

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

EFFECTO DEL TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-*GRAFT*-  
POLI (*N*-VINIL CAPROLACTAMA) EN SUS PROPIEDADES BIOCAMPATIBLES



QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE MATERIALES

PRESENTA:

ANDREA MICHELLE LÓPEZ CANIZALES

HERMOSILLO, SONORA

AGOSTO, 2019

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría titulada **EFFECTO DEL TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-GRAFT-POLI(N-VINIL CAPROLACTAMA) EN SUS PROPIEDADES BIOCOMPATIBLES** presentada por Andrea Michelle López Canizales, han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencia de Materiales por la Universidad de Sonora.



---

**Dra. Teresa del Castillo Castro**

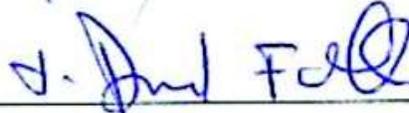
**Director de Tesis**



---

**Dr. Martín Rafael Pedroza Montero**

**Codirector de Tesis**



---

**Dr. Daniel Fernández Quiroz**

**Sinodal**



---

**Dra. Rocío Sugich Miranda**

**Sinodal**



---

**Dra. Ma. Araceli Correa Murrieta**

**Sinodal externo**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional en Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante estos dos años de posgrado.

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales por poner a mi disposición las herramientas teóricas y prácticas necesarias que me iniciaron en el campo de la investigación y ayudaron a moldear mi formación profesional.

A mi comité de tesis. Especialmente al Dr. Martín Pedroza por desde el inicio brindarme la confianza para trabajar bajo su tutela. Le agradezco de igual manera abrirme las puertas de sus instalaciones sin restricciones, sabiendo colocarme bajo la enseñanza y guía de personas cien por ciento capacitadas y trabajadoras. A la Dra. Teresa del Castillo por animarme a tomar este reto como bióloga en el campo de la ingeniería. Por su amable y siempre dispuesto apoyo ante cualquier duda presente. Y al Dr. Daniel por enseñarme con toda la paciencia el maravilloso mundo de los polímeros. Gracias por dar el extra a sus deberes y ayudarme en todos los retos.

A la Dra. Erika por su incondicional apoyo e ideas. Por siempre motivarme y hacer el papel de consejera en múltiples ocasiones.

A mis amigos de la maestría, Alita, Shio y Tadeo. Fueron mi apoyo desde el día que los conocí, sin saber que serian tan importantes en este proceso.

A mis compañeros del Laboratorio de Biofísica Médica. Andrés, que en los momentos más oscuros no me dejaste sola y madrugaste conmigo con los ensayos hemaglutinación y los benditos MTT. Gracias por prestarme tu brazo y permitirme practicar mis primeros pasos de venopunción y hacerte un caminito de piquetes. Lulú, gracias por esos ratitos de escape a la tiendita. Nayelli, gracias por tus consejos tanto de ciencia y personales.

A Manlio, por su incondicional apoyo en todas las áreas de mi vida.

Y finalmente, gracias a Dios por guiarme en este proceso tan maravilloso y poner en mi camino a personas y experiencias inolvidables.

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo de tesis a mi familia. Especialmente a mi madre y abuela por ser mi motivo para superarme. Por apoyarme con todos los recursos para sacar adelante mis estudios, dándome lo necesario y más. Siempre les agradeceré todo su esfuerzo y amor incondicional.

**Agradezco a mi familia por todo lo que soy y seré por ellos.**

## TABLA DE CONTENIDO

|   |             |
|---|-------------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....  | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE TABLAS</b> .....  | <b>x</b>    |
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>xi</b>   |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>xiii</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>    |
| <b>2. HIPÓTESIS</b> .....   | <b>4</b>    |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | <b>5</b>    |
| <b>3.1. General</b> .....   | <b>5</b>    |
| <b>3.2. Específicos</b> .....   | <b>5</b>    |
| <b>4. ANTECEDENTES</b> .....  | <b>6</b>    |
| <b>4.1. Materiales Poliméricos</b> .....                                | <b>6</b>    |
| 4.1.1. Polímeros Sintéticos.....  | 7           |
| 4.1.2. Polímeros Naturales .....  | 10          |
| 4.1.3. Copolímeros .....  | 10          |
| <b>4.2. Quitosana</b> .....   | <b>13</b>   |
| <b>4.3. Polímeros Sensibles ante Estímulos</b> .....                    | <b>14</b>   |
| 4.3.1. Polímeros Termosensibles.....                                    | 15          |
| 4.3.2. Sistema Quitosana-graft-Poli(N-vinilcaprolactama) .....          | 18          |
| <b>4.4. Métodos de Obtención para Nanopartículas de Quitosana</b> ..... | <b>20</b>   |
| 4.4.1. Coacervación.....  | 20          |
| 4.4.2. Emulsión .....   | 21          |
| 4.4.3. Gelificación Ionotrópica .....                                   | 22          |
| <b>4.5. Técnicas de Caracterización</b> .....                           | <b>23</b>   |
| 4.5.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier .....      | 23          |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.5.2. Espectroscopía RAMAN.....                                   | 24        |
| 4.5.3. Dispersión Dinámica de la Luz.....                          | 25        |
| 4.5.4. Potencial- $\zeta$ .....                                    | 26        |
| 4.5.5. Microscopio Electrónico de Barrido .....                    | 27        |
| <b>4.6. Ensayos Biológicos .....</b>                               | <b>27</b> |
| 4.6.1. Actividad Hemolítica .....                                  | 28        |
| 4.6.2. Actividad Hemaglutinante.....                               | 28        |
| 4.6.3. Ensayo de MTT .....   | 29        |
| <b>5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>                            | <b>30</b> |
| <b>5.1. Reactivos.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>5.2. Preparación de los materiales.....</b>                     | <b>30</b> |
| 5.2.1. Purificación de la Quitosana.....                           | 30        |
| 5.2.2. Síntesis del Copolímero Cs-g-PVCL.....                      | 31        |
| 5.2.3. Preparación de Nanopartículas a partir de Cs-g-PVCL .....   | 31        |
| <b>5.3. Caracterización morfológica.....</b>                       | <b>32</b> |
| 5.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido .....                    | 32        |
| <b>5.4. Caracterización de los materiales.....</b>                 | <b>32</b> |
| 5.4.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier ..... | 32        |
| 5.4.2. Espectroscopía RAMAN.....                                   | 32        |
| 5.4.3. Dispersión Dinámica de la Luz.....                          | 33        |
| <b>5.5. Ensayos Biológicos .....</b>                               | <b>34</b> |
| 5.5.1. Actividad Hemolítica .....                                  | 34        |
| 5.5.2. Actividad Hemaglutinante.....                               | 34        |
| 5.5.3. Ensayo de MTT .....   | 35        |
| <b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>                           | <b>37</b> |
| <b>6.1. Preparación de los materiales.....</b>                     | <b>37</b> |
| 6.1.1. Preparación de Nanopartículas a partir de Cs-g-PVCL .....   | 37        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6.2. Caracterización morfológica.....</b>                       | <b>39</b> |
| 6.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido .....                    | 39        |
| <b>6.3. Caracterización de los materiales.....</b>                 | <b>40</b> |
| 6.3.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier ..... | 40        |
| 6.3.2. Espectroscopía RAMAN.....                                   | 42        |
| 6.3.3. Estabilidad Coloidal .....                                  | 44        |
| 6.3.4. Comportamiento Termosensible .....                          | 46        |
| <b>6.4. Ensayos Biológicos .....</b>                               | <b>48</b> |
| 6.4.1. Actividad Hemolítica .....                                  | 48        |
| 6.4.2. Actividad Hemaglutinante.....                               | 50        |
| 6.4.3. Ensayo de MTT .....   | 53        |
| <b>7. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>8. RECOMENDACIONES .....</b>                                    | <b>56</b> |
| <b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>62</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| <b>Figura</b> |   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| <b>1</b>      | Clasificación de los polímeros según su origen.....   | 6             |
| <b>2</b>      | Copolímero (a) aleatorio, (b) alternado, (c) por bloques (d) y de injerto.....  | 11            |
| <b>3</b>      | Estructura química de la quitosana.....   | 13            |
| <b>4</b>      | Representación esquemática de los diagramas de fase para polímeros que muestran un comportamiento de LCST o UCST.....   | 16            |
| <b>5</b>      | Estructura química del (a) monómero <i>N</i> -vinil caprolactama y el (b) polímero PVCL.....  | 17            |
| <b>6</b>      | Síntesis del copolímero Cs- <i>g</i> -PVCL. ....  | 18            |
| <b>7</b>      | Métodos de obtención de nanopartículas de quitosana por emulsión.....   | 21            |
| <b>8</b>      | Formación de nanopartículas de quitosana por medio de gelificación ionotrópica usando TPP.....  | 22            |
| <b>9</b>      | Representación gráfica del diámetro hidrodinámico por DLS.....  | 26            |
| <b>10</b>     | Representación gráfica de potencial- $\zeta$ por DLS. a) Partículas cargadas se repelen unas a otras. b) Partículas sin carga formando aglomeraciones.....            | 27            |
| <b>11</b>     | Apariencia de eventos de hemaglutinación. Fila superior de izquierda a derecha, +++++, +++, ++, +, +, $\pm$ . Fila inferior de izquierda a derecha, $\pm$ , -, -..... | 35            |
| <b>12</b>     | Distribución del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de Cs- <i>g</i> -PVCL de 169 y 281 nm, respectivamente. ....  | 38            |
| <b>13</b>     | Morfología de las nanopartículas de Cs- <i>g</i> -PVCL de a)169 y b)281 nm obtenida por SEM.....  | 39            |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| <b>14</b> | Espectros FTIR en la región 1800-600 cm <sup>-1</sup> para muestras de Cs, PVCL y Cs- <i>g</i> -PVCL.....  | 41 |
| <b>15</b> | Espectros FTIR en la región 1800-600 cm <sup>-1</sup> para muestras de copolímero Cs- <i>g</i> -PVCL y nanopartículas de Cs- <i>g</i> -PVCL de 169 y 281 nm.....             | 42 |
| <b>16</b> | Espectro RAMAN en la región 1000-600 cm <sup>-1</sup> para muestras de Cs, PVCL y Cs- <i>g</i> -PVCL.....  | 43 |
| <b>17</b> | Estabilidad coloidal de las nanopartículas Cs- <i>g</i> -PVCL a) 169 y b) 281 nm en medio acuoso (pH 7), solución salina fisiológica (pH 4.4) y DMEM (pH 7.4) a 25 ° C. .... | 45 |
| <b>18</b> | Efecto de la temperatura en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de Cs- <i>g</i> -PVCL de a) 169 y b) 281 nm, suspendidas en agua (pH 7).....                     | 47 |
| <b>19</b> | Actividad hemolítica cuantitativa de las nanopartículas de Cs- <i>g</i> -PVCL de 169 y 281 nm.....   | 49 |
| <b>20</b> | Actividad hemolítica cualitativa de las nanopartículas de Cs- <i>g</i> -PVCL de 169 y 281 nm. ....   | 50 |
| <b>21</b> | Apariencia de eventos hemaglutinantes presentes ante el estímulo del copolímero Cs- <i>g</i> -PVCL. ....   | 51 |
| <b>22</b> | Resultado de la actividad hemaglutinante tras 1 hora de incubación bajo el estímulo de nanopartículas Cs- <i>g</i> -PVCL de 169 y 281 nm.....                                | 52 |
| <b>23</b> | Viabilidad en línea celular a) HUVEC y b) HeLa para las nanopartículas de Cs- <i>g</i> -PVCL de 169 y 281 nm.....  | 54 |

## LISTA DE TABLAS

| <b>Tabla</b> |  | <b>Página</b> |
|--------------|--|---------------|
| <b>I</b>     | Tipos de polimerización radicalica.....                                      | 9             |
| <b>II</b>    | Copolímeros de injerto derivados de quitosana. ....                          | 12            |
| <b>III</b>   | Descripción del grado de hemaglutinación.....                                | 35            |
| <b>IV</b>    | Promedio del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de Cs-g-PVCL. .... | 37            |

## RESUMEN

Los polímeros inteligentes son materiales capaces de responder reversiblemente ante estímulos externos como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, luz, campo eléctrico, entre otros. Estos polímeros son de gran interés en la comunidad científica, debido a sus potenciales aplicaciones. En particular, el copolímero termosensible quitosana-*graft*-poli (*N*-vinil caprolactama), es soluble en agua, su temperatura de solución crítica inferior es dependiente de la longitud de cadena de poli (*N*-vinil caprolactama) injertada (36 - 44°C) y se considera biocompatible. La temperatura de transición de fase que presenta es cercana a la fisiológica, y por tanto es un buen candidato para utilizarse en aplicaciones biomédicas, como encapsulación y liberación de fármacos, ingeniería de tejidos, entre otras.

En este trabajo se sintetizaron nanopartículas a partir del copolímero quitosana-*graft*-poli (*N*-vinil caprolactama) con el objetivo de evaluar el efecto del tamaño de las nanopartículas en sus propiedades biocompatibles. Se analizó la estabilidad coloidal por dispersión dinámica de luz, así como el comportamiento del diámetro hidrodinámico ante la temperatura. Se estudió la morfología de las nanoestructuras mediante microscopía electrónica de barrido. La modificación química se analizó por espectroscopia Raman y FTIR. Además, se evaluó el efecto citotóxico, la actividad hemolítica y hemaglutinante para las nanopartículas de quitosana-*graft*-poli (*N*-vinil caprolactama).

Como resultado, se obtuvieron nanopartículas de quitosana-*graft*-poli (*N*-vinil caprolactama) de morfología pseudo-esférica con diámetro hidrodinámico de 169 y 281 nm y potencial- $\zeta$  de +29 y +45 mV, respectivamente. En particular, las nanopartículas de 169 nm mostraron mayor efecto citotóxico, hemolítico y hemaglutinante. Lo anterior se puede relacionar con que, a tamaños más pequeños, se favorecen las interacciones superficiales entre el material y las células. Los resultados sugieren que el tamaño de las nanopartículas de

quitosana-*graft*-poli (*N*-vinil caprolactama) es un factor que influye en sus propiedades de biocompatibilidad.

## ABSTRACT

Intelligent polymers are materials capable of reversibly responding to external stimuli such as temperature, pH, ionic strength, light, electric field, among others. These polymers have introduced great interest in the scientific community, due to its potential applications. In particular, the thermosensitive chitosan-*graft*-poly (*N*-vinyl caprolactam) copolymer is soluble in water, its lower critical solution temperature depends on the chain length of grafted poly (*N*-vinyl caprolactam) (36-44 ° C) and it is considered biocompatible. The temperature of phase transition of this polymer is close to the physiological temperature, and therefore it is a good candidate to be used in biomedical applications, such as encapsulation and drug release, tissue engineering, among others.

In this work, nanoparticles were synthesized from the chitosan-*graft*-poly (*N*-vinyl caprolactam) copolymer with the aim of evaluating the effect of the size of the nanoparticles on their biocompatible properties. The colloidal stability was analyzed by dynamic light scattering, as well as the behavior of the hydrodynamic diameter as function of temperature. The morphology of the nanostructures was studied by scanning electron microscopy. Chemical modification was analyzed by Raman spectroscopy and FTIR. In addition, the cytotoxic effect, haemolytic activity and hemagglutinating agent for chitosan-*graft*-poly (*N*-vinyl caprolactam) nanoparticles was evaluated.

As a result, chitosan-*graft*-poly (*N*-vinyl caprolactam) nanoparticles of pseudo-spherical morphology with hydrodynamic diameter of 169 and 281 nm and potential- $\zeta$  of +29 and +45 mV, respectively, were obtained. In particular, the 169 nm nanoparticles showed greater cytotoxic, haemolytic and haemagglutinating effects. This can be related to the fact that, at smaller sizes, superficial interactions between the material and the cells are favored. The results

suggest that the size of the nanoparticles of chitosan-graft-poly (N-vinyl caprolactam) is a factor that influences their biocompatibility properties.

## 1. INTRODUCCIÓN

Para la comunidad científica, la investigación relacionada con materiales inteligentes ha tenido un notable interés en áreas como biotecnología, textiles, alimentos, biomedicina, entre otras. Estos materiales tienen la capacidad de responder de manera reversible ante algún estímulo externo como la temperatura, pH, campo eléctrico, campo magnético, fuerza iónica, entre otros (Aguilar and San Román, 2014). Especialmente en el área biomédica, se ha buscado introducir a los materiales sensibles a la temperatura y el pH como alternativa a los sistemas tradicionales de administración de fármacos, ya que son estímulos que ocurren de manera natural en el cuerpo humano (Hoogenboom, 2014).

En este sentido, algunos polímeros sintéticos y naturales han sido estudiados para explotar sus propiedades. Uno de los biopolímeros mayormente investigado es la quitosana (Cs), debido a que presenta propiedades biocompatibles, biodegradables y no tóxicas con el organismo. Este polímero tiene grupos reactivos adecuados para su modificación química: grupos hidroxilo primarios en el C-6 y secundarios en el C-3, y grupos amino en el C-2 de cada unidad desacetilada. Esto hace a la Cs susceptible a una variedad de reacciones que pueden aplicarse de forma controlada para mejorar sus propiedades u obtener una amplia gama de nuevos materiales (Peniche et al., 2008; Prabakaran et al., 2008).

Entre los métodos para modificar químicamente a los polímeros naturales, se encuentra la copolimerización por injerto, una técnica sencilla no degradativa, que permite enlazar covalentemente los grupos terminales del material a injertar, con los grupos funcionales laterales de la cadena principal de un polímero. En este sentido, la Cs posee la estructura propicia para efectuar cambios químicos

de esta naturaleza, que conlleve a la formación de derivados funcionales con características particulares (O dian, 2004).

La poli(*N*-vinil caprolactama) (PVCL) es un polímero termosensible que se presenta como un gran candidato. Lo característico de este material es que exhibe una separación de fase en solución acuosa a una temperatura alrededor de los 37 ° C, cercana a las condiciones fisiológicas. Dicha temperatura de transición puede ser modificada, alterando la longitud de cadena y la concentración de la solución, y de esta forma buscar obtener materiales para diferentes aplicaciones (Cortez-Lemus and Licea-Claverie, 2016; Medeiros et al., 2010).

Recientemente, el copolímero quitosana-*graft*-PVCL (Cs-*g*-PVCL) ha tenido gran impacto en el área biomédica debido a su sensibilidad al pH, fuerza iónica y temperatura, y a no ser tóxico en intervalo de concentración considerable. Este copolímero es soluble en agua por debajo de su temperatura crítica inferior de solución (LCST), la cual es dependiente de la arquitectura molecular del material y se encuentra entre 37-46 ° C (Fernández-Quiroz et al., 2015).

Particularmente, se ha reportado la preparación de nanopartículas (NP) a partir de este copolímero termosensible, las cuales han presentado potencialidad para aplicaciones de acarreamiento de diversos fármacos antitumorales (Fernández-Quiroz et al., 2019; Rejinold et al., 2011; Sanoj Rejinold et al., 2015). Sin embargo, para poder aplicar este sistema polimérico en el área biomédica, hay muchos factores que inciden sobre sus propiedades biocompatibles. El tamaño, la forma, la concentración y la carga de las nanopartículas son algunos aspectos influyentes. En especial el tamaño de las nanoestructuras, es un parámetro importante en la interacción, estabilidad, captación, deposición y citotoxicidad celular (González-Fernández et al., 2012; Grassian, 2008).

Por lo anterior, en el presente trabajo se prepararon nanopartículas a partir del copolímero Cs-*g*-PVCL y se analizó el efecto del tamaño de las nanopartículas sobre sus propiedades biocompatibles.

## 2. HIPÓTESIS

La variación en el tamaño de las nanopartículas elaboradas a partir del copolímero quitosana-*graft*-poli (*N*-vinil caprolactama), tiene un efecto sobre las propiedades biocompatibles del sistema.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. General

Evaluar el efecto del tamaño de las nanopartículas obtenidas a partir del copolímero quitosana-*graft*-poli (*N*-vinil caprolactama) en sus propiedades biocompatibles.

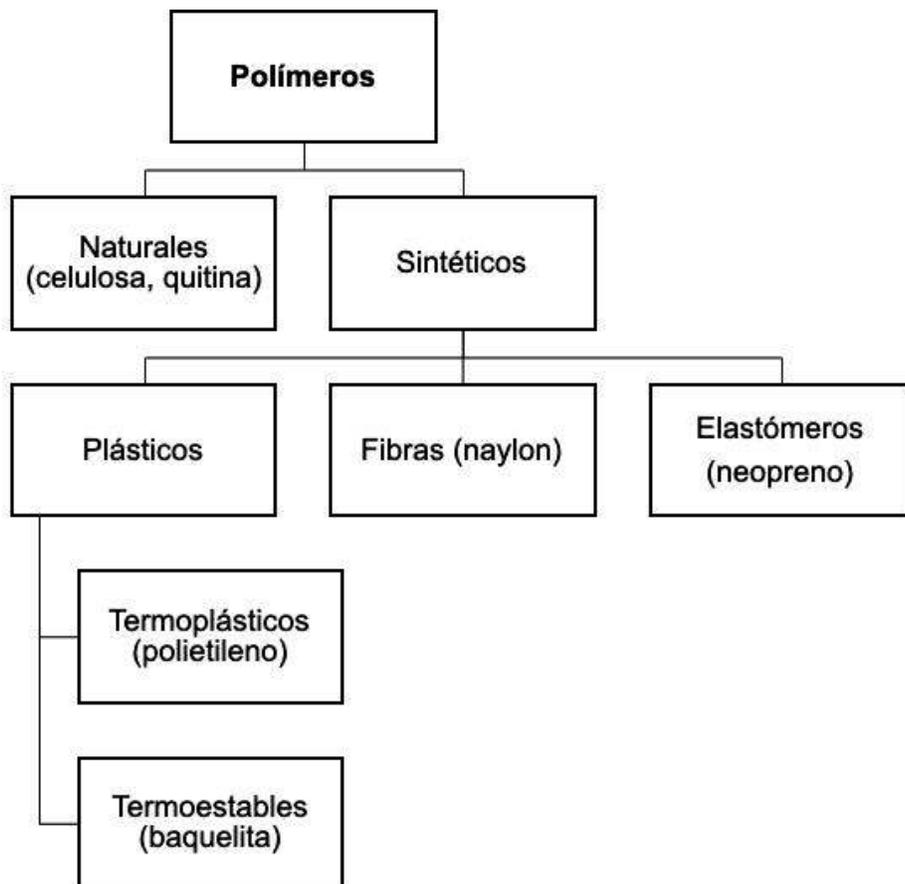
#### 3.2. Específicos

- Sintetizar el copolímero Cs-*g*-PVCL mediante la amidación de los grupos amina de la quitosana y los grupos -COOH de la PVCL usando DMTMM como agente activador de los grupos carboxilo.
- Preparar nanopartículas del copolímero Cs-*g*-PVCL por el método de gelificación ionotrópica, partiendo de dos diferentes concentraciones del copolímero.
- Caracterizar los materiales obtenidos por espectroscopía FTIR y RAMAN.
- Analizar las características morfológicas de las nanopartículas obtenidas por SEM.
- Estudiar el tamaño, potencial- $\zeta$  y estabilidad coloidal de las nanopartículas de Cs-*g*-PVCL a partir de mediciones por dispersión dinámica de luz.
- Evaluar el efecto del tamaño de las nanopartículas de Cs-*g*-PVCL en su actividad hemolítica, hemaglutinante, y su citotoxicidad.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Materiales Poliméricos

Los polímeros son macromoléculas formadas de la unión de monómeros, moléculas pequeñas de bajo peso molecular, que se unen por enlaces químicos de tipo covalente. Existen varias clasificaciones para estos materiales y una de ellas es por su origen, divididos en polímeros sintéticos y naturales (Figura 1) (O dian, 2004).



**Figura 1.** Clasificación de los polímeros según su origen. Modificado de Odian, (2004).

#### 4.1.1. Polímeros Sintéticos

Los polímeros sintéticos son creados por el hombre a nivel laboratorio o industria. Estos se clasifican en polímeros de adición y condensación diferenciándose en la composición de los monómeros a partir de los cuales se sintetizan. Los polímeros de adición resultan de reacciones de adición de monómeros con la misma composición química, mientras que los polímeros de condensación se forman a partir de monómeros que contienen dos o más grupos funcionales, que por las diversas reacciones de condensación se da la eliminación de alguna molécula pequeña como el agua (Ouellette and Rawn, 2015).

Para la síntesis de estos polímeros, existen dos mecanismos de polimerización: en cadena y por pasos. La polimerización en cadena es típica de los polímeros por adición o poliadicionados, mientras que los polímeros de condensación o policondensados siguen reacciones que proceden por pasos discretos (Odián, 2004).

En la polimerización en cadena se utiliza un iniciador, que puede ser un radical libre, un catión o un anión, para producir una especie con un centro reactivo. La finalidad es propagar ese centro reactivo por las adiciones sucesivas de grandes números de moléculas de monómero en una reacción en cadena. La característica distintiva de la polimerización en cadena es que el crecimiento del polímero tiene lugar por el monómero que reacciona solo con el centro reactivo (Odián, 2004).

La polimerización por radicales libres en cadena, comprende de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La etapa de iniciación se da lugar por la generación de especies reactivas o radicales, a partir de la ruptura homolítica de un enlace químico o por transferencia de electrones. Estas especies reactivas (radicales libres) reaccionan con la molécula monomérica por

apertura del enlace- $\pi$  para formar un nuevo radical (monómero activado), lo que da pie a al crecimiento de la cadena polimérica. La terminación de esta reacción en cadena sucede por la desactivación del centro reactivo, lo cual puede ocurrir por combinación o desproporción (Odián, 2004).

La polimerización radicalica puede llevarse a cabo en condiciones homogéneas (en masa y en solución) o heterogéneas (suspensión y emulsión) (Tabla I). Para el desarrollo de este trabajo, es de interés el proceso de polimerización en disolución, el cual favorece la transferencia de calor homogénea en la reacción (Odián, 2004).

Como desventajas del proceso de polimerización en solución, se tiene la posible transferencia de cadena con el solvente y la remoción posterior del solvente para poder obtener un material puro. La velocidad con la que ocurre la reacción se verá afectada por la concentración de monómero agregado. De igual forma variando la concentración del monómero en la disolución y la relación monómero/iniciador es posible modificar y controlar en el peso molecular promedio y la polidispersidad del producto final. De manera general, cuanto mayor es la concentración de monómero y menor es la concentración de iniciador, las cadenas del polímero obtenido serán más largas, y viceversa (Odián, 2004).

**Tabla I.** Tipos de polimerización radicalica. Modificada de (Odian, 2004).

| <b>Polimerización radicalica en:</b> | <b>Proceso</b>   | <b>Ventajas</b>   | <b>Desventajas</b>   |
|--------------------------------------|--|---|--|
| <b>Solución</b>                      | Monómeros disueltos en un solvente inerte.   | Buen control térmico.<br>El uso de un solvente hace sencilla la agitación y disminuye la viscosidad de la mezcla en reacción. | La pureza del polímero puede verse afectada si hay dificultades en la eliminación del disolvente.                    |
| <b>Masa</b>                          | Ausencia de solvente inerte o medio de dispersión.   | Mínima contaminación en el producto.  | Naturaleza altamente exotérmica, tiene problemas de viscosidad y dificultad para la disipación del calor.            |
| <b>Suspensión</b>                    | El monómero y el iniciador se dispersan en el medio de reacción en el cual no son solubles.                                    | Buen control térmico y la facilidad para extraer las partículas discretas del polímero.                                       | Se utilizan de estabilizadores. El sistema de dos fases no se puede mantener en polimerización sin agitación.        |
| <b>Emulsión</b>                      | Los componentes principales son el (los) monómero (s), el medio de dispersión, el emulsionante y el iniciador soluble en agua. | Se pueden emplear altos pesos moleculares y altas velocidades de reacción.  | El polímero obtenido tiene algunas impurezas debido al uso de tensioactivos. Hay problemas térmicos y de viscosidad. |

#### 4.1.2. Polímeros Naturales

Por otro lado, los polímeros naturales son todos aquellos que provienen de los seres vivos, y por lo tanto, dentro de la naturaleza se puede encontrar una gran diversidad de ellos. Los carbohidratos, las proteínas y los ácidos nucleicos son polímeros producto de la síntesis biológica que cumplen funciones vitales en los organismos y por tanto se les llama biopolímeros (Hamidakash et al., 2015).

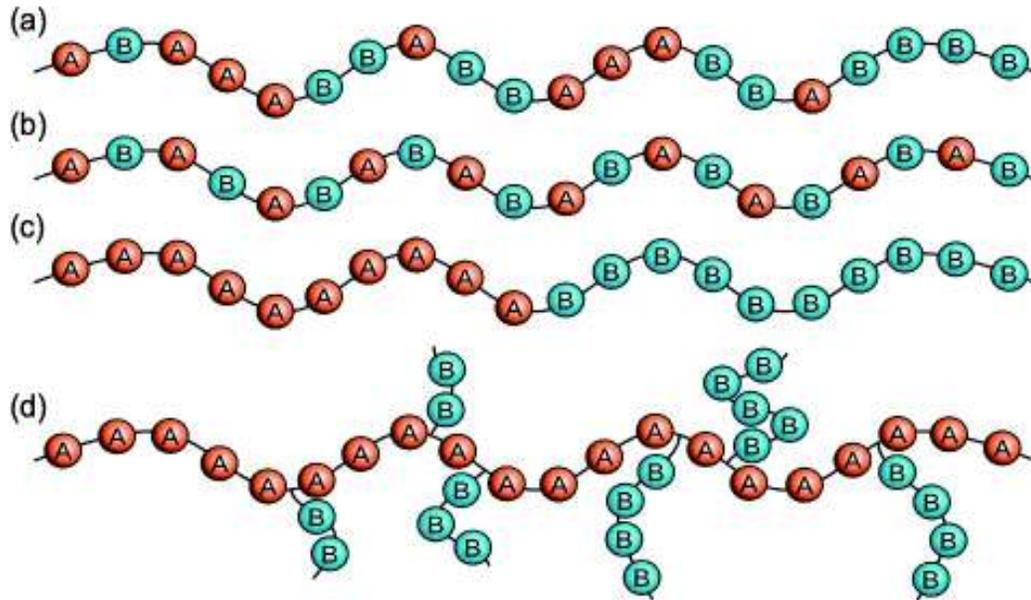
Los carbohidratos en particular exhiben diversidad en sus estructuras y propiedades, debido a que tienen un amplio rango de pesos moleculares, un gran número de grupos reactivos y una composición química variable. Debido a la presencia de grupos hidroxilo, carboxilo y amina, pueden modificarse fácilmente de acuerdo con la demanda y los requisitos (Argüelles-Monal et al., 2018).

Un claro ejemplo de la versatilidad de los carbohidratos es la quitina, segundo polímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa. Al someter este polisacárido a un proceso de desacetilación para eliminar sus grupos acetilo y dar lugar a la formación de grupos reactivos aminas, se puede obtener Cs. Este biopolímero es de gran interés en muchas aplicaciones tales como biomedicina, farmacia, biotecnología, nanotecnología, etc (Argüelles-Monal et al., 2018).

#### 4.1.3. Copolímeros

De acuerdo con el tipo de monómeros que forman a los polímeros, estos reciben el nombre de homopolímeros y copolímeros. El primero define a macromoléculas que son formadas por la repetición de unidades monoméricas idénticas, es decir no contiene heteroátomos, mientras que un copolímero es una macromolécula compuesta por dos o más monómeros o unidades repetitivas

distintas dispuestas aleatoriamente, alternadas, por bloques o por injerto (Figura 2) (Odian, 2004).



**Figura. 2.** Copolímero (a) aleatorio, (b) alternado, (c) por bloques (d) y de injerto.

Se le considera un copolímero alternante cuando los monómeros se intercalan en la estructura del material uno después del otro para formar las cadenas. Un copolímero aleatorio tiene sus unidades monoméricas distribuidas al azar, es decir, sin orden específico a lo largo de la cadena. Mientras que el copolímero en bloque, es una cadena principal lineal con una o más secuencias largas ininterrumpidas de cada especie polimérica (Odian, 2004).

Haciendo énfasis en los copolímeros de injerto, estos se definen como macromoléculas con una cadena principal lineal de un monómero al que están unidas una o más ramificaciones de otro monómero. Existe a su vez tres métodos de síntesis, "injerto sobre" (*grafting onto* en inglés), "injerto desde" (*grafting from*), y el "injerto a través de" (*grafting through*) (Odian, 2004).

Para esta investigación, se muestra especial interés en definir el copolímero por injerto *grafting onto* que deriva de una reacción de acoplamiento entre grupos funcionales finales de las cadenas a injertar en los grupos funcionales laterales de la cadena principal (O dian, 2004). Las propiedades de los copolímeros resultantes están ampliamente controladas por las características de las cadenas laterales, que incluyen la estructura molecular, la longitud y el número.

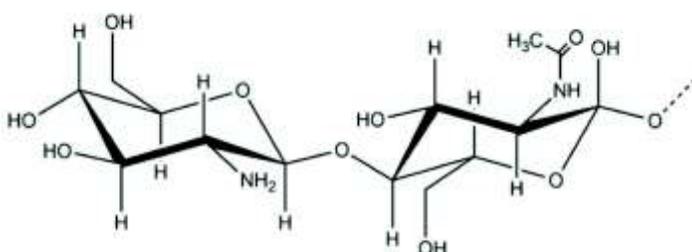
Entre los diversos métodos, la copolimerización por injerto es la más atractiva para modificar las propiedades químicas y físicas de los polímeros naturales. Hasta hoy, se han realizado extensos trabajos de investigación para estudiar copolímeros de injerto derivados de Cs (Jayakumar et al., 2005). Se citan algunos ejemplos en la Tabla II.

**Tabla. II.** Copolímeros de injerto derivados de quitosana.

| <b>Material combinado con Cs</b>  | <b>Propiedades</b>                           | <b>Aplicaciones</b>   | <b>Referencia</b>                |
|-----------------------------------|--|---|----------------------------------|
| <b>Polianilina</b>                | Material conductor                           | Encapsulación y liberación fármacos ante cambios de conductividad eléctrica | (Ramanathan et al., 2014).       |
| <b>Poli (ácido acrílico)</b>      | Material super-absorbente                    | Dispositivos en la liberación controlada de solutos                         | (Rodrigues et al., 2013).        |
| <b>Poli (N-vinilcaprolactama)</b> | Material sensible a estímulos de temperatura | Encapsulación y liberación fármacos ante cambios de temperatura             | (Fernández-Quiroz et al., 2019). |

## 4.2. Quitosana

La Cs es un polisacárido catiónico lineal que se obtiene por la desacetilación alcalina de la quitina, componente principal del exoesqueleto de los crustáceos, como los camarones. Se compone de dos tipos de unidades estructurales: 2-amino-2-deoxi-D-glucosa y N-acetil-2-amino-2-deoxi-D-glucosa, unidas entre sí por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) (Figura 3) (Peniche et al., 2008).



**Figura. 3.** Estructura química de la quitosana. Modificado de Argüelles-Monal et al., (2017).

Este polisacárido tiene características de interés para el área biomédica, tales como sensibilidad al pH y a la fuerza iónica, biocompatibilidad, biodegradabilidad, mucoadhesividad, baja toxicidad y baja inmunogenicidad (Quiñones et al., 2018). Debido a estas propiedades favorables, el interés en la Cs y sus derivados como transportadores de fármacos dirigidos a tumores se ha incrementado en los últimos años (Prabaharan, 2015).

Este biopolímero es uno de los más utilizados para la preparación de nanopartículas debido a sus características estructurales únicas y a la diversidad de agentes de reticulación para proporcionar una red que eficientemente pueda contener moléculas de un fármaco (Prabaharan, 2015). Dado que estas nanoestructuras muestran tiempos de circulación sanguínea relativamente largos y una baja captación por parte del sistema retículo endotelial por su pequeño tamaño, pueden dirigirse a los sitios del tumor a través de la arquitectura vascular

desorganizada y defectuosa en el tejido tumoral, conocida como la permeabilidad mejorada (Prabaharan, 2015). Además, se sabe que la naturaleza catiónica de las nanopartículas de Cs interactúa favorablemente con las membranas celulares, mejorando así su captación intracelular (Fernández-Quiroz et al., 2019).

Con el fin de mejorar las propiedades de la Cs, se ha prestado atención a su modificación química. Este polímero tiene grupos reactivos adecuados para este propósito: grupos hidroxilo primarios en el C-6 y secundarios en el C-3, y grupos amino en el C-2 de cada unidad desacetilada. Esto hace a la Cs susceptible a una variedad de reacciones que pueden aplicarse de forma controlada para obtener una amplia gama de nuevos materiales (Peniche et al., 2008).

De las posibles modificaciones, se anticipa que la copolimerización es prometedora en el desarrollo de diseños moleculares, al ofrecer nuevos tipos de materiales híbridos hechos a medida de polímeros naturales, como la Cs, y polímeros sintéticos (Jayakumar et al., 2005).

#### **4.3. Polímeros Sensibles ante Estímulos**

Los sistemas vivos responden a condiciones ambientales que varían naturalmente, cambiando su estructura y funcionalidad para adaptarse mediante el uso de complejos mecanismos de detección, funciones de activación y regulación. La naturaleza puede considerarse el mejor ejemplo que un científico puede tener al desarrollar nuevos materiales y aplicaciones, y el desafío general para los científicos es crear materiales con propiedades dinámicas y ajustables, imitando el microambiente activo que ocurre en la naturaleza (Aguilar and San Román, 2014).

Los polímeros inteligentes o sensibles a estímulos se definen generalmente como macromoléculas capaces de experimentar transiciones de fase rápidas y reversibles de una microestructura hidrófila a hidrófoba. Estas transiciones son provocadas por pequeños cambios en su microambiente, tales como variaciones de temperatura, pH, fuerza iónica y campo eléctrico o magnético (Recillas et al., 2009) que inducen respuestas macroscópicas en el material, como hinchamiento/colapso o transiciones de solución a gel, dependiendo del estado físico de las cadenas (Hoogenboom, 2014a).

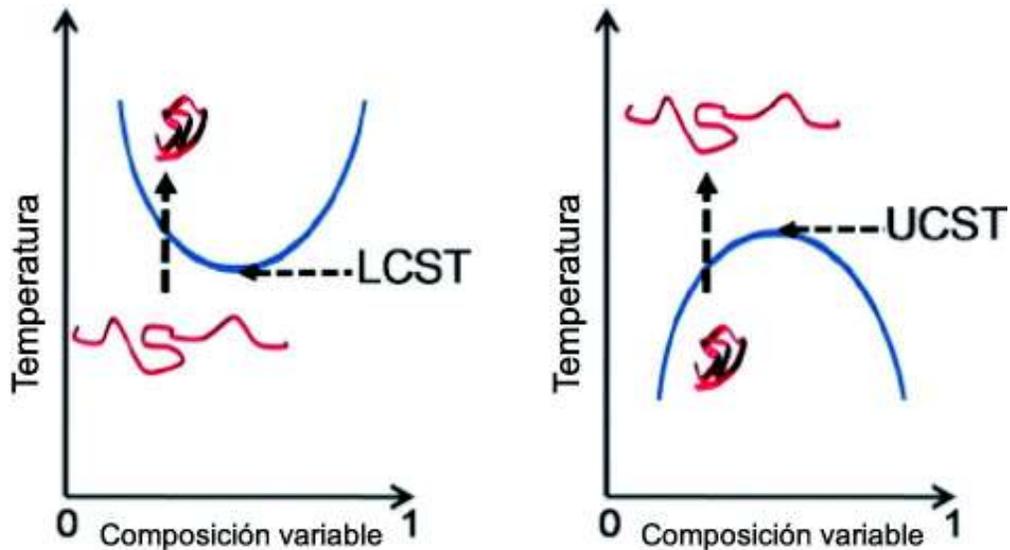
#### 4.3.1. Polímeros Termosensibles

Los polímeros termosensibles son especialmente interesantes ya que las variaciones de temperatura pueden aplicarse externamente de una manera no invasiva, e igualmente, pueden ocurrir de manera natural, por ejemplo, durante los ciclos diurnos y nocturnos, así como el aumento de la temperatura del tejido inflamado, siendo potencialmente útiles en aplicaciones biomédicas (Hoogenboom, 2014).

Hay tres principales clases de polímeros sensibles a la temperatura: Los (1) materiales con memoria de forma, (2) materiales líquidos cristalinos y (3) soluciones de polímeros sensibles. Este último es el más estudiado, ya que como su nombre lo indica, la separación de fases ocurre desde una solución homogénea a una fase de polímero concentrado y una fase de polímero diluido. Lo anterior suele ir acompañado de una transición de una solución clara a turbia, también conocida como temperatura de punto de nube (TPN) para soluciones de polímeros de baja concentración (Hoogenboom, 2014; Medeiros et al., 2013).

Cuando la separación de fases se produce a una temperatura elevada, se conoce como una transición de temperatura crítica inferior de solución (LCST),

mientras que el comportamiento de fase inversa se conoce como transición de temperatura crítica superior de solución (UCST) (Figura 4).



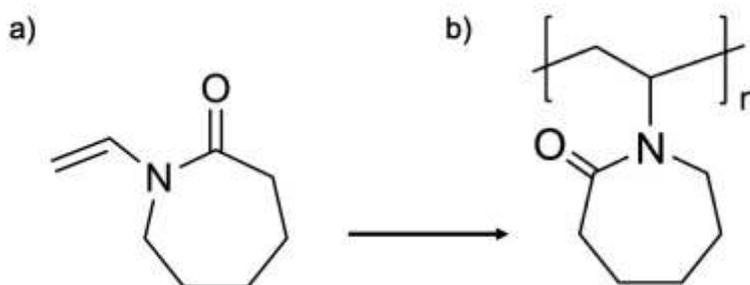
**Figura 4.** Representación esquemática de los diagramas de fase para polímeros que muestran un comportamiento de LCST o UCST. Modificado de Hoogenboom, (2014).

La estructura anfifílica de estos materiales exhiben cambios abruptos en el estado conformacional de estas macromoléculas en solución después del calentamiento, como la transición de ovillo a glóbulo, formación de micelas, gelificación, entre otros. La transición térmica suele ir acompañada de la modificación del equilibrio hidrofílico/hidrofóbico entre las cadenas de polímero (Fernández-Quiroz et al., 2016).

La disolución de los polímeros anfifílicos en agua, a temperatura ambiente, se produce principalmente como consecuencia de la interacción entre los segmentos polares de la macromolécula y las moléculas de agua (hidratación hidrofílica). En el proceso de solución de solutos no polares en medio acuoso, el agua forma *parches congelados* o *icebergs* microscópicos alrededor de tales

moléculas de soluto. Esta estructuración de las moléculas de agua permanece rodeando los segmentos no polares del polímero (hidratación hidrofóbica). Naturalmente, la extensión de las estructuras del *iceberg* disminuye cuando aumenta la temperatura, lo que conduce a un incremento de las interacciones polímero-polímero (hidrófobas) y la transición sucesiva de la estructura ovillo-glóbulo (Fernández-Quiroz et al., 2016).

La PVCL (Figura 5) es un polímero termosensible bien conocido, no iónico, biocompatible, soluble en agua y que cuenta con una LCST entre 36 y 44 ° C. La LCST depende en gran medida del peso molecular y la concentración, y en menor medida, de la dispersión molecular o la naturaleza de los grupos finales de la cadena (Fernández-Quiroz et al., 2015).

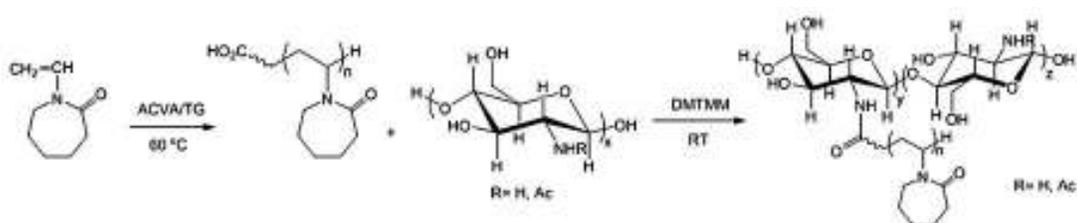


**Figura 5.** Estructura química del (a) monómero *N*-vinil caprolactama y el (b) polímero PVCL.

En el área biomédica, la PVCL gracias a su capacidad de respuesta a la temperatura en un rango fisiológico, ha sido de gran interés para la liberación controlada de fármacos. Los nanotransportadores poliméricos sensibles a estímulos representan una estrategia interesante para mejorar la especificidad, la biodistribución y la internalización de los medicamentos, reduciendo los efectos secundarios en los órganos sanos (Fernández-Quiroz et al., 2019).

#### 4.3.2. Sistema Quitosana-*graft*-Poli(*N*-vinilcaprolactama)

La conjugación de Cs con la PVCL se realizó por primera vez en 2008 (Prabaharan et al., 2008) a partir del método *graft onto*. El proceso involucra dos pasos: (1) la polimerización de *N*-vinilcaprolactama con terminación carboxilo; y (2) el injerto de la PVCL-COOH en la cadena de Cs. El sistema Cs-g-PVCL se obtiene a partir de la amidación entre los grupos terminales carboxilo de la PVCL, y los grupos aminos libres de la fracción desacetilada de la Cs. En artículos pioneros, la reacción se llevó a cabo con ácido acético como disolvente y el sistema EDC/NHS como agentes activadores de los grupos terminales carboxilo (Figura 6) (Prabaharan, 2015; Rejinold et al., 2011).



**Figura 6.** Síntesis del copolímero Cs-g-PVCL. Modificado de Fernández-Quiroz et al., (2015).

Estudios posteriores demostraron que el uso de ácidos inorgánicos como disolventes en esta reacción de injerto, favorecen el desarrollo de la reacción, evitando que el grupo -COOH del ácido acético compita con los grupos terminales de la PVCL al momento de la ocurrencia de la reacción de amidación (Fernández-Quiroz et al., 2015). Por otro lado, el uso de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) como agente activador, favorece el rendimiento en estas reacciones ya que funciona activamente en un amplio rango de pH (D'Este et al., 2014; Farkaš et al., 2013).

Fernández-Quiroz et al., (2015), reportaron la dependencia de las propiedades termosensibles de este copolímero con respecto a su arquitectura molecular, observando que al incrementar la longitud de la cadena de PVCL injertada en el copolímero, la LCST disminuye. Además, el menor espaciamiento entre las cadenas de PVCL injertadas en el copolímero, la temperatura de transición disminuye. Este material también es responsivo ante pH y fuerza iónica.

Una de las características principales de este material, es su solubilidad en agua a temperatura por debajo de su LCST. Se conoce que la Cs es soluble en medio ácido; este hecho es una evidencia de la adecuada conjugación con la PVCL (Argüelles-Monal et al., 2018).

En el trabajo realizado por Fernández-Quiroz et al., (2019) se evaluaron tres parámetros: la concentración de tripolifosfato de sodio (TPP), la concentración de polímero y la relación de volumen de TPP/polímero, concluyendo que el tamaño de las NP depende dichas condiciones experimentales. Esto es importante ya que, por lo general, las partículas poliméricas de 50 a 300 nm en diámetro se prefieren para los sistemas de administración de medicamentos debido a que estos tamaños favorecen los largos tiempos de circulación.

La estabilidad coloidal de las NP poliméricas en un entorno biológico es un parámetro relevante a tener en cuenta para las aplicaciones biomédicas. De acuerdo con los resultados de autores, las nanopartículas de Cs-g-PVCL son estables en solución salina fisiológica a 25°C. Este resultado está de acuerdo con la carga superficial reportada para este copolímero. Se ha sugerido que los valores de potencial- $\zeta$  de alrededor de +30 mV son adecuados para estabilizar electrostáticamente sistemas nanoparticulados, ya que la carga superficial relativamente alta le confiere la estabilidad asociada con la repulsión

electrostática, evitando así la formación de grandes agregados (Fernández-Quiroz et al., 2019).

#### **4.4. Métodos de Obtención para Nanopartículas de Quitosana**

Existen varios métodos para obtener nanopartículas de Cs y derivados, entre los que destacan la auto asociación y el entrecruzamiento. Los métodos de preparación determinan fuertemente la estructura de las cadenas poliméricas en el ordenamiento a escala nanoscópica, que se rigen por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente (Goycoolea et al., 2009).

Peniche et al., 2003 describe tres técnicas más usuales para la obtención de nanopartículas de Cs: Coacervación simple, emulsión y gelificación ionotrópica que se abordan a continuación.

##### **4.4.1. Coacervación**

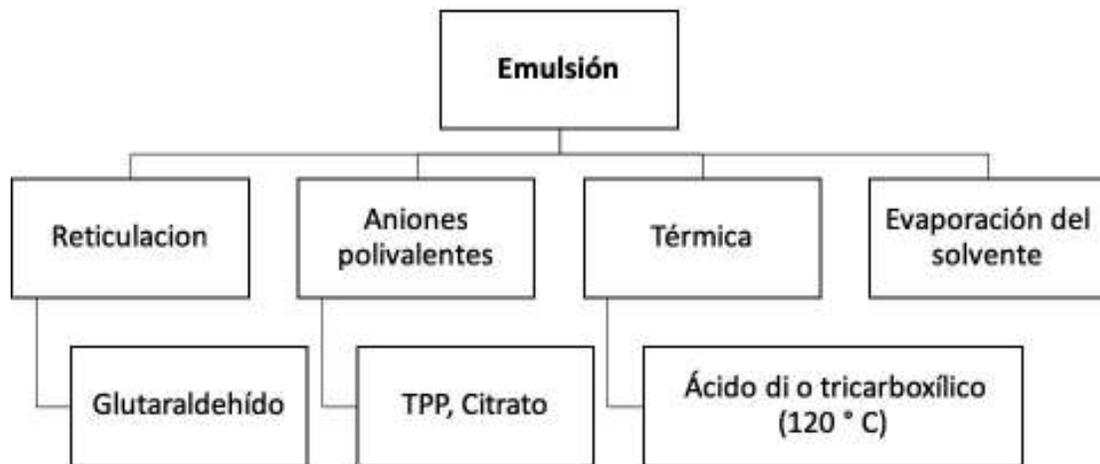
Las técnicas de coacervación implican la separación de una solución de polímero diluida en dos fases coexistentes: una fase rica en polímero y una fase muy diluida, casi libre de polímero. La coacervación en sistemas acuosos se subdivide en coacervación simple y compleja. En la primera, el coloide hidrófilo se priva del disolvente mediante la adición de una sustancia hidrófila competidora, como una sal o un alcohol. Por otro lado, la coacervación compleja se produce mezclando dos polielectrolitos con carga opuesta. El complejo de polielectrolito se separa en una fase rica en polímeros que coexiste con una fase muy diluida (Peniche et al., 2003).

Las nanopartículas de Cs obtenidas por este método pueden presentar diferente porosidad y estabilidad mecánica, lo cual está influenciado por la concentración de la Cs, su grado de *N*-desacetilación y el tipo y concentración

del agente de coacervación utilizado. Las NP se estabilizan por lavados sucesivos con agua caliente y fría o por reticulación con glutaraldehído o epoxiclopropano (Peniche et al., 2003).

#### 4.4.2. Emulsión

Esta técnica consiste en la formación de una emulsión de agua en aceite con el uso de un surfactante. Las gotas de la solución de Cs suspendidas en la fase oleosa pueden estabilizarse mediante diferentes métodos (Figura 7): reticulación con glutaraldehído (reticulación en suspensión), por evaporación del solvente o por adición de aniones polivalentes, como el TPP o el citrato (gelificación ionotrópica). Las gotas también pueden estabilizarse mediante la reticulación de la Cs con un ácido dicarboxílico o tricarboxílico como el ácido cítrico. En tales casos, la reticulación se realiza térmicamente, a través de la formación de enlaces amida a 120 ° C (Peniche et al., 2003).

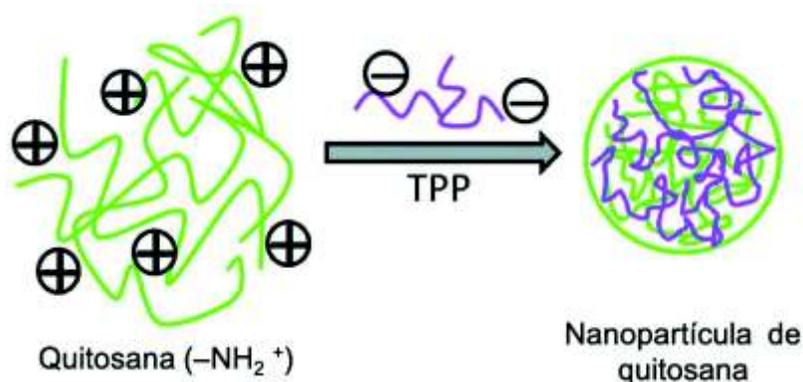


**Figura. 7.** Métodos de obtención de nanopartículas de quitosana por emulsión. Modificado de Peniche et al., (2003).

El tamaño y la morfología de las partículas dependen de múltiples factores, tales como: la temperatura, la velocidad de agitación, la relación molar entre el agente gelificante/polímero/surfactante, así como la concentración de estos componentes, la viscosidad de las fases y la configuración del recipiente de reacción y el agitador, entre otros (Peniche et al., 2003).

#### 4.4.3. Gelificación Ionotrópica

Este método es uno de los más prometedores para el desarrollo en aplicaciones farmacéuticas. Dentro de los agentes químicos de mayor atención, destacan aquellos basados fundamentalmente en el principio de la gelificación iónica utilizando tripolifosfato sódico (TPP). El mecanismo ocurre por interacciones electrostáticas entre los productos de la disociación del TPP en solución acuosa ( $P_3O_{10}^{-5}$  y  $HP_3O_{10}^{-4}$ ), con los grupos  $-NH_3^+$  de la Cs (Figura 8) (Goycoolea et al., 2009).



**Figura. 8.** Formación de nanopartículas de quitosana por medio de gelificación ionotrópica usando TPP.

El pH y la fuerza iónica son dos factores que afectan fuertemente este sistema. En general, el tamaño de partícula resultante se ha observado que varía en un rango de 100 a 350 nm; el potencial- $\zeta$  entre +20 y +50 mV e invariablemente

poseen una morfología esférica de acuerdo a evidencia de microscopia de transmisión electrónica y de fuerza atómica. Dichas características, confieren a las nanopartículas de Cs propiedades óptimas para la interacción con diversos epitelios (Goycoolea et al., 2009).

#### **4.5. Técnicas de Caracterización**

En este apartado, se describe el fundamento básico y aplicación de diferentes técnicas de caracterización utilizadas para el análisis de las estructuras poliméricas nanoestructuradas. La espectroscopía RAMAN y FTIR se utiliza para analizar modificaciones químicas en los materiales. El comportamiento del diámetro hidrodinámico y el potencial- $\zeta$ , se mide por dispersión dinámica de luz, así como para el estudio de la morfología de nanopartículas, se utiliza microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica.

##### **4.5.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier**

Es una técnica de amplio uso que considera los espectros de absorción, emisión y reflexión de la radiación infrarroja con base en la espectroscopia de absorción. Estos espectros se pueden explicar como resultado de distintos cambios energéticos producidos por las transiciones de las moléculas de unos estados energéticos vibracionales y rotacionales en otros (Skoog et al., 2008).

Para absorber radiación infrarroja una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar cuando vibra o gira. Sólo en estas circunstancias el campo eléctrico alternante de la radiación puede interaccionar con la molécula y modificar la amplitud de alguno de sus movimientos. Si la frecuencia de radiación coincide exactamente con la frecuencia de vibración natural de la molécula, tiene lugar la absorción de la radiación, lo cual origina un cambio en la amplitud de la vibración molecular (Skoog et al., 2008).

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de estiramiento y de flexión. En una vibración de estiramiento hay un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos, llamadas simétricas y asimétricas. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de tijereteo, balanceo, aleteo y torsión (Skoog et al., 2008).

El espectro infrarrojo de un compuesto proporciona gran información sobre sus propiedades internas como: composición química, impurezas, interacción entre sustituyentes, análisis de grupos funcionales, etc., por lo que es de gran importancia en análisis cualitativo (Skoog et al., 2008).

#### 4.5.2. Espectroscopía RAMAN

La teoría Raman consiste en que la longitud de onda visible de una pequeña fracción de la radiación dispersada por ciertas moléculas difiere del haz incidente y, además, que los desplazamientos de la longitud de onda dependen de la estructura química de las moléculas causantes de la dispersión (Skoog et al., 2008).

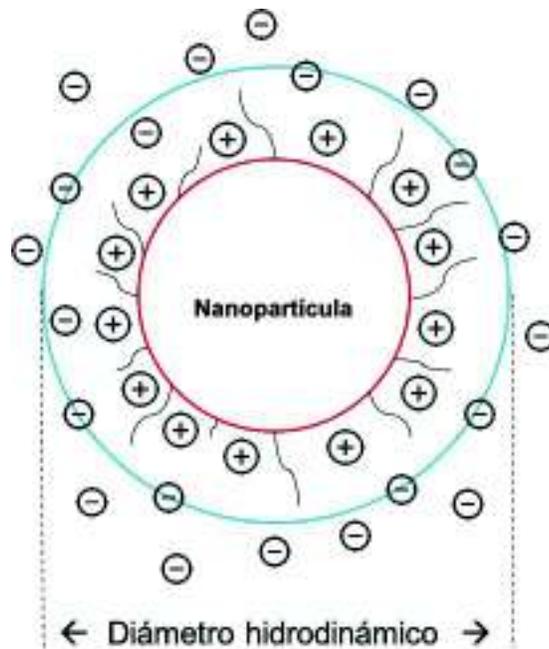
Una molécula en el nivel vibracional fundamental puede absorber un fotón de energía y emitir un fotón de energía. Cuando la radiación difundida es de frecuencia más baja que la radiación de excitación se denomina difusión de Stokes. Las moléculas en estado vibracional excitado pueden difundir también radiación de manera inelástica y producir una señal Raman de energía. La radiación difundida de una frecuencia más alta que la radiación de la fuente se llama difusión anti-Stokes. Asimismo, la dispersión elástica también se presenta con la emisión de un fotón de la misma energía que el fotón de excitación, dicha radiación recibe el nombre de radiación de Rayleigh (Skoog et al., 2008).

Aunque hay similitudes entre los espectros Raman y los espectros infrarrojos, hay suficientes diferencias entre las clases de grupos que son activos para hacer que las técnicas sean complementarias y no competitivas. La absorción en el infrarrojo requiere que haya un cambio en el momento dipolar, solo así la radiación de la misma frecuencia puede interactuar con la molécula e impulsarla a un estado vibracional excitado. Por el contrario, en Raman, la difusión necesita una distorsión momentánea de los electrones distribuidos alrededor de un enlace de la molécula, seguida por la reemisión de la radiación cuando el enlace vuelve a su estado normal. En esta forma distorsionada, la molécula está temporalmente polarizada, es decir, produce de manera momentánea un dipolo inducido que desaparece cuando hay relajación y reemisión. Debido a esta diferencia fundamental en el mecanismo, la actividad Raman de un modo vibracional determinado puede diferir marcadamente de su actividad en el infrarrojo (Skoog et al., 2008).

#### 4.5.3. Dispersión Dinámica de la Luz

La dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica no invasiva de espectroscopía de correlación de fotones o dispersión cuasi-elástica de luz, empleada para la determinación del tamaño y la distribución de partículas (índice de polidispersidad) en suspensión, o macromoléculas en solución como los polímeros, típicamente en la región submicrométrica (Cuadros-Moreno et al., 2014).

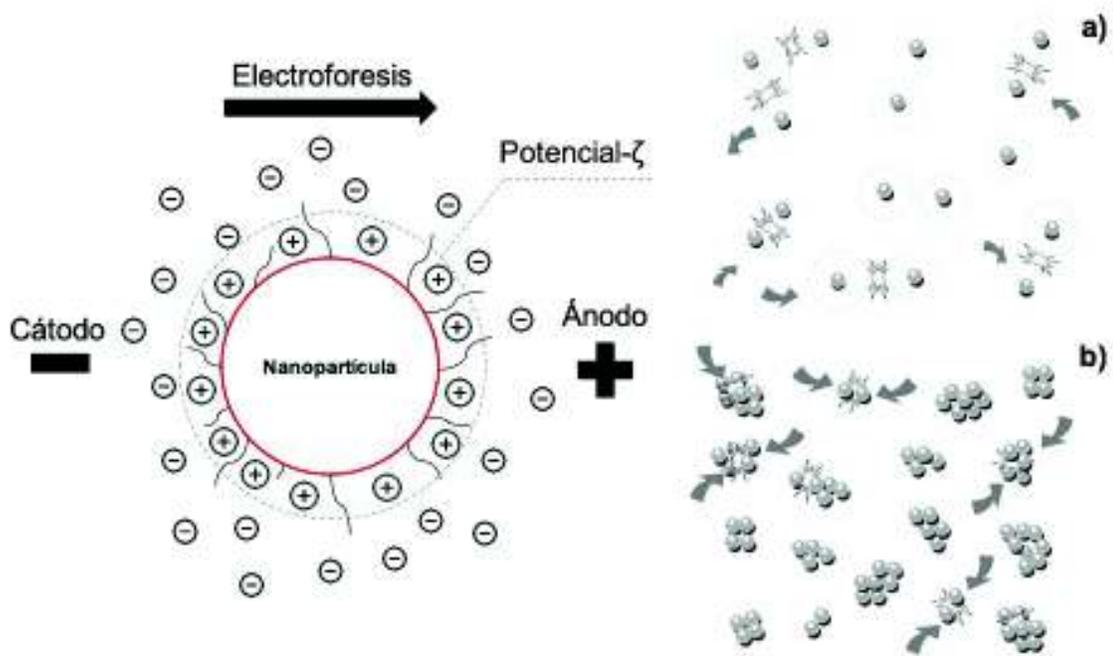
Cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa, la mayoría de las veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie. En DLS, el diámetro medido se conoce como hidrodinámico ( $D_H$ ) (Figura 9), debido a que esta capa influye en el movimiento de la partícula. El grosor de la capa depende de distintos factores, entre los cuales cuenta la conductividad eléctrica del líquido (Cuadros-Moreno et al., 2014).



**Figura. 9.** Representación gráfica del diámetro hidrodinámico por DLS.

#### 4.5.4. Potencial- $\zeta$

Se mide a partir de mediciones de movilidad electroforética de las partículas. Dicha movilidad se refiere a la velocidad de una partícula bajo un campo eléctrico utilizado (Figura 10). La movilidad electroforética depende de la carga de la partícula y del coeficiente de fricción. Este último es afectado por la viscosidad del medio, el tamaño y la forma de la partícula. Mientras que la carga puede variar por el pH del buffer o por la fuerza iónica del medio. El potencial- $\zeta$  es una medida de la estabilidad de una dispersión coloidal, debido a que este es un buen índice de la magnitud de la interacción repulsiva entre partículas coloidales (Bhattacharjee, 2016).



**Figura. 10.** Representación gráfica de potencial- $\zeta$  por DLS. a) Partículas cargadas se repelen unas a otras. b) Partículas sin carga formando aglomeraciones.

#### 4.5.5. Microscopio Electrónico de Barrido

El microscopio electrónico de barrido (SEM), utiliza electrones en lugar de luz para formar una imagen. Para lograrlo, el equipo cuenta con un dispositivo llamado filamento, que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con diferentes detectores se recogen después los electrones generados de la interacción con la superficie de esta para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma, proporcionando información de las formas, texturas y composición química de sus constituyentes (Liu et al., 2016).

#### 4.6. Ensayos Biológicos

En la actualidad, la mayoría de los trabajos publicados se centran en la obtención de nuevas NP y en su caracterización fisicoquímica, pero es necesario diseñar y

establecer técnicas normalizadas que permitan evaluar su posible toxicidad. Como se ha abordado en los temas anteriores, las nanopartículas de Cs-g-PVCL tienen propiedades favorables para su aplicación en biomedicina, por lo que resulta importante en este trabajo realizar ensayos celulares, proponiendo las siguientes técnicas (González-Fernández et al., 2012).

#### 4.6.1. Actividad Hemolítica

La determinación de las propiedades hemolíticas es una de las pruebas más comunes en estudios de interacción de nanopartículas con componentes sanguíneos (González-Fernández et al., 2012). La mayoría de los estudios *in vitro* de hemólisis inducida por partículas evalúan el porcentaje de hemólisis mediante la detección espectrofotométrica de derivados de hemoglobina libres de plasma después de incubar las partículas con sangre y luego separar las células no dañadas mediante centrifugación. El tiempo de incubación, la longitud de onda en la que se cuantifica la hemoglobina y las condiciones de la sangre (por ejemplo, el uso de eritrocitos purificados en lugar de sangre completa, y la inclusión de varios anticoagulantes) varían significativamente de un estudio a otro (Dobrovolskaia et al., 2008).

#### 4.6.2. Actividad Hemaglutinante

Las reacciones de aglutinación se producen entre partículas que están en suspensión. Generalmente, es el antígeno el que está presente en la superficie de las partículas (aglutinógeno) y se enfrenta a un anticuerpo específico de él (aglutinina). Si la partícula utilizada en la aglutinación es un hematíe se dice que es una reacción de hemaglutinación (De Lima et al., 2015; Espinosa et al., 2016).

Las reacciones de aglutinación pueden llevarse a cabo sobre portaobjetos, en tubos de ensayo o en placas de microtitulación, como es en esta investigación.

Estas últimas son de plástico y constan de una serie de pocillos cuyo fondo es redondeado (en “U”). El resultado positivo aparece con un velo que cubre todo el pocillo, mientras que el negativo se observa como un botón formado por la sedimentación sin aglutinar de las partículas empleadas (Espinosa et al., 2016).

#### 4.6.3. Ensayo de MTT

El ensayo MTT es un indicador sensible y confiable de la proliferación celular y viabilidad *in vitro* en respuesta a factores externos. El ensayo se basa en la reducción bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, un colorante amarillo de tetrazolio soluble en agua, por las células metabólicamente activas, principalmente por las deshidrogenasas mitocondriales, a cristales de formazán de color púrpura. El producto de formazán se analiza espectrofotométricamente (570 nm) después de su disolución en dimetilsulfóxido (DMSO). Los espectros de las células tratadas con NP y las células no tratadas dan una estimación del grado de citotoxicidad (Patravale et al., 2012).

## 5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen los pasos seguidos para el desarrollo del presente trabajo, desde la preparación de los materiales poliméricos, su caracterización y la aplicación en ensayos biológicos.

### 5.1. Reactivos

Quitosa (Sigma Aldrich, bajo peso molecular), solución salina 0.9 % NaCl (Laboratorios PISA), tripolifosfato de sodio (TTP) (Sigma Aldrich), Cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio 96 % (DMTMM) (Sigma Aldrich), medio esencial mínimo Dulbecco (DMEM) (Gibco), suero fetal bovino (Gibco), azul de tiazolil tetrazolio bromuro (MTT) (Sigma Aldrich), dimetilsulfóxido (DMSO) (Faglab).

### 5.2. Preparación de los materiales

La mayoría de los reactivos y solventes utilizados para la realización de este trabajo fueron utilizados tal y como se recibieron. Para todos los experimentos se utilizó agua pura Tipo 2 con una conductancia  $\leq 0.2 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

#### 5.2.1. Purificación de la Quitosa

La Cs se disolvió en ácido acético al 0.5 M. Posteriormente, se filtró con ayuda de una bomba de vacío por un filtro de grado 1 para después precipitarse con hidróxido de amonio 1 M. El material se sometió a varios lavados con agua Milli Q, y se separó por centrifugación hasta que el residuo mostró una conductividad similar a la del agua pura. Por último, se congeló y se liofilizó para obtener la Cs purificada.

### 5.2.2. Síntesis del Copolímero Cs-*g*-PVCL

La preparación del copolímero quitosana-*graft*-PVCL se realizó en dos pasos: (1) la polimerización de N-vinilcaprolactama con terminación carboxilo; y (2) el injerto de la PVCL-COOH en la cadena de Cs. La PVCL fue donado por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) con las siguientes características:  $\bar{X}_n = 126$ , P.D.I. = 1.8, LCST= 40.7 ° C.

El paso (2), se llevó a cabo a partir de la amidación de los grupos amina en la Cs con los grupos terminales -COOH de la PVCL, utilizando DMTMM como activador de sus grupos carboxílicos. Para esto, se preparó una disolución de Cs en HCl (0.5% p/v) a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó la PVCL-18 al frasco de reacción junto con la DMTMM; la reacción de injerto permaneció a temperatura ambiente, con agitación constante durante 3 días. La conjugación se detuvo por adición de acetona pura, lo cual ocasiona la precipitación del material. El producto se purificó con lavados con acetona y por extracción Soxhlet durante 48 h, para asegurar la eliminación de cadenas de PVCL no injertadas en la Cs. El copolímero Cs-*g*-PVCL-18 (cadenas de PVLC injertadas con  $M_n$  de 18 kDa) se disolvió en agua, se congeló y liofilizó.

### 5.2.3. Preparación de Nanopartículas a partir de Cs-*g*-PVCL

Para obtener las NP a partir del copolímero Cs-*g*-PVCL, se llevó a cabo el entrecruzamiento ionotrópico con TPP, de acuerdo con el método planteado por (Calvo et al., 1997) con ligeras modificaciones. Brevemente, se disolvió el copolímero en agua mili-Q y se colocó en agitación constante a una temperatura ambiente. Simultáneamente, se preparó una disolución de TPP en agua. Se utilizó una concentración de copolímero de 1 y 3 mg/mL y una concentración de TPP de 2 mg/mL con una relación de volumen v/v de copolímero/TPP de 10/0.1. Las nanopartículas de Cs-*g*-PVCL se formaron espontáneamente al adicionar

gota a gota el TPP a la solución de copolímero, bajo agitación magnética moderada. Posteriormente, la muestra se sonicó (procesador ultrasónico Q500, QSONICA) durante 5 minutos con una amplitud del 35%. Las nanopartículas Cs-g-PVCL se centrifugaron para eliminar posibles residuos y se re-suspendieron en agua.

### **5.3. Caracterización morfológica**

#### 5.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido

La morfología de las nanopartículas de Cs-g-PVCL se caracterizó por microscopía electrónica de barrido en el equipo JEOL, JSM-5410LV. Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 55 000 utilizando una tensión de aceleración de 25,0 kV.

### **5.4. Caracterización de los materiales**

#### 5.4.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

Los espectros FTIR se efectuaron en modo de reflectancia totalmente atenuada en un espectrofotómetro FTIR Perkin Elmer Frontier. Las muestras se analizaron a temperatura ambiente por 16 escaneos a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

#### 5.4.2. Espectroscopía RAMAN

Los espectros Raman de los materiales analizados se obtuvieron en un espectrofotómetro Witec Alpha 300 Confocal Raman Microscope. Laser 532, potencia de 49 mW.

### 5.4.3. Dispersión Dinámica de la Luz

El diámetro hidrodinámico, el índice de polidispersidad (PDI) y las mediciones del potencial- $\zeta$  se realizaron en el equipo Möbiu $\zeta$  (Wyatt Technologies), bajo temperaturas controladas. El sistema Möbiu $\zeta$  utiliza un láser de modo longitudinal único de 45 mW que funciona a una longitud de onda de 532 nm. Las mediciones se realizaron con un ángulo de dispersión de 163.5 ° C.

Para evaluar el comportamiento del  $D_H$  de las nanopartículas de Cs-g-PVCL ante la temperatura, la muestra se sometió a un programa de calentamiento de 0.25 ° C min<sup>-1</sup>. A cada temperatura, la muestra se mantuvo en equilibrio durante 40 min antes de las mediciones. Las muestras se cargaron en una cubeta de cuarzo de 45  $\mu$ L con conjunto de electrodos. La recopilación y el análisis de datos se llevó a cabo con el software DYNAMICS 7.8.0.26 (Wyatt Technology Corporation).

La estabilidad coloidal de las nanopartículas de Cs-g-PVCL se evaluó experimentalmente en agua (pH 7), solución salina fisiológica (pH 6.4) y DMEM (pH 7.4). La estabilidad se investigó en términos de la evolución del tamaño de partícula a lo largo del tiempo durante la incubación a 25°C por 4 h. Las mediciones de diámetro hidrodinámico se registraron en el equipo Möbiu $\zeta$  (Wyatt Technologies), bajo temperaturas controladas. El sistema Möbiu $\zeta$  utiliza un láser de modo longitudinal único de 45 mW que funciona a una longitud de onda de 532 nm. Las mediciones se realizaron con un ángulo de dispersión de 163.5°C.

## 5.5. Ensayos Biológicos

### 5.5.1. Actividad Hemolítica

Se siguió la metodología reportada por Diaz-Galvez et al., 2019. A partir de muestras sanguíneas tratadas previamente en tubos vacutainer con EDTA, se realizó una suspensión de sangre total en solución salina (15  $\mu$ L: 1000  $\mu$ L). La dilución de glóbulos rojos (1 mL) se mezcló con concentraciones finales de nanopartículas de Cs-*g*-PVCL de 125.00, 62.50, 31.20, 15.60, 7.80, 3.90, 1.90, 0.95, 0.47, 0.23 y 0.00  $\mu$ g/mL (n = 4). Después de 24 h de incubación a 37 ° C, se centrifugaron los glóbulos rojos (6 rpm durante 10 min) y se analizó la hemólisis por absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro (espectrofotómetro Thermo Scientific Multiscan). Los glóbulos rojos diluidos en agua se utilizaron como control positivo.

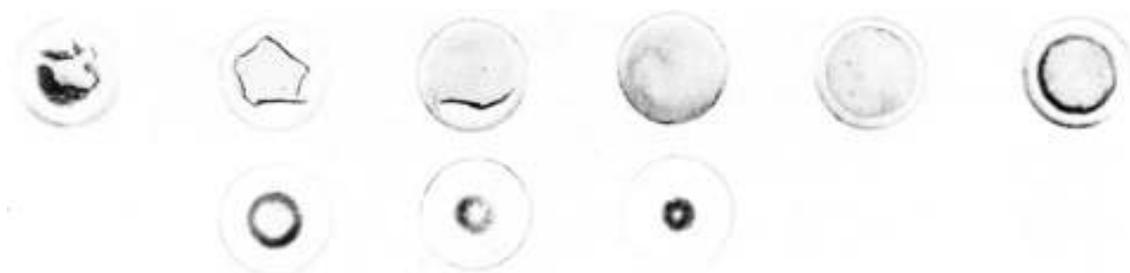
### 5.5.2. Actividad Hemaglutinante

A partir de muestras sanguíneas tratadas previamente en tubos vacutainer con EDTA, se obtuvo una suspensión de eritrocitos al 1%. Previamente, se tomó un 1 mL de sangre total y se realizaron 3 lavados con 0.5 mL de solución salina para retirar el plasma. Posteriormente, en una microplaca de 96 pozos de fondo en "U", se añadieron 50  $\mu$ L de solución salina (NaCl 0.9%, pH 7.4) y 50  $\mu$ L del estímulo, en este caso, nanopartículas de Cs-*g*-PVCL de 169 y 281 nm. Se trabajó por cuadruplicado. Las concentraciones finales de NP fueron de 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9, 0.95, 0.47, 0.23 y 0  $\mu$ g/mL (n = 4). Al final, se añadieron 50  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos al 1% y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. Los datos se interpretaron según la escala (Tabla III) propuesta para hemaglutinación por Stavitsky y Jarchow, 1954 (Figura 11, sección 4.6.2).

**Tabla III.** Descripción del grado de hemaglutinación. Modificado de Stavitsky y Jarchow, (1954).

| Grado de aglutinación <sup>a</sup> | Descripción  |
|------------------------------------|--|
| ++++                               | Aglutinante granular compacto  |
| +++                                | Alfombra lisa en la parte inferior del pozo con bordes doblados          |
| ++                                 | Alfombra lisa en la parte inferior del pozo con los bordes algo rasgados |
| +                                  | Anillo rojo estrecho con borde de alfombra lisa                          |
| ±                                  | Área pequeña del pozo cubierta con anillo grueso alrededor               |
| -                                  | Botón rojo discreto en el centro de la parte inferior del pozo           |

<sup>a</sup> Grados de aglutinación distintos se interpretan como eventos indeterminados



**Figura. 11.** Apariencia de eventos de hemaglutinación. Fila superior de izquierda a derecha, +++++, +++, ++, +, +, ±. Fila inferior de izquierda a derecha, ±, -, -. Modificado de Stavitsky y Jarchow, (1954).

### 5.5.3. Ensayo de MTT

Los estudios de citotoxicidad de las nanopartículas de Cs-g-PVCL se evaluaron en células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Las células HUVEC se cultivaron en DMEM, complementadas con FBS (5%), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (10 µg / mL) y estreptomycin (0,1 mg/mL), y se incubaron a 37 ° C con atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%), y 80% de humedad. Se

sembraron aproximadamente 5,000 células en microplaca de 96 pocillos y se cultivaron hasta alcanzar el 80% de una monocapa. Las pruebas de viabilidad celular se realizaron en presencia de diferentes concentraciones de nanopartículas de Cs-g-PVCL. Antes del ensayo, la dispersión de NP se irradió con UV durante 15 minutos y se prepararon diluciones en serie en solución salina estéril. El medio de cultivo se eliminó y se reemplazó con un medio completamente fresco (100 µL), seguido de cada dispersión de NP (100 µL). Las concentraciones finales fueron 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9, 0.95, 0.47, 0.23 y 0 µg/mL (n = 4). El MTT se diluyó en solución tamponada con fosfato (5 mg/mL) y se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm. Después de 24 h de incubación, se eliminó el estímulo. El MTT diluido en DMEM (100 µL, 12 mM) se añadió a los pocillos y se incubó a 37 ° C (5% de CO<sub>2</sub>) por 4 h.

Se añadió DMSO (100 µL) para solubilizar los cristales de formazán formados. Luego, la absorbancia se midió a 570 nm en un espectrofotómetro UV (Thermo Scientific Multiskan GO), y los resultados se compilaron con el software SkanIt. Las células de control negativo no estimuladas se incubaron con el medio completo respectivo. La viabilidad celular se expresa como un porcentaje del control negativo, dado por:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Abs\ muestra}{Abs\ control} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde absorción (Abs) muestra representa la medición de los pozos tratados con nanoformulaciones, y Abs control representa el valor obtenido de los pozos tratados con un medio.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. Preparación de los materiales

#### 6.1.1. Preparación de Nanopartículas a partir de Cs-g-PVCL

Las NP a partir del copolímero Cs-g-PVCL se obtuvieron de forma espontánea en medio acuoso (pH 7) a temperatura ambiente. Para su preparación se utilizó el método de gelificación ionotrópica, siguiendo el protocolo desarrollado por Calvo et al., (1997).

Para este sistema de NP, es conocido que existen factores que afectan el tamaño: la concentración de polímero, la concentración de TPP y la relación de volumen de polímero / TPP. En este trabajo se evaluó el efecto de la concentración de polímero con 1 y 3 mg/mL, utilizando para todas las muestras una concentración de TPP de 2 mg/mL y una relación de 10:1 en el volumen de polímero / TPP. En la Tabla IV se muestran los resultados obtenidos para la distribución del  $D_H$  de las nanopartículas de Cs-g-PVCL.

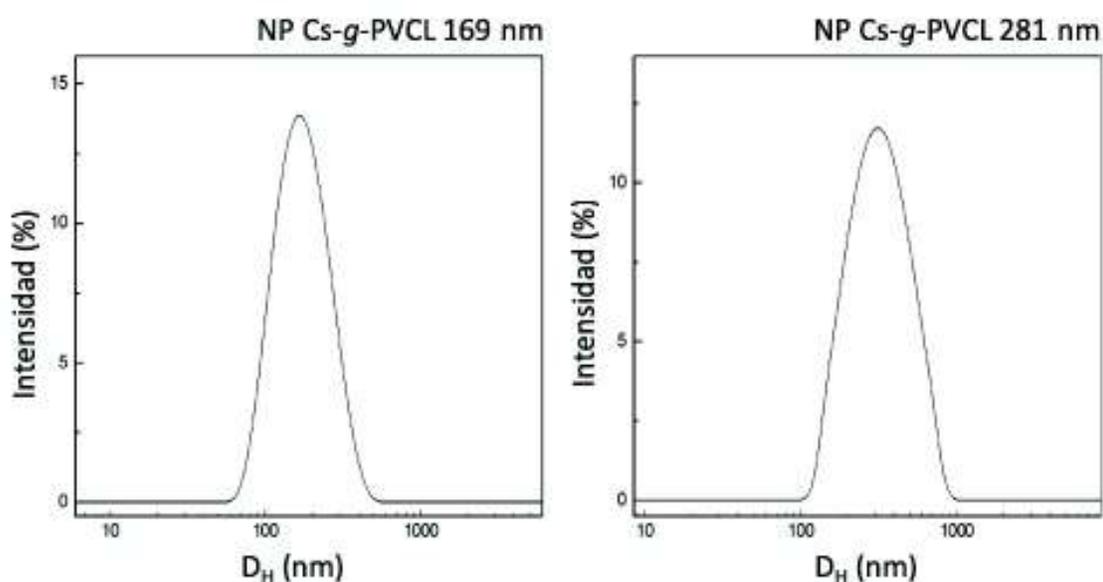
**Tabla IV.** Promedio del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de Cs-g-PVCL.

| Concentración de copolímero (mg/mL) | Volumen copolímero (mL) | $D_H$ (nm) | Potencial- $\zeta$ (mV) | PDI          |
|-------------------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|--------------|
| 1                                   | 12                      | 169 ± 3.8  | +29 ± 1.1               | 0.198 ± 0.04 |
| 3                                   | 4                       | 281 ± 2.4  | +45 ± 1.3               | 0.192 ± 0.03 |

\* Concentración de TPP de 2 mg/mL y una relación de 10:1 en el volumen de polímero / TPP.

En los resultados se observa claramente un incremento en el  $D_H$  con el incremento en la concentración de copolímero utilizado, obteniéndose NP de 169 y 281 nm. Este comportamiento se reporta por Fernández-Quiroz et al., (2019), quienes obtuvieron nanopartículas de Cs-g-PVCL de  $156 \pm 3.4$  y  $239.4 \pm 2.1$  nm utilizando las mismas condiciones planteadas anteriormente en este trabajo.

En la Figura 12 se pueden observar las curvas monomodales de ambos sistemas obtenidas por DLS. Para el tamaño de 169 nm, se obtuvo un índice de polidispersidad (PDI) de 0.198, y un potencial- $\zeta$  de +29 mV. Para el tamaño de 281 nm, obtuvimos un PDI de 0.192 y un potencial- $\zeta$  de +45 mV.



**Figura. 12.** Distribución del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 y 281 nm, respectivamente.

Azouri et al., 2006, plantea que un sistema que presente un potencial- $\zeta$  por arriba de +25 mV o por debajo de -25 mV es un sistema estable. De acuerdo a lo anterior, se considera que los valores obtenidos de potencial- $\zeta$  para las NP

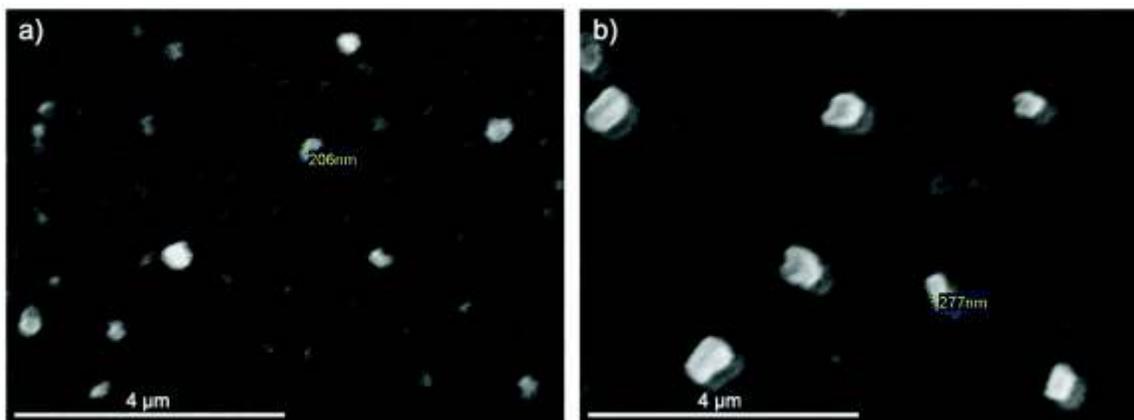
preparadas son adecuados para que se mantengan en suspensión, evitando la formación de agregados.

## 6.2. Caracterización morfológica

### 6.2.1. Microscopía Electrónica de Barrido

La morfología de las nanopartículas de Cs-*g*-PVCL se analizó mediante SEM. La Figura 13 permite apreciar que los nanosistemas exhiben una morfología pseudo-esférica, además de que no se observa agregación. Fernández-Quiroz et al., (2019) reporta la morfología obtenida en NP del mismo material.

De acuerdo con el análisis del tamaño, para las NP de Cs-*g*-PVCL de 169 nm (Figura 13a), se observa un diámetro alrededor de 206 nm. Este resultado es ligeramente superior a los valores obtenidos por DLS debido a que la muestra presenta un PDI de  $0.198 \pm 0.04$ . Por otro lado, para las NP de Cs-*g*-PVCL de 281 nm (Figura 13b), se observa un diámetro alrededor de 277 nm correspondiente al valor obtenido por DLS.



**Figura. 13.** Morfología de las nanopartículas de Cs-*g*-PVCL de a) 169 y b) 281 nm obtenida por SEM.

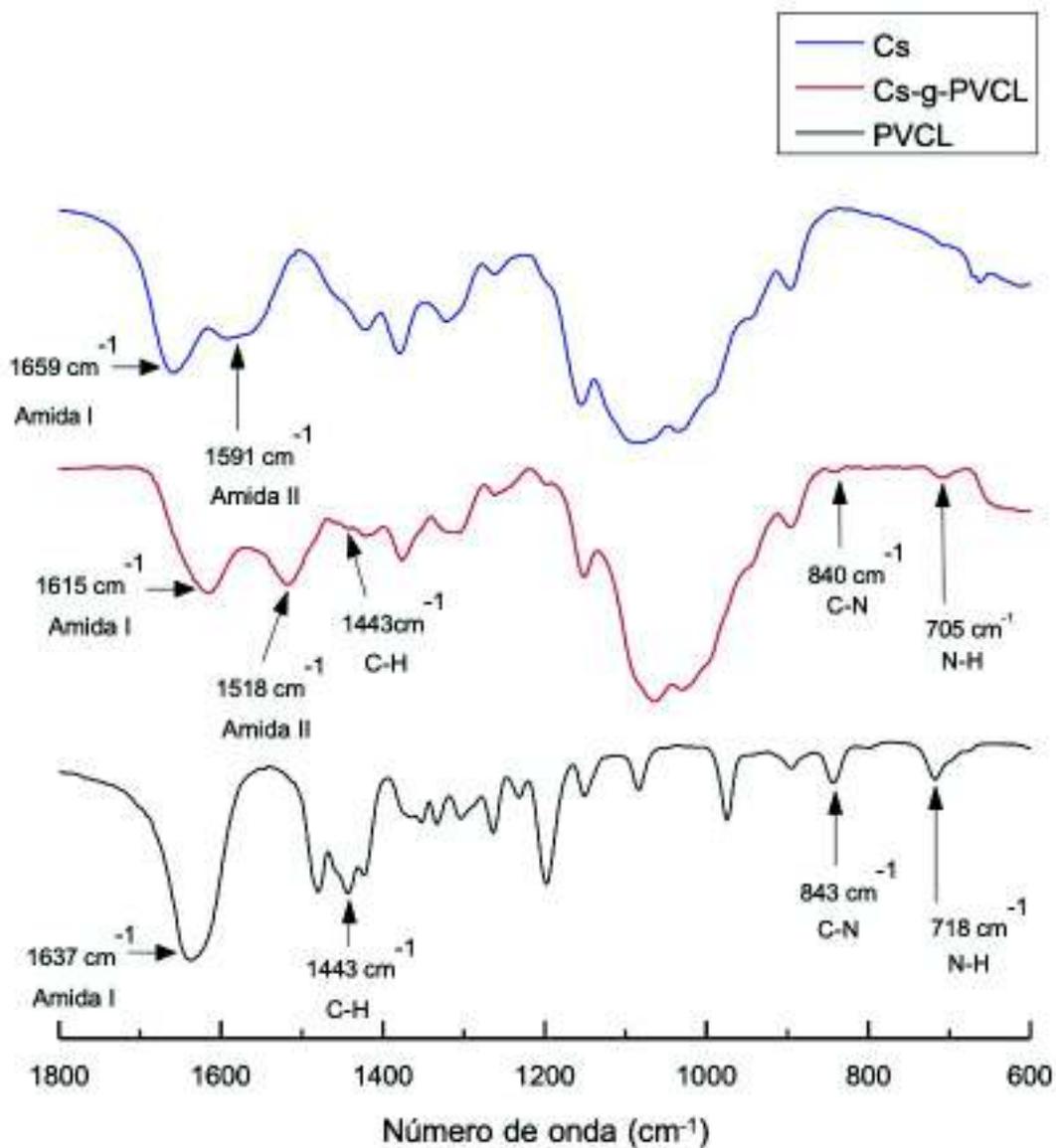
### 6.3. Caracterización de los materiales

#### 6.3.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

En la Figura 14 se observan los espectros FTIR obtenidos de la Cs, la PVCL y el copolímero Cs-*g*-PVCL. El espectro de la Cs pura muestra una banda a  $1659\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la amida I, debido a la vibración de estiramiento de C=O para amidas alifáticas primarias. A  $1591\text{ cm}^{-1}$  corresponde la banda asignada a la amida II, debido a la vibración de deformación N-H. Además se tienen bandas a  $1418\text{ cm}^{-1}$  (-CH<sub>2</sub>, flexión),  $1383\text{ cm}^{-1}$  (-CH<sub>3</sub>, vibración de deformación simétrica),  $1317\text{ cm}^{-1}$  (amida III, debido a la vibración de estiramiento C-N),  $1169\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C, vibración de fuerza asimétrica),  $1084$  y  $1032\text{ cm}^{-1}$  (vibración de la estructura de piranosa).

Por otro lado, las bandas características del polímero PVCL se encuentran a  $1637\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a amida I, en  $1443\text{ cm}^{-1}$  asignada a la deformación C-H, a  $843\text{ cm}^{-1}$  por el estiramiento C-N y a  $718\text{ cm}^{-1}$  por la vibración de deformación N-H. Estas bandas características de Cs y PVCL también se observan en el espectro del copolímero de injerto, aunque con algunas modificaciones.

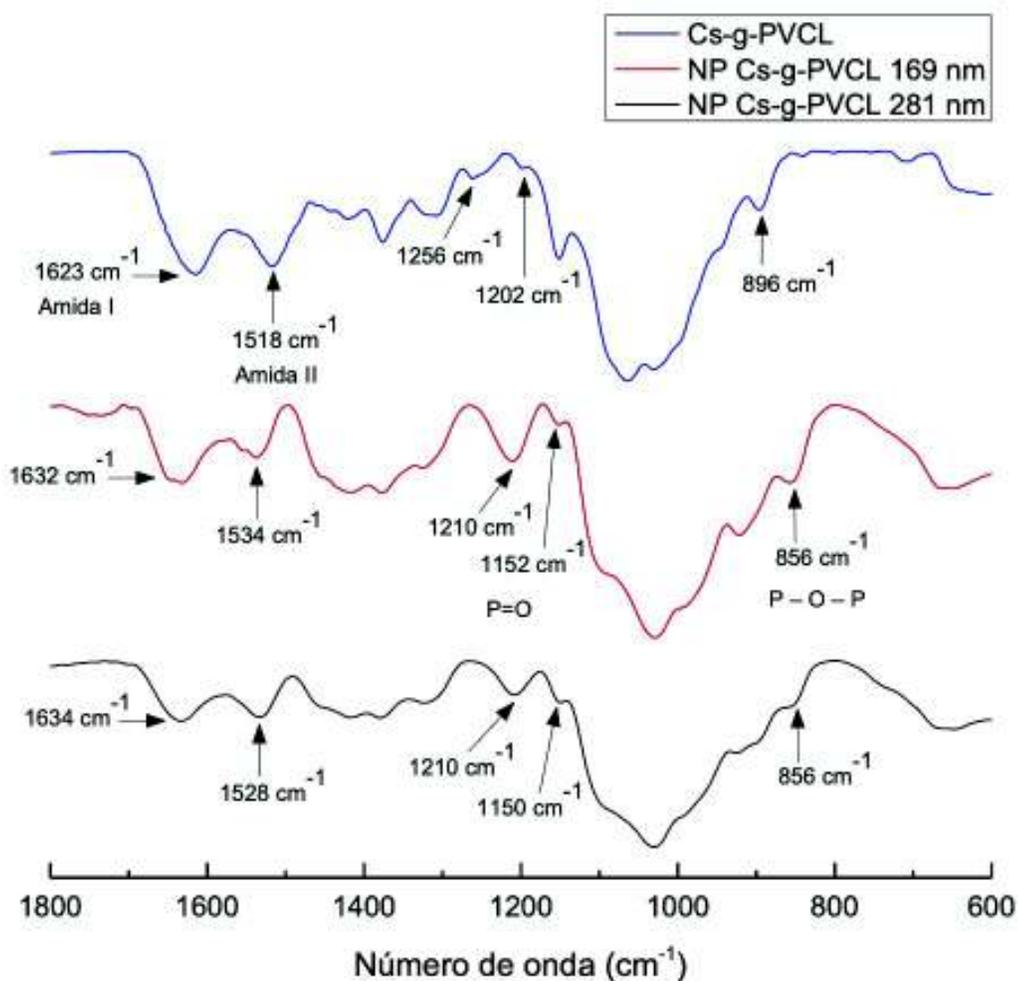
En particular, el corrimiento de las bandas de amida I y II situadas a  $1615$  y  $1520\text{ cm}^{-1}$  en el espectro Cs-*g*-PVCL son indicativas de la formación de nuevos enlaces amida entre el grupo carboxílico terminal de PVCL y los restos amina de la Cs (Fernández-Quiroz et al., 2015).



**Figura. 14.** Espectros FTIR en la región 1800-600  $\text{cm}^{-1}$  para muestras de Cs, PVCL y Cs-g-PVCL.

Igualmente se realizaron los espectros FTIR para las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 y 281 nm (Figura 15). Se puede confirmar un corrimiento a menor número de onda en los espectros de las NP de ambos tamaños con respecto al espectro del copolímero, en la región entre 1260-1200  $\text{cm}^{-1}$  que se debe a la vibración por estiramiento del grupo P=O. Igualmente observamos que a 856  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup> aparecen las vibraciones de estiramiento de grupos P–O–P (Fernández-Quiroz et al., 2019).



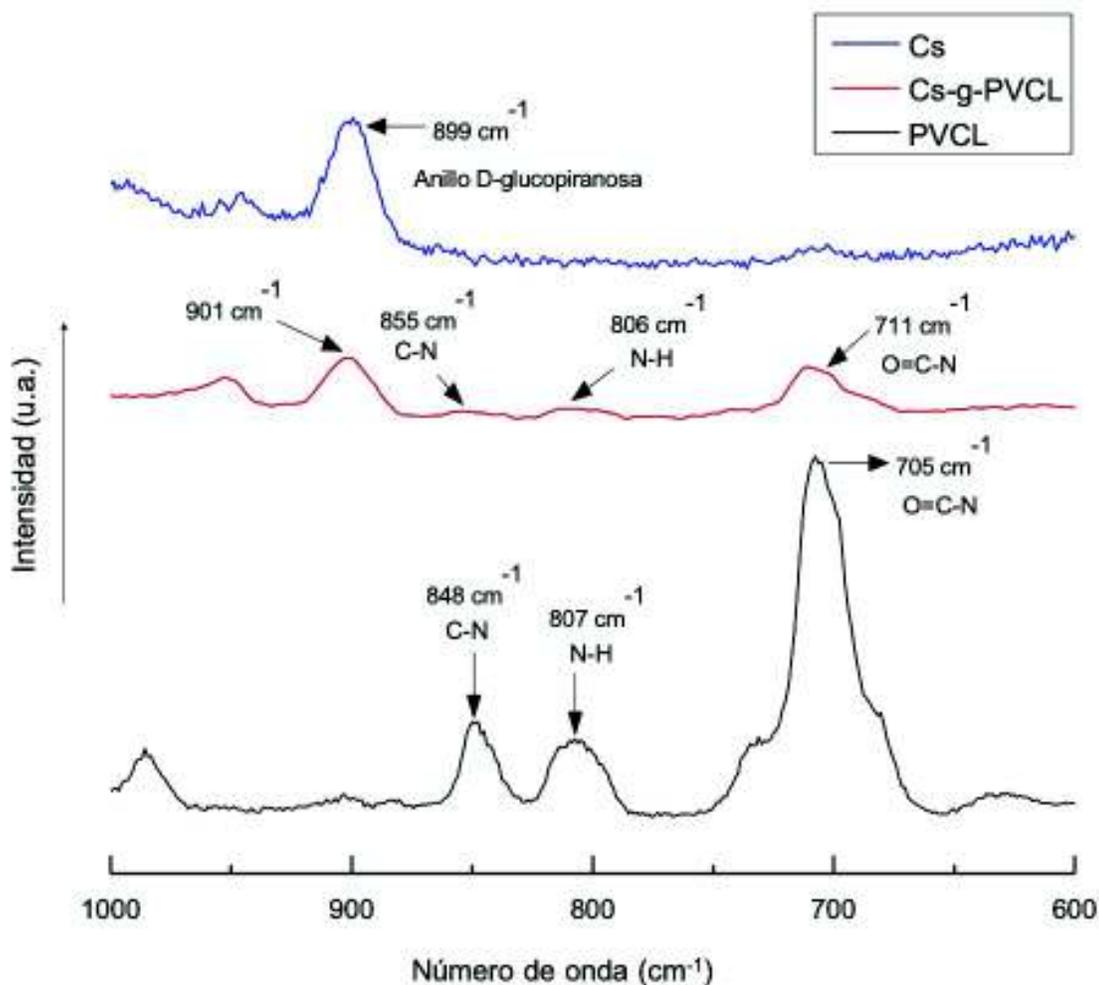
**Figura. 15.** Espectros FTIR en la región 1800-600 cm<sup>-1</sup> para muestras de copolímero Cs-g-PVCL y nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 y 281 nm.

### 6.3.2. Espectroscopía RAMAN

Debido a que el rango de 900 – 800 cm<sup>-1</sup> en espectroscopía FTIR es de intensidad débil para los grupos amida, se obtuvieron los espectros RAMAN de las muestras de los homopolímeros y del copolímero. En esta técnica las amidas alifáticas

secundarias suelen presentar una fuerte banda polarizada en tal región debido a la vibración de estiramiento C-N-C simétrica.

En la Figura 16 se observan los espectros RAMAN obtenidos de la Cs pura, la PVCL y el copolímero Cs-g-PVCL. En el espectro de PVCL, se observan bandas a  $848\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-N),  $807\text{ cm}^{-1}$  (vibración N-H) y  $705\text{ cm}^{-1}$  (vibración de deformación N-H fuera del plano) presentes en el espectro del copolímero de injerto a  $855\text{ cm}^{-1}$ ,  $806\text{ cm}^{-1}$  y  $711\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura. 16.** Espectro RAMAN en la región  $1000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  para muestras de Cs, PVCL y Cs-g-PVCL.

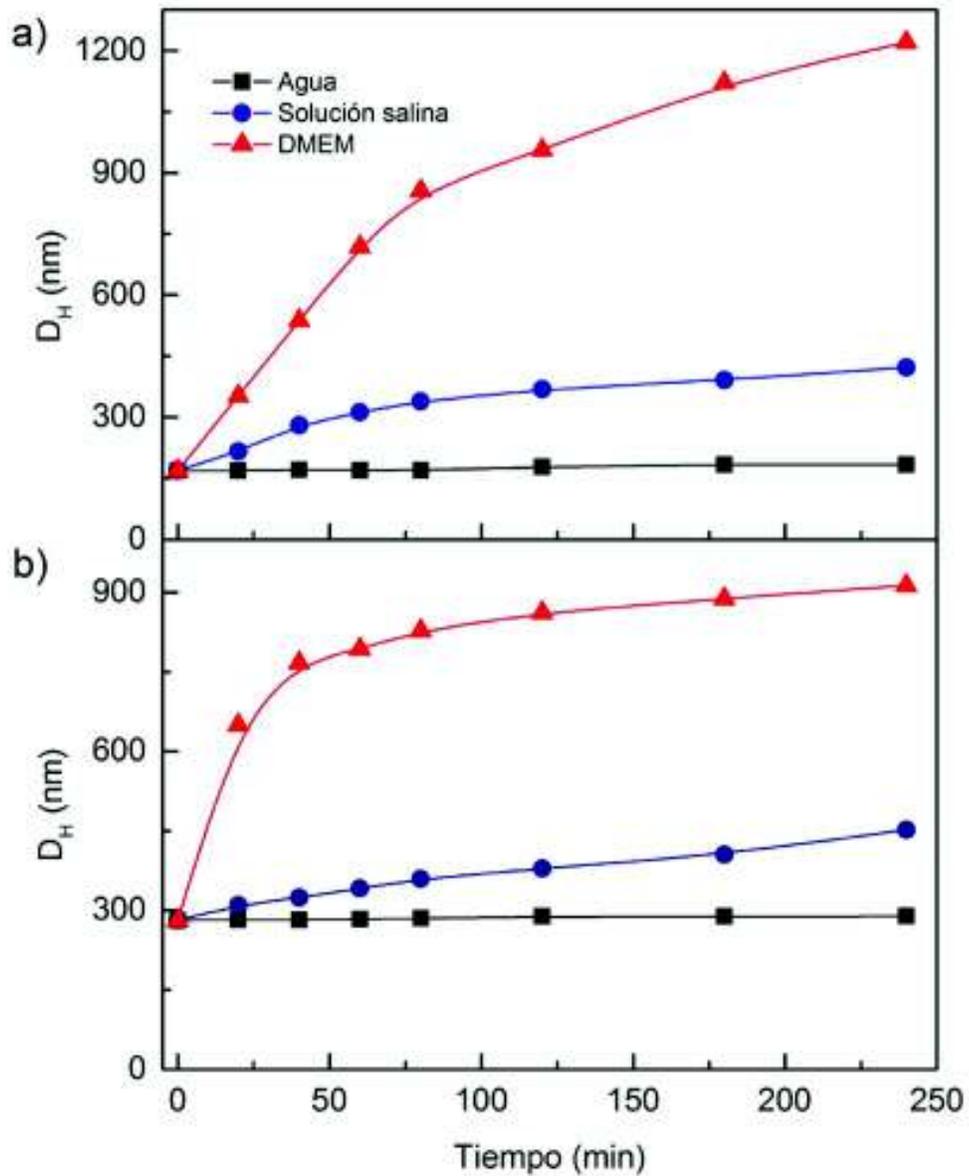
Por otro lado, se encuentra en el espectro de la Cs la banda a  $899\text{ cm}^{-1}$  debido al estiramiento del anillo de D-glucopiranososa, que en el copolímero Cs-g-PVCL se presenta a  $901\text{ cm}^{-1}$ . Por lo anterior, los espectros Raman confirman la formación de enlaces amida.

### 6.3.3. Estabilidad Coloidal

La estabilidad coloidal de las NP poliméricas en un entorno biológico es un parámetro relevante a tener en cuenta para las aplicaciones biomédicas (Fernández-Quiroz et al., 2019). En este sentido, la variación del  $D_H$  de las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 y 281 nm fue evaluado a lo largo del tiempo en agua (pH 7), solución salina fisiológica (pH 4.4) y DMEM (pH 7.4) a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Como se muestra en la Figura 17, en ambos tamaños, las NP suspendidas en agua no presentaron crecimiento en su  $D_H$  en 4 horas, lo que evidenció la estabilidad de las nanopartículas en este medio. Por otro lado, para las nanopartículas de 169 nm suspendidas en solución salina, durante los primeros 80 min, aumentaron a 339 nm. Posteriormente, a los 240 min, el crecimiento fue ligeramente más evidente, alcanzando los 422 nm (~250% de su tamaño inicial). En DMEM, a solo 20 min, las NP alcanzaron un tamaño de 352 nm. A los 240 min, se registró un  $D_H$  de 1220 nm (~722% del tamaño inicial).

Este comportamiento fue similar para las nanopartículas de 281 nm. En solución salina, durante los primeros 80 min, aumentaron a 370 nm. Posteriormente, a los 240 min, el crecimiento fue ligeramente más evidente, alcanzando los 452 nm (~161% de su tamaño inicial). En DMEM, a solo 20 min, las NP alcanzaron un tamaño de 650 nm. A los 240 min, se registró un  $D_H$  de 913 nm (~325% de su tamaño inicial).



**Figura. 17.** Estabilidad coloidal de las nanopartículas Cs-g-PVCL a) 169 y b) 281 nm en medio acuoso (pH 7), solución salina fisiológica (pH 4.4) y DMEM (pH 7.4) a 25 ° C.

A partir de estos resultados, se puede deducir que estas nanoformulaciones son estables en agua y presentan agregación en solución salina y DMEM. Este resultado está de acuerdo con la carga superficial analizada en las muestras. Para las nanopartículas de 169 y 281 nm suspendidas en agua, se obtuvo un

potencial- $\zeta$  de +29 y +45 mV, bajando al encontrarse en solución salina con valores de +9 y +16 mV y en DMEM con potenciales de -8.9 y -5.5, respectivamente.

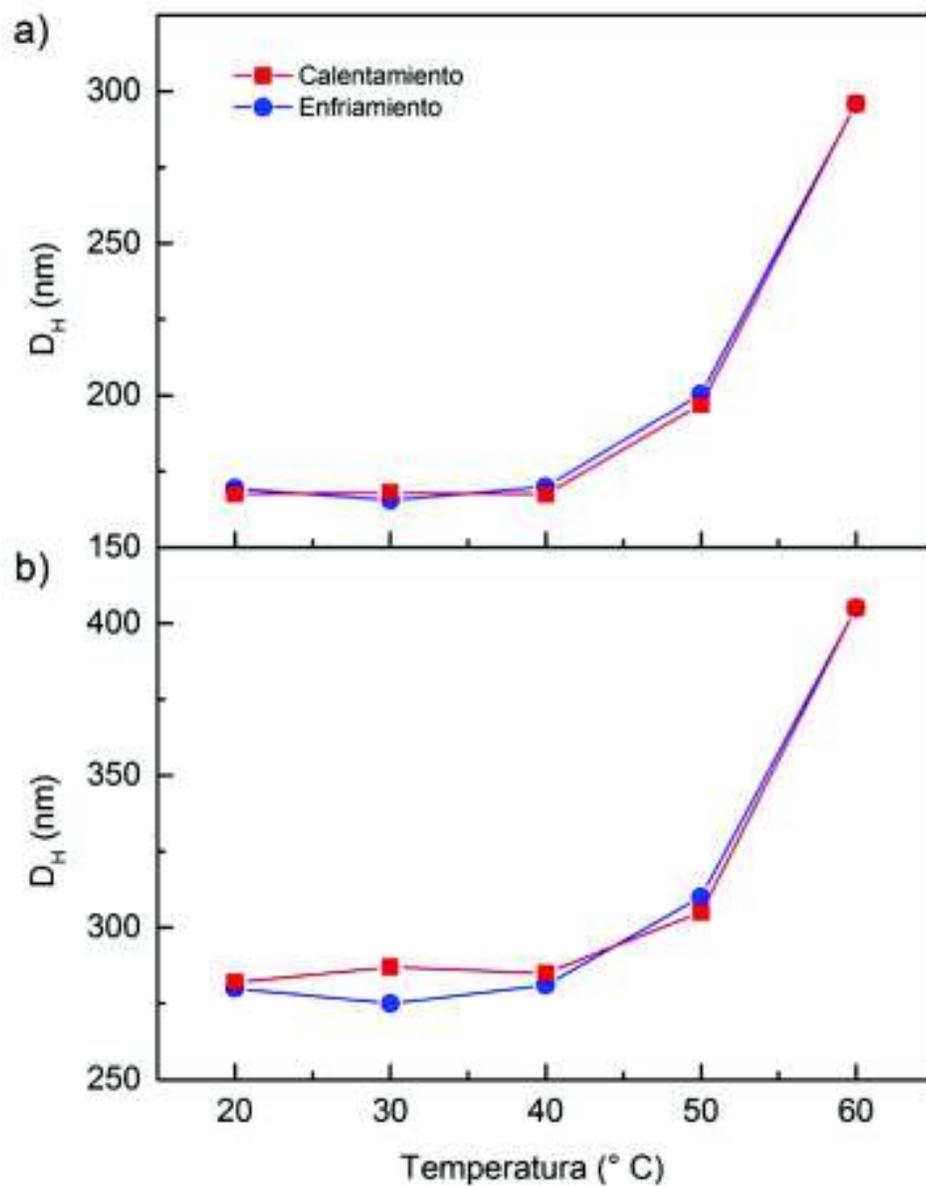
Se ha sugerido que los valores de potencial- $\zeta$  de alrededor de +30 mV son adecuados para estabilizar electrostáticamente los sistemas de nanopartículas. La carga superficial relativamente alta confiere la estabilidad asociada con la repulsión electrostática, evitando así la formación de grandes agregados de partículas (Grumezescu, 2017).

#### 6.3.4. Comportamiento Termosensible

De igual forma se analizó la termo sensibilidad de los nanosistemas. La figura 18 muestra el efecto de la temperatura en el  $D_H$  para las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 y 281 nm, en medio acuoso (pH 7). Se puede observar que por debajo de la LCST (40.7 ° C) el  $D_H$  es estable con valores de 170 y 281 nm, respectivamente. Sin embargo, al aumentar la temperatura a 60 °C las NP pueden alcanzar un tamaño de 282 y 405 nm.

Este cambio está asociado a la transición de fase de este copolímero termosensible, la cual se debe a la asociación hidrofóbica de las NP. Estudios previos del copolímero en solución, han sugerido que la razón de estos cambios de tamaño en las nanopartículas están correlacionados a una transición altamente cooperativa en donde ocurre un cambio en el equilibrio hidrofóbico/hidrofílico de las macromoléculas injertadas (Fernández-Quiroz et al., 2016; Fernández-Quiroz et al., 2019).

Para este trabajo, no se realizaron estimulaciones térmicas. Se puede comprobar con los valores obtenidos, que la temperatura no alteró el  $D_H$  durante los ensayos biológicos de cultivo celular donde se manejan 37 ° C.



**Figura. 18.** Efecto de la temperatura en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de Cs-g-PVCL de a) 169 y b) 281 nm, suspendidas en agua (pH 7).

## 6.4. Ensayos Biológicos

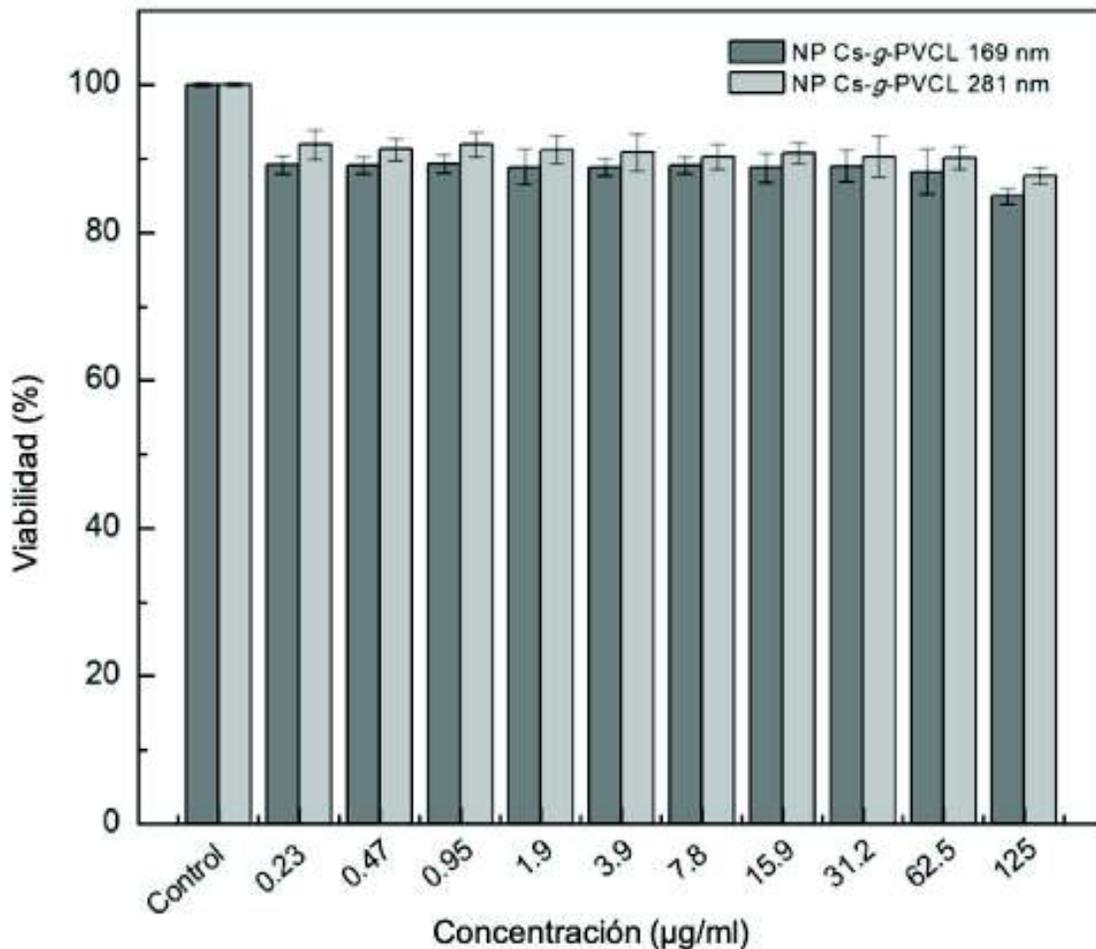
En la actualidad, la mayoría de los trabajos publicados se centran en la obtención de nuevas nanopartículas y en su caracterización físicoquímica, pero es necesario diseñar y establecer técnicas normalizadas que permitan evaluar su posible toxicidad. Para el copolímero Cs-*g*-PVCL, hay escasa información sobre sus posibles efectos tóxicos en células humanas. Las nanoestructuras están destinadas a su uso en humanos por vía intravenosa, por lo que entrarán en contacto con las células del endotelio y de sangre periférica (mayormente glóbulos rojos) (González-Fernández et al., 2012). Por lo anterior, en este trabajo se consideró realizar ensayos celulares, cuyos resultados se presentan en las subsecciones siguientes.

### 6.4.1. Actividad Hemolítica

La determinación de las propiedades hemolíticas es una de las pruebas más comunes en estudios de interacción de nanopartículas con componentes sanguíneos (Balan and Verestiuc, 2014). La aplicación de nanoestructuras como agentes terapéuticos debe considerar que estos sistemas tendrán una interacción directa con los componentes de la sangre, principalmente glóbulos rojos. En este contexto se evaluó el efecto hemolítico de las nanopartículas de Cs-*g*-PVCL de 169 y 181 nm durante 24 horas.

Los resultados obtenidos por espectrometría (Figura 19) muestran que a concentraciones menores de 62.4  $\mu\text{g/mL}$ , las nanopartículas de Cs-*g*-PVCL de 169 y 281 nm, obtuvieron un porcentaje de hemólisis del 11 y 8%, respectivamente. Para la concentración máxima correspondiente a 125  $\mu\text{g/mL}$ , el porcentaje de hemólisis sube al 15% y 11%, respectivamente.

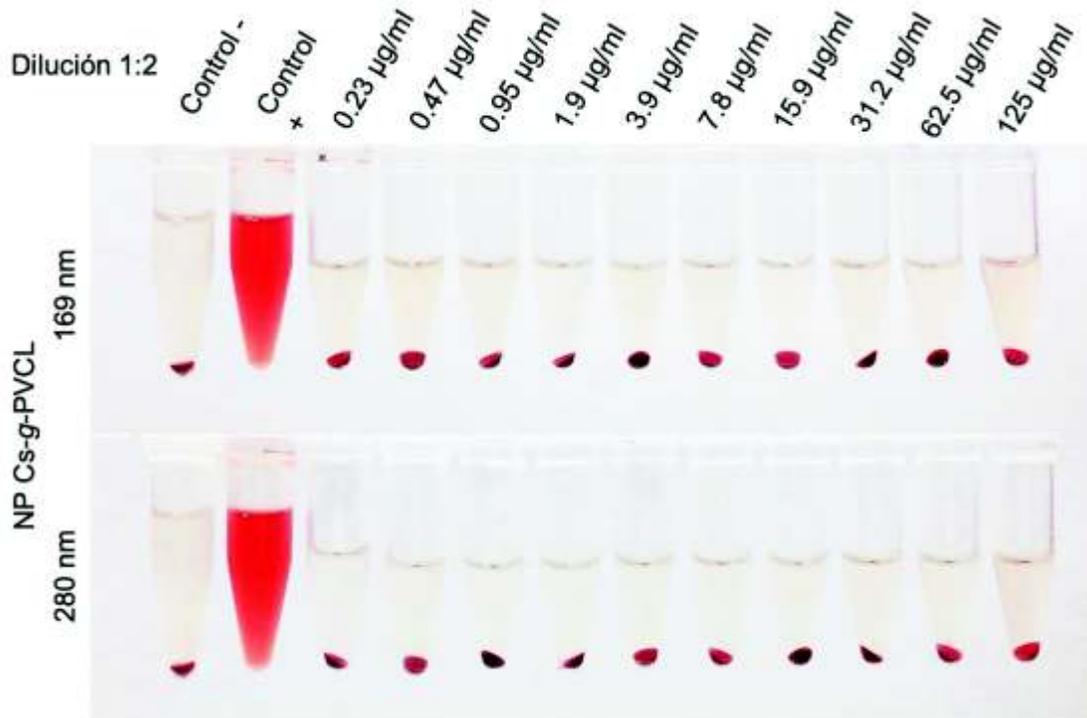
En la Figura 20 se muestran las fotografías del ensayo, que, concordando con lo obtenido por espectrometría, se observa mayor liberación de hemoglobina en la concentración de 125 µg/mL representada por un color rojizo en el sobrenadante.



**Figura. 19.** Actividad hemolítica cuantitativa de las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 y 281 nm.

Chen et al., (2015) reporta que las partículas de menor tamaño poseen mayor actividad hemolítica, como los resultados obtenidos en el presente estudio. Esto se debe a que se favorece la interacción de las cargas positivas de los grupos amina de las nanopartículas de Cs-g-PVCL, con las cargas negativas presentes

en la membrana de los glóbulos rojos, al existir mayor área superficial de contacto (Maya et al., 2012).

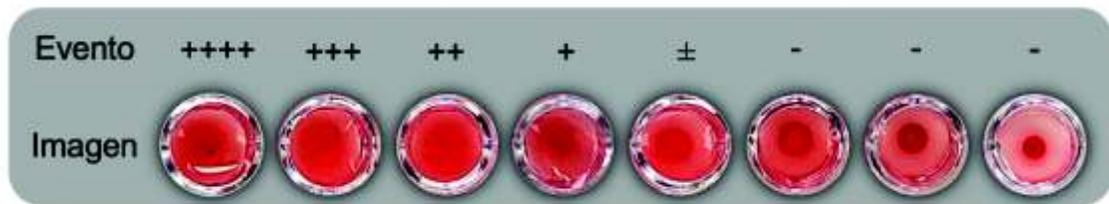


**Figura. 20.** Actividad hemolítica cualitativa de las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 y 281 nm.

#### 6.4.2. Actividad Hemaglutinante

Entre las técnicas sanguíneas, una de las más importantes es la de hemaglutinación. Este fenómeno se produce cuando las proteínas con carga negativa, componentes de la membrana de los glóbulos rojos, forman interacciones electrostáticas en contacto con partículas exógenas. Esto ocasiona que se reduzca la distancia impuesta por las fuerzas de repulsión de las propias células rojas con otras de su misma naturaleza y se formen aglutinaciones, es decir, la formación de grumos visibles macroscópicamente.

Siguiendo el protocolo propuesto por Stavitsky y Jarchow, (1954), fue posible la determinación visual de los eventos de aglutinación en glóbulos rojos para todas las muestras incubadas con nanopartículas de Cs-*g*-PVCL de 169 y 281 nm (Figura 21).



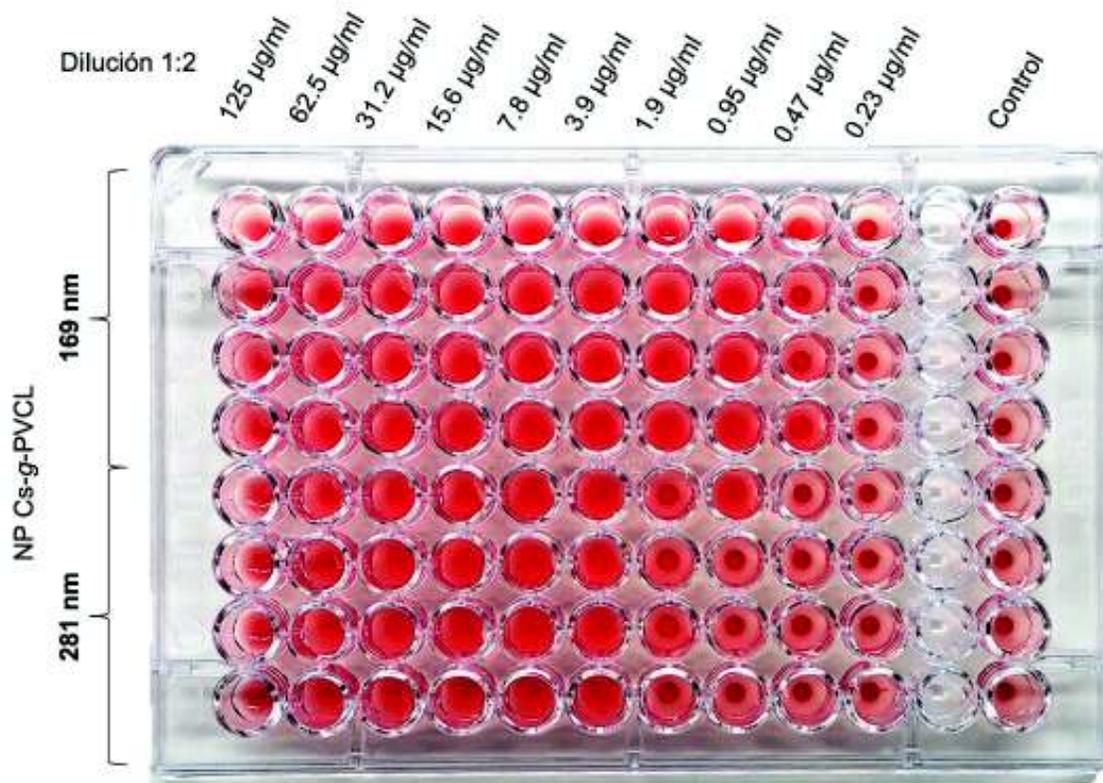
**Figura. 21.** Apariencia de eventos hemaglutinantes presentes ante el estímulo del copolímero Cs-*g*-PVCL.

Las nanopartículas de 169 nm presentaron diferentes eventos de hemaglutinación (++++, +++, ++) hasta la concentración de 0.95  $\mu\text{g/mL}$ . A concentraciones menores de 0.47  $\mu\text{g/mL}$ , se obtuvieron eventos indeterminados ( $\pm$ ) y no hemaglutinantes (-). En las nanopartículas de 281 nm, se puede observar el corrimiento de eventos no hemaglutinantes a una concentración de 1.9  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 22).

De Lima et al., (2015) relaciona la actividad hemaglutinante de la Cs con las cargas positivas de sus grupos amina. Dado que la mayoría de las membranas biológicas presentan naturaleza aniónica, la Cs podría adherirse fuertemente a ellas mediante interacciones electrostáticas, las células pueden deformarse y, por lo tanto, disminuir la repulsión entre ellas. Se cree que los glóbulos rojos unidos a la Cs forman una red local independientemente de otros agentes hemostáticos (Nogueira et al., 2013).

Pogorielov et al., (2015), discute que la hemaglutinación depende de la concentración de Cs en solución y no depende significativamente del peso

molecular del polímero. En este trabajo se menciona que probablemente, las soluciones de Cs de alta concentración tienen más grupos protonados y, por lo tanto, más posibilidades de unirse con la pared de los glóbulos rojos.



**Figura. 22.** Resultado de la actividad hemaglutinante tras 1 hora de incubación bajo el estímulo de nanopartículas Cs-g-PVCL de 169 y 281 nm.

Actualmente, no se ha reportado la relación entre el tamaño de NP con la actividad hemaglutinante de la Cs y del copolímero Cs-g-PVCL. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede inferir que las NP de 169 nm generan mayor presencia de eventos aglutinantes en comparación con de 281 nm, lo cual puede estar asociado a una mayor área superficial en contacto con los glóbulos rojos.

Es ampliamente conocido que a medida que disminuye el tamaño de las partículas, las superficies comienzan a dominar y controlar las propiedades de los materiales nanoestructurados (Baer et al., 2013). Por lo anterior, se puede inferir que, las NP de 169 nm presentan más interacciones electrostáticas con los glóbulos rojos, reflejándose en la presencia de eventos hemaglutinantes a menores concentraciones de copolímero.

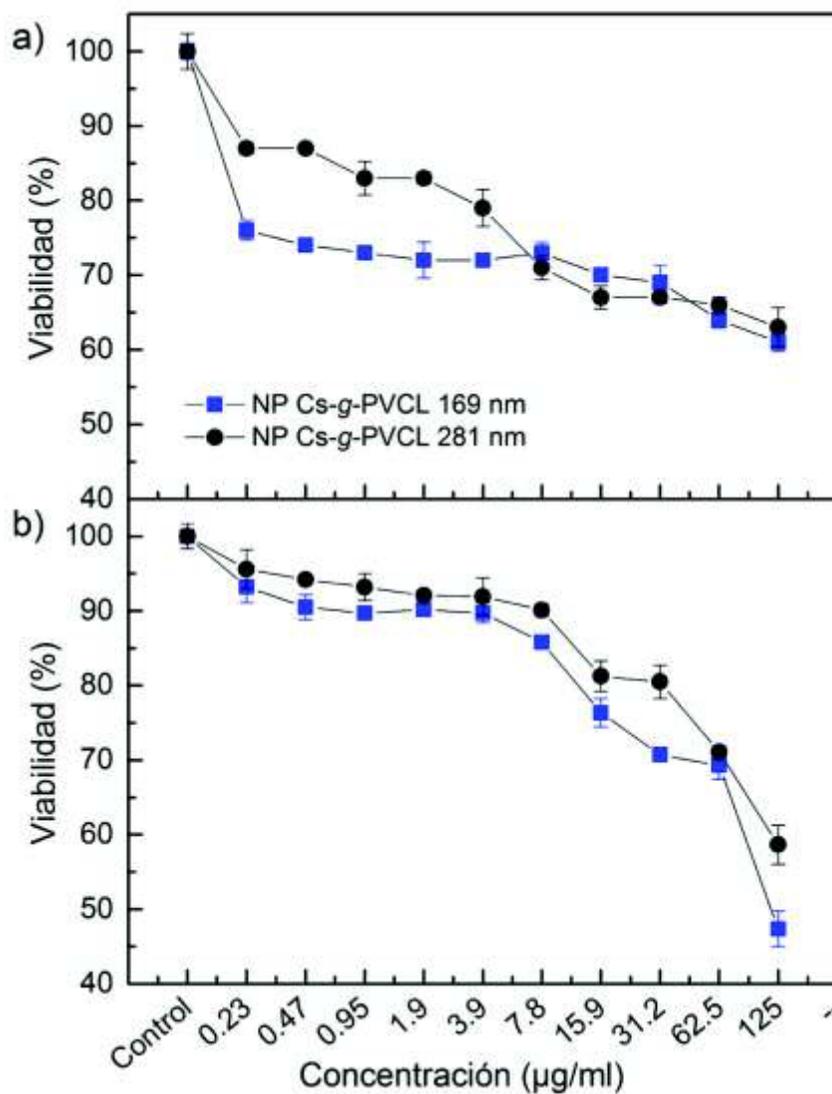
### 6.4.3. Ensayo de MTT

Los ensayos de viabilidad celular son utilizados como pruebas de rutina con el fin de estudiar el efecto citotóxico que pueden tener nanocompuestos sobre la proliferación celular.

La Figura 23a, muestra los resultados de viabilidad en la línea celular HUVEC tras 24 horas de incubación. Para las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 nm, se obtuvo que a concentraciones menores de 1.9  $\mu\text{g/mL}$ , hay una viabilidad por arriba del 80%. Para la concentración máxima utilizada en este estudio (125  $\mu\text{g/mL}$ ), la viabilidad baja y se reporta con 60%. Los porcentajes de viabilidad difieren para las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 281 nm, donde se obtuvo arriba del 80% de viabilidad a concentraciones menores de 3.9  $\mu\text{g/mL}$ . Similar a las NP de 169 nm, la viabilidad obtenida a 125  $\mu\text{g/mL}$  fue del 63%.

Por otro lado, los resultados para la línea celular HeLa (Figura 23b) tras 24 horas de incubación, muestran que para las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 nm, a concentraciones menores de 3.9  $\mu\text{g/mL}$ , hay una viabilidad por arriba del 90%. Se reporta la concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ) a 125  $\mu\text{g/mL}$ . Los porcentajes de viabilidad difieren para las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 281 nm, donde se obtuvo el 90% de viabilidad a concentraciones menores de 7.8  $\mu\text{g/mL}$ . A diferencia de las NP de 169 nm, no se reporta la  $IC_{50}$  ya que a 125  $\mu\text{g/mL}$  se obtuvo una viabilidad del 60%.

Varios autores han reportado que la viabilidad es mayor en las células cancerígenas HeLa que en células HUVEC, comportamiento que se comprueba en este trabajo (Das et al., 2015; Wang et al., 2019).



**Figura. 23.** Viabilidad en línea celular a) HUVEC y b) HeLa para las nanopartículas de Cs-g-PVCL de 169 y 281 nm.

## 7. CONCLUSIONES

En este trabajo se lograron obtener nanopartículas termosensibles a partir del copolímero Cs-*g*-PVCL por gelificación ionotrópica en medio acuoso, usando tripolifosfato de sodio como entrecruzante. Las NP mostraron una morfología pseudo-esférica con diámetro hidrodinámico de 169 nm y 281 nm y potencial- $\zeta$  de +29 mV y +45 mV, respectivamente.

En particular, las nanopartículas de 169 nm mostraron mayor efecto citotóxico, hemolítico y hemaglutinante, atribuyéndose a que, a tamaños más pequeños, se favorecen las interacciones superficiales entre el material y las células.

Los resultados sugieren que el tamaño de las NP de quitosana-*graft*-poli (*N*-vinil caprolactama) es un factor que influye en sus propiedades de biocompatibilidad.

## 8. RECOMENDACIONES

Se recomienda estudiar las propiedades termosensibles de las nanopartículas del copolímero Cs-*g*-PVCL, así como la encapsulación y liberación del fármaco tomando en cuenta las concentraciones abordadas en este trabajo.

Evaluar el comportamiento y estabilidad de las nanopartículas ante diferente pH y fuerza iónica. Esto permitiría conocer el rango de aplicación que podrían alcanzar estos materiales, así como sus condiciones de almacenamiento idóneas.

En este trabajo las nanopartículas a partir del copolímero Cs-*g*-PVCL presentaron una temperatura LCST de alrededor de los 39 ° C, se puede buscar reducir esta temperatura a una más cercana a la corporal ( $\approx 37$  ° C) aumentando el tamaño de cadena injertada de PVCL en la estructura de la Cs.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M.R., San Román, J., 2014. Introduction to smart polymers and their applications, in: *Smart Polymers and Their Applications*. Elsevier, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1533/9780857097026.1>
- Argüelles-Monal, W., Recillas-Mota, M., Fernández-Quiroz, D., 2017. Chitosan-Based Thermosensitive Materials, in: Emad Shalaby (Ed.), *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*. InTech, pp. 279–302.
- Argüelles-Monal, W.M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Recillas-Mota, M.T., Montiel-Herrera, M., 2018. Chitosan Derivatives: Introducing New Functionalities with a Controlled Molecular Architecture for Innovative Materials. *Polymers* 10, 342. <https://doi.org/10.3390/polym10030342>
- Azouri, A., Ge, M., Xun, K., Sattler, K., Lichwa, J., Ray, C., 2006. Zeta Potential Studies of Titanium Dioxide and Silver Nanoparticle Composites in Water-Based Colloidal Suspension. <https://doi.org/10.1115/MN2006-17072>
- Baer, D.R., Engelhard, M.H., Johnson, G.E., Laskin, J., Lai, J., Mueller, K., Munusamy, P., Thevuthasan, S., Wang, H., Washton, N., Elder, A., Baisch, B.L., Karakoti, A., Kuchibhatla, S.V.N.T., Moon, D., 2013. Surface characterization of nanomaterials and nanoparticles: Important needs and challenging opportunities. *J. Vac. Sci. Technol. Vac. Surf. Films Off. J. Am. Vac. Soc.* 31. <https://doi.org/10.1116/1.4818423>
- Balan, V., Verestiuc, L., 2014. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *Eur. Polym. J.* 53, 171–188. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.01.033>
- Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Controlled Release* 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines. *Pharm. Res.* 14, 1431–1436. <https://doi.org/10.1023/A:1012128907225>
- Chen, L.Q., Fang, L., Ling, J., Ding, C.Z., Kang, B., Huang, C.Z., 2015. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 501–509. <https://doi.org/10.1021/tx500479m>
- Cortez-Lemus, N.A., Licea-Claverie, A., 2016. Poly(N-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular. *Prog. Polym. Sci.* 53, 1–51. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.08.001>
- Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R.C., Martín-Martínez, E.S., Fernandez, J.Y., 2014. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas 8, 5.
- Das, M., Yi, D., An, S., 2015. Analyses of protein corona on bare and silica-coated gold nanorods against four mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine* 10, 1521–

45. <https://doi.org/10.2147/IJN.S76187>
- De Lima, J.M., Sarmento, R.R., de Souza, J.R., Brayner, F.A., Feitosa, A.P.S., Padilha, R., Alves, L.C., Porto, I.J., Batista, R.F.B.D., de Oliveira, J.E., de Medeiros, E.S., Bonan, P.R.F., Castellano, L.R., 2015. Evaluation of Hemagglutination Activity of Chitosan Nanoparticles Using Human Erythrocytes. *BioMed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/247965>
- D'Este, M., Eglin, D., Alini, M., 2014. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to hyaluronan in water. *Carbohydr. Polym.* 108, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.070>
- Diaz-Galvez, K.R., Teran-Saavedra, N.G., Burgara-Estrella, A.J., Fernandez-Quiroz, D., Silva-Campa, E., Acosta-Elias, M., Sarabia-Sainz, H.M., Pedroza-Montero, M.R., Sarabia-Sainz, J.A., 2019. Specific capture of glycosylated graphene oxide by an asialoglycoprotein receptor: a strategic approach for liver-targeting. *RSC Adv.* 9, 9899–9906. <https://doi.org/10.1039/C8RA09732A>
- Dobrovolskaia, M.A., Clogston, J.D., Neun, B.W., Hall, J.B., Patri, A.K., McNeil, S.E., 2008. Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties in Vitro. *Nano Lett.* 8, 2180–2187. <https://doi.org/10.1021/nl0805615>
- Espinosa, B.G., Campal, F.R., Burguillos, R.R., 2016. Técnicas de inmunodiagnóstico. Ediciones Paraninfo, S.A.
- Farkaš, P., Čížová, A., Bekešová, S., Bystrický, S., 2013. Comparison of EDC and DMTMM efficiency in glycoconjugate preparation. *Int. J. Biol. Macromol.* 60, 325–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.014>
- Fernández-Quiroz, D., González-Gómez, Á., Lizardi-Mendoza, J., Vázquez-Lasa, B., Goycoolea, F.M., Román, J.S., Argüelles-Monal, W.M., 2016. Conformational study on the thermal transition of chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) in aqueous solution. *Colloid Polym. Sci.* 294, 555–563. <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3816-0>
- Fernández-Quiroz, D., González-Gómez, Á., Lizardi-Mendoza, J., Vázquez-Lasa, B., Goycoolea, F.M., San Román, J., Argüelles-Monal, W.M., 2015. Effect of the molecular architecture on the thermosensitive properties of chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam). *Carbohydr. Polym.* 134, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.069>
- Fernández-Quiroz, D., Loya-Duarte, J., Silva-Campa, E., Argüelles-Monal, W., Sarabia-Sainz, A.-í, Lucero-Acuña, A., Castillo-Castro, T. del, Román, J.S., Lizardi-Mendoza, J., Burgara-Estrella, A.J., Castaneda, B., Soto-Puebla, D., Pedroza-Montero, M., 2019. Temperature stimuli-responsive nanoparticles from chitosan-graft-poly(N-vinylcaprolactam) as a drug delivery system. *J. Appl. Polym. Sci.* 47831. <https://doi.org/10.1002/app.47831>
- González-Fernández, A., Peleteiro, M., Lozano-Fernández, T., Simón-Vázquez, R., Díaz-Freitas, B., 2012. *Nanotecnología y Sistema inmunitario*. pp. 21–33.
- Goycoolea, F.M., Remuñán-López, C., Alonso, M.J., 2009. 3. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano 29.

- Grassian, V.H., 2008. When Size Really Matters: Size-Dependent Properties and Surface Chemistry of Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Gas and Liquid Phase Environments. *J. Phys. Chem. C* 112, 18303–18313. <https://doi.org/10.1021/jp806073t>
- Grumezescu, A.M., 2017. Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics. Elsevier, Amsterdam.
- Hamidakash, M.S., Rehman, K., Chen, S., 2015. Natural and Synthetic Polymers as Drug Carriers for Delivery of Therapeutic Proteins. *Polym. Rev.* 55, 371–406. <https://doi.org/10.1080/15583724.2014.995806>
- Hoogenboom, R., 2014a. Temperature-responsive polymers: properties, synthesis and applications, in: *Smart Polymers and Their Applications*. Elsevier, pp. 15–44. <https://doi.org/10.1533/9780857097026.1.15>
- Hoogenboom, R., 2014b. Temperature-responsive polymers: properties, synthesis and applications, in: *Smart Polymers and Their Applications*. Woodhead Publishing, pp. 15–44.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Reis, R.L., Mano, J.F., 2005. Graft copolymerized chitosan—present status and applications. *Carbohydr. Polym.* 62, 142–158. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.07.017>
- Liu, D., Yang, F., Xiong, F., Gu, N., 2016. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics* 6, 1306–1323. <https://doi.org/10.7150/thno.14858>
- Maya, S., Indulekha, S., Sukhithasri, V., Smitha, K.T., Nair, S.V., Jayakumar, R., Biswas, R., 2012. Efficacy of tetracycline encapsulated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles against intracellular infections of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.009>
- Medeiros, S.F., Barboza, J.C.S., Giudici, R., Santos, A.M., 2013. Thermally-sensitive and Biocompatible Poly(N-vinylcaprolactam): A Kinetic Study of Free Radical Polymerization in Ethanol. *J. Macromol. Sci. Part Pure Appl. Chem.* 50, 763–773. <https://doi.org/10.1080/10601325.2013.792662>
- Medeiros, S.F., Barboza, J.C.S., Ré, M.I., Giudici, R., Santos, A.M., 2010. Solution polymerization of N-vinylcaprolactam in 1,4-dioxane. Kinetic dependence on temperature, monomer, and initiator concentrations. *J. Appl. Polym. Sci.* 118, 229–240. <https://doi.org/10.1002/app.32204>
- Nogueira, D.R., Tavano, L., Mitjans, M., Pérez, L., Infante, M.R., Vinardell, M.P., 2013. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials* 34, 2758–2772. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.005>
- Odian, G., 2004. Principles of Polymerization, 4th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Ouellette, R.J., Rawn, J.D., 2015. Synthetic Polymers, in: *Principles of Organic Chemistry*. Elsevier, pp. 397–419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802444-7.00015-X>
- Patravale, V., Dandekar, P., Jain, R., 2012. Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles, in: *Nanoparticulate Drug Delivery*. Elsevier,

- pp. 123–155. <https://doi.org/10.1533/9781908818195.123>
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F.M., 2008. Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications, in: *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier, pp. 517–542. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00025-9>
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Peniche, H., Acosta, N., 2003. Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromol. Biosci.* 3, 511–520. <https://doi.org/10.1002/mabi.200300019>
- Pogorielov, M., Kalinkevich, O., Deineka, V., Garbuzova, V., Solodovnik, A., Kalinkevich, A., Kalinichenko, T., Gapchenko, A., Sklyar, A., Danilchenko, S., 2015. Haemostatic chitosan coated gauze: in vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness. *Biomater. Res.*
- Prabaharan, M., 2015. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 1313–1322. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.052>
- Prabaharan, M., Grailer, J.J., Steeber, D.A., Gong, S., 2008. Stimuli-Responsive Chitosan-graft-Poly(N-vinylcaprolactam) as a Promising Material for Controlled Hydrophobic Drug Delivery. *Macromol. Biosci.* 8, 843–851. <https://doi.org/10.1002/mabi.200800010>
- Quiñones, J.P., Peniche, H., Peniche, C., 2018. Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery. *Polymers* 10, 235. <https://doi.org/10.3390/polym10030235>
- Ramanathan, S., Ponnuswamy, V., Gowtham, B., Premnazeer, K., Murugavel, S.C., 2014. Effect of aniline concentration on chitosan grafted polyaniline. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 16, 973–977.
- Recillas, M., Silva, L.L., Peniche, C., Goycoolea, F.M., Rinaudo, M., Argüelles-Monal, W.M., 2009. Thermoresponsive Behavior of Chitosan-g-N-isopropylacrylamide Copolymer Solutions. *Biomacromolecules* 10, 1633–1641. <https://doi.org/10.1021/bm9002317>
- Rejinold, N.S., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Tamura, H., Jayakumar, R., 2011. Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier. *Carbohydr. Polym.* 83, 776–786. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.052>
- Rodrigues, F.H.A., Pereira, A.G.B., Fajardo, A.R., Muniz, E.C., 2013. Synthesis and characterization of chitosan- *graft* -poly(acrylic acid)/nontronite hydrogel composites based on a design of experiments. *J. Appl. Polym. Sci.* 128, 3480–3489. <https://doi.org/10.1002/app.38386>
- Sanoj Rejinold, N., Thomas, R.G., Muthiah, M., Chennazhi, K.P., Manzoor, K., Park, I.-K., Jeong, Y.Y., Jayakumar, R., 2015. Anti-cancer, pharmacokinetics and tumor localization studies of pH-, RF- and thermo-responsive nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 74, 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.044>
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2008. *Principios de Análisis Instrumental*.
- Stavitsky, A.B., Jarchow, C.C., 1954. Procedure and General Applications of Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Reactions with Tannic

Acid and Protein-Treated Red Blood Cells. *J. Immunol.* 72.  
Wang, L., Zhang, J., Guo, X., Chen, S., Cui, Y., Yu, Q., Yang, L., Sun, H., Gao, D., Xie, D., 2019. Highly Stable and Biocompatible Zwitterionic Dendrimer-Encapsulated Palladium Nanoparticles to Maintain Their Catalytic Activity in Bacterial Solution. *New J. Chem.* 42. <https://doi.org/10.1039/C8NJ04263B>

## ANEXOS

Durante el tercer semestre de la Maestría en Ciencias de Materiales, se realizó una estancia académica internacional a la Universidad Autónoma de Madrid, España en el Departamento de Física de Materiales bajo la orientación del Dr. José García Solé. El proyecto en el que participe se titula “Nanotermometría e hipertermia para tejidos biológicos asistidos con nanotubos de carbono y nanodiamantes”

El trabajo de investigación se presentó en los siguientes eventos de divulgación científica:

- XXI Jornada de Jóvenes Científicos, Universidad Autónoma de Madrid. Presentación de cartel titulado “Gold nanoparticles coated with a termosensitive and biocompatible copolymer for nanothermometry applications”.
- XIII Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales, Universidad de Sonora. Presentación de cartel titulado “Nanopartículas de oro recubiertas con copolímero termosensible para aplicaciones de nanotermometría”.
- 2do Coloquio en Materiales de Interés Biotecnológico, Universidad de Sonora. “Perspectivas en la salud humana”. Presentación de cartel titulado “Nanopartículas de oro recubiertas con copolímero termosensible para aplicaciones de nanotermometría”.