afecta a la población en general, posicionándose entre una de las principales causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el año de 2020 se atribuyeron casi 10 millones de defunciones a los diferentes tipos de cáncer conocidos, por lo que se considera una amenaza global significativa para la salud pública (World Health Organization, 2022).

En la actualidad, existen varios enfoques terapéuticos contra el cáncer, los cuales incluyen quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, hipertermia y cirugía, por mencionar algunas, siendo la quimioterapia y la radioterapia los estándares de oro para tratar esta patología (Babu et al., 2017). La quimioterapia neoadyuvante suele ser el tratamiento inicial para diversos tipos de cáncer, cuyo objetivo es destruir las células cancerosas para controlar el crecimiento tumoral, y prevenir su propagación, con la finalidad de mejorar las opciones quirúrgicas disponibles, incluso para casos de cáncer en etapas avanzadas (Larissa A Korde et al., 2021).

La doxorubicina (DOX) es uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados para tratar distintos tipos de cáncer, incluidas leucemias, linfomas, sarcomas, carcinomas, cáncer de ovarios, endometrio, vejiga, pulmón, gástrico, tiroides, hígado, páncreas y mama (National Cancer Institute, 2023). En particular, este último mencionado es el cáncer más común en mujeres, y la DOX es uno de los principales tratamientos para el cáncer de mama temprano y avanzado (Kostrzewa-Nowak et al., 2005).

No obstante, su uso está limitado debido a que causa una toxicidad en el tejido sano, efecto inherente a su propiedad vesicante y genotóxica (Kreidieh et al., 2016), provocando en algunos de los casos efectos secundarios graves como miopatía cardíaca, cuadros gastrointestinales,

vómitos, náuseas, dolor de ojos, dolor en manos o pies, erupción cutánea, dificultad para respirar, convulsiones, entre otras (MedlinePlus, 2012). Estos problemas pueden ocurrir durante el tratamiento o, en algunas ocasiones, meses o años después de recibir doxorubicina. Esta citotoxicidad inespecífica se debe a dos mecanismos de acción del compuesto: 1) intercalación en el ADN con alteración de la topoisomerasa II (corta y repara hebras enredadas del ADN), y/o 2) generación de radicales libres que dañan las membranas celulares, el ADN y las proteínas (Narmani et al., 2019). Es por ello, que la quimioterapia generalmente se asocia como una amenaza tóxica para todo el organismo, dando lugar a los efectos secundarios (Dhamecha et al., 2015; Ye et al., 2014) que afectan la calidad de vida del paciente oncológico.

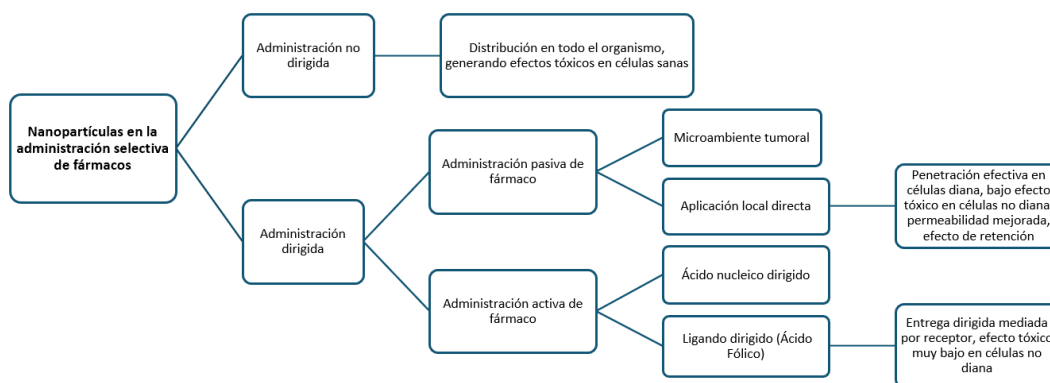


Figura 1 Representación esquemática de la administración de fármacos.

Para superar estos enfoques terapéuticos no específicos e invasivos, se ha propuesto la llamada administración dirigida (activa) de fármacos para mejorar la terapia del cáncer. En la Figura 1, se muestra un esquema de la administración de fármaco mediada por nanopartículas (NPs), donde se destaca la administración dirigida y no dirigida.

La administración de fármacos dirigida basada en la administración activa ayuda a que el fármaco administrado llegue hasta el sitio del tumor por medio de ligandos que permiten que las células introduzcan estos fármacos (endocitosis), ocasionando una disminución en los efectos tóxicos que pueden causar estos fármacos. Por otro lado, la administración no dirigida se basa en la

entrega del fármaco a través de todo el cuerpo, sin especificidad para células cancerosas (Dhamecha et al., 2015; Ye et al., 2014).

1.2 Nanocompuestos magnéticos funcionalizados con ácido fólico para encapsulamiento de fármaco antitumoral

1.2.1 Nanocompuestos

Diversos tipos de nanomateriales han sido propuestos como agentes oncoterapéuticos. En este estudio nos enfocaremos en los nanomateriales magnéticos, particularmente las nanopartículas de ferrita de manganeso (NPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$).

Los nanomateriales se definen como materiales con más de una fase sólida, donde al menos una de ellas tiene dimensiones de $1 \times 10^{-9}\text{m}$, en estado amorfo, semicristalino o cristalino (Porwal & Saggarr, 2017). Por otro lado, los nanocompuestos que se encuentran en presencia de una matriz polimérica se pueden clasificar como nanocompuestos poliméricos (por sus siglas en inglés, polymer nanocomposite, PNC) (Kurc et al., 2021).

En la Figura 2 se representa un PNC, donde se muestra una matriz en la que se encuentran las NPs distribuidas uniformemente. Este tipo de materiales tienen múltiples ventajas tales como estabilidad en tamaño, reduce la presencia de defectos superficiales, incrementa la estabilidad térmica, entre otras.

Sin embargo, tiende a aglomerarse lo cual provoca dispersión de tamaños de las NPs. En el caso de los nanocompuestos magnéticos para el encapsulamiento de fármacos antitumorales, la fase matriz ocurre en el recubrimiento de un polímero, mientras que la nanofase contiene las nanopartículas magnéticas, donde se sabe que al recubrir las nanopartículas magnéticas con un polímero reduce su toxicidad y permite modificar con facilidad la superficie (Narmani et al., 2018).

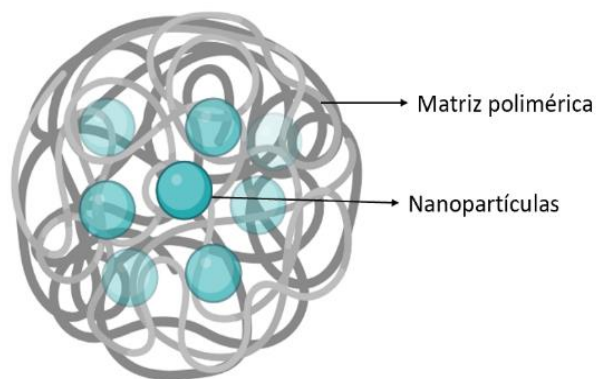


Figura 2 Nanocompuesto polimérico.

1.2.2 Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (MNPs) poseen una alta adaptabilidad de las composiciones estructurales y exhiben un campo magnético local que puede ser manipulado mediante la aplicación de un campo magnético externo (Mirza et al., 2019). En particular, las MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ poseen una gran área superficial, magnetización de alta saturación, mínima o cercana coercitividad a cero y una excelente biocompatibilidad, por lo que se utilizan ampliamente en muchas áreas biológicas como la resonancia magnética, tratamiento de hipertermia y en sistemas de administración de medicamentos (Kafshgari et al., 2019; Kalaiselvan et al., 2022).

Así mismo, tienen algunas ventajas cuando se usan como agentes en la administración de fármacos, una de ellas es que pueden ser guiadas y activada con la ayuda de un campo magnético externo. Adicionalmente, es posible monitorearla a través de resonancia magnética nuclear, y se ha demostrado que al alterar la frecuencia de los campos magnéticos es posible generar calor localmente; técnica conocida en biomedicina como terapia magnética de hipertermia.

La carga de fármacos es de los temas más importantes para la entrega dirigida hacia el sitio del tumor. Los medicamentos pueden ser absorbidos o atrapados en los poros, encapsulados dentro o covalentemente adheridos a la superficie de las MNPS, estos factores son determinados por el tamaño, la forma y la química de la superficie (Kalaiselvan et al., 2022).

1.2.3 Nanopartículas biocompatibles funcionalizados con ácido fólico (FA) y recubiertas con polietilenglicol (PEG)

Otro punto importante en el uso de NPs para aplicaciones biomédicas es la biocompatibilidad. La conjugación de MNPs con moléculas biocompatibles de ácido fólico (FA) para la administración selectiva de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer en el sitio del tumor son uno de los enfoques más prácticos en los sistemas de administración de fármacos dirigidos, ya que pueden aumentar la acumulación de nanocomplejos en el tumor hasta diez veces más que cuando el fármaco se administra solo (Pakdaman Goli et al., 2021).

Esto se debe a que las células cancerosas poseen una sobreexpresión de receptores de FA en su superficie. El FA fisiológico se transporta usando estos receptores proteicos que están asociados a la membrana celular o al receptor de FA (FR) a través de endocitosis. En la Figura 3a se representa la modificación superficial y la funcionalización de MNPs para mejorar su biocompatibilidad, capacidad de carga de fármacos, estabilidad in vivo y propiedades farmacocinéticas para mejorar la potencia terapéutica de las MNPs. Adicionalmente, en la Figura 3b se representa la orientación tumoral de las MNPs mediante la internalización medida por FA, después de la internalización, los componentes de los nanocomplejos disociados en condiciones acidificadas de endosomas y agentes terapéuticos inhiben el crecimiento celular (Narmani et al., 2019).

Por otro lado, el polietilenglicol (PEG) es un tipo principal de poliéster (Sukanya, et al 2022), es utilizado como recubrimiento de las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs), permite un mayor tiempo de circulación en la sangre debido a su capacidad de rechazar proteínas, buena biocompatibilidad y baja citotoxicidad (Huang et al., 2017).

En este proyecto se propone el uso de nanocompuestos magnéticos de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ y FA con DOX encapsulada ($\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ -PEG-DOX-FA) para optimizar la encapsulación y la liberación selectiva de la DOX en células cancerígenas, se espera que al funcionalizar las MNPs con el receptor de FA exista una internalización de las MNPs por parte de las células cancerígenas ya que tienen sobre expresado el FR en su membrana.

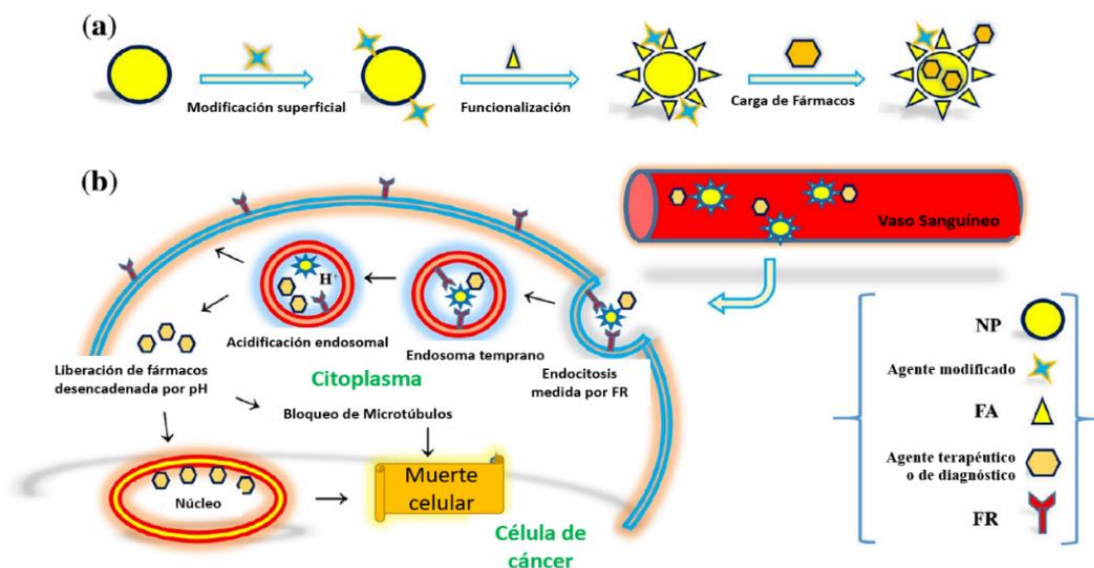


Figura 3 Representación esquemática de MNPs funcionalizados con FA en la entrega de orientación activa (Narmani et al., 2019).

1.3 Antecedentes

Desde hace unas décadas el estudio de los enfoques terapéuticos contra el cáncer ha despertado un interés entre la comunidad científica. Desde entonces, se ha tratado de mejorar dichos tratamientos con ayuda de la nanotecnología, lo que produce una mejora en la eficiencia terapéutica y el diagnóstico. A continuación, se presentan diferentes trabajos relacionados con el problema de investigación; tratamientos contra el cáncer basados en DOX encapsulada en MNPs como categorías principales del presente estudio.

Rana y colaboradores (2016) realizaron una investigación titulada: *Nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 conjugadas con ácido fólico para la administración dirigida de doxorubicina*, cuyo objetivo se basó en la síntesis de MNPs con propiedades bifuncionales (luminiscentes y magnéticas) para hipertermia y aplicaciones de imágenes diagnósticas. A través de su investigación describen que la utilización de MNPs, como el óxido de hierro, tienen diferentes aplicaciones biomédicas prometedoras como la entrega dirigida, terapia de hipertermia localizada y agentes de contraste para resonancia magnética nuclear (RMN). Además, mencionan que las MNPs se destacan al poder modificar su superficie con facilidad y hacer conjugaciones que permiten orientar las MNPs

a un sitio en específico. En el trabajo citado los autores sintetizaron nanopartículas magnéticas bifuncionales (BMNPs) enriquecidas con amina y carboxilo a través de la reacción de clic de tioleno, a las cuales se les conjugó FA en su superficie para ser dirigidas hacia las células cancerosas. También, conjugaron la DOX en la superficie de las partículas haciéndolas fluorescentes y a la vez pueden provocar apoptosis en las células diana. Específicamente, compararon las Fe_3O_4 MNPs conjugadas con FA como vehículo de administración de fármaco dirigido de DOX (DOX-FBMNPs) en células cancerosas, y las mismas MNPs, pero sin la conjugación del FA (DOX-BMNPs). Los autores concluyen que es posible sintetizar nanopartículas magnéticas conjugadas con FA con potencial para las aplicaciones de fármacos dirigidos, debido a la internalización que presentaron en las células cancerosas que tienen sobre expresado el receptor de ácido fólico.

En complemento Rajkumar y Parbaharan (2018) reportaron nanoportadores multifuncionales basados en nanopartículas de óxido de hierro (IONP) conjugadas con DOX, PEG y FA (IO-MMA-DOXPEG-OCH₃/FA) con objetivos teranósticos para la terapia del cáncer. Asimismo, compararon nanoportadores libre de FA con los conjugados de FA mostrando una adsorción celular más alta debido endocitosis medida por receptores de folato (FR). La metodología utilizada por los autores fue in vitro, incubando las células HeLa (cáncer cervicouterino) con las MNPs y midiendo la captación celular libre de DOX, IO-MMA-DOXPEG-OCH₃ y IO-MMA-DOXPEG-OCH₃/FA. En cuanto a las células que se trataron con IO-MMA-DOX-PEG-OCH₃/FA, la intensidad de fluorescencia DOX en la región del citosol aumentó y la acumulación de DOX en el núcleo se hizo más evidente, demostrando que los nanoportadores funcionalizados con FA se internalizan de manera más eficiente en las células HeLa positivas para FR a través de apoptosis, lo que presentó así una citotoxicidad mejorada.

Para ilustrar este proceso de endocitosis medida por receptor de los nanoportadores funcionalizados con FA (IO-MMA-DOXPEG-OCH₃/FA) podemos observar en la Figura 4 el esquema representativo. En el cual podemos observar la liberación del fármaco dentro de la célula es pH dependiente, esto se puede atribuir a la presencia de un enlace hidrazona entre el DOX y la superficie de IONPs. Dado que el enlace de hidrazona es considerablemente estable en condiciones neutras en el medio y propenso a la hidrólisis en medio ácido, se liberó la cantidad

máxima de DOX en pH 5.6, esto puede resultar beneficioso para mejorar la eficiencia terapéutica de los fármacos en células cancerosas y conduce a una reducción de los efectos citotóxicos de medicamentos contra el cáncer en células sanas.

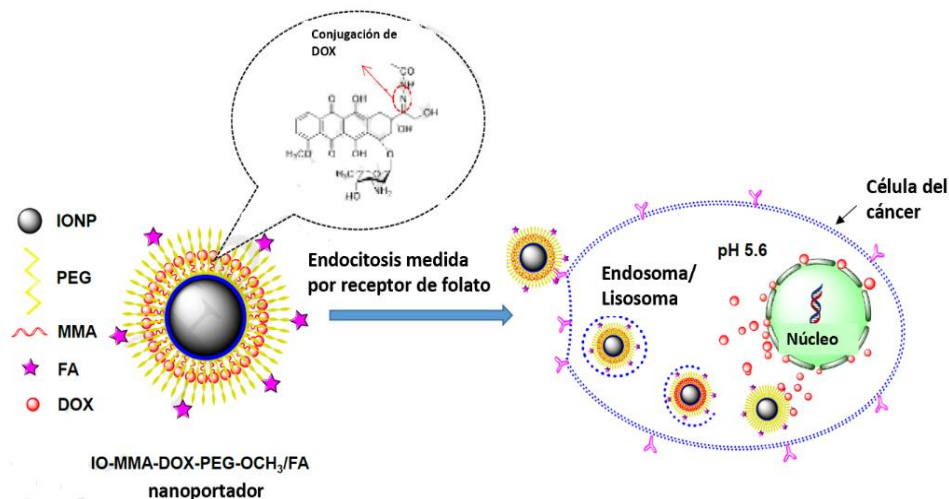


Figura 4 Esquema de reacción para la preparación de I-MMA-DOX-PEG-OCH₃/FA (Rajkumar & Parabakaran, 2018)

Por otro lado, Erdem, Yalcin y Gunduz (2017) realizaron un estudio *in vitro* en células HeLa similar a los antes mencionados, teniendo por objetivo que fue la internalización de nanopartículas de óxido de hierro Fe₃O₄ conjugadas con DOX, PEG y FA, como un sistema de liberación controlada de fármaco. De esta manera, poder minimizar o eliminar los efectos secundarios que pueda causar la droga DOX. En el trabajo citado, los autores destacan que las nanopartículas tienen un comportamiento paramagnético al ser sometidas a un campo magnético, al ser recubiertas con PEG permiten una mejor biocompatibilidad y su circulación a través de la sangre, el tamaño deseado de las nanopartículas está entre 5.5 nm a 200 nm para inhibir la rápida eliminación renal de la sangre y endocitosis por fagocitosis celular. También, afirmaron que las MNPs de óxido de hierro sin ningún tipo de revestimiento no fueron absorbidos por las células debido a su carga superficial negativa proveniente de los abundantes iones de OH⁻. Sin embargo, los DOX-FA-MNPs cargados positivamente se unen fácilmente a la membrana celular cargada negativamente, lo que resulta en una mayor tasa de internalización celular. De acuerdo con los resultados obtenidos, los autores concluyen que los compuestos con PEG conjugados con FA cargados con DOX son efectivos para generar apoptosis en células cancerosas y pueden disminuir los efectos secundarios de DOX (Erdem et al., 2017; Rajkumar & Brabanaran, 2018; Rana et al., 2016).

Tomando en cuenta a la literatura anterior, se propone en este trabajo la síntesis de NPs de un nanocompuesto de ferrita de manganeso, funcionalizados con FA y DOX ($\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn-PEG-DOX-FA}$) para optimizar la encapsulación y la liberación selectiva de DOX en soluciones acuosas. En este sentido, se espera que, al modificar el pH del medio acuoso, se libere la DOX presente en el entrecruzamiento del PEG.

1.4 Hipótesis

El complejo de nanocompuestos de ferrita de manganeso funcionalizados con ácido fólico recubierto con polietilenglicol tiene la capacidad de mejorar la encapsulación y liberación selectiva de doxorubicina ($\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn-PEG-DOX-FA}$) en solución acuosa.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Diseñar y evaluar nanocompuestos magnéticos funcionalizados con ácido fólico como sistema de encapsulamiento y liberación controlada de fármaco antitumoral (DOX).

1.5.2 Objetivos específicos

- a) Sintetizar un sistema de nanocompuesto de ferrita de manganeso y ácido fólico con doxorubicina encapsulada ($\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn-PEG-DOX-FA}$).
- b) Caracterización del tamaño y forma del nanocompuesto de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn-PEG-DOX-FA}$.
- c) Evaluación de la eficiencia de encapsulación y la cinética de liberación de doxorubicina (DOX) en las MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn-PEG-DOX-FA}$.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas por método hidrotermal

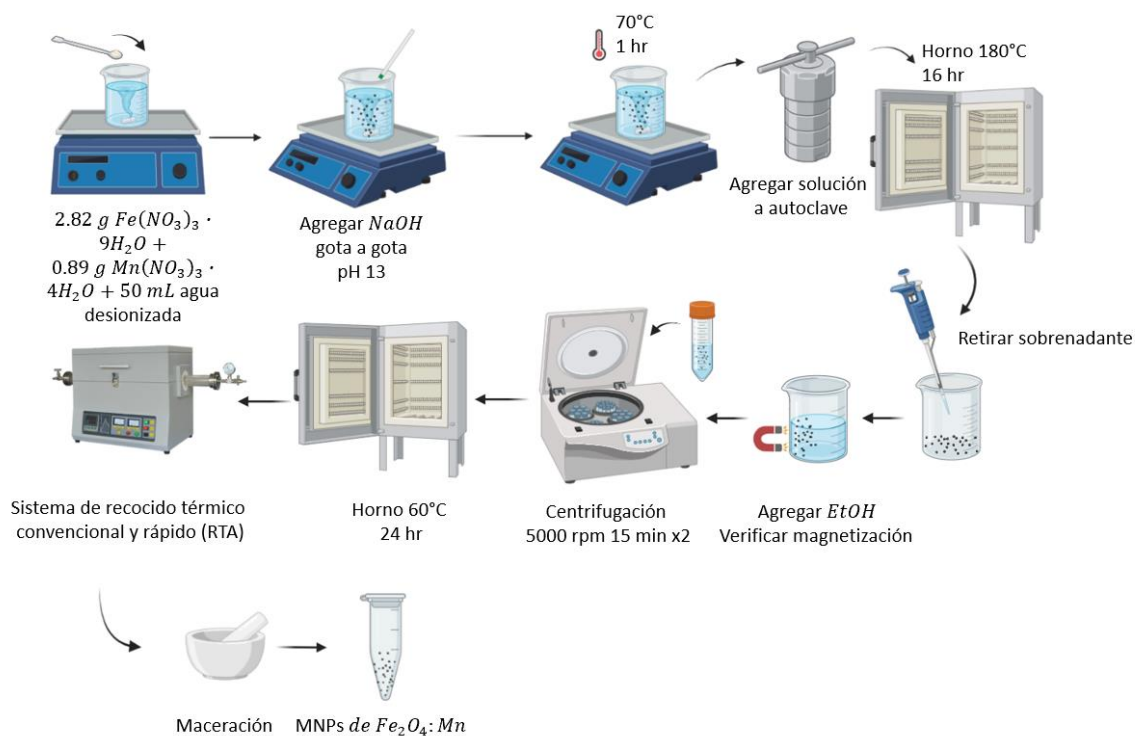


Figura 5 Representación esquemática de síntesis hidrotermal de MNPs de $Fe_2O_4:Mn$.

El método de síntesis de las MNPs de $Fe_2O_4:Mn$ fue por medio de una síntesis hidrotermal. Donde los precursores principales fueron $Fe(NO_3)_3$ hidratado y $Mn(NO_3)_2$. Respecto al procedimiento experimental: se disolvieron 2.82 g de $Fe(NO_3)_3$ hidratado y 0.89 g de $Mn(NO_3)_2$ en 50 mL de agua desionizada hasta disolverse en una placa con agitador magnético, mientras se disolvió la solución anterior se hizo una solución de $NaOH$ a 1M en 50 mL de agua desionizada. Al finalizar las dos diluciones, se añadió a la primera solución la segunda solución gota a gota (30 mL aprox.) hasta obtener un pH de 13. Después, se calentó la solución resultante a 70°C por 1 hora. Para secar la muestra de MNPs se vació la solución en una autoclave para ingresarlas a un horno por 16 horas a 180°C. Al haber transcurrido 16 horas, la muestra se retiró del horno, fue necesario retirar el sobrenadante y agregarles etanol para pasarlas a un vaso de precipitado para comprobar si las

muestras de MNPs eran magnéticas con un imán. Al comprobar que las MNPs eran magnéticas, se agitaron con un agitador magnético en una placa de calentamiento por 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se repitió de 6-7 veces. Después, las muestras se pasaron a viales para ser centrifugados a 5000 rpm por 30 minutos, retirando el sobrenadante a los 15 minutos y añadiendo más etanol para un segundo lavado, finalmente se retiró el sobrenadante final. Por último, la muestra se ingresó a un horno RTA para tratamiento térmico por 24 horas, añadiendo gas nitrógeno para que no tendiera a oxidarse la muestra, al concluir el tiempo en el horno se retiró la muestra y se trituró en un mortero hasta obtener un polvo (Kafshgari et al., 2019). Este proceso de síntesis hidrotermal para la realización de MNPs de ferrita de manganeso se encuentra ilustrado en la Figura 5.

2.2 Preparación de PEG en superficie

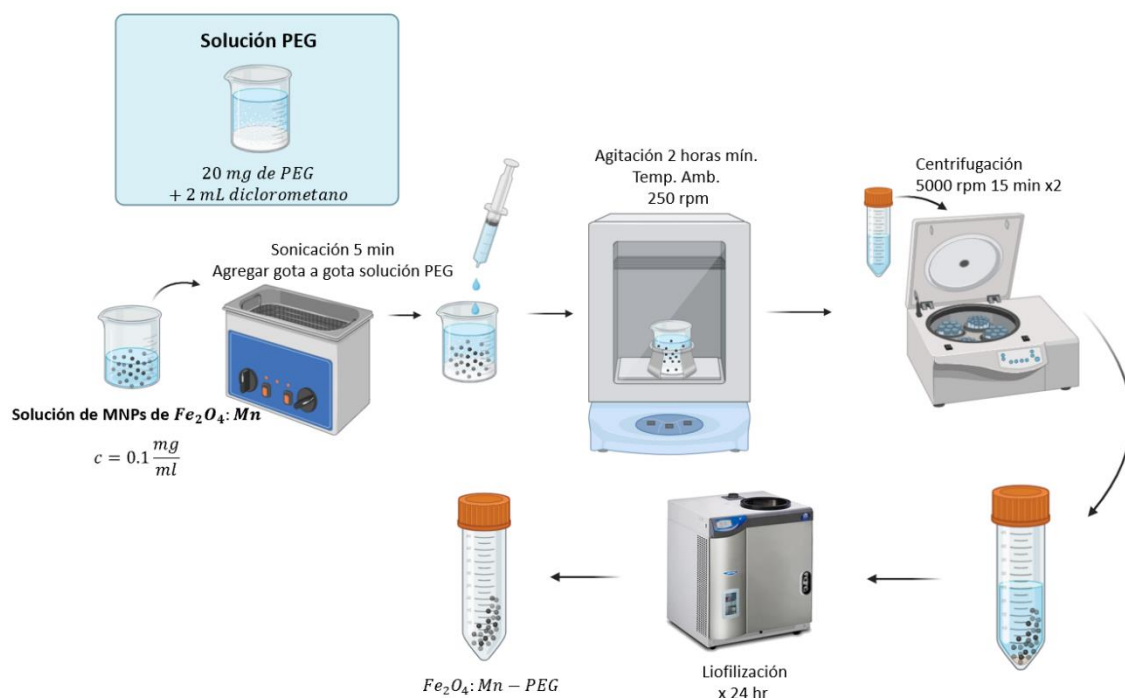


Figura 6 Representación esquemática de la síntesis de recubrimiento de $Fe_2O_4:Mn$ con PEG.

Para recubrir las MNPs con PEG se pesaron 20 mg de PEG para posteriormente diluirlo en 2 mL de diclorometano. Después 10 mg de MNPs se añadieron a una solución de agua desionizada la

cual se sometió a un baño ultrasónico hasta redispersar las nanopartículas durante 5 minutos aproximadamente. Posteriormente al obtener la solución con nanopartículas dispersadas se añadió gota a gota la solución de diclorometano con PEG, para mantenerlo en agitación a temperatura ambiente de 2 a 3 horas. Al transcurrir este tiempo se realizaron lavados de esta solución por medio de centrifugación para separar las nanopartículas que fueron recubiertas con PEG del sobrenadante que contiene PEG libre en la solución, estos lavados consistieron en someter la muestra a 5000 rpm durante 15 minutos, retiramos el sobrenadante para agregar 10 mL de agua desionizada a la solución y repetimos el proceso de centrifugado por una segunda ocasión, y volvemos a retirar el sobrenadante hasta obtener una pasta al fondo de nuestro tubo para centrifugar. Por último, al obtener una muestra húmeda se pasa a un proceso de liofilización, el cual consiste en someter nuestra muestra a bajas temperaturas y presiones bajas para remover la humedad que haya permanecido en nuestra muestra (Khaledian et al., 2020).

2.3 Encapsulación de DOX en MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn-PEG}$

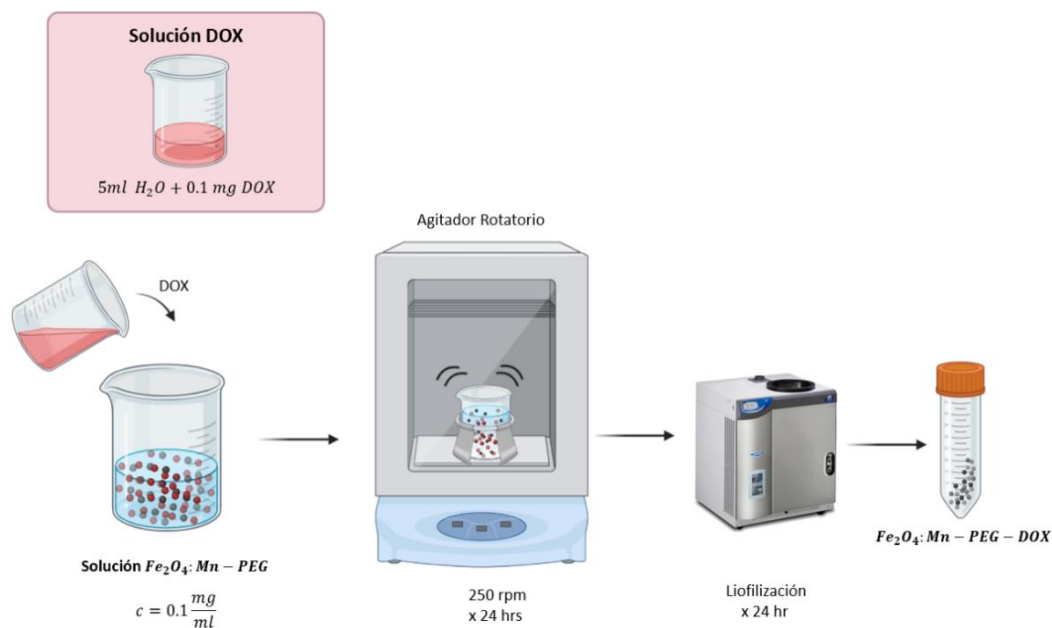


Figura 7 Representación esquemática de encapsulación de DOX en MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn-PEG}$.

Realizaremos una solución madre de 3.73 mL de DOX con una concentración de 0.67 mg/mL (total de 2.5 mg de DOX), la cual se agregó a una solución con $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn-PEG}$ y se sometió a una

agitación vigorosa en un agitador rotatorio a 250 rpm a 37°C por 24 horas, finalmente para obtener la muestra en polvo se liofilizo durante 24 horas a temperaturas y presiones bajas (Huang et al., 2017).

2.4 Recubrimiento de FA en MNPs de Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX

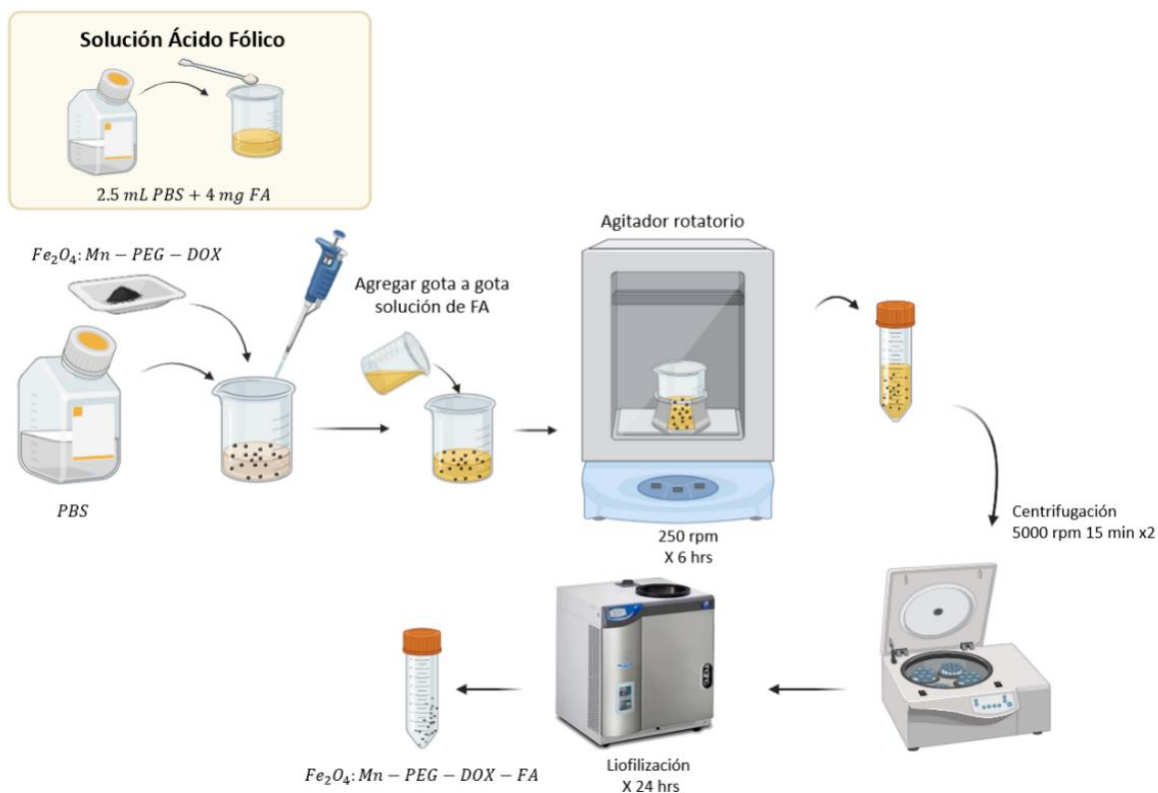


Figura 8 Representación esquemática funcionalización de FA.

Para acoplar covalentemente el ácido fólico (FA) a la superficie de las MNPs de Fe₂O₄:Mn, agregamos en 10 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS) 25 mg de Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX, después para aminorar la superficie de las MNPs se añadió 2 mg de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, 97%) y 3 mg de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS, 98%), dicha solución se agitó gentilmente a una temperatura de 25°C durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de agitación, se realizó una solución de 4 mg de FA en 2.5 mL de PBS para mezclarlos con la solución anterior para mantenerlos en agitación durante 6 horas a temperatura ambiente. Al concluir la reacción, la solución resultante se lavó para eliminar los reactivos que no reaccionaron en la

superficie de las MNPs, estos lavados consistieron en someter la muestra a 5000 rpm por 15 minutos, después se retiró el sobrenadante para agregar 10 mL de agua desionizada y volver a centrifugar por una segunda ocasión (Kefeng Liu, 2016).

2.5 Técnicas de caracterización de nanopartículas

Las múltiples propiedades físicas y químicas que presentan las MNPs sintetizadas fueron evaluadas con diversas técnicas de caracterización, las cuales fueron:

2.5.1 Potencial zeta (Z) y dispersión dinámica de luz (DLS)

Las muestras de MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ -PEG con una concentración de 0.03 mg/mL fueron analizadas por DLS, específicamente con un analizador de partículas Litesizer 500 de marca Anton Paar®, este equipo incluye tres ángulos de medición (dispersión hacia atrás, lateral y hacia adelante) para la determinación del tamaño de partículas y permite la medición del potencial zeta a bajos voltajes. Su fundamento consiste en iluminar con un rayo láser y un fotodetector detecta las fluctuaciones de la luz dispersada en un ángulo de dispersión conocido. Las partículas dispersan la luz y como tal, “imprimen” información sobre su movimiento. Analizando las fluctuaciones de la luz dispersada se obtiene la información de las propias partículas (Beckman Coulter, n.d.).

2.5.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La morfología y la distribución de tamaños de las MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ con una concentración conocida de 0.01 mg/mL se analizaron por microscopia electrónica de transmisión (por sus siglas en inglés, transmission electron microscopy, TEM) mediante un equipo JEOL JEM-2010F equipado con un detector CCD Gatan Quantax SC200B usando un voltaje de aceleración de 80kV. La imagen es formada a través de la interacción de los electrones con la muestra, donde se magnifica y se enfoca el haz de electrones transmitido hacia el detector. Esta técnica permite visualizar la morfología y tamaño de la muestra.

2.5.3 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (por sus siglas en inglés, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) caracteriza la interacción radiación-materia por medio de un espectro de absorción o transmisión de luz. Esta técnica hace uso de la absorción de luz por la muestra en frecuencias características de las moléculas que la conformen. En su forma más simple, consta de un interferómetro de luz que cuantifica las frecuencias absorbidas por la muestra y las compara con el haz de luz incidente por medio de una transformada de Fourier. Cada paso de la síntesis fue analizado mediante espectros FTIR, para así confirmar la estructura de los conjugados mediante sus grupos funcionales en su superficie. Esto se realizó con un espectroscopio infrarrojo Perkin Elmer Spectrum Two en modo de reflectancia ATR, grabando el espectro de transmitancia de la muestra en cada paso en el rango de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ en pasos de 4 cm^{-1} promediando 16 escaneos.

2.5.4 Magnetómetro de muestra vibrante (MMV)

Las mediciones de magnetización de los MNPs fueron determinadas mediante análisis de magnetometría de muestra vibrante, usando un magnetómetro EZ-VSM de MicroSense. Esta técnica consiste en posicionar la muestra en un campo magnético constante donde se hace vibrar a amplitudes controladas. Después, un electroimán magnetiza la muestra y, finalmente, bobinas de detección detectan las perturbaciones de campo magnético.

2.5.5 Espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS)

La técnica de caracterización de absorción de luz UV-Visible permite identificar distintos grupos funcionales en la muestra. Utiliza radiación electromagnética en el rango del UV y visible para iluminar una muestra, de la cual el haz de luz transmitido es cuantificado y restado al haz incidente, obteniendo así un espectro de absorción de luz, comúnmente en los rangos de 200-1000 nm. Para los estudios de UV-VIS, se utilizó un MultiskanGO Thermofisher en el rango de 400-600 nm para la visualización de la banda de absorbancia de la DOX localizada en

aproximadamente 481 nm, el espectro de absorción de DOX pura disuelta en agua estéril fue a una concentración conocida de 0.67 mg/mL.

2.6 Cinética de encapsulación y liberación de DOX

La cinética de liberación y encapsulación de DOX es un campo crucial en la investigación de sistemas de liberación controlada de fármacos. Aquí se detalla cómo se estudian estos procesos. El proceso de encapsulación se refiere a cómo un fármaco como la DOX se introduce y se retiene dentro de un material encapsulante. Este material puede ser un polímero, liposoma o nanomaterial. La elección del material encapsulante depende de sus propiedades físicas y químicas, así como de su capacidad para retener el fármaco de manera estable hasta que sea liberado. Una vez encapsulada la DOX en el material, comienza el proceso de liberación. La liberación se refiere a cómo la sustancia activa (en este caso, la DOX) se desprende gradualmente del material encapsulante hacia su entorno circundante, donde puede ejercer su efecto terapéutico. Este proceso puede estar controlado por varios factores como la descomposición del material encapsulante que se refiere a la liberación que puede ocurrir a medida que el material encapsulante se descompone debido a factores como la degradación enzimática, la hidrólisis, o la disociación del material estructural. Por otro lado, la respuesta a cambios externos está dada por sistemas de liberación que son diseñados para responder a estímulos externos como cambios de pH (por ejemplo, ácidos en entornos tumorales), temperatura (hipertermia localizada), luz (fototerapia), o incluso campos magnéticos. Estos procesos pueden ser estudiados utilizando diferentes modelos cinéticos que describen cómo se produce la liberación en el tiempo.

- **Cinética de orden cero:** La tasa de liberación es constante e independiente de la concentración de fármaco en el sistema.

$$\frac{dC}{dt} = -k \quad (1)$$

Donde C es la concentración de fármaco, k es la constante de velocidad de orden cero.

- **Cinética de primer orden:** La tasa de liberación es proporcional a la cantidad de fármaco aún presente en el sistema.

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (2)$$

Donde C es la concentración de fármaco, k es la constante de velocidad de primer orden.

- **Cinética de Higuchi:** Este modelo es comúnmente utilizado en sistemas de liberación controlada donde la liberación ocurre por difusión a través de una matriz sólida. La ecuación diferencial es la siguiente:

$$\frac{dC}{dt} = -k_H \frac{1}{\sqrt{t}} \quad (3)$$

Donde C es la concentración de fármaco, k_H es la constante de disolución de Higuchi.

Estos modelos cinéticos son útiles para entender y predecir cómo se comportará un sistema de liberación controlada en condiciones específicas, lo cual es esencial para optimizar la eficiencia terapéutica y reducir posibles efectos adversos (Bruschi Marcos Luciano, 2015).

Capítulo 3. Resultados y discusión

En el presente capítulo se describirán las diferentes técnicas que fueron utilizadas para el análisis de los nanocompuestos que fueron sintetizados.

3.1 Síntesis de sistema de nanocompuesto de ferrita de manganeso ($\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn-PEG-DOX-FA}$)

Como parte del objetivo general de este trabajo se sintetizaron nanocompuestos de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn-PEG-DOX-FA}$, siguiendo la secuencia de procedimientos que se ilustran en la Figura 9. Para simplificar el procedimiento, se divide en cuatro pasos. En el primer paso, se obtuvo un material de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn}$ por medio de una síntesis hidrotermal siguiendo el protocolo descrito por Leila Kafshgari, et.al. (2018).

En el segundo paso, las MNPs de ferrita de manganeso fueron recubiertas con PEG, con el fin de mejorar la circulación sanguínea a largo plazo, utilizando un método prometedor basado en un protocolo publicado en la literatura (Khaledian et al., 2020).

En un tercer paso, se cargó el tratamiento quimioterapéutico, en este caso DOX, dentro del entrecruzamiento de la estructura polimérica. En el último paso, se funcionalizó la superficie de la estructura con FA; el cual, permite una orientación dirigida hacia el sitio del tumor por medio de receptores sobre expresados en la superficie de ciertos tipos de cáncer.

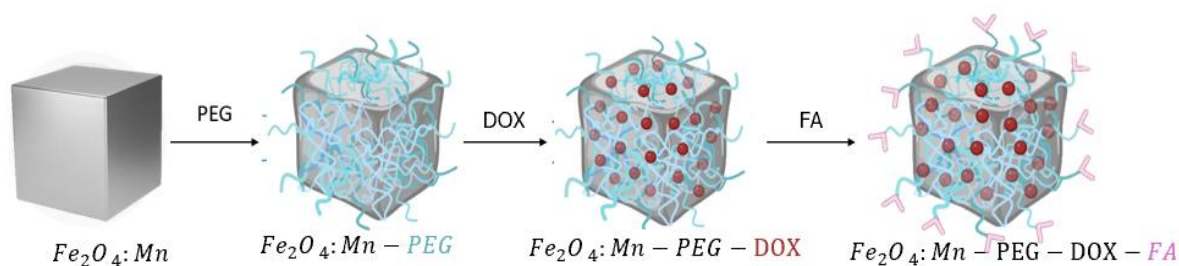


Figura 9 Síntesis de nanocompuesto de ferrita de manganeso y encapsulamiento de DOX en $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn-PEG-DOX-FA}$.

3.2 Caracterización del tamaño y forma de las Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX-FA.

3.2.1 Caracterización física TEM

La microscopía electrónica de transmisión permite estudiar muestras a escalas micro y nano, con una resolución extremadamente alta, resolviendo estructuras a nivel atómico. Utiliza un haz de electrones y lentes electromagnéticas para formar imágenes detalladas de la muestra. Esta microscopía es esencial para investigar la estructura de los materiales como la morfología y tamaños en campos como las nanociencias y la nanotecnología, biología y ciencias de los materiales.

En la Figura 10 se observa que las nanoestructuras sintetizadas para este trabajo presentan formas tipo cúbicas con bordes irregulares. También se logra identificar nanopartículas con distinta morfología, variando desde nanocubos hasta nanotubos. El inset en la Figura 10A nos permite apreciar un nanocubo individual, de un tamaño aproximado de 35 nm de lado. Asimismo, se logra observar como las nanopartículas tienden a formar aglomerados de mayor tamaño, donde se aprecia como las nanopartículas de menor tamaño tienden a ser atraídas sobre la superficie de las nanopartículas de mayor tamaño, ocasionando que las MNPs se aglomeren hasta tamaños micrométricos en cuestión de minutos durante su almacenamiento y difícilmente mitigado mediante procesos de sonicación o ultrasonificación. La aglomeración es un fenómeno que ocurre en soluciones coloidalmente inestables, la cual consiste en la unión de distintas partículas formando estructuras de mayor tamaño (Khairunnisa et al., 2021). La aglomeración observada coincide con lo reportado por Anggraini, V. et al. para MNPs obtenidas por un método de coprecipitación. Este autor propone que la aglomeración se debe a las velocidades de rotación de 600 rpm usadas en la síntesis. Cuanta mayor sea la energía cinética, mayor será la frecuencia de colisión de partículas, lo que permite que los materiales interactúen entre sí y forman aglomeraciones más grandes. Por otro lado, se ha reportado que los procesos de aglomeración también pueden ser producidos por la aparición de contaminación en la muestra, en los materiales de laboratorio o residuos de humedad después de cocción (Anggraini et al., 2021).

Los métodos más comunes de desaglomeración incluyen a los procesos mecánicos (agitación, sonicación, ultrasonicación) (Arbain et al., 2011) o químicos (tratamientos ácidos, modificación de pH) (Godymchuk et al., 2019). En este estudio recurrimos a la ultrasonicación con el fin de prevenir la aglomeración de las nanopartículas. Este procedimiento consistió en la aplicación de ondas ultrasónicas para dispersar y romper los agregados de partículas. Además, utilizamos una estrategia química que consistió en recubrir la superficie de las nanopartículas con un polímero, el PEG, el cual actúa como agente estabilizador al formar una capa protectora alrededor de cada partícula, impidiendo su aglomeración y mejorando su estabilidad en suspensión (Suk et al., 2016). Una vez realizada la PEGilación, se obtuvieron imágenes TEM para determinar su efecto en la morfología de las MNPs. En la Figura 11A, se aprecia como las MNPs se encuentran menos aglomeradas cuando están PEGiladas, lo cual se debe a que la capa del PEG provee de una mejor estabilidad coloidal en suspensiones acuosas tal como se reporta en la literatura (Aboudzadeh et al., 2021).

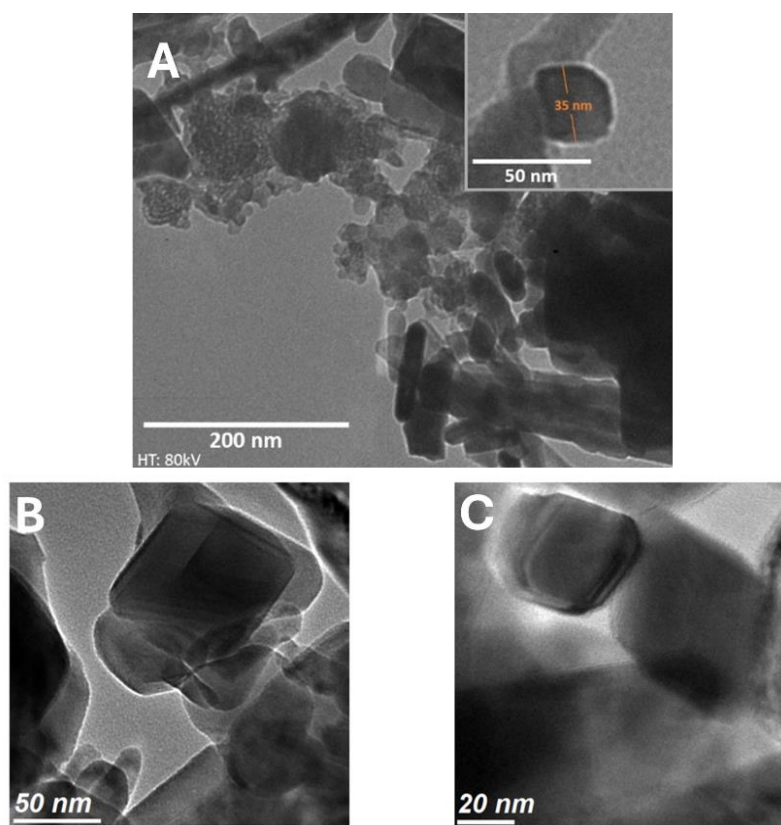


Figura 10 Micrografías TEM de las MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$. A) Imagen amplia mostrando distintas morfologías de las MNPs en aglomeración. Inset: Magnificación a un nanocubo de 35 nm de longitud. Nanocubos de B) 70 nm y C) 40 nm de tamaño.

Comparativamente, las MNPs sin recubrir se aglomeran comúnmente hasta tamaños de micrómetros como se observó en la Figura 10A, lo cual es consistente con los resultados obtenidos por Kafshgari, L. A. et al., quienes realizaron tres métodos de síntesis que producen nanopartículas magnéticas, no obstante, en sus tres muestras presentaron procesos de aglomeración hasta tamaños superiores a 1 μm (Kafshgari et al., 2019). En particular para el caso de MNPs recubiertas con PEG, se observó que los procesos de aglomeración ocurren hasta tamaños de 150 nm, aproximadamente, como se muestra en la imagen representativa en la Figura 11A y corroborando con los resultados de DLS presentados.

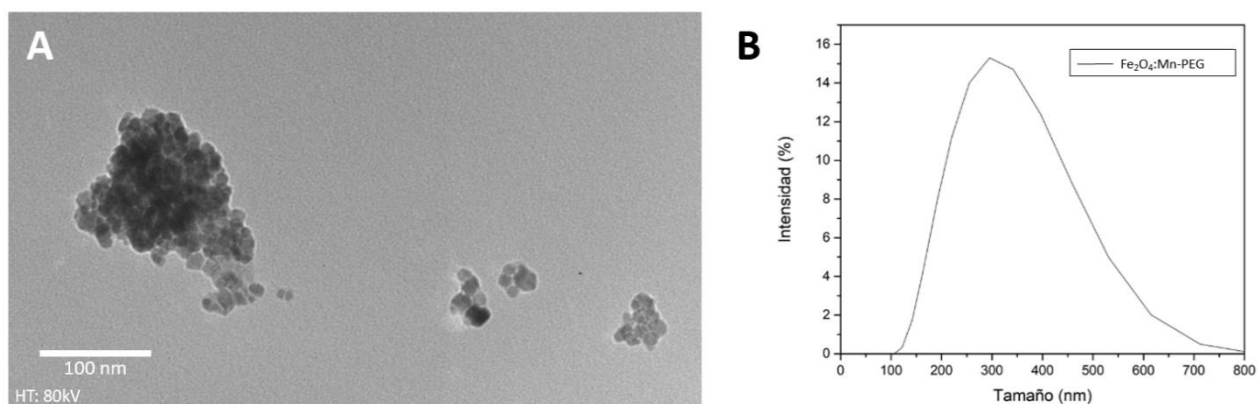


Figura 11 A) Micrografías obtenida por microscopia electrónica de transmisión para nanocubos de ferrita de manganeso recubiertas con PEG y B) dispersión de tamaños de partículas por dispersión dinámica.

3.2.2 Análisis superficial con FTIR

En este estudio se utilizó la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier con el propósito de identificar la composición química de la superficie de la nanoestructura sintetizada. El FTIR es una herramienta que tiene la capacidad de confirmar la adhesión específica del polímero PEG a las nanopartículas magnéticas, así como para validar la conjugación precisa del fármaco en las MNPs recubiertas con PEG, tal como se ha demostrado en investigaciones anteriores (Kayal & Ramanujan, 2010; Shah et al., 2013). Se obtuvieron espectros mediante FTIR durante los pasos de recubrimiento de PEG, encapsulación de DOX y la funcionalización con FA. Los espectros de FTIR obtenidos para las Fe₂O₄:Mn, Fe₂O₄:Mn-PEG, Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX y Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX-FA

son mostrados en la Figura 12. La identificación de los grupos funcionales de las MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ -PEG-DOX-FA están descritos en la Tabla 1.

Finalmente, es posible encontrar en la literatura información específica a las bandas de infrarrojo presentes en MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ encapsulados con DOX. La síntesis de las MNPs usando el método hidrotermal permite la fabricación de nanopartículas cuya carga de grupos funcionales en su superficie es poca o nula, basada en la baja señal integrada.

Se destaca que la estructura funcional después del recubrimiento con PEG está de acuerdo con lo reportado a la literatura para el mismo tipo de nanopartículas metálicas recubiertas (Shah et al., 2013).

Por otro lado, al encapsular DOX en el entrecruzamiento de PEG se logra apreciar la estructura de los grupos OH alrededor de 2900 cm^{-1} y se identifica un pico característico al anillo C=C alrededor de 1450 cm^{-1} (Kayal & Ramanujan, 2010).

Finalmente, al obtener el nanocomplejo funcionalizado con FA, se observa como la estructura vibracional de la DOX es apantallada por la señal del anillo de fenilo del FA alrededor de 1461 cm^{-1} , no obstante, la estructura vibracional de DOX alrededor de 2900 cm^{-1} es claramente identificada previa a la funcionalización con FA.

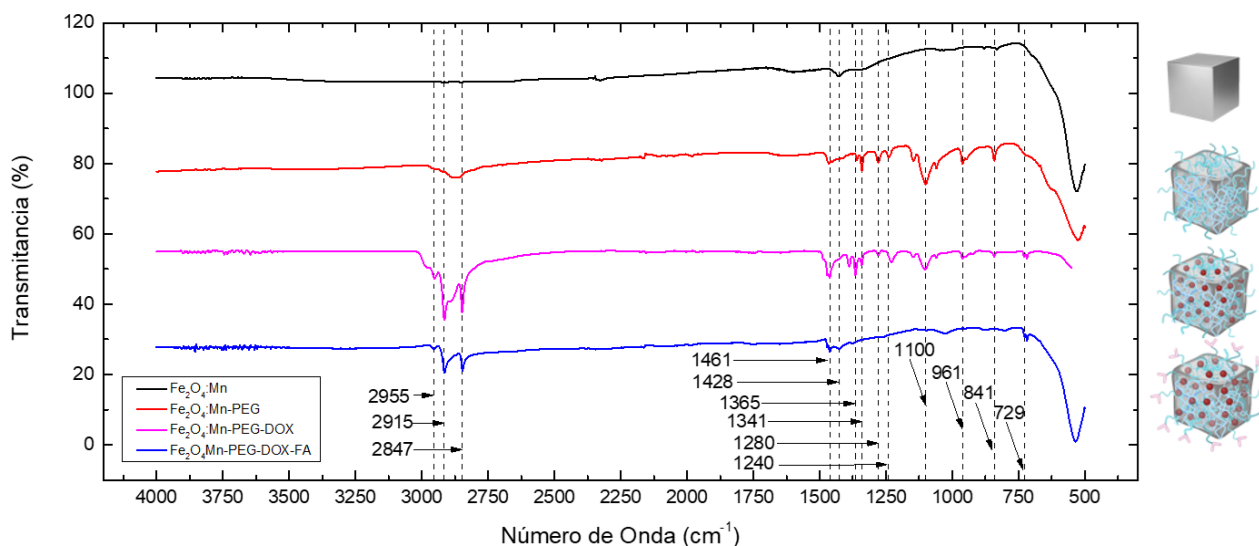


Figura 12 FTIR de nanocompuesto en los distintos pasos de la síntesis.

Tabla 1 Asignación de grupos funcionales asociados a las bandas vibracionales de FTIR para los distintos pasos de la funcionalización del nanocomplejo de $Fe_2O_4:Mn$ -PEG-DOX-FA.

<i>Muestra</i>	<i>Número de onda (cm⁻¹)</i>	<i>Descripción funcional</i>
<i>Fe₂O₄:Mn</i>	1428	v (C-C)
	841	v (C-H ₂)
<i>Fe₂O₄:Mn-PEG</i>	961	v (C-O)
	1100	v (C-O)
	1240	v (C-O)
	1280	v (C-O)
	1341	δ (C-H)
	1365	v (C-O)
	1461	δ (C-H)
	2955	v (C-H)
<i>Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX</i>	1280	v (C-O)
	1341	δ (O-H)
	1365	v (C-O)
	1428	v (C=O anillo)
	1461	δ (C-H)
	2847	v (C-H)
	2915	v (C-H)
	2955	v (C-H)
<i>Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX-FA</i>	729	δ (C=C)
	1461	δ (C-H)
		v: estiramiento δ: doblamiento

3.2.3 Caracterización magnética de $Fe_2O_4:Mn$ y $Fe_2O_4:Mn$ -PEG

La evaluación de la capacidad magnética de las nanopartículas es esencial en el diseño de nanocompuestos magnéticos funcionalizados con ácido fólico para el encapsulamiento de fármacos antitumorales. En el campo de la biomedicina, esta propiedad permite la orientación precisa de las nanopartículas hacia el sitio del tumor, mejorar la eficiencia de entrega del fármaco, y la terapia hipertérmica magnética para aniquilar tumores, entre otros (Obaidat et al., 2019). En conjunto, estas características integran diagnóstico y terapia, ofreciendo una estrategia

prometedora para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, en este estudio se evaluó la propiedad magnética que aporta la presencia de las nanopartículas de ferrita de manganeso al nanocompuesto diseñado. Para ello, se hizo un estudio de magnetización de las nanopartículas de ferrita de manganeso no recubiertas y recubiertas con PEG a temperatura ambiente en un equipo de magnetómetro de muestra vibrante (MMV). Este equipo caracteriza propiedades magnéticas como las curvas de histéresis, la coercitividad, la magnetización remanente, la saturación de magnetización, entre otros.

El super paramagnetismo es un tipo de magnetismo que ocurre en partículas ferromagnéticas donde la magnetización de las nanopartículas cambia aleatoriamente debido a campos magnéticos externos y la temperatura. Este fenómeno es muy similar al paramagnetismo, sin embargo, posee de cientos a miles de momentos atómicos acoplados lo que la hace “super”. En ausencia de un campo magnético el magnetismo promedio de las nanopartículas aparenta ser cero en cualquier dirección, por otro lado, cuando un campo magnético externo está presente las nanopartículas se orientan sus momentos magnéticos con el campo. Para que el super paramagnetismo ocurra las nanopartículas deben ser del orden nanométrico para permitir cambios en la dirección de magnetización, a tamaños mayores las partículas son de dominio sencillo y su magnetización puede ser aproximada a un solo momento magnético. La investigación de nanopartículas de ferrita de manganeso tiene relevancia en la oncología en términos de la entrega de fármacos orientada mediante receptores de ácido fólico y la hipertermia magnética para el tratamiento in situ de cáncer.

En la Figura 13 se muestra una curva de magnetización donde se observa la ausencia de las curvas de histéresis, lo que indica que las partículas son super paramagnéticas. Sin embargo, como era de esperarse, la magnetización de las MNPs sin recubrir es mucho mayor que aquella de las $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ -PEG. Esto se debe probablemente a diversas variables, tales como 1) la cantidad de nanopartículas embebidas en la nanoestructura, y 2) las nanopartículas disponibles en comparación con las que están en la muestra pura. No obstante, es importante señalar que el grado de magnetización presentado puede ser suficiente para inducir la amplificación de efectos de interés, en particular para este trabajo, la terapia magnética hipertérmica (Mirza et al., 2019).

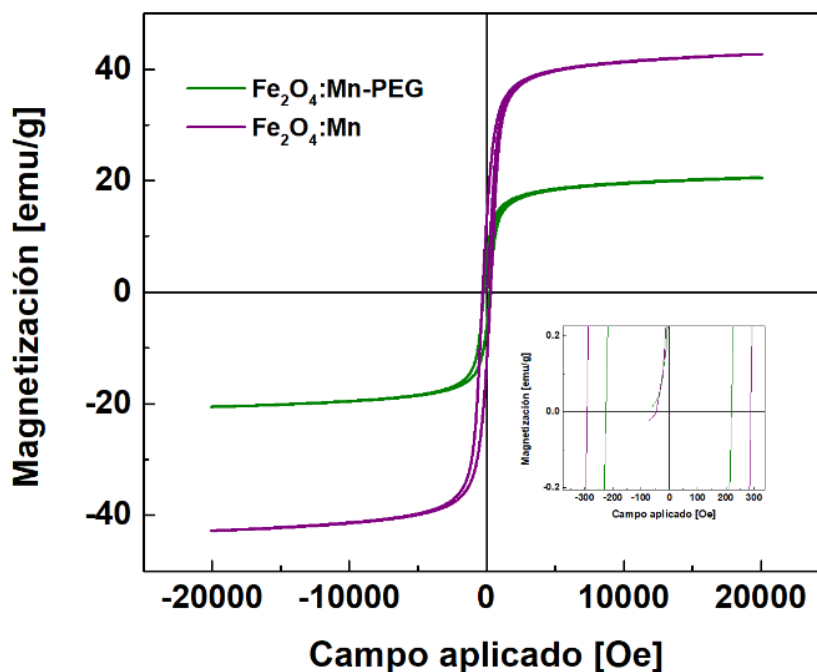


Figura 13 Curva de magnetización de ferritas de manganeso sin recubrir y recubiertas con PEG.

3.3 Evaluación de la eficiencia de encapsulación y la cinética de liberación de DOX en las $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn-PEG-DOX-FA}$

La evaluación de la encapsulación y liberación de la DOX en la nanoestructura $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn-PEG-DOX-FA}$ permite identificar su potencial uso como agente para *drug delivery* en el tratamiento contra el cáncer. Para lograr este objetivo se realizó la encapsulación y liberación controlada por pH de DOX con las MNPs. La eficiencia de encapsulación (EE) se le conoce al porcentaje del fármaco atrapado dentro de las MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{:Mn}$. Este método de caracterización se llevó a cabo liofilizando a las MNPs, para después suspenderlas en agua estéril y luego recuperar el sobrenadante por centrifugación (3000 RPM, 10 min), repitiendo el paso del lavado una segunda ocasión (A_1 y A_2).

La concentración de DOX en el sobrenadante se midió por espectroscopía UV-VIS a 481 nm y se comparó con el espectro de absorción de DOX pura disuelta en agua estéril a una concentración conocida de 0.67 mg/mL (A_{DOX}). La eficiencia de encapsulación del fármaco será calculada mediante la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{A_{DOX} - A_1 - A_2}{A_{DOX}} \times 100 \quad (4)$$

Para investigar la eficiencia de liberación (EL) de DOX de las MNPs en ambientes fisiológicos, se utilizó una técnica similar a la de encapsulación descrita anteriormente. En breve, la solución acuosa de MNPs basadas en Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX-FA fue estabilizada a pH=5.4.

Este sistema de liberación se mantuvo a una agitación de 100 rpm a 37°C para proporcionar una condición de hundimiento. Se analizaron las absorbancias de los sobrenadantes de las muestras (A_L) en los intervalos de tiempo de 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas. Los valores de absorbancia fueron característicos de la cantidad de DOX liberada por variación de pH en el sobrenadante (Khaledian et al., 2020). La eficiencia de liberación es expresada como:

$$EL(\%) = \frac{A_L}{A_{DOX} - A_1 - A_2} \times 100 \quad (5)$$

Donde A_{DOX} es la absorbancia de la DOX libre en agua a una concentración de 0.67 mg/mL, A₁ y A₂ son las absorbancias de los dos lavados durante la encapsulación y A_L es la absorbancia de DOX una vez liberado por variación de pH.

Para el caso de las MNPs de Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX-FA se logró identificar una eficacia de encapsulación (EE) del 35.78%. Considerando que se incubaron 2.5 mg iniciales de DOX, es posible estimar que se logró encapsular 0.94 mg de DOX en las Fe₂O₄:Mn-PEG-DOX-FA. Asimismo, este fármaco logra una eficacia de liberación (EL) del 25.87% para 0.5 h, lo que equivale a aproximadamente 0.23 mg de DOX liberada.

En contraste, la EL para 24 h de incubación demuestra valores del 43.3%, los cuales permiten la liberación de 0.38 mg de DOX. Los resultados pertinentes a la encapsulación y liberación medidos por espectroscopia UV-Vis se muestran en la Figura 14.

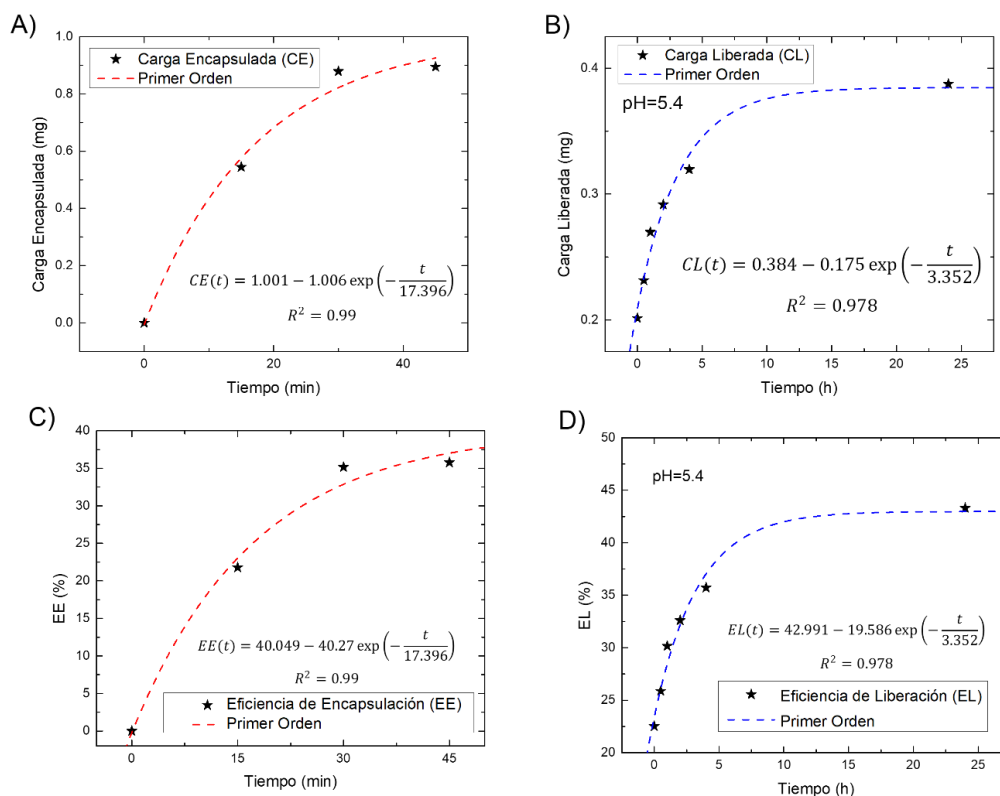


Figura 14 Cinética de primer orden encapsulación y liberación de DOX en nanocompuestos magnéticos funcionalizados con FA. A) Carga encapsulada de DOX, B) carga liberada de DOX, C) eficiencia de encapsulación y D) eficiencia de liberación de DOX usando $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn-PEG-DOX-FA}$.

Para dilucidar la cinética de encapsulación y liberación de las MNPs de $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn-PEG-DOX-FA}$ se usó una aproximación de primer orden, los cuales se muestran en líneas punteadas en la Figura 14. Los modelos se ajustan bien a la dispersión de datos con un valor de $R^2=0.99$ a la carga encapsulada y $R^2=0.978$ a la carga liberada. Así mismo, se observó cómo después del tercer lavado no se registró el pico de DOX en los sobrenadantes recuperados indicando la finalización de la fase de encapsulación. Por otra parte, este modelo indica que la liberación no podrá superar el valor de 0.38 mg a más de 24 horas de incubación de 2.5 mg de DOX usando un pH controlado de 5.4.

Capítulo 4. Conclusiones

En este trabajo se reporta una síntesis hidrotérmica que produce nanopartículas de tamaños aproximados del orden de 40 nm con morfología cúbica según lo observado por TEM. Además, se identificaron los grupos funcionales de la nanoestructura a través de su conjugación con PEG, DOX y FA mediante FTIR. Los resultados de magnetización corroboran las propiedades superparamagnéticas de la nanoestructura. Adicionalmente, se reporta la liberación y encapsulación de DOX mediada por pH, donde se destaca una eficiencia de encapsulación de hasta un 35.78% de DOX en la superficie de las MNPs y presentan una eficiencia de liberación del 43.3% para 24 horas. Las nanopartículas funcionalizadas $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ -PEG-DOX-FA tienen el potencial de ser una plataforma eficaz para la entrega de fármacos antitumorales, con una capacidad de encapsulación adecuada y una liberación controlada de la DOX. Además, se espera que la funcionalización con ácido fólico facilite la internalización celular específica en células tumorales, lo que podría aumentar la concentración intracelular del fármaco y mejorar su eficacia terapéutica. Estos resultados demuestran la importancia en torno a la investigación de nanoestructuras con aplicaciones en la oncología para entrega dirigida de fármacos antitumorales, así como la hipertermia inducida magnéticamente.

Capítulo 5. Perspectivas

Las MNPs basadas en $\text{Fe}_2\text{O}_4:\text{Mn}$ -PEG-DOX-FA en soluciones acuosas presentan un notable potencial en la entrega de fármaco debido a sus propiedades de encapsulación y liberación de DOX. Sin embargo, se requiere un estudio exhaustivo en líneas celulares de cáncer de mama y no cancerosas, para determinar su selectividad, citotoxicidad y eficacia terapéutica. Asimismo, esto abre la posibilidad del análisis de viabilidad celular de la DOX para optimizar su liberación y concentración según el medio celular. Por otra parte, una perspectiva adicional es el uso de nanopartículas fabricadas comercialmente para establecer una metodología de funcionalización con PEG, DOX y FA para su estudio en líneas celulares de cáncer de mama. Esto abre la puerta a futuras investigaciones que nos permitan estandarizar todos los parámetros en estudios *in vitro* e *in vivo*.

Literatura citada

- Aboudzadeh, M. A., Kruse, J., Sanromán Iglesias, M., Cangialosi, D., Alegria, A., Grzelczak, M., & Barroso-Bujans, F. (2021). Gold nanoparticles endowed with low-temperature colloidal stability by cyclic polyethylene glycol in ethanol. *Soft Matter*, 17(33), 7792–7801. <https://doi.org/10.1039/d1sm00720c>
- Angraini, V., Putra, R. A., & Fadlly, T. A. (2021). *Synthesis and Characterization of Manganese Ferrite (MnFe₂O₄) Nanoparticles by Coprecipitation Method at Low Temperatures*. <https://doi.org/10.2991/assehr.k.210909.028>
- Arbain, R., Othman, M., & Palaniandy, S. (2011). Preparation of iron oxide nanoparticles by mechanical milling. *Minerals Engineering*, 24(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2010.08.025>
- Babu, G., Bahl, A., Bhattacharya, G. S., Bhowmik, K. T., Dattatraya, P. S., Ghadyalpatil, N., Karandikar, S. M., Kulkarni, P., Sridharan, N., Parikh, P., Prabhash, K., Raja, T., Rajasundaram, S., Subramanian, S., Talapatra, K., & Vaid, A. (2017). Oncology gold standard® practical consensus recommendations for the use of monoclonal antibodies in the management of squamous cell carcinoma of head and neck. *South Asian Journal of Cancer*, 6(4), 154–160. https://doi.org/10.4103/sajc.sajc_181_17
- Bruschi Marcos Luciano. (2015). Mathematical models of drug release. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 63–86). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100092-2.00005-9>
- Dhamecha, D., Jalalpure, S., & Jadhav, K. (2015). Doxorubicin functionalized gold nanoparticles: Characterization and activity against human cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 50(12), 2298–2306. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.10.007>
- Erdem, M., Yalcin, S., & Gunduz, U. (2017). Folic acid-conjugated polyethylene glycol-coated magnetic nanoparticles for doxorubicin delivery in cancer chemotherapy: Preparation, characterization and cytotoxicity on HeLa cell line. *Human and Experimental Toxicology*, 36(8), 833–845. <https://doi.org/10.1177/0960327116672910>
- Godymchuk, A., Papina, I., Karepina, E., Kuznetsov, D., Lapin, I., & Svetlichnyi, V. (2019). Agglomeration of iron oxide nanoparticles: pH effect is stronger than amino acid acidity. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(10). <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4634-y>
- Huang, Y., Mao, K., Zhang, B., & Zhao, Y. (2017). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with folic acid for dual target-specific drug delivery and MRI in cancer theranostics. *Materials Science and Engineering C*, 70, 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.052>
- Kafshgari, L. A., Ghorbani, M., & Azizi, A. (2019). Synthesis and characterization of manganese ferrite nanostructure by co-precipitation, sol-gel, and hydrothermal methods. *Particulate Science and Technology*, 37(7), 900–906. <https://doi.org/10.1080/02726351.2018.1461154>

- Kalaiselvan, C. R., Laha, S. S., Somvanshi, S. B., Tabish, T. A., Thorat, N. D., & Sahu, N. K. (2022). Manganese ferrite (MnFe₂O₄) nanostructures for cancer theranostics. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 473). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214809>
- Kayal, S., & Ramanujan, R. V. (2010). Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, 30(3), 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.01.006>
- Khairunnisa, S., Wonoputri, V., & Samadhi, T. W. (2021). Effective Deagglomeration in Biosynthesized Nanoparticles: A Mini Review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1143(1), 012006. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1143/1/012006>
- Khaledian, M., Nourbakhsh, M. S., Saber, R., Hashemzadeh, H., & Darvishi, M. H. (2020). Preparation and evaluation of doxorubicin-loaded pla-peg-fa copolymer containing superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Spions) for cancer treatment: Combination therapy with hyperthermia and chemotherapy. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6167–6182. <https://doi.org/10.2147/IJN.S261638>
- Kostrzewa-Nowak, D., Paine, M., Wolf, C. R., & Tarasiuk, J. (2005). The role of bioreductive activation of doxorubicin in cytotoxic activity against leukaemia HL60-sensitive cell line and its multidrug-resistant sublines. *British Journal of Cancer*, 93(1), 89–97. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602639>
- Kreidieh, F. Y., Moukadem, H. A., & El Saghir, N. S. (2016). Overview, prevention and management of chemotherapy extravasation. In *World Journal of Clinical Oncology* (Vol. 7, Issue 1, pp. 87–97). Baishideng Publishing Group Co., Limited. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.87>
- Larissa A Korde, Mark R Somerfield, & Lisa A Carey. (2021). Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.*, 39(13), 1485–1505. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.03399>
- Mirza, S., Ahmad, M. S., Shah, M. I. A., & Ateeq, M. (2019). Magnetic nanoparticles: Drug delivery and bioimaging applications. In *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications* (pp. 189–213). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816960-5.00011-2>
- N. Catherine Sánchez. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Elsevier*, 553–562. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X)
- Narmani, A., Farhood, B., Hagi-Aminjan, H., Mortezaadeh, T., Aliasgharzadeh, A., Mohseni, M., Najafi, M., & Abbasi, H. (2018). Gadolinium nanoparticles as diagnostic and therapeutic agents: Their delivery systems in magnetic resonance imaging and neutron capture therapy. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 44, pp. 457–466). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.011>
- Narmani, A., Rezvani, M., Farhood, B., Darkhor, P., Mohammadnejad, J., Amini, B., Refahi, S., & Abdi Goushbolagh, N. (2019). Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug Development Research*, 80(4), 404–424. <https://doi.org/10.1002/ddr.21545>

- National Cancer Institute. (2023). *Doxorubicin Hydrochloride*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/doxorubicinhydrochloride>
- Obaidat, I. M., Narayanaswamy, V., Alaabed, S., Sambasivam, S., & Muralee Gopi, C. V. V. (2019). Principles of magnetic hyperthermia: A focus on using multifunctional hybrid magnetic nanoparticles. In *Magnetochemistry* (Vol. 5, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry5040067>
- Pakdaman Goli, P., Bikhof Torbati, M., Parivar, K., Akbarzadeh Khiavi, A., & Yousefi, M. (2021). Magnetic-fluorescent nanoliposomes decorated with folic acid for active delivery of cisplatin and gemcitabine to cancer cells. *Process Biochemistry*, *110*, 201–215. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.08.007>
- Rajkumar, S., & Prabakaran, M. (2018). Multi-functional nanocarriers based on iron oxide nanoparticles conjugated with doxorubicin, poly(ethylene glycol) and folic acid as theranostics for cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *170*, 529–537. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.051>
- Rana, S., Shetake, N. G., Barick, K. C., Pandey, B. N., Salunke, H. G., & Hassan, P. A. (2016). Folic acid conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Dalton Transactions*, *45*(43), 17401–17408. <https://doi.org/10.1039/c6dt03323g>
- Shah, S. A., Majeed, A., Rashid, K., & Awan, S. U. (2013). PEG-coated folic acid-modified superparamagnetic MnFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia therapy and drug delivery. *Materials Chemistry and Physics*, *138*(2–3), 703–708. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.12.044>
- Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 99, pp. 28–51). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
- World Health Organization. (2022, February 3). *Cáncer*. <https://www.who.int/news/item/03-02-2022-world-cancer-day-closing-the-care-gap>
- Ye, W. L., Du, J. B., Zhang, B. Le, Na, R., Song, Y. F., Mei, Q. B., Zhao, M. G., & Zhou, S. Y. (2014). Cellular uptake and antitumor activity of DOX-hyd-PEG-FA nanoparticles. *PLoS ONE*, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097358>