



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN NANOCIENCIAS Y  
NANOTECNOLOGÍA**

**“Nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )  
encapsuladas con análogos de CAPE empleando  
los polímeros o-carboximetilquitosano y  
quitosano para su evaluación en cáncer de  
pulmón”**

**T E S I S**

Que presenta:

**M. EN C. ELMER JOEL MILLÁN CASARRUBIAS**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**

Directores de la Tesis:

**Dra. Verónica Rocío Vásquez Garzón  
Dr. Daniel Bahena Uribe**

Ciudad de México

AGOSTO, 2022

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis asesores la Dra. Verónica Rocío Vásquez Garzón y al Dr. Daniel Bahena Uribe por la oportunidad de poder trabajar con ellos y todo su apoyo para poder desarrollar este proyecto.

Un sincero agradecimiento al Dr. Saul Villa Treviño por permitirme trabajar en el laboratorio 50 de Biológica Celular, y poder llevar a cabo la parte química, así como la parte *in vitro* de este proyecto. Además de contar con sus valiosas observaciones y guía para el desarrollo de los diferentes protocolos.

Agradezco al Dr. Santoyo por el apoyo proporcionado para poder llevar a cabo algunas caracterizaciones, así como asesoría para poder desarrollar algunas metodologías de síntesis.

Agradecimiento al Dr. José Gerardo Cabañas por la oportunidad brindada para poder ingresar al programa de doctorado y por el apoyo durante su gestión en la coordinación de dicho programa.

Al Dr. Enrique Ángeles por su apoyo y proporcionar los compuestos y por su ayuda para llevar a cabo algunas de las caracterizaciones en su laboratorio de la FES Cuautitlán.

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Centro de investigación y de Estudios Avanzados del IPN, por el apoyo proporcionado para el desarrollo de este proyecto.

Al programa de doctorado en nanociencias y nanotecnología del cinvestav y a la coordinación de dicho programa por el apoyo y orientación proporcionados durante todo el periodo en que fui parte del programa.

# CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	6
ACRONIMOS .....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
II.1 NANOMATERIALES.....	9
II.2 NANOPARTÍCULAS.....	10
<i>II.2.1 Nanopartículas metálicas.....</i>	<i>12</i>
<i>II.2.2 Magnetita.....</i>	<i>13</i>
II.4 FUNCIONALIZACIÓN .....	15
II.4 QUITOSANO .....	17
II.4.1 O-CARBOXIMETIL QUITOSANO .....	19
II.4.2 MÉTODOS DE SÍNTESIS .....	19
II.5 CÁNCER .....	20
<i>II.5.1 Cáncer de pulmón.....</i>	<i>20</i>
II.6 CAPE.....	22
<i>II.6.1 CAPE en cáncer de pulmón.....</i>	<i>24</i>
<i>II.6.2 Análogos de CAPE.....</i>	<i>25</i>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>V.1 OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>28</b>
<b>V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>28</b>
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
VI.1 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	29
VI.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE O-CARBOXIMETIL QUITOSANO.....	30
VI.3 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE O-CARBOXIMETIL QUITOSANO A BAJA TEMPERATURA.....	31
VI.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE LQM-755/CARBOXIMETILQUITOSANO. ....	32
VI.5 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE LQM-755/ MAGNETITA/CARBOXIMETIL QUITOSANO.....	33

VI.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOACARREADORES .....	34
VI.6.1 Espectroscopia FT-IR .....	34
VI.6.2 Espectroscopia UV-Vis.....	34
VI.6.3 Análisis XRD.....	34
VI.6.4 Microscopia de transmisión electrónica (TEM).....	34
VI.6.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	35
VI.6.6 Espectrometría RMN 1H.....	35
VI.7 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTT) CON COMPUESTOS ANÁLOGOS CAPE.....	35
VI.8 MODELO DE XENOINJERTO.....	36
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
VII.1 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTT) CON COMPUESTOS ANÁLOGOS CAPE.....	37
VII.2 ENSAYOS DE TOXICIDAD POR MTT CON EL ANÁLOGO LQM-755.....	40
VII.3 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA .....	40
VII.4 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE O-CARBOXIMETILQUITOSANO .....	46
VII.5 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE LQM-755 CON O-CARBOXIMETIL QUITOSANO .....	48
VII.6 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE LQM-755/ MAGNETITA/O-CARBOXIMETIL QUITOSANO .....	50
VII.7 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTT) CON QUITOSANO Y O-CARBOXIMETILQUITOSANO .....	61
VII.8 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE O-CARBOXIMETILQUITOSANO A BAJA TEMPERATURA .....	62
VII.9 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE LQM-755 CON O-CARBOXIMETILQUITOSANO A BAJA TEMPERATURA .....	63
VII.10 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE LQM-755/MAGNETITA/QUITOSANO/O- CARBOXIMETILQUITOSANO A BAJA TEMPERATURA.....	63
VII.11 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE LQM-755/ MAGNETITA/O-CARBOXIMETILQUITOSANO A BAJA TEMPERATURA.....	69
VII.12 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN .....	70
VII.13 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT) CON NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO/O- CARBOXIMETILQUITOSANO/ MAGNETITA/ LQM-755.....	72
VII.14 MODELO DE XENOINJERTO CON CÉLULAS A549 EN RATONES NSG .....	75
VII.15 MODELO DE XENOINJERTO CON CÉLULAS A549 ADMINISTRADOS CON LQM-755 .....	76
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>81</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>82</b>
<b>XI. ANEXOS .....</b>	<b>87</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química del CAPE (éster fenílico del ácido cafeico).....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura química del LQM-717.....	7
<b>Figura 4.</b> Sistema de nanoacarreadores propuesto.....	8
<b>Figura 5.</b> Clasificación de materiales nanoestructurados de acuerdo con su aspecto dimensional modificado de L. Cornejo, et al 2015. ....	9
<b>Figura 6.</b> Diferentes aplicaciones para nanopartículas modificado de S. Assa, et al 2016.....	11
<b>Figura 7.</b> Tipos de funcionalización en las nanopartículas. ....	17
<b>Figura 8.</b> Número de nuevos casos para cada tipo de cáncer en México. ....	22
<b>Figura 9.</b> Estructura química de CAPE. ....	23
<b>Figura 10.</b> Estructura química de LQM-717.....	25
<b>Figura 11.</b> Reacción de coprecipitación para sintetizar magnetita.....	29
<b>Figura 12.</b> Reacción para obtener O-carboximetil quitosano. ....	30
<b>Figura 13.</b> Síntesis de O-carboximetil quitosano a baja temperatura.....	31
<b>Figura 14.</b> Esquema propuesto para la síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano/o-carboximetil quitosano. ....	32
<b>Figura 15.</b> Esquema propuesto para la síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano/o-carboximetil quitosano incorporando nanopartículas de magnetita.....	33
<b>Figura 16.</b> Proceso para llevar a cabo ensayos de viabilidad celular.....	36
<b>Figura 17.</b> Esquema propuesto para el modelo de xenoinjerto con células cancerígenas de pulmón A549. ....	36
<b>Figura 18.</b> Resultados obtenidos por ensayo de MTT para el compuesto LQM-717 sobre la línea de cáncer de pulmón A549.....	38
<b>Figura 19.</b> Resultados obtenidos por ensayo de MTT para el compuesto LQM-755 sobre la línea de cáncer de pulmón A549.....	40
<b>Figura 20.</b> Resultados obtenidos por ensayo de MTT para el compuesto LQM-755 sobre la línea de fibroblastos normales LL47. ....	40
<b>Figura 21.</b> Patrón por DRX de la muestra de nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método coprecipitación.....	41

<b>Figura 22.</b> Espectro FTIR de las nanopartículas de magnetita obtenidas a 90°C por el método de coprecipitación.....	42
<b>Figura 23.</b> Diámetro promedio obtenido por la técnica de dispersión dinámica de luz para la muestra de nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método de coprecipitación y sin funcionalizar. ....	43
<b>Figura 24.</b> Potencial z obtenido para la muestra de nanopartículas de magnetita sin funcionalizar sintetizadas por coprecipitación. ....	44
<b>Figura 25.</b> Micrografías obtenidas por TEM de las nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método de coprecipitación a 90 °C en campo oscuro y en campo claro. ....	45
<b>Figura 26.</b> Espectro FTIR de los polímeros a) quitosano y el sintetizado b) o-carboximetil quitosano con estructura similar, pero con la incorporación de grupos -COOH.....	46
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN de H1 correspondiente al polímero sintetizado o-carboximetilquitosano. ....	47
<b>Figura 28.</b> Espectro FTIR del compuesto LQM-755 donde se aprecian las señales correspondientes al compuesto el cual fue proporcionado por el Dr. Enrique Ángeles (FES-Cuautitlán). ....	49
<b>Figura 29.</b> Espectro FTIR de las muestras; a) polímero o-carboximetil quitosano, b) compuesto LQM-755 y c) nanopartículas de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 empleando el agente gelificante CaCl <sub>2</sub> . ....	50
<b>Figura 30.</b> Espectro FTIR de las muestras; a) compuesto LQM-755, b) o-carboximetil quitosano y c) nanopartículas de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 y nanopartículas de magnetita empleando como agente gelificante CaCl <sub>2</sub> .....	51
<b>Figura 31.</b> Espectro FTIR de nanopartículas poliméricas a base de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 y nanopartículas de magnetita empleando como agente gelificante CaCl <sub>2</sub> . ....	52
<b>Figura 32.</b> Micrografías obtenidas por SEM de las nanopartículas poliméricas de o-carboximetil quitosano/ magnetita/ LQM-755.....	53
<b>Figura 33.</b> Micrografías obtenidas por SEM de las nanopartículas poliméricas de o-carboximetil quitosano/quitosano/ magnetita/ LQM-755 a una magnificación de x200 000.....	54
<b>Figura 34.</b> Espectro de EDS y composición elemental de la muestra nanopartículas poliméricas de o-carboximetil quitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el agente gelificante CaCl <sub>2</sub> . ....	55
<b>Figura 35.</b> Micrografías obtenidas por TEM del sistema de nanopartículas formado por o-carboximetil quitosano/quitosano/magnetita/LQM-755. ....	57
<b>Figura 36.</b> Espectro de EDS lineal y composición elemental de la muestra nanopartículas.....	59

<b>Figura 37.</b> Espectro de EDS lineal y composición elemental de la muestra nanopartículas poliméricas de o-carboximetilquitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el agente gelificante CaCl <sub>2</sub> ; obtenido con el microscopio de TEM.....	59
<b>Figura 38.</b> Composición elemental de la muestra nanopartículas poliméricas de o-carboximetilquitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el agente gelificante CaCl <sub>2</sub> ; obtenido con el microscopio de TEM.....	60
<b>Figura 40.</b> Ensayo de viabilidad celular por la técnica de MTT en un tiempo de 48 horas con la línea celular A549 .....	62
<b>Figura 41.</b> Espectro FTIR de las muestras; a) o-carboximetil quitosano y b) nanopartículas de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 y nanopartículas de magnetita empleando como agente gelificante TPP.....	64
<b>Figura 42.</b> Micrografía obtenida por SEM del sistema de nanopartículas formado por o-carboximetil quitosano/quitosano/magnetita/LQM-755 empleando como agente gelificante TPP.....	65
<b>Figura 43.</b> Micrografía obtenida por SEM con un voltaje de 5 KV y una magnificación de x100 000 del sistema de nanopartículas formado por o-carboximetil quitosano/quitosano/magnetita/LQM-755 empleando como agente gelificante TPP.....	66
<b>Figura 44.</b> Micrografía obtenida por SEM con un voltaje de 5 KV y una magnificación de x100 000 del sistema de nanopartículas formado por o-carboximetil quitosano/quitosano/magnetita/LQM-755 empleando como agente gelificante TPP.....	67
<b>Figura 45.</b> Espectro de EDS y composición elemental de la muestra nanopartículas poliméricas de o-carboximetilquitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el agente gelificante TPP. ....	68
<b>Figura 46.</b> Espectro FT-IR de las muestras; a) o-carboximetil quitosano sintetizado a baja temperatura y b) nanopartículas de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 y nanopartículas de magnetita empleando como agente gelificante TPP.....	69
<b>Figura 47.</b> Curva de calibración para la concentración del compuesto LQM-755 empleando como vehículo metanol por la técnica de U. V.-vis.....	71
<b>Figura 48.</b> Ensayo de viabilidad celular por la técnica de MTT en un tiempo de 24 horas con la línea celular A549 .....	73
<b>Figura 49.</b> Imágenes obtenidas con microscopio óptico normal con aumento de 40x 24 horas después de administrar diferentes grupos sobre la línea de células de cáncer de pulmón A549 .....	75
<b>Figura 50.</b> Evolución del tumor en un ratón sin administrar al paso de 3 semanas después de haber sido inoculados con 2 x10 <sup>6</sup> de células de cáncer de pulmón A549 en el flanco derecho. ....	76

**Figura 51.** Resultados obtenidos empleando el modelo de xenoinjerto en ratones de la cepa NSG administrados con los diferentes grupos de estudio..... 78

**Figura 52.** Resultados obtenidos empleando el modelo de xenoinjerto en ratones de la cepa NSG administrados con los diferentes grupos de estudio..... 78

## ACRONIMOS

<b>CAPE</b>	Ester Fenético del Acido Cafeico
<b>CS</b>	Quitosano
<b>OCMQ</b>	O-Carboximetil Quitosano
<b>NP</b>	Nanopartículas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OG</b>	Oxido de Grafeno
<b>OGR</b>	Oxido de Grafeno reducido
<b>2D</b>	Dos Dimensiones
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos (siglas en ingles)
<b>MNP</b>	Nanopartícula magnética
<b>0D</b>	Cero dimensiones
<b>1D</b>	Una dimensión
<b>3D</b>	Tres dimensiones
<b>NM</b>	Nanómetros
<b>UM</b>	Micrómetros
<b>AUNPS</b>	Nanopartículas de Oro
<b>PH</b>	Potencial de hidrogeno
<b>GA</b>	Grado de Acetilación
<b>GD</b>	Grado de Desacetilación
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>MMHR</b>	Modelo Modificado del Hepatocito Resistente
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxigeno
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>XRD</b>	Difracción de Rayos X
<b>FT-IR</b>	Infrarrojos por transformada de Fourier
<b>TEM</b>	Microscopia Electrónica de Transmisión
<b>SEM</b>	Microscopia Electrónica de Barrido
<b>Kv</b>	Kilo Volts
<b>EDS</b>	Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>DLS</b>	Dispersión Dinámica de Luz
<b>MTT</b>	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino (siglas en ingles)
<b>TPP</b>	Tripolifosfato sódico
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection



## Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Entre los tipos de cáncer más comunes, el de pulmón representa el 16,7% de todos los nuevos casos diagnosticados en hombres. Es importante también destacar que el cáncer de pulmón tiene la tasa de mortalidad más alta y una tasa de supervivencia menor a 5 años. Los tratamientos usados en el cáncer de pulmón han resultado poco eficientes. Por esa razón, es importante implementar nuevas estrategias para el tratamiento de este tipo de cáncer, además del desarrollo de nuevos fármacos que provean una mayor eficacia y disminuyan los efectos adversos. El éster fenólico del ácido cafeico (CAPE), es un compuesto fenólico derivado del propóleo al que se le ha detectado un efecto anti-neoplásico. A partir de esta sustancia se han desarrollado diversos análogos que buscan mejorar las propiedades del compuesto natural, aumentando su producción y reduciendo su elevado costo. Los análogos de CAPE, LQM-717 y LQM-755 han demostrado tener un mayor efecto quimioprotector que CAPE en la reducción de las lesiones preneoplásicas y de tumores. En el presente trabajo se desarrollaron nanopartículas (NP's) de magnetita como soporte para generar nanoacarreadores con los polímeros quitosano y o-carboximetil quitosano para el compuesto LQM-755, con la finalidad de ayudar a proteger de la metabolización, aumentar el efecto terapéutico y disminuir los efectos tóxicos. Se selecciono previamente el polímero quitosano para generar las nanopartículas poliméricas, ya que, tiene una gran cantidad de beneficios y aplicaciones en el área médica, como por ejemplo su uso en nanopartículas para administración de fármacos por la vía respiratoria, que es una vía de administración directa para el tratamiento del cáncer de pulmón. Esto debido a las propiedades de este polímero de incrementar la mucoadhesividad y llevar a cabo liberación prolongada y controlada por un mayor tiempo. Además, de que no se tienen antecedentes como posibles efectos tóxicos para este polímero. También se sintetizó un derivado de quitosano, que fue el o-carboximetil quitosano para generar las nanopartículas, esto debido a que la naturaleza de este polímero permite obtener una mayor solubilidad de las nanopartículas y por lo tanto de los compuestos que sean encapsulados. Por otra

parte, para ayudar a controlar el diámetro de partícula y generar un método de separación más rápido y eficiente se emplearon nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método de coprecipitación. Estas partículas permitieron obtener un menor tamaño de partícula, además de que se logró incrementar el rendimiento de encapsulación. Una vez obtenido el sistema, se seleccionó el análogo LQM-755 debido a que en ensayos de viabilidad celular contra la línea de células cancerosas A549 obtuvo resultados significativos a diferencia del análogo LQM-717. El análogo LQM-755 se evaluó también en una cepa de ratones NSG inoculados con células de cáncer de pulmón, para determinar el efecto del fármaco sobre tumores sólidos. Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de este compuesto de inhibir el crecimiento del tumor a diferencia de ratones que no fueron administrados. Las nanopartículas formadas por todos los componentes fueron administradas en ensayos *in vitro* y en ensayos *in vivo*. Los resultados *in vitro* demostraron generar un efecto parecido al obtenido por el fármaco sin encapsular. Por otra parte, los resultados *in vivo* permitieron demostrar que las nanopartículas no generaron efectos tóxicos aparentes, además de inhibir el crecimiento de los tumores a diferencia de los grupos control. El sistema de nanopartículas propuesto para los análogos de CAPE permitió obtener un buen rendimiento de encapsulación además de generar síntesis amigable con el medio ambiente, por lo que puede ser una buena opción para la administración de fármacos insolubles por la vía respiratoria.

## **Abstract**

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Among the most common types of cancer, lung cancer represents 16.7% of all new cases diagnosed in men. It is also important to note that lung cancer has the highest mortality rate and a survival rate of less than 5 years. The treatments used in lung cancer have been inefficient. For this reason, it is important to implement new strategies for the treatment of this type of cancer, in addition to the development of new drugs that supply greater efficacy and reduce adverse effects. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is a phenolic compound derived from propolis that has been found to have an anti-neoplastic effect. Various analogs have been developed from this substance to improve the properties of the natural compound, increasing its production, and reducing its excessive cost. The CAPE analogs, LQM-717 and LQM-755, have been shown to have a greater chemoprotective effect than CAPE in reducing preneoplastic lesions and tumors. In the present work, magnetite nanoparticles (NP's) were developed as a support to generate nanocarriers with the polymer's chitosan and o-carboxymethyl chitosan for the compound LQM-755, to protect from metabolization, increase the therapeutic effect, and reduce toxic effects. The chitosan polymer was previously selected to generate the polymeric nanoparticles, since it has many benefits and applications in the medical area, such as its use in nanoparticles for the administration of drugs through the respiratory route, which is a route of direct administration for the treatment of lung cancer. This is due to the properties of this polymer to increase mucoadhesiveness and conduct prolonged and controlled release for a longer time. In addition, there is no background of possible toxic effects for this polymer. A chitosan derivative which was o-carboxymethyl chitosan, was also synthesized to generate the nanoparticles, because of the nature of this polymer that allows for greater solubility of the nanoparticles and therefore of the compounds that are encapsulated. On the other hand, to control the particle diameter and generate a faster and more efficient separation method, magnetite nanoparticles synthesized by the coprecipitation method were used. These particles made it possible to obtain a smaller particle size, in addition to increasing the encapsulation yield. Due to the remarkable results obtained in cell viability tests against

the A549 cancer cell line, the LQM-755 analog was selected rather than the LQM-717 analog. The LQM-755 analog was also assessed in a strain of NSG mice inoculated with lung cancer cells to determine the effect of the drug on solid tumors. The results obtained demonstrated the ability of this compound to inhibit tumor growth, unlike mice that were not administered. The nanoparticles formed by all the components were administered in *in vitro* tests and *in vivo* tests. The *in vitro* results showed to generate an effect like that obtained by the drug without encapsulation. On the other hand, the *in vivo* results made it possible to prove that the nanoparticles did not generate apparent toxic effects, in addition to inhibiting tumor growth, unlike the control groups. The nanoparticle system proposed for CAPE analogs allowed to obtain a good encapsulation performance in addition to generating environmentally friendly synthesis, so it can be a good option for the administration of insoluble drugs through the respiratory route.

## I. INTRODUCCIÓN

La Nanotecnología junto con la Biotecnología y la información tecnológica, la cual tiene su fundamento en el estudio de los fenómenos ocurridos en la nanoescala constituyen un dominio científico que ha servido para el diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras y nanomateriales.

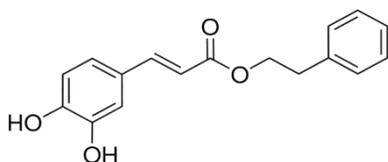
Los nanomateriales especialmente los nanomateriales funcionales, han atraído la atención de los investigadores en los últimos años. Dentro los principales tipos de nanomateriales que se han desarrollado y estudiado para generar sistemas de liberación de fármacos se encuentran los nanotubos, las nanopartículas y nanomateriales 2D como el caso del grafeno. Sin embargo, el caso de los nanotubos se ha dejado atrás debido a que se ha reportado que tiene una mayor toxicidad. Por lo que, los nanomateriales más estudiados para este tipo de sistemas son los derivados de grafeno (OG, OGr) y las NP's (liposomas, nanopartículas poliméricas, micelas, dendrímeros y nanopartículas metálicas). Estas últimas han cobrado una mayor importancia debido a los diversos tipos de nanopartículas que se pueden desarrollar, además de la gran cantidad de métodos de síntesis que ya se han estudiado y que en algunos casos son baratos, eficaces y que producen un alto rendimiento y control del tamaño de partícula, lo cual es importante para tener un óptimo control de carga de fármaco y de liberación de este mismo. Los nanomateriales magnéticos, como la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), se han empleado asiduamente en estudios de resonancia magnética, liberación de drogas, separaciones biológicas, e incluso en catálisis biológica. Los nanomateriales magnéticos son química y biológicamente inertes, por lo que se funcionalizan con metales catalíticos, enzimas o anticuerpos con el objetivo de elevar su funcionalidad. Sin embargo, el uso de nanopartículas (NP's) como nanoacarreadores ha cobrado una mayor importancia en los últimos años debido a las diversas propiedades fisicoquímicas y a la facilidad de acoplar fármacos de interés bilógico. Por lo que, el objetivo de usar nanoacarreadores es ayudar a proteger de la metabolización al fármaco cargado, aumentar el efecto terapéutico y disminuir los efectos tóxicos (Santos et al., 2011). Como se mencionó anteriormente, otro tipo de material empleado para liberación de fármacos es el óxido de grafeno (OG), el cual es un material en dos dimensiones (2D) derivado del grafeno

que se ha empleado para desarrollar sistemas de liberación de fármacos y genes en la última década, debido a su fácil funcionalización o carga del fármaco, amplia área de contacto y que los métodos de síntesis para su obtención son accesibles y no requieren de condiciones drásticas (Goenka et al., 2014; Santos et al., 2011).

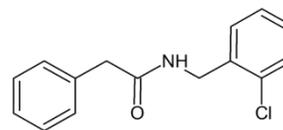
Por otra parte, se sabe que el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los casos de cáncer más diagnosticados en 2012 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) fueron: pulmón, mama, colorrectal y estomacal representando más del 40% de todos los tipos diagnosticados en todo el mundo; así mismo la OMS informó de un estimado de 14,1 millones de nuevos casos a nivel mundial ese mismo año (Jemal et al., 2011). Entre los tipos de cáncer más comunes, el de pulmón representa el 16,7% de todos los nuevos casos diagnosticados en hombres. Generalmente el cáncer de pulmón se puede clasificar en dos tipos: de células pequeñas que representa en 13% de casos y el de células no pequeñas, el cual, es el más frecuente con el 87% de casos. Es importante también destacar que el cáncer de pulmón tiene la tasa de mortalidad más alta y una tasa de supervivencia menor a 5 años (Jemal et al., 2011). De los 8,2 millones de muertes causadas por cáncer en 2011 a nivel mundial, la mortalidad por cáncer de pulmón contribuyó con 1,3 millones de muertes, lo que representó el índice más alto en ese año (Goenka et al., 2014). Históricamente, el cáncer de pulmón se ha relacionado con el tabaquismo y, en consecuencia, se clasifica como una enfermedad social (Thompson et al., 2004). Contrariamente a la creencia popular, el cáncer de pulmón no sólo afecta a los fumadores, sino también a los no fumadores. Por otra parte, sólo el 15% de los pacientes con cáncer de pulmón sobreviven más de 5 años después del diagnóstico (Rodríguez & Lilenbaum, 2010). Claramente hay una falta de diagnósticos y regímenes de tratamiento eficaces. La cirugía, la quimioterapia y la radiación son opciones de tratamiento convencionales para este tipo de cáncer, dependiendo de la etapa en que se encuentre (Chang, 2011). La quimioterapia es un tratamiento de primera línea para el estadio avanzado del cáncer de pulmón en el que los fármacos quimioterapéuticos se administran por vía intravenosa (2004; Paumier & le Péchoux, 2010). El uso de fármacos quimioterapéuticos se basa en el principio de compuestos tóxicos para inhibir la proliferación de células cancerosas. Por ejemplo, la

combinación de gemcitabina (agente quimioterapéutico aprobado por la FDA) con cisplatino se ha utilizado ampliamente para tratamientos de primera o segunda línea de pacientes con cáncer de pulmón avanzado o metastásico (Sandler et al., 2000). Además, los fármacos quimioterapéuticos comunes, tales como paclitaxel, docetaxel y gemcitabina, y vinorelbina se utilizan ampliamente en combinación con fármacos de platino (es decir, cis-platino), para mejorar el efecto terapéutico (Oan et al., 2002; Sandler et al., 2000; Wozniak et al., 1998). Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los fármacos usados en la quimioterapia se asocia con efectos secundarios como dolor, daño a los nervios, reacciones alérgicas de la piel, etc. Por esa razón, es importante implementar nuevas estrategias para el tratamiento de este tipo de cáncer, además del desarrollo de nuevos fármacos que provean una mayor eficacia y disminuyan los efectos adversos derivados de estos mismos.

La quimioprevención es una estrategia importante para hacer frente a esta enfermedad. El éster fenético del ácido cafeico (CAPE) Figura 1, es un compuesto fenólico derivado del propóleo al que se le ha detectado un efecto quimio protector por su poderosa capacidad antioxidante. A partir de esta sustancia se han sintetizado análogos que buscan igualar y mejorar las propiedades del compuesto natural, aumentando su producción y reduciendo su elevado costo. En estudios recientes el análogo LQM-717 (Figura 2), demostró tener un mayor efecto quimio protector que CAPE en la reducción de las lesiones preneoplásicas y de tumores, mostrando un poder terapéutico distinto al CAPE (Macías-Pérez et al., 2013).



**Figura 1.** Estructura química del CAPE (éster fenético del ácido cafeico).

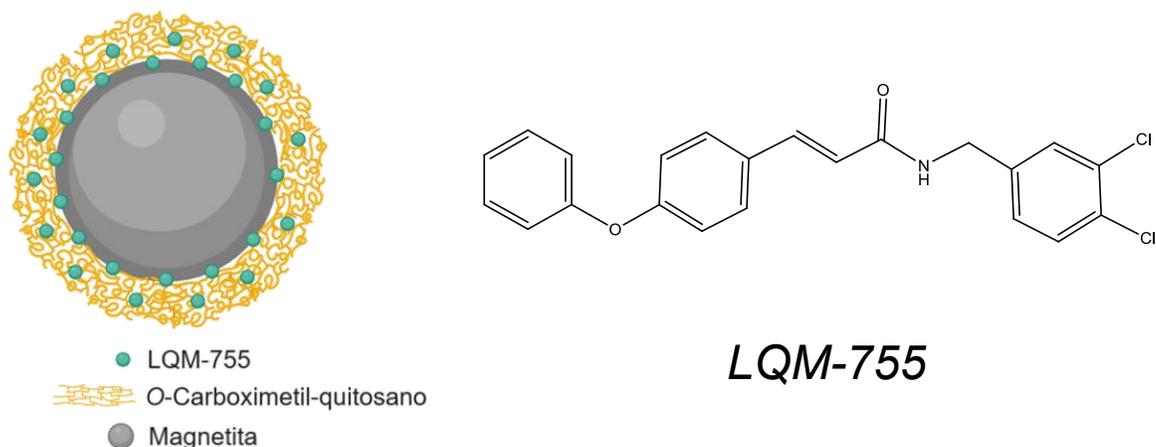


**Figura 2.** Estructura química del LQM-717.

Cabe destacar que en estudios *in vitro* realizados con CAPE y la línea de cáncer de pulmón A549, se demostró que este compuesto es capaz de inhibir la proliferación

celular de manera importante respecto a células normales, por lo que esto podría sugerir que el uso del análogo LQM-717 tendría un mayor efecto sobre este tipo de cáncer que CAPE (M.-F. Chen et al., 2004).

Tomando en cuenta los resultados reportados *in vitro* de CAPE sobre células de cáncer de pulmón y el reciente surgimiento de diversos tipos de nanomateriales con aplicaciones biológicas; el uso de nanomateriales de magnetita y OG como nanoacarreadores del compuesto LQM-717 podría ser una alternativa para incrementar el efecto terapéutico y disminuir efectos tóxicos empleando polímeros biocompatibles (Figura 3). Por lo que, es importante llevar a cabo estudios *in vivo* para demostrar el efecto del compuesto LQM-717 administrado solo y realizar estudios empleando nanoacarreadores.

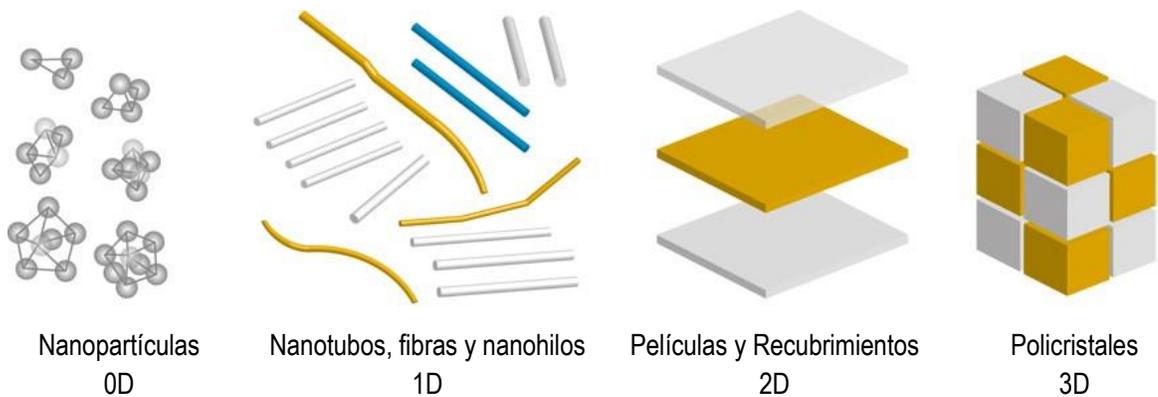


**Figura 3.** Sistema de nanoacarreadores propuesto.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Nanomateriales

La Nanotecnología junto con la Biotecnología y la información tecnológica, la cual tiene su fundamento en el estudio de los fenómenos ocurridos en la nanoescala y en los nanomateriales y constituyen un dominio científico que ha servido para el diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras y nanomateriales. Los materiales nanoestructurados se consideran como aquellos materiales cuyos constituyentes tienen un tamaño menor a 100 nm. Por lo que, existen cuatro categorías: 0D (fulerenos, nanopartículas o clústeres), 1D (nanofibras, nanohilos, nanotubos), 2D (grafeno y películas delgadas) y 3D (Fig.4), indicándose con esta nomenclatura cuántas de las dimensiones de la nanoestructura superan el rango de la nanoescala, es decir: 100 nm.



**Figura 4.** Clasificación de materiales nanoestructurados de acuerdo con su aspecto dimensional modificado de L. Cornejo, et al 2015.

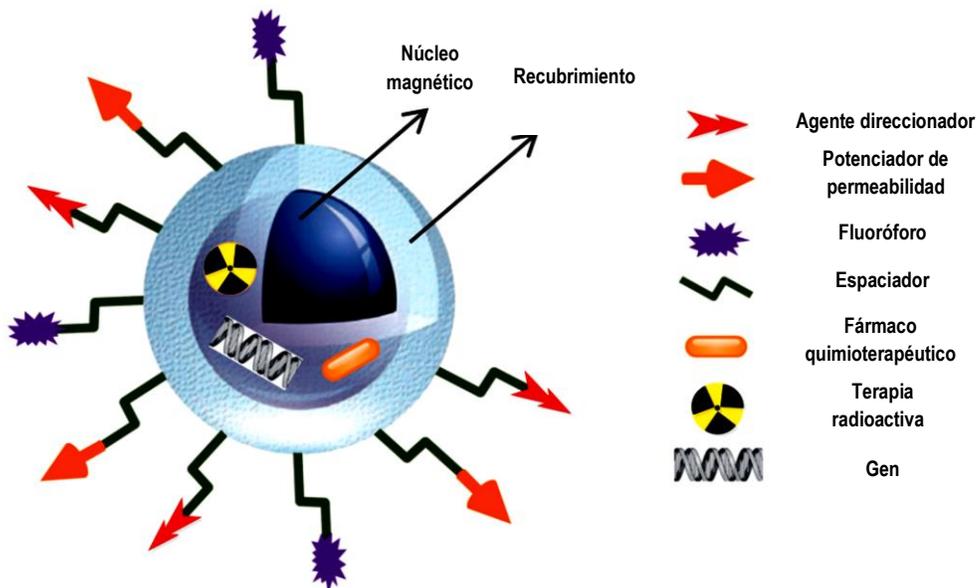
La importancia de estas nanoestructuras viene determinada por la cantidad de aplicaciones en campos tan diversos como la catálisis, la separación, el transporte de fluidos, el suministro controlado de medicamentos y almacenamiento de gases, desarrollo de materiales compuestos, eliminación de contaminantes y usos en ámbitos energético, entre otros.

## II.2 Nanopartículas

Las partículas suelen clasificarse con base a su tamaño o dimensión, por lo que pueden ser partículas finas cuando comprenden un diámetro entre 100 y 2500 nm, mientras que las partículas ultrafinas o “nanopartículas” son aquellas con un diámetro entre 1-100 nm

Las nanopartículas pueden ser preparadas de diferentes elementos químicos y estas pueden clasificarse con respecto a sus componentes como: orgánicas, inorgánicas, metálicas, semiconductores, iónicas y moleculares (Tabla 1) (Oropeza et al., 2012).

Las nanopartículas metálicas han sido de un mayor interés debido a sus propiedades, por ejemplo; extensa superficie de contacto, momento magnético y estas han recibido una importante atención, ya que se ha encontrado una extensa variedad de aplicaciones biomédicas, tales como su uso en resonancia magnética nuclear, bioensayos y clasificadores de células, terapias para el cáncer, tratamiento de agua, nanofiltración (Fig. 5) (Laurent et al., 2008; Oropeza et al., 2012; Schulte & Dutta, 2005; Wiesner & Bottero -Y, 2007).



**Figura 5.** Diferentes aplicaciones para nanopartículas modificado de S. Assa, et al 2016.

Diversos métodos físicos y químicos han sido utilizados para síntesis de nanopartículas. Técnicas físicas como, tecnologías en aerosol, litografía, ablación laser y campos ultrasónicos has sido usadas exitosamente para producir nanopartículas, sin embargo, son muy costosas ya que utilizan equipos poco accesibles y/o altas cantidades de energía (Laurent et al., 2008; Wiesner & Bottero -Y, 2007).

De acuerdo con la ASTM Standard E2456-06 (2006), las nanopartículas son partículas ultrafinas con diámetros en dos o tres dimensiones y mayores a 1 nm y más pequeñas de 100 nm (Schwarzer & Peukert, 2004).

**Tabla 1** Tipos y usos de nanopartículas (Sellers et al., 2008)

		<b>Composición</b>					
		<b>Carbono</b>		<b>Metales</b>		<b>Cerámica/Silica</b>	
<b>Estructura</b>		<b>(NP)</b>	<b>Uso</b>	<b>(NP)</b>	<b>Uso</b>	<b>(NP)</b>	<b>Uso</b>
<i>Partícula</i>		Carbono negro	Pigmento; refuerzo de productos de caucho	Dióxido de Titanio (TiO <sub>2</sub> )	Cosméticos; remediación ambiental	Nanopartículas de cerámica	Recubrimiento en papel fotográfico
		Partículas de cera de tamaño nanométrico	Cera de auto	Hierro de valencia cero; magnetita (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	Remediación ambiental		
				Plata	Agente antibacterial para cuidado de heridas, ropa deportiva, máquinas de lavado		
				Óxido de Zinc	Cosméticos		
				Oxido de Cerio	Aditivo en el diésel para disminuir emisiones		

Los materiales a nanoescala pueden estar formados por diferentes elementos de carbón, compuestos basados en carbón, metales u óxidos de metales, cerámicas, etc. Ellos pueden tomar muchas formas. Estas generalmente incluyen las siguientes estructuras:

- Partículas o cristales
- Tubos, alambres o varillas
- Dendrímeros
- Compositos
- Otros

Las nanopartículas libres como su nombre lo indica, están en solución o suspensión. Los productos comerciales que incluyen partículas libres incluyen (Sellers et al., 2008):

- El combustible diésel contiene partículas de óxido de cerio para reducir emisiones.
- Algunos protectores solares contienen dióxido de titanio y algunas cremas faciales contienen fulerenos.
- Algunos fármacos están en dendrímeros para dirigir la liberación.
- Productos alimenticios, por ejemplo, aceites vegetales contienen, nanogotas de componentes como vitaminas, minerales y fitoquímicos.

### II.2.1 Nanopartículas metálicas

Los nano clústeres de carbón de una clase especial incluyen el famoso “buckyball” ( $C_{60}$ ), relacionado con fulerenos y nanotubos de carbono. Los clústeres se caracterizan por ser homogéneos si estos contienen un solo tipo de átomo, o heterogéneos si ellos contienen más de un constituyente.

La obtención de nanopartículas metálicas estables en solución ha sido un área muy activa de investigación. Las más comúnmente sintetizadas y estudiadas son las de metales como: oro, plata, platino y paladio fundamentalmente.

Las nanopartículas de metales nobles y, más específicamente, las nanopartículas de oro (AuNPs), exhiben unas excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico. Destacan especialmente sus peculiares e inesperadas propiedades fototérmicas, por las que, al ser activadas en presencia de luz láser, desprenden calor, actuando como auténticos nano-calefactores.

La síntesis de nanopartículas metálicas cobró recientemente gran interés debido a la particularidad de sus propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y catalíticas. Muchas de estas propiedades y sus posibles aplicaciones son fuertemente influenciadas por el tamaño y la forma de estas: esferas, barras, discos, prismas, etc. Es por eso por lo que en los últimos años se desarrollaron distintas técnicas de preparación de nanopartículas tendientes a controlar las características morfológicas del producto obtenido; estas incluyen métodos físicos y químicos.

### II.2.2 Magnetita

En materiales a granel, el magnetismo ocurre en un limitado rango de la tabla periódica. El hierro, el cobalto y el níquel, exhiben ferromagnetismo por el nivel electrónico 3d sin llenar, mientras que sus vecinos cromo y manganeso muestran antiferromagnetismo de varios grados de complejidad. Las tierras raras, con el nivel electrónico 4f sin llenar, exhiben un orden magnético complejo. En el nivel atómico, por otra parte, la mayoría de los elementos muestran un momento magnético diferente de cero en estado base (Blackman, 2009).

El comportamiento atómico o bultico es más fuerte en los metales de transición 3d que en las tierras raras por que el orbital 3d está menos localizado que el orbital 4f (Blackman, 2009). El comportamiento atómico o bultico es más fuerte en los metales de transición 3d que en las tierras raras por que el orbital 3d está menos localizado que el orbital 4f (Blackman, 2009).

El método de síntesis de nanopartículas está definido por la aplicación que se da a la nanoestructura (Laurent et al., 2008). A continuación, se presenta una breve descripción de algunos métodos de síntesis más conocidos:

**Coprecipitación:** Este es uno de los métodos más simples y eficientes que se han reportado en la literatura. La precipitación se lleva a cabo una escala de pH entre 8 y 14. El tamaño y la forma de estas nanopartículas puede ser controlado mediante el ajuste del pH, fuerza iónica, temperatura, naturaleza de las sales, adición de aniones orgánicos quelantes o polímeros (Jolivet et al., 2004; Laurent et al., 2008; Schwarzer & Peukert, 2004). Se han reportado tamaños de partícula entre 5 y 100 nm empleando este método.

**Micelas inversas y Microemulsión:** Este método incluye surfactantes anfóteros para crear estructuras micelares invertidas infladas con agua en disolventes no polares. Las moléculas de surfactante pueden formar espontáneamente nanogotas de diferentes tamaños, micelas (1-10 nm) o emulsiones de agua en aceite (10-100 nm) (Deng et al., 2003; Pileni & Duxin, 2001). En estas nanogotas, las soluciones acuosas de sales de hierro están encapsuladas por un revestimiento de surfactante que proporciona un confinamiento que limita la nucleación de las partículas y el crecimiento. La principal ventaja de la micela inversa o tecnología de emulsión es la diversidad de nanopartículas que se pueden obtener variando la naturaleza y la cantidad de surfactante o las condiciones de reacción. Además, el tamaño de la partícula de magnetita puede ser controlado por la temperatura y la concentración de surfactante (Pileni & Duxin, 2001).

**Termólisis de precursores:** Utilizado en la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro. Consiste en la descomposición orgánica en fase de disolución del precursor de hierro a altas temperaturas (superior a 200 °C) (Laurent et al., 2008). Este método ha mejorado significativamente el control del tamaño medio, la distribución y la cristalinidad de las nanopartículas de hierro magnético. En este proceso, las condiciones de reacción, tales como disolvente, temperatura y tiempo, suelen tener efectos importantes sobre los productos. Se han probado muchos precursores de hierro, por ejemplo, se han preparado nanopartículas de magnetita monodispersa con un tamaño de 3 a 20 nm mediante reacción a alta temperatura (265 °C) de acetilacetonato de hierro, Fe<sub>3</sub>, en éter fenílico en presencia de alcohol, ácido oleico y oleilamina (Sun & Zeng, 2002).

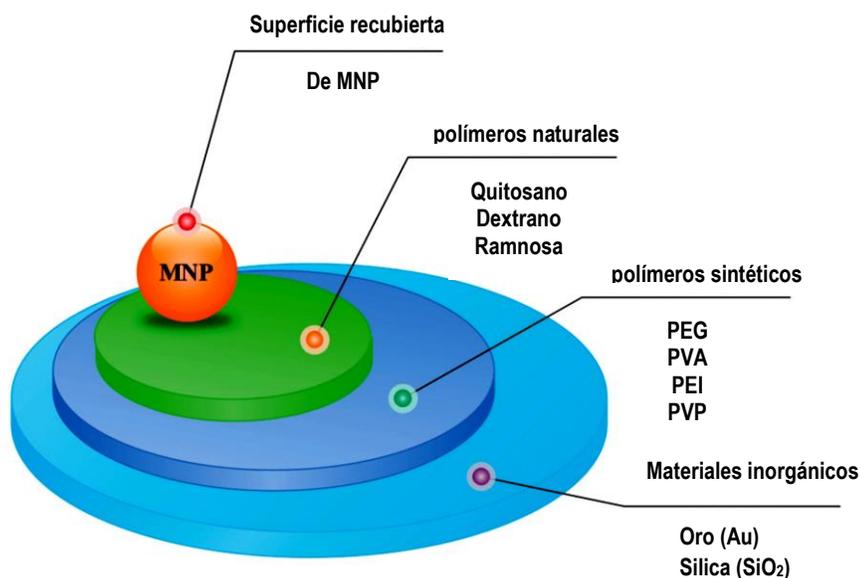
**Reacciones hidrotérmicas:** En la literatura se han descrito síntesis hidrotérmicas de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en la última década (Daou et al., 2006; Mizutani et al., 2008; Wang et al., 2004). Estas reacciones se realizan en medios acuosos en reactores o autoclaves donde la presión puede ser mayor a 2000 psi y la temperatura puede estar por encima de 200 °C. Existen dos vías principales para la formación de magnetita a través de condiciones hidrotérmicas: hidrólisis y oxidación o neutralización de hidróxidos metálicos mixtos. Estas dos reacciones son muy similares, excepto que sólo se usan sales ferrosas en el primer método. En este proceso, las condiciones de reacción, tales como disolvente, temperatura y tiempo, suelen tener efectos importantes sobre los productos. En el proceso hidrotérmico, el tamaño de partícula se controla principalmente a través de los procesos de velocidad de nucleación y crecimiento de grano.

**Nanocompuestos magnéticos:** Las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pueden recubrirse con material inorgánico como sílice, oro o plata (M. Chen et al., 2003; Du & Jing, 2011; Fu et al., 2011). Estos revestimientos no sólo mejoran la estabilidad de las nanopartículas en solución, sino que también proporcionan sitios para la unión covalente con ligandos específicos a la superficie de las nanopartículas. Estas nanopartículas tienen un núcleo interno de óxido de hierro con una capa exterior de materiales inorgánicos. Por ejemplo, el uso de sílice confiere gran estabilidad a la dispersión de nanopartículas frente al cambio de pH y la concentración de electrolitos (Mulvaney et al., 2000).

#### II.4 Funcionalización

La definición de funcionalización en el área de nanotecnología implica el recubrimiento con diferentes tipos de materiales y compuestos que pueden ser de una variable naturaleza química (Fig. 6) y cumplen muchas funciones principalmente evitar la aglomeración de las partículas, reducir efectos tóxicos, aumentar biodisponibilidad de algún compuesto químico que se le haya acoplado, incrementar la hidrosolubilidad, evitar la rápida degradación en un organismo vivo, etc. Algunos ejemplos de funcionalización se muestran a continuación:

- ❖ Los materiales de micro y nanocompuestos de sílice magnética proporcionan buenos soportes, ya que la formación de recubrimiento de sílice funcionalizado en la superficie de nanopartículas de magnetita puede prevenir su agregación en líquido y mejorar su estabilidad química, así como su biocompatibilidad. La superficie hidrófila de las nanopartículas de sílice también puede ayudar a la unión de enzimas en solución acuosa.
- ❖ Las matrices poliméricas pueden utilizarse como materiales de atrapamiento para perlas magnéticas, proporcionando también buenos estabilizadores y adsorbentes para enzimas, generando efectos estéricos y previniendo la opsonización en condiciones biológicas.
- ❖ Las nanopartículas magnéticas revestidas con estreptavidina pueden unirse selectivamente a proteínas marcadas con biotina.
- ❖ El quitosano es un polímero biocompatible y biodegradable, bioactivo y no tóxico. Las nanopartículas magnéticas estabilizadas por quitosano pueden ser buenos soportes de inmovilización, capaces de unir fármacos, proteínas, enzimas y otras entidades biológicas, haciéndolas adecuadas para aplicaciones biomédicas.
- ❖ La silanización de nanopartículas magnéticas con amino-silanos puede producir una superficie modificada que presenta grupos amino, que pueden usarse como adsorbente o como sitios de acoplamiento.



**Figura 6.** Tipos de funcionalización en las nanopartículas.

#### II.4 Quitosano

El quitosano (CS) es una familia de polisacáridos lineales que se compone de unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina unidas entre sí por enlaces glucosídicos  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4). El CS se obtiene por la desacetilación parcial del polisacárido natural, la quitina, que es esencialmente poli(N-acetilglucosamina). Dependiendo de la fuente natural y las condiciones utilizadas para aislar y desacetilar la quitina, el grado de acetilación (GA) resultante y el peso molecular del quitosano dependerán de los parámetros de reacción involucrados. El peso molecular, la DA e incluso el patrón de acetilación (la distribución de unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina a lo largo de la cadena de quitosano) afectarán sus propiedades químicas y biológicas. El grado de desacetilación ( $GD = 100 - GA$ ) del quitosano es de alrededor del 50 % o superior. En soluciones ácidas acuosas diluidas, los grupos amino del quitosano se protonan, lo que permite su disolución. De hecho, la solubilidad del quitosano en ácido acético al 1% o 0,1 M es un criterio sencillo y práctico para diferenciarlo de la quitina. Sin embargo, la solubilidad del quitosano depende de su GD, la concentración iónica, el pH y la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena, así como de las condiciones de aislamiento y secado. Si la desacetilación de la quitina se realiza en condiciones homogéneas, los quitosanos con una GD de alrededor del 50 % podrían disolverse, pero si la desacetilación se lleva a cabo en condiciones heterogéneas, normalmente se necesita una GD del 65 % o superior para lograr la disolución. (Quiñones et al., 2018)

El quitosano es un material biocompatible, biodegradable y no tóxico. Exhibe otras propiedades biológicas significativas, como la capacidad de cicatrización de heridas, actividades antimicrobianas y hemostáticas. Es un excelente formador de película y se puede procesar en fibras, geles, microsferas, microcápsulas y micro/nanopartículas. Además, debido a que tiene grupos  $-OH$  y  $-NH_2$  libres en su estructura, es susceptible de modificaciones químicas que pueden potenciar algunas de sus propiedades para ciertas aplicaciones. Todas estas notables propiedades físicas, químicas y biológicas han hecho del CS un excelente candidato para aplicaciones en cosmética, industria

alimentaria, medicina y farmacia. La preferencia del quitosano en comparación con otros polímeros catiónicos, como la polilisina, la poliarginina o la polietilenimina para muchas de estas aplicaciones se basa en su toxicidad comparativamente más baja. Las propiedades mucoadhesivas y de mejor absorción también se encuentran en el CS. Estas propiedades también hacen del CS un candidato ideal para la entrega de fármacos y moléculas bioactivas en general. Las aplicaciones incluyen al CS como excipiente en tabletas, hidrogeles de quitosano, películas, fibras, micro/nanocápsulas y micro/nanopartículas. Las nanopartículas de CS se usan para la administración de fármacos, no solo por las vías de administración tradicionales (p. ej., vía oral y parenteral), sino también por vía mucosa (nasal, pulmonar, vaginal) y ocular. Las nanopartículas de quitosano también se utilizan en el diseño de vectores no virales para la administración de genes y vacunas. Se han utilizado diferentes enfoques para producir nanopartículas de CS. Estos incluyen gelificación ionotrópica, secado por aspersión, reticulación de emulsión de agua en aceite, formación de micelas inversas, coalescencia de gotas de emulsión, nanoprecipitación, y por un mecanismo de autoensamblaje. El autoensamblaje ha sido descrito como la asociación de ciertas moléculas, macromoléculas o materiales compuestos entre sí para formar redes tridimensionales u otras estructuras con nuevas propiedades distintivas. El proceso de autoensamblaje puede tener lugar a nivel molecular o supramolecular. Puede ocurrir por autoasociación o por asociación con otras estructuras a través de interacciones tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones iónicas o hidrofóbicas. También puede ser causado por un mecanismo de inclusión como el complejo de inclusión de yodo con almidón. Las nanopartículas (NP) autoensambladas (también conocidas como autoagregadas) de CS son particularmente útiles para encapsular fármacos hidrofílicos y lipofílicos. El autoensamblaje puede ser provocado por la introducción de fracciones hidrofóbicas en las moléculas de CS por injerto, para modificar su equilibrio hidrofóbico-hidrofílico. Con frecuencia, se utiliza un derivado de CS soluble en agua, como quitosano de glicol o quitosano de succinilo, en lugar de CS. Otra forma adecuada de generar nanopartículas de quitosano autoensambladas es

mediante la formación de complejos de polielectrolitos con polianiones. (Quiñones et al., 2018)

#### II.4.1 O-Carboximetil quitosano

Entre los derivados de quitosano solubles en agua, OCMQ es un derivado de éter anfiprótico, contiene grupos  $-\text{COOH}$  y grupos  $-\text{NH}_2$  en su estructura. El OCMQ tiene muchas propiedades sobresalientes que incluyen no toxicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, actividad antibacteriana y antifúngica. Por estas ventajas, el OCMQ ha adquirido una mayor importancia para su uso en aplicaciones biomédicas. El OCMQ se puede preparar haciendo reaccionar polvo de quitosano con ácido monocloroacético en alcohol isopropílico como disolvente mediante la reacción de condensación. Antes de la reacción, el quitosano se trata con una solución de hidróxido de sodio al 50 % a 18 °C durante 12 h. La solubilidad en agua del OCMQ puede depender de las condiciones experimentales y el grado de carboximetilación. El OCMQ, preparado a temperaturas de 0 a 10 °C, es soluble en agua. Pero el OCMQ preparado entre 20° y 60 °C es insoluble en agua a un pH casi neutro. La insolubilidad en agua del OCMQ a varios pH varía con el grado de carboximetilación. El aumento de la temperatura de reacción aumenta la fracción de carboximetilación y aumenta la insolubilidad a pH más bajos; el aumento de la relación agua/isopropanol en el solvente de reacción disminuye la fracción de carboximetilación y aumenta la insolubilidad a pH más altos (Jayakumar et al., 2010).

#### II.4.2 Métodos de síntesis

El medio de reacción utilizado para la preparación de OCMC es fuertemente alcalino. El OCMC se prepara suspendiendo quitosano, hidróxido de sodio e isopropanol como disolvente en el matraz y agitando la suspensión alcalina a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se añade gota a gota a la mezcla de reacción ácido monocloroacético disuelto en isopropanol. La mezcla de reacción completa se hace reaccionar durante 4 horas a 55 °C. Finalmente, el sólido se filtra y se lava con alcohol etílico y se seca al vacío. Las condiciones de preparación y el grado de

carboximetilación determinan la solubilidad en agua del OCMC (Upadhyaya et al., 2014).

## II.5 Cáncer

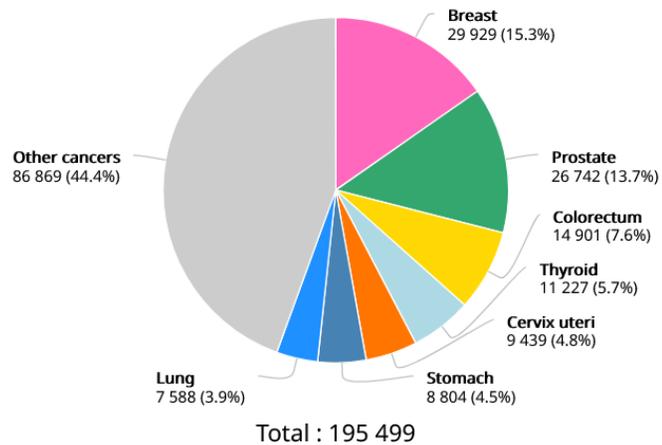
El cáncer es una patología con efectos devastadores sobre los seres humanos y los animales domésticos, se caracteriza por una proliferación incontrolada de células anormales, las cuales tienen la capacidad de invadir otros tejidos, teniendo un origen monoclonal. El cáncer es un proceso multietapas en el cual se presenta la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, confiriendo la transformación progresiva de células normales a células malignas. La célula tumoral se caracteriza por su resistencia a la muerte celular, evasión de los supresores de crecimiento, autosuficiencia de señales de crecimiento, capacidad de invasión y metástasis e inducción de la angiogénesis. Las células malignas se encuentran energéticamente desreguladas, y son capaces de evadir de la respuesta inmune, promover la inflamación, así como la inestabilidad genómica y la mutación con una capacidad proliferativa ilimitada. Las alteraciones en estos procesos fisiológicos son responsables tanto de los cambios iniciales para la transformación neoplásica celular y así como de los cambios subsecuente en la progresión tumoral, que resultan en el desarrollo de la carcinogénesis.

### II.5.1 Cáncer de pulmón

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los casos de cáncer más diagnosticados en 2012 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) fueron: pulmón, mama, colorrectal y estomacal representando más del 40% de todos los tipos diagnosticados en todo el mundo; así mismo la OMS informó de un estimado de 14,1 millones de nuevos casos a nivel mundial ese mismo año (Jemal et al., 2011). Entre los tipos de cáncer más comunes, el de pulmón representa el 16,7% de todos los nuevos casos diagnosticados en hombres. Generalmente el cáncer de pulmón se puede

clasificar en dos tipos: de células pequeñas que representa en 13% de casos y el de células no pequeñas, el cual, es el más frecuente con el 87% de casos. Es importante también destacar que el cáncer de pulmón tiene la tasa de mortalidad más alta y una tasa de supervivencia menor a 5 años (Jemal et al., 2011). De los 8,2 millones de muertes causadas por cáncer en 2011 a nivel mundial, la mortalidad por cáncer de pulmón contribuyó con 1,3 millones de muertes, lo que represento el índice más alto en ese año (Goenka et al., 2014). Históricamente, el cáncer de pulmón se ha relacionado con el tabaquismo y, en consecuencia, se clasifica como una enfermedad social (Thompson, 2004). Contrariamente a la creencia popular, el cáncer de pulmón no sólo afecta a los fumadores, sino también a los no fumadores. Por otra parte, sólo el 15% de los pacientes con cáncer de pulmón sobreviven más de 5 años después del diagnóstico (Rodríguez & Lilenbaum, 2010). Claramente hay una falta de diagnósticos y regímenes de tratamiento eficaces. La cirugía, la quimioterapia y la radiación son opciones de tratamiento convencionales para este tipo de cáncer, dependiendo de la etapa en que se encuentre (Chang, 2011). La quimioterapia es un tratamiento de primera línea para el estadio avanzado del cáncer de pulmón en el que los fármacos quimioterapéuticos se administran por vía intravenosa (Arriagada et al., 2004; Paumier & le Péchoux, 2010). El uso de fármacos quimioterapéuticos se basa en el principio de compuestos tóxicos para inhibir la proliferación de células cancerosas. Por ejemplo, la combinación de gemcitabina (agente quimioterapéutico aprobado por la FDA) con cisplatino se ha utilizado ampliamente para tratamientos de primera o segunda línea de pacientes con cáncer de pulmón avanzado o metastásico (Sandler et al., 2000). Además, los fármacos quimioterapéuticos comunes, tales como paclitaxel, docetaxel y gemcitabina, y vinorelbina se utilizan ampliamente en combinación con fármacos de platino (es decir, cis-platino), para mejorar el efecto terapéutico (Oan et al., 2002; Sandler et al., 2000; Wozniak et al., 1998). Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los fármacos usados en la quimioterapia se asocia con efectos secundarios como dolor, daño a los nervios, reacciones alérgicas de la piel, etc.

Estimated number of new cases in 2020, Mexico, both sexes, all ages



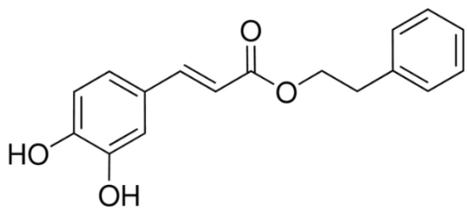
Data source: GLOBOCAN 2020  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)  
© International Agency for Research on Cancer 2022

**Figura 7.** Número de nuevos casos para cada tipo de cáncer en México.

## II.6 CAPE

El éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE) es un compuesto bioactivo natural del extracto de propóleo. También se denomina cafeato de feniletilo o cafeato de fenetilo. Su fórmula molecular es  $C_{17}H_{16}O_4$ . Es un polvo de color blanco como producto comercial con una temperatura de almacenamiento de  $-20^{\circ}C$  y soluble en etanol, DMSO y acetato de etilo (50 mg/ml). La estructura química de CAPE se muestra en la Figura 8. Este éster polifenólico también se puede sintetizar haciendo reaccionar ácido cafeico con alcoholes fenetílicos (Ozturk et al., 2012). CAPE es un polifenol con grupos hidroxilo dentro del anillo de catecol que es responsable de su papel crucial para su actividad biológicas. Los estudios disponibles lo describen como un compuesto eficaz contra diversas patologías como infecciones, estrés oxidativo, inflamación, cáncer, diabetes, neurodegeneración, quimiopreención y reversión de tumores (Murtaza et al., 2014). El CAPE tiene actividad anticarcinogénica y quimioprotectora en la iniciación y promoción del modelo modificado del hepatocito resistente

(MMHR). El término de quimioprevención se acuñó para describir una nueva disciplina en oncología, que consiste en el uso de compuestos sintéticos o naturales para inhibir, retardar o revertir la carcinogénesis. La quimioprevención se basa en la hipótesis de que la interrupción de los eventos biológicos involucrados en la carcinogénesis inhibirá este proceso y reducirá la incidencia de cáncer. Los quimioprotectores se han detectado frecuentemente cuando se estudia el efecto de sustancias purificadas de extractos de productos naturales a los cuales la medicina alternativa ha atribuido propiedades terapéuticas. Este es el caso del propóleo y de sus componentes, por ejemplo, CAPE. Estudios sugieren que el mecanismo de acción del CAPE, consiste en modificar la bioactivación del DEN impidiendo su daño e impidiendo así el desarrollo del proceso de hepatocarcinogénesis (Macías-Pérez et al., 2013). Con base a los estudios anteriores se ha propuesto que el mecanismo de quimio protección observado en CAPE, consiste en modular los citocromos encargados del metabolismo y bioactivación de DEN, disminuyendo el estrés oxidativo, la necrosis y las especies químicas reactivas, previniendo de esta forma los eventos que conducen a la formación de células iniciadas.



**Figura 8.** Estructura química de CAPE.

Por otra parte, se conoce que CAPE es un inhibidor específico de NF- $\kappa$ B. Se ha demostrado que suprime significativamente la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico durante la inflamación en concentraciones de  $\mu$ M. A una concentración de 10  $\mu$ M, bloquea por completo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). (Galip Yildiz et al., 2008). Los hallazgos explican que CAPE es un polifenol terapéuticamente activo versátil y un adyuvante eficaz de la quimioterapia

para mejorar la eficacia terapéutica y disminuir la toxicidad. Un impedimento para el uso generalizado de CAPE es que su extracción a partir de productos naturales, como el propóleo, es compleja, con rendimientos entre 2 y 5%. Asimismo, por síntesis química, la reacción de síntesis junto con los métodos de purificación requiere un largo procedimiento con rendimientos entre el 35 y el 50%, lo que se traduce en un alto costo de producción. Los análogos de CAPE están ampliamente distribuidos en el reino vegetal en café, aceitunas, propóleos y frutas. Estos compuestos se presentan como derivados simples del ácido cinámico, que incluyen amidas, ésteres de azúcar y glucósidos, o en formas más complejas, como ácido rosmarínico (dímero de ácido cafeico), ácido litospérmico (trímero de ácido cafeico), verbascósido (éster heterosídico y glucósido de dihidroxifeniletanol y ácido cafeico), y derivados ligados a flavonoides. Se sabe que estos compuestos tienen actividad antibacteriana, antiinflamatoria, inmunoestimuladora, antiaterosclerótica, neuroprotectora, antiproliferativa, antiviral y antioxidante (Macías-Pérez et al., 2013)

#### II.6.1 CAPE en cáncer de pulmón

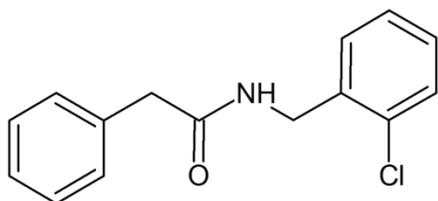
Se ha informado que muchos agentes quimiopreventivos interfieren con la señal intracelular relacionada con la carcinogénesis, la proliferación de células cancerosas, la apoptosis y la migración celular. Los efectos de los agentes quimiopreventivos representativos sobre el fenotipo invasivo inducido por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) usando células de adenocarcinoma de pulmón A549 como sistema modelo se investigaron usando CAPE como agente terapéutico. CAPE suprimió eficazmente la motilidad celular potenciada por TGF- $\beta$  y la activación de Akt (proteína quinasa  $\beta$ ) inducida por TGF- $\beta$ , así como un inhibidor específico de la vía de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) /Akt, LY29400216. Por este hallazgo, los autores sugieren que CAPE se puede aplicar no solo como agente quimiopreventivo sino también como agente terapéutico antimetastásico. Se encontró que la dosis terapéutica útil de CAPE para la línea celular de cáncer de pulmón A549 era de 6  $\mu\text{g/ml}$  y la dosis de tolerancia de los fibroblastos de pulmón normales para CAPE parecía ser mayor que la dosis terapéutica. Se afirma que CAPE inhibe el crecimiento de células tumorales

utilizando vías de estrés oxidativo conectadas a vías independientes de p53 y se observa que inhibe los procesos oxidativos al disminuir la generación de peróxido de hidrógeno intracelular ( $H_2O_2$ ) en células A549. La disminución en la producción de  $H_2O_2$  y el nivel de GSH de las células A549 se observó de manera muy rápida y profunda. Además, el agotamiento de las reservas intracelulares de GSH (glutación reducido) por CAPE puede hacer que las células sean más susceptibles a la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (Ozturk et al., 2012).

### II.6.2 Análogos de CAPE

Se han desarrollado moléculas con estructura análoga al CAPE, debido a que es difícil obtener de manera natural, así como por la vía sintética por que se obtiene en un bajo rendimiento. Sin embargo, se busca que estas estructuras nuevas conserven las propiedades biológicas adecuadas similares a las obtenidas por CAPE.

Un análogo es un fármaco cuya estructura se relaciona a la de otro fármaco, pero sus propiedades químicas y biológicas pueden ser diferentes. El término “análogo” se refiere a compuestos químicos con una relación estructural cercana al compuesto padre. Se incluyen compuestos que tienen un parecido estructural, pero uno o más átomos en su estructura han sido remplazados por otros.



**Figura 9.** Estructura química de LQM-717.

El término “derivados” se refiere a compuestos químicos que, al menos teóricamente, pueden ser obtenidos a partir de otro compuesto al que está estructuralmente relacionado. Un derivado químico debe mantener las características esenciales del compuesto padre incluyendo su estructura química básica; debe tener los grupos funcionales del compuesto padre sin modificar; mantener el número y posición de los

dobles enlaces; mantener los sustituyentes y ser sustituido en los átomos de hidrógeno principalmente.

La obtención del CAPE conlleva un proceso de extracción difícil de bajo rendimiento, proceso de purificación prolongado y su costo es elevado, por las propiedades terapéuticas que posee ha propiciado la síntesis de análogos que tengan la misma capacidad terapéutica de fácil obtención y con costos de producción económicos. Uno de los análogos sintetizados es el denominado LQM-717, Figura 9, el cual en estudios recientes ha demostrado tener un mayor efecto quimioprotector que CAPE en la reducción de las lesiones preneoplásicas y de tumores en el MMHR, mostrando un poder terapéutico distinto al CAPE. Se ha estudiado el efecto de estas sustancias quimioprotectoras por separado, por lo tanto, estudios sobre sinergias terapéuticas representa un campo de investigación prometedor.

### III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial a pesar de la gran cantidad de fármacos que se han desarrollado en las últimas décadas y los diferentes efectos adversos que estos generan, por lo cual, el empleo de nuevas estrategias que permitan incrementar la eficacia, disminuir los efectos adversos y aumentar la expectativa de vida de los pacientes es uno de los retos que han ido tomando mayor importancia. Con respecto a esto último, algunos análogos de CAPE han demostrado tener un importante efecto quimioprotector y antiproliferativo en cáncer de hígado y colón, por lo que el uso de NP`s como nanoacarreadores podría ayudar a incrementar la eficacia de estos compuestos y, por lo tanto, disminuir los efectos tóxicos al requerir una menor concentración del compuesto para el efecto terapéutico.

### IV. HIPÓTESIS

El uso de nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) como núcleo, permitirá obtener un menor tamaño de partícula en la formación de nanopartículas poliméricas de quitosano, además de incrementar el efecto antiproliferativo del compuesto LQM-755, ayudando a su vez a disminuir el crecimiento de tumores cancerígenos, y se reducirán los posibles efectos tóxicos disminuyendo la concentración requerida del compuesto.

## V. OBJETIVOS

### V.1 Objetivo General

Sintetizar nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) para su encapsulación con el agente anticancerígeno LQM-755 empleando los polímeros o-carboximetilquitosano y quitosano para su evaluación en cáncer de pulmón.

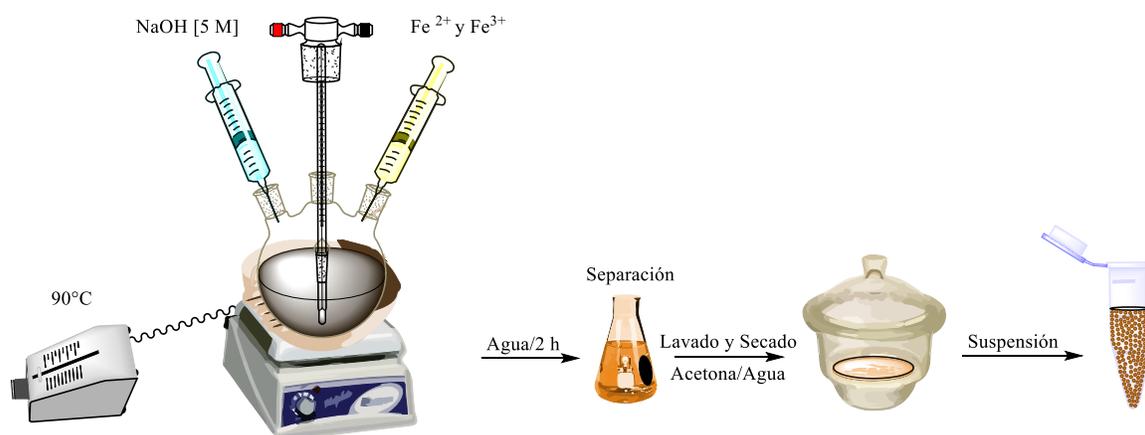
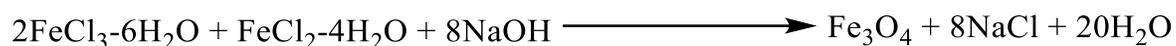
### V.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto anticancerígeno de los análogos de CAPE LQM-755 y LQM-717.
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) por el método de coprecipitación.
- Funcionalizar las nanopartículas con o-carboximetilquitosano y llevar a cabo su caracterización.
- Encapsular las nanopartículas de magnetita y el análogo LQM-755 empleando los polímeros quitosano y o-carboximetilquitosano.
- Realizar estudios de eficiencia de encapsulamiento y liberación de fármaco.
- Determinar el efecto antitumoral de LQM-755 en un modelo in vivo de xenoinjerto en ratones NSG.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### VI.1 Síntesis de las nanopartículas magnéticas

La síntesis de las partículas magnéticas se realizará mediante el método de coprecipitación (Jadhav et al., 2013). En un matraz de bola de 50 mL previsto de un agitador magnético se agregaron 20 mL de agua desionizada y posteriormente se elevó la temperatura a 90 ° C y se puso en agitación vigorosa. Una vez alcanzada la temperatura se agregó por goteo una solución acuosa de sales de Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> en una relación 1:2, y al mismo tiempo se agregó también por goteo una solución de NaOH a una concentración de 5 M. Esta reacción se llevó a cabo bajo atmosfera de nitrógeno y la reacción se detuvo después de 2 horas (Figura 10).



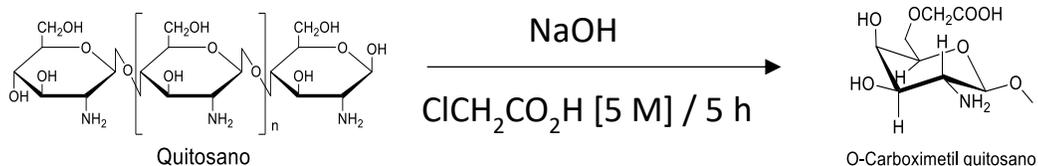
**Figura 10.** Reacción de coprecipitación para sintetizar magnetita.

Una vez terminado el tiempo de reacción las nanopartículas de magnetita fueron separadas por medio de un imán de neodimio y purificadas mediante lavados de acetona y agua desionizada. Posteriormente se llevará a cabo el ajuste de pH a 7 para dejar las nanopartículas neutras, empleando ácido clorhídrico (HCl) concentrado añadido por goteo con ayuda de una micropipeta de 100 uL. Después de purificar y neutralizar las nanopartículas, una fracción se dejó en suspensión de agua desionizada para llevar a cabo su caracterización por microscopía TEM y SEM. La otra fracción se

puso a secar en un horno a 50 ° C para caracterizar por técnicas de espectroscopia (FT-IR, XRD, UV-vis).

## VI.2 Síntesis y caracterización de o-carboximetil quitosano

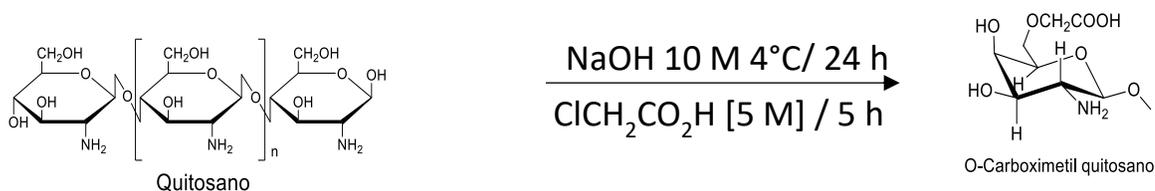
Para llevar a cabo la funcionalización de las nanopartículas de magnetita, se procederá a realizar la síntesis de un derivado del polímero de quitosano de bajo peso molecular mediante una metodología reportada (Muzzarelli, 1988) y se caracterizará por espectroscopia de infrarrojo. Las condiciones de reacción serán como se encuentra reportado. En un matraz de bola de 100 mL previsto de un agitador magnético, se colocará 20 mL de una solución de hidróxido de sodio a una concentración molar de 10 M para alcalinizar el polímero. Posteriormente se agregará poco a poco y mediante agitación vigorosa 500 mg de quitosano. La solución se deja a temperatura ambiente durante 7 horas y sin atmosfera de nitrógeno. Pasado el tiempo de reacción se procederá a elevar la temperatura a 50 ° C mediante el uso de un reóstato y una mantilla de calentamiento. Una vez alcanzada la temperatura de reacción se agregará por goteo durante 20 minutos 2 ml de ácido monocloroacético a una concentración de 5 M y se dejará en agitación vigorosa durante 5 horas. Pasado el tiempo de reacción se procederá a parar la reacción apagando el reóstato y quitando la mantilla de calentamiento y agregando etanol grado reactivo a una concentración de 70% v/v. Después de alcanzar la temperatura ambiente la reacción será filtrada utilizando papel filtro y previamente se ajustará el pH a 7 empleando hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El sólido obtenido nuevamente se vuelve a lavar con etanol al 70% y se filtrara nuevamente con papel filtro y se dejara secando. Después de repetir este procedimiento 3 veces, el sólido obtenido se dejará secando en un horno a 50 ° C para llevar a cabo su caracterización (Figura 11).



**Figura 11.** Reacción para obtener O-carboximetil quitosano

### VI.3 Síntesis y caracterización de o-carboximetil quitosano a baja temperatura

Para mejorar la solubilidad de las nanopartículas, se modificará las condiciones de reacción del polímero o-carboximetilquitosano empleando una metodología ya descrita (X. G. Chen & Park, 2003; Jayakumar et al., 2010; Zheng et al., 2011). En un matraz de bola de 100 mL previsto de un agitador magnético, se colocará 20 mL de una solución de hidróxido de sodio a una concentración molar de 10 M para alcalinizar el polímero. Posteriormente se agregará poco a poco y mediante agitación vigorosa 500 mg de quitosano. La solución se deja a temperatura de 4 ° C en un cuarto frío durante 24 horas. Pasado el tiempo de reacción se procederá a elevar la temperatura a 50 ° C mediante el uso de un reóstato y una mantilla de calentamiento. Una vez alcanzada la temperatura de reacción se agregará por goteo durante 20 minutos 20 ml de ácido monocloroacético a una concentración de 5 M y se dejará en agitación vigorosa durante 5 horas. Pasado el tiempo de reacción se procederá a parar la reacción apagando el reóstato y quitando la mantilla de calentamiento y agregando etanol grado reactivo a una concentración de 70% v/v. Después de alcanzar la temperatura ambiente la reacción será filtrada utilizando papel filtro y previamente se ajustará el pH a 7 empleando hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El sólido obtenido nuevamente se vuelve a lavar con etanol al 70% y se filtrara nuevamente con papel filtro y se dejara secando. Después de repetir este procedimiento 3 veces, el sólido obtenido se dejará secando en un horno a 50 ° C para llevar a cabo su caracterización (Figura 12).



**Figura 12.** Síntesis de O-carboximetil quitosano a baja temperatura.

#### VI.4 Nanopartículas poliméricas de LQM-755/carboximetilquitosano.

Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas con el polímero de o-carboximetilquitosano, se utilizará la metodología ya descrita (Bai et al., 2017); y se encapsulará el compuesto LQM-755 por medio de una técnica de gelación iónica empleando el reactivo cloruro de calcio. En un matraz de bola de 50 mL previsto de 30 mL de agua bidestilada y un agitador magnético. Se agrega 100 mg del polímero o-carboximetilquitosano poco a poco en agitación vigorosa. Posteriormente se agrega el compuesto LQM-755 previamente disuelto en metanol y dispersado en un baño de ultrasonido durante 15 min. Una vez alcanzada la dispersión del compuesto en el matraz se agregará por goteo una solución de cloruro de calcio de manera lenta con ayuda de una micropipeta de 1000 uL y se dejará en agitación durante 1 hora. Pasado el tiempo de reacción se someterá a una centrifugación a 14000 rpm durante 20 min para separar el compuesto y polímero sin encapsular, con ayuda de tubos falcón de 50 mL donde será colocada la suspensión con las nanopartículas obtenidas. El precipitado formado se vuelve a resuspender en agua bidestilada y nuevamente se volverá a centrifugar para ayudar a purificar las nanopartículas. Terminada la purificación se dejará una parte en suspensión y otra parte se pondrá a secar para llevar a cabo su caracterización. Cabe mencionar que el sobrenadante resultante de las centrifugaciones para la purificación, así como las aguas madre de la reacción serán recolectadas y guardadas para determinar la concentración del compuesto LQM-755 presente en las nanopartículas mediante la técnica de espectroscopia de UV-vis (Figura 13).



**Figura 13.** Esquema propuesto para la síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano/o-carboximetil quitosano.

## VI.5 Nanopartículas poliméricas de LQM-755/ magnetita/carboximetil quitosano.

Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas con el polímero de o-carboximetil quitosano, se modificará la metodología ya descrita (Bai et al., 2017); y se encapsularan las nanopartículas de magnetita y el compuesto LQM-755 por medio de una técnica de gelación iónica empleando el reactivo cloruro de calcio. Previamente sintetizadas y purificadas las nanopartículas de magnetita por la técnica de coprecipitación empleando como sales cloruro ferroso tetra hidratado y cloruro férrico hexahidratado y como base fuerte hidróxido de sodio a una concentración de 5M, en la misma fase se encapsularon las nanopartículas de magnetita y el compuesto LQM-755 con el polímero de o-carboximetilquitosano y la purificación se realizó con agua bidestilada. En un matraz de bola de 50 mL previsto de 20 mL de agua bidestilada y un agitador magnético, se agregaron 5 mg de nanopartículas de magnetita durante una agitación vigorosa. Una vez dispersadas las nanopartículas, se procede a agregar 20 mg del polímero o-carboximetilquitosano. Posteriormente, se pondrán en baño de ultrasonido durante 15 min 20 mg del compuesto LQM-755 disuelto en metanol (Figura 14). Una vez homogenizados todos los componentes se agregará por goteo lentamente una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) y durante una agitación vigorosa y constante. Terminado el tiempo de reacción se procederá a separar las nanopartículas con ayuda de un magneto de neodimio. El precipitado formado será lavado con agua desionizada las veces que sea necesario y las aguas madre de la reacción, así como las empleadas para los lavados, serán guardadas para llevar a cabo la determinación de la concentración del compuesto LQM-755 mediante la técnica de espectroscopia de UV-vis.



**Figura 14.** Esquema propuesto para la *síntesis* de nanopartículas poliméricas de quitosano/o-carboximetil quitosano incorporando nanopartículas de magnetita.

## VI.6 Caracterización de los nanoacarreadores

La caracterización de las nanopartículas se realizará mediante:

### VI.6.1 Espectroscopia FT-IR

El espectro de infrarrojo de o-carboximetilquitosano se midió en un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier NICOLET 6700 FT-IR a temperatura ambiente. Se formó una pastilla a partir de 2 mg de muestra y 100 mg de KBr. Los espectros fueron obtenidos de 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### VI.6.2 Espectroscopia UV-Vis

Las nanopartículas de magnetita se dispersaron en una mezcla de agua/metanol con ayuda de un agitador ultrasónico. Los espectros se midieron a temperatura ambiente (25 °C) y para registrar el espectro de UV-vis se utilizó una cubeta de cuarzo. Los espectros UV-vis de las nanopartículas se registraron en un equipo Shimadzu UV-1800, de 200 a 800 nm. Como blanco se utilizó usó metanol grado reactivo.

### VI.6.3 Análisis XRD

Las nanopartículas de magnetita se secaron y se pulverizaron en un mortero para llevar a cabo el análisis XRD. El patrón de XRD se registró en un difractómetro Bruker D8 Advance eco y se aplicó un valor de discriminador inferior de 0,180 V en la configuración del detector Lynxeye. Las intensidades difractadas se registraron en ángulos de  $2\theta$  de 5° a 130°.

### VI.6.4 Microscopia de transmisión electrónica (TEM)

Se obtuvieron micrografías electrónicas de transmisión de alta resolución en un microscopio JEOL-ARM200F operando a un voltaje de 200 kV. Las muestras para observación por microscopía electrónica se prepararon en solución acuosa. Posteriormente, se depositaron 40  $\mu\text{L}$  de la solución sobre una película de Carbono soportada sobre una rejilla de cobre (Cu) y se dejó evaporar en un desecador. Todos los análisis de tamaño se realizaron con el software Gatan Microscopy Suite versión 2.01 (Gatan Inc. CA Estados Unidos).

#### VI.6.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

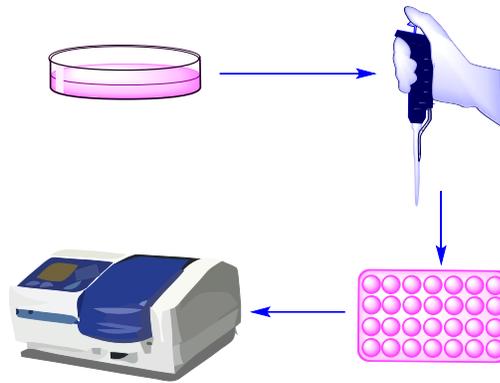
La muestra se midió en un microscopio SEM-FEG JEOL JSM-7401F equipado con un detector EDS-Thermo. Se registraron las micrografías y se registró su espectro EDS correspondiente centrándose en un grupo de partículas.

#### VI.6.6 Espectrometría RMN 1H

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón para caracterizar el polímero o-carboximetil quitosano se obtuvo en un espectrómetro Bruker ARX 500 utilizando DMSO-D6 como solvente a 25 °C. La muestra se disolvió en un tubo de 5 mm de diámetro a una concentración de 20 mg/ml. Las condiciones de medición fueron las siguientes: una ventana espectral de 500 MHz, 32k puntos de datos, un ángulo de pulso de 45°, un tiempo de adquisición de 2,83 s y 16 escaneos con un retraso de 1 s entre escaneo

#### VI.7 Ensayos de viabilidad celular (MTT) con compuestos análogos CAPE

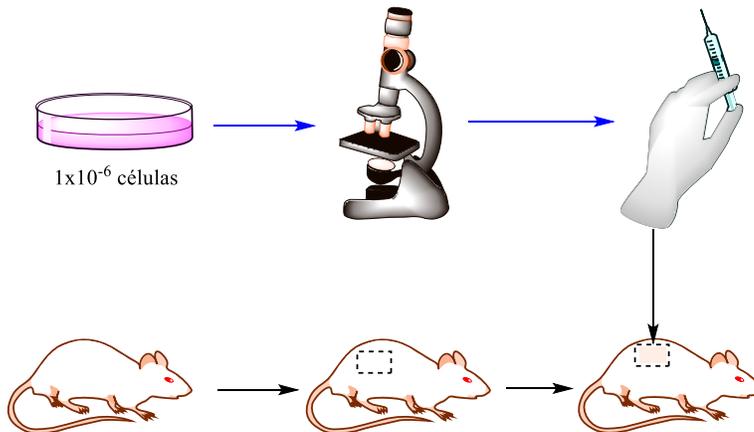
Para determinar el efecto anticancerígeno de los diferentes componentes de las nanopartículas, se realizaron ensayos de viabilidad celular por la técnica de MTT a las 24 horas (M.-F. Chen et al., 2004), empleando como vehículos DMSO, PBS/ácido acético. Los grupos para evaluar fueron los siguientes: LQM-755 a una concentración de 0.02 y 0.2 mmol, nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico a una concentración de 5 y 100 ug/mL, quitosano a una concentración de 5 y 100 ug/mL disuelto en PBS/ácido acético, carboximetil quitosano a una concentración de 5 y 100 ug/mL disuelto en PBS, y finalmente los tres componentes de la nanopartícula LQM-755 a 0.02 mmol, carboximetil quitosano a una concentración de 4 ug/mL y magnetita a una concentración de 2 ug/mL. Estos estudios se realizaron por triplicado (Figura 15).



**Figura 15.** Proceso para llevar a cabo ensayos de viabilidad celular.

### VI.8 Modelo de xenoinjerto

El modelo de xenoinjerto se realizó inoculando 2 millones de células cancerígenas de la línea A549 en ratones de la cepa NSG de aproximadamente 6 semanas en el flanco derecho. Como se propuso en el protocolo; se administraron los primeros grupos experimentales que consistieron en: LQM-755, vehículo, quitosano. Los ratones se administraron diez días después de la inoculación cada 48 horas en diferentes dosis. Los resultados obtenidos indican que el modelo se puede reproducir satisfactoriamente. Se obtuvo una disminución del tamaño de los tumores en los ratones administrados únicamente con LQM-755 a una dosis de 15 mg/Kg de peso.

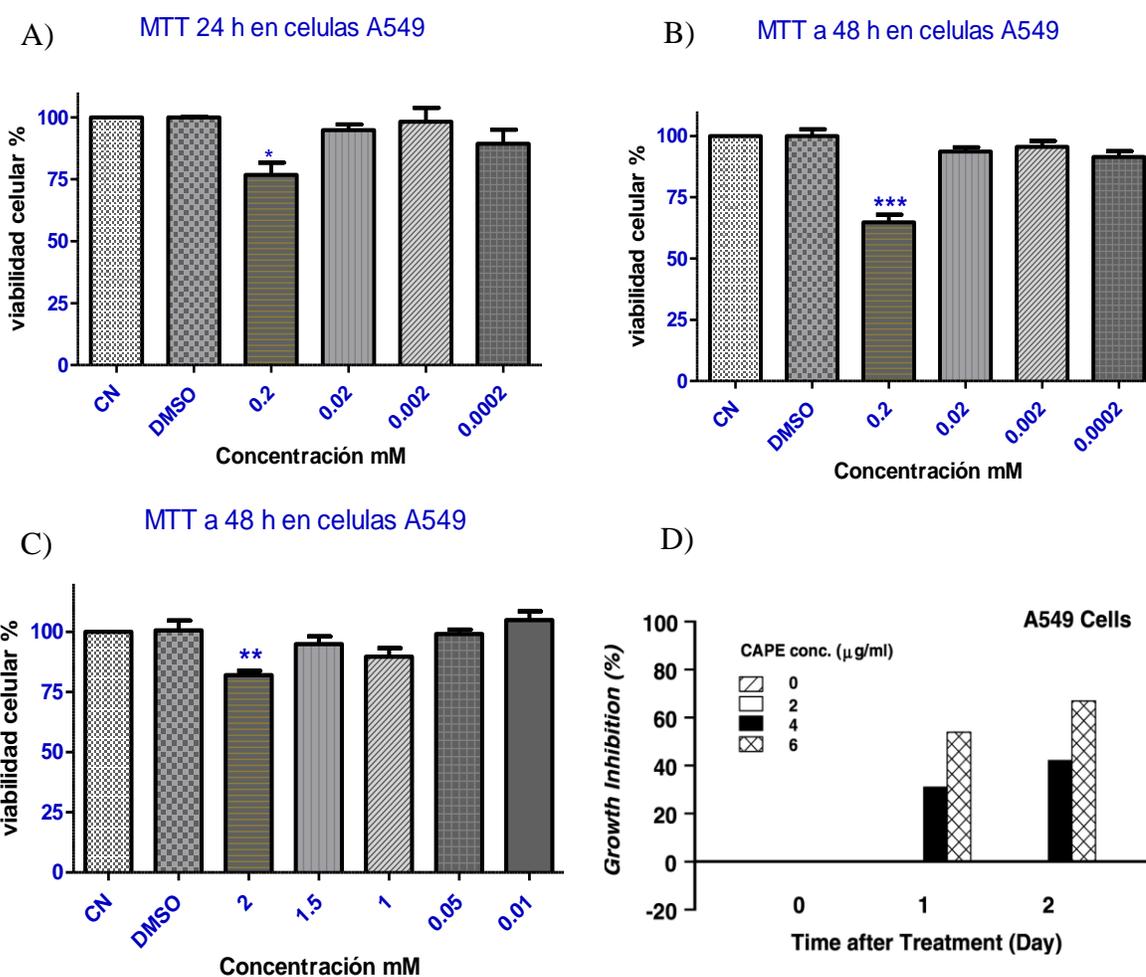


**Figura 16.** Esquema propuesto para el modelo de xenoinjerto con células cancerígenas de pulmón A549.

## VII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.1 Ensayos de viabilidad celular (MTT) con compuestos análogos CAPE

Para determinar el efecto anticancerígeno y la selección del análogo de CAPE que se cargara sobre las nanopartículas propuestas; se procedió a realizar ensayos de viabilidad celular por medio de la técnica de MTT sobre la línea de células de cáncer de pulmón A549. Los análogos que se evaluaron fueron los compuestos LQM-717 y LQM-755 a un tiempo de 24 y 48 horas Figura 17, de los cuales no se tenían antecedentes sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549. Sin embargo, el compuesto CAPE si tenía antecedentes sobre esta misma línea celular, por lo que se utilizaron los valores reportados para emplearlo como referencia.



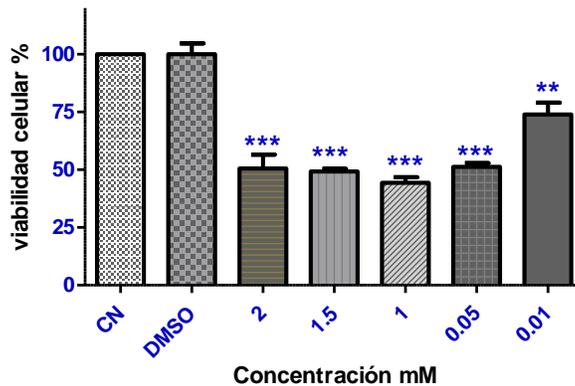
**Figura 17.** Resultados obtenidos por ensayo de MTT para el compuesto LQM-717 sobre la línea de cáncer de pulmón A549. A) Administrado y evaluado a las 24 horas. B) Estudio realizado a las 48 horas. C) Estudio realizado a las 48 horas a mayor concentración del compuesto. D) Grafica para comparar la concentración de 6 ug/mL equivalente a 0.02 mM para el compuesto CAPE a 24 y 48 horas reportado por (M.-F. Chen et al., 2004).

En la figura 17 se presentan los resultados obtenidos para el análogo LQM-717 el cual fue disuelto en DMSO y se sometió a sonicación durante 15 minutos para ayudar a disolverlo, ya que no es hidrosoluble completamente. En el panel A) no se encontró diferencia estadísticamente significativa a la misma concentración que se utilizó con el compuesto de CAPE sobre la misma línea celular de cáncer, únicamente a la concentración de 0.2 mM que representa 10 veces más que la concentración utilizada en el estudio reportado. El estudio fue repetido, pero ahora con un tiempo de incubación de 48 horas (panel B) con el análogo LQM-717, donde se encontró un efecto similar a las mismas concentraciones empleadas para el estudio a las 24 horas, ya que únicamente hubo diferencia estadísticamente significativa para la concentración de 0.2 mM y mayor porcentaje de inhibición respecto del estudio a menor tiempo de incubación. Para el caso del panel C) se realizó un ensayo a 48 horas de incubación y se emplearon valores de concentración más altos que los realizados con anterioridad y se encontró únicamente diferencia estadísticamente significativa a valores de 2 mM. En el panel D) se encuentra la gráfica correspondiente al estudio reportado con CAPE (M.-F. Chen et al., 2004), donde se aprecia el mejor resultado de inhibición del crecimiento celular a una concentración equivalente a 0.02 mM. El análogo LQM-717 no obtuvo buenos resultados y puede deberse al problema de solubilidad que tiene este compuesto, por lo que, a pesar de incrementar la concentración, no se aprecia una disminución considerable de la viabilidad celular.

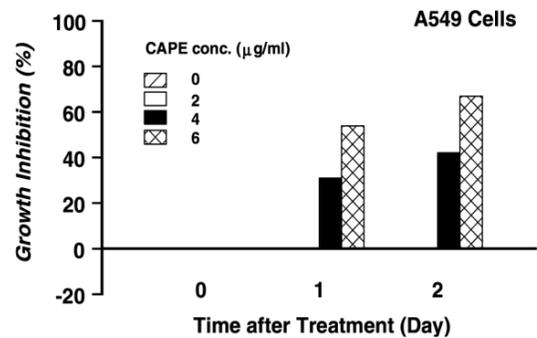
En la gráfica 18 se presentan los resultados para el ensayo de viabilidad celular para el análogo LQM-755 a diferentes concentraciones. Este compuesto de manera similar que el LQM-717 es parcialmente soluble en agua, por lo que se disolvió en DMSO y se colocó en sonicación durante 15 min antes de ser administrado. En el panel A) se aprecian los resultados a las 24 horas de haber sido administrado y encontró diferencia significativa para las diferentes concentraciones disminuyendo a un 50% la viabilidad

celular, obteniendo buenos resultados a partir de concentraciones superiores a 0.05 mM. El panel B) representa los resultados reportados en la bibliografía para CAPE en la misma línea celular (M.-F. Chen et al., 2004), donde se aprecia un efecto similar al generado por el análogo LQM-755. En el panel C) se presenta el resultado de un estudio de MTT a 24 horas empleando concentraciones de 0.05 mM y 1 mM, en el cual se encontró un mayor efecto de disminución hasta un 25% de la viabilidad celular para este compuesto a una concentración de 0.05 mM. En el panel D) se encuentran los resultados de un ensayo de viabilidad a las 48 horas de haber administrado el análogo LQM-755 con las mismas concentraciones empleadas para el ensayo a las 24 horas y se obtuvo un efecto de inhibición cercano al 50%. Por otra parte, se encontró diferencia respecto al efecto generado a menor concentración en el estudio a las 24 horas que con el estudio a las 48 horas, que puede explicarse por la solubilidad parcial del compuesto en el medio empleado para el crecimiento de las células.

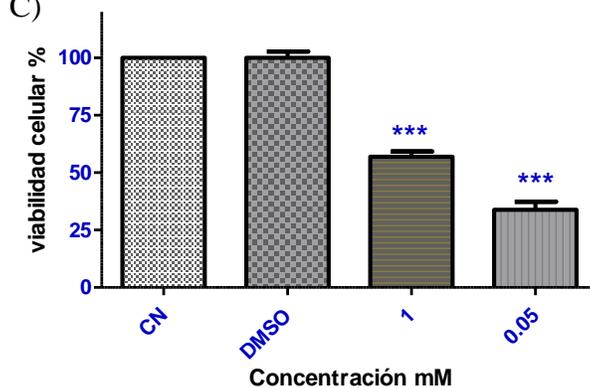
A) MTT a 24 h en células A549



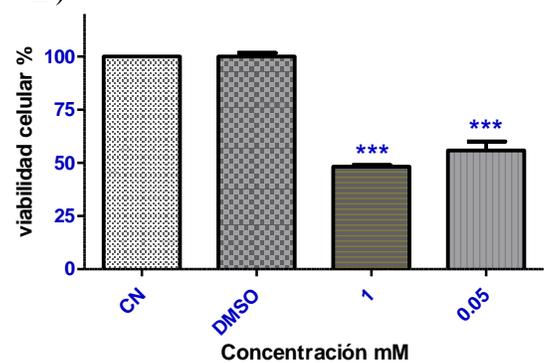
B)



C) MTT a 24 h en células A549



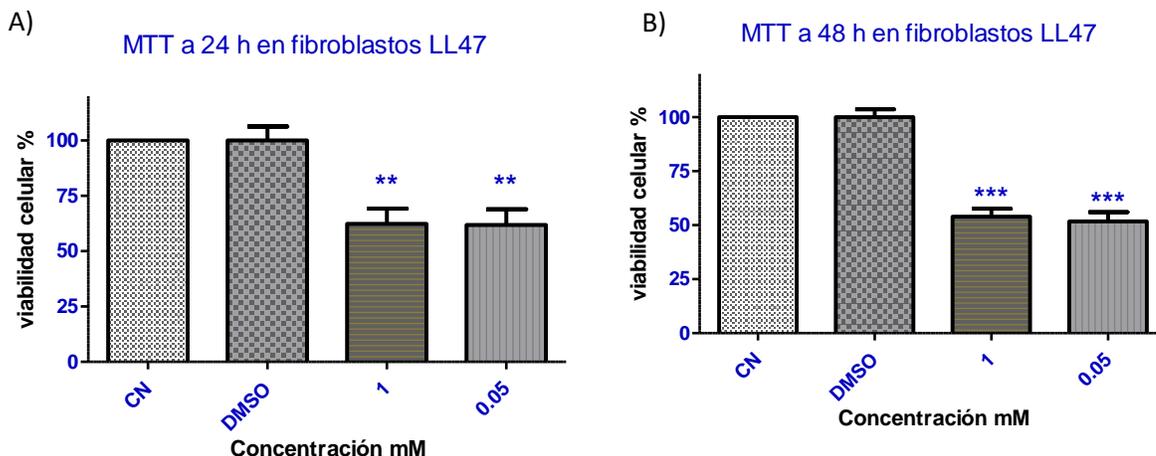
D) MTT a 48 h en células A549



**Figura 18.** Resultados obtenidos por ensayo de MTT para el compuesto LQM-755 sobre la línea de cáncer de pulmón A549. A) Administrado y evaluado a las 24 horas a diferentes concentraciones. B) Grafica para comparar la concentración de 6 ug/mL equivalente a 0.02 mM para el compuesto CAPE a 24 y 48 horas reportado por (M.-F. Chen et al., 2004). C) Estudio realizado a las 24 horas. D) Estudio realizado a las 48 horas a la misma concentración del compuesto que se utilizó para el ensayo de MTT a las 24 horas.

## VII.2 Ensayos de toxicidad por MTT con el análogo LQM-755

Para evaluar la posible toxicidad del compuesto LQM-755 se realizaron estudios de viabilidad celular por la técnica de MTT sobre la línea de fibroblastos normales LL47 a las 24 y 48 horas (Figura 19) de administración a las mismas concentraciones a las cuales tuvo el mejor efecto sobre la línea de cáncer de pulmón A549. La grafica muestra un efecto similar tanto a las 24 como a las 48 horas. Por lo que estos compuestos a las concentraciones de 1 y 0.05 mM tienen efecto estadísticamente significativo respecto a los controles sobre células normales.

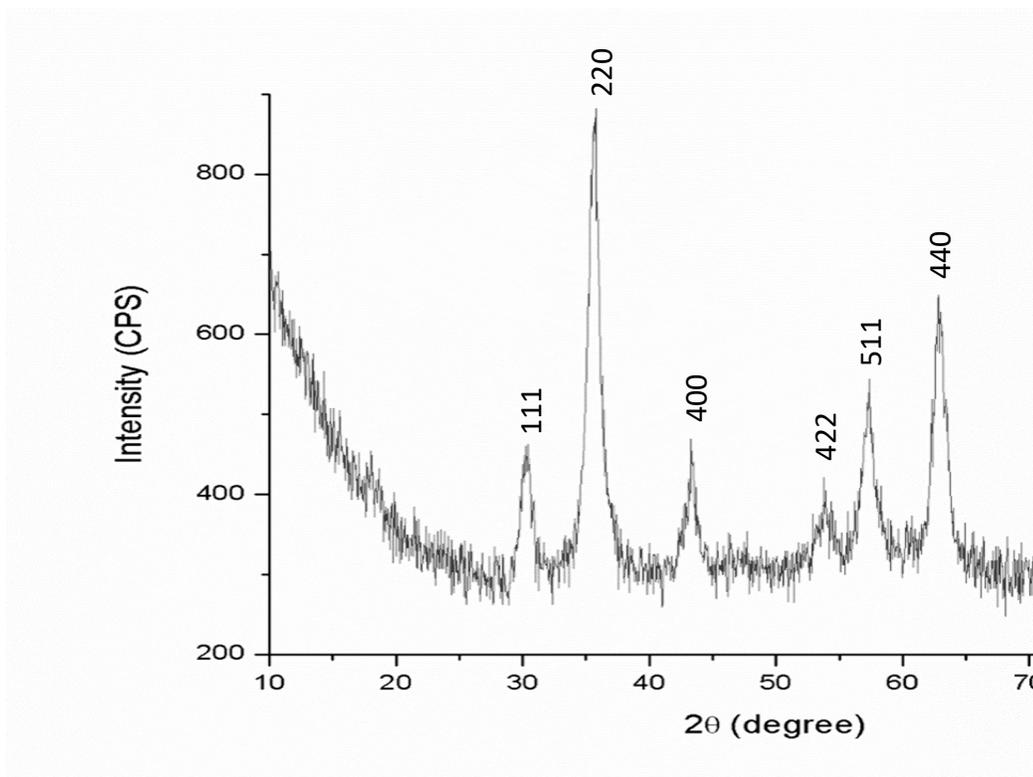


**Figura 19.** Resultados obtenidos por ensayo de MTT para el compuesto LQM-755 sobre la línea de fibroblastos normales LL47. A) Administrado y evaluado a las 24 horas a diferentes concentraciones. B) Resultados a las 48 horas empleando las mismas concentraciones que se emplearon a las 24 horas.

## VII.3 Síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita

Se llevó a cabo de manera satisfactoria la síntesis de nanopartículas de magnetita por el método de coprecipitación empleando sales de hierro y empleando como base fuerte hidróxido de sodio 5 M. El núcleo magnético se caracterizó por la técnica de difracción

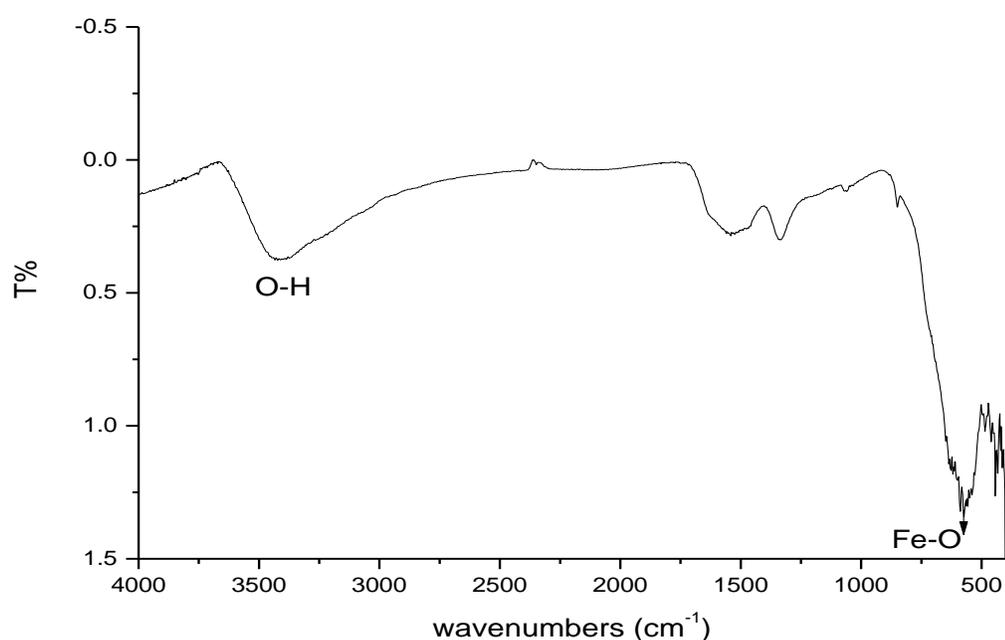
de rayos X (DRX) (Figura 20), los picos obtenidos para la muestra de nanopartículas sintetizadas coinciden con los reportados en la literatura para magnetita (Zhang et al., 2006). Por lo que la fase cristalina corresponde a un arreglo cubico, como esta reportado para este tipo de nanopartículas sintetizadas por método de coprecipitación.



**Figura 20.** Se presenta el patrón por DRX de la muestra de nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método coprecipitación.

Por otra parte, se llevó a cabo la caracterización por la técnica de FT-IR empleando las nanopartículas en polvo y las bandas obtenidas se muestra en la figura 21 El pico de absorción correspondiente a  $590\text{ cm}^{-1}$  corresponde al grupo Fe-O respectivamente como se encuentra reportado en la literatura (Jadhav et al., 2013; Zhang et al., 2006). Las bandas de absorción entre  $1750$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a los enlaces entre O y H ya que, la superficie de la nanopartícula tiene una cantidad importante de átomos de oxígeno que fácilmente pueden interactuar con moléculas de agua. Respecto al pico encontrado en  $3500\text{ cm}^{-1}$  corresponde a moléculas de agua presentes en la muestra, debido a que el espectro obtenido se realizó con la preparación de una pastilla de KBr

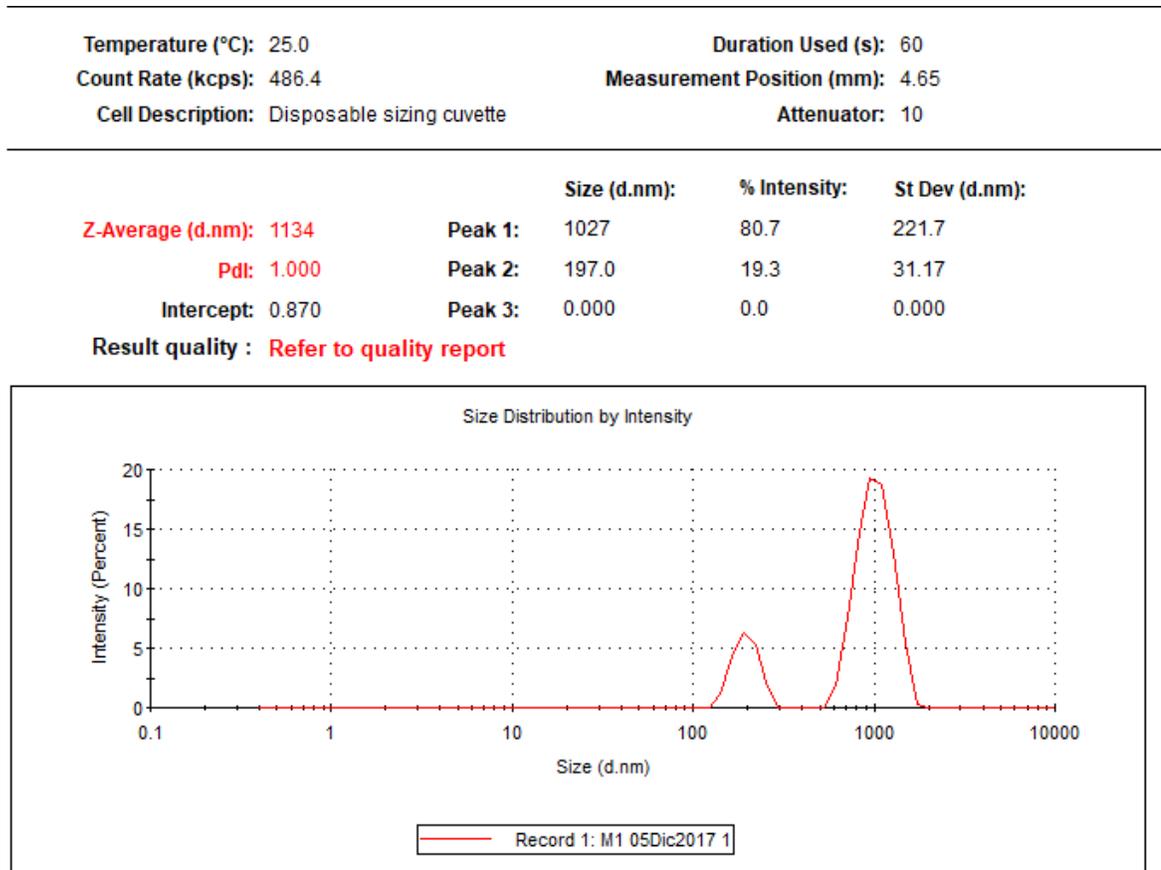
y este reactivo suele tener presente humedad. Otra posible la razón en la presencia de humedad en la muestra se debe a que las nanopartículas no se hayan secado completamente recordando que para la purificación de magnetita se realizan lavados con acetona/agua desionizada. En el caso de acetona para precipitar las nanopartículas y el agua desionizada para separar las sales de Fe y el hidróxido de sodio que no haya reaccionado. Por lo cual, para llevar a cabo la purificación de manera exitosa es necesario después de la purificación, llevar un proceso de secado, previamente en mufla a 50 °C durante 50 min y posteriormente colocar en trampa de vacío por 24 horas.



**Figura 21.** Espectro FTIR de las nanopartículas de magnetita obtenidas a 90°C por el método de coprecipitación.

En la figura 22 se muestra el resultado generado para el tamaño de partícula por triplicado empleando la técnica de dispersión de dinámica de luz. El diámetro promedio obtenido es de 1100 nm aproximadamente, lo cual indica una aglomeración de las nanopartículas de magnetita, ya que, éstas no están funcionalizadas y por tanto tienen tendencia a aglomerarse al paso del tiempo y dependiendo del proceso de almacenamiento, así como si se lleva a cabo la medición de una muestra en polvo

resuspendida, o si se obtuvo una alícuota después de llevar a cabo el proceso de purificación después de la síntesis para mantener las partículas en suspensión y disminuir la aglomeración. Sin embargo, al no estar recubiertas genera una acumulación de nanopartículas que con el paso del tiempo se va incrementando y por esa razón las lecturas en el equipo generan esos tamaños de partícula con un tamaño de población menor a 200nm y otra población con un tamaño superior a 1000 nm.



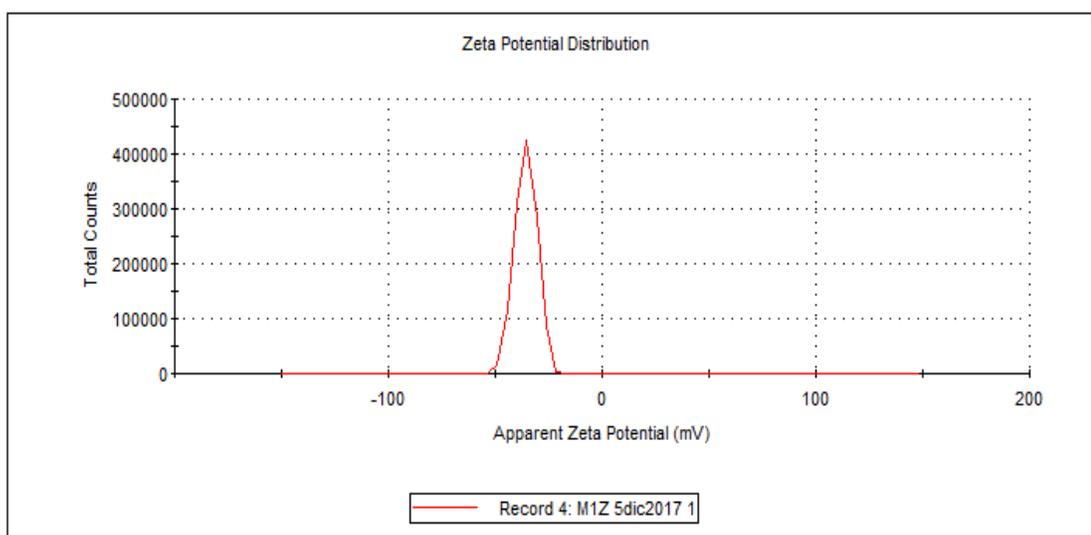
**Figura 22.** Diámetro promedio obtenido por la técnica de dispersión dinámica de luz para la muestra de nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método de coprecipitación y sin funcionalizar.

Las ventajas del equipo Malvern, es que permite llevar a cabo medición de potencial Z, y el obtenido para esta muestra de nanopartículas de magnetita fue de -35.6 mV (Figura 23), lo cual indica que hay una buena dispersión de las nanopartículas, a pesar de que se generaron aglomeraciones.

Temperature (°C): 25.0	Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 226.2	Measurement Position (mm): 4.50
Cell Description: Zeta dip cell	Attenuator: 6

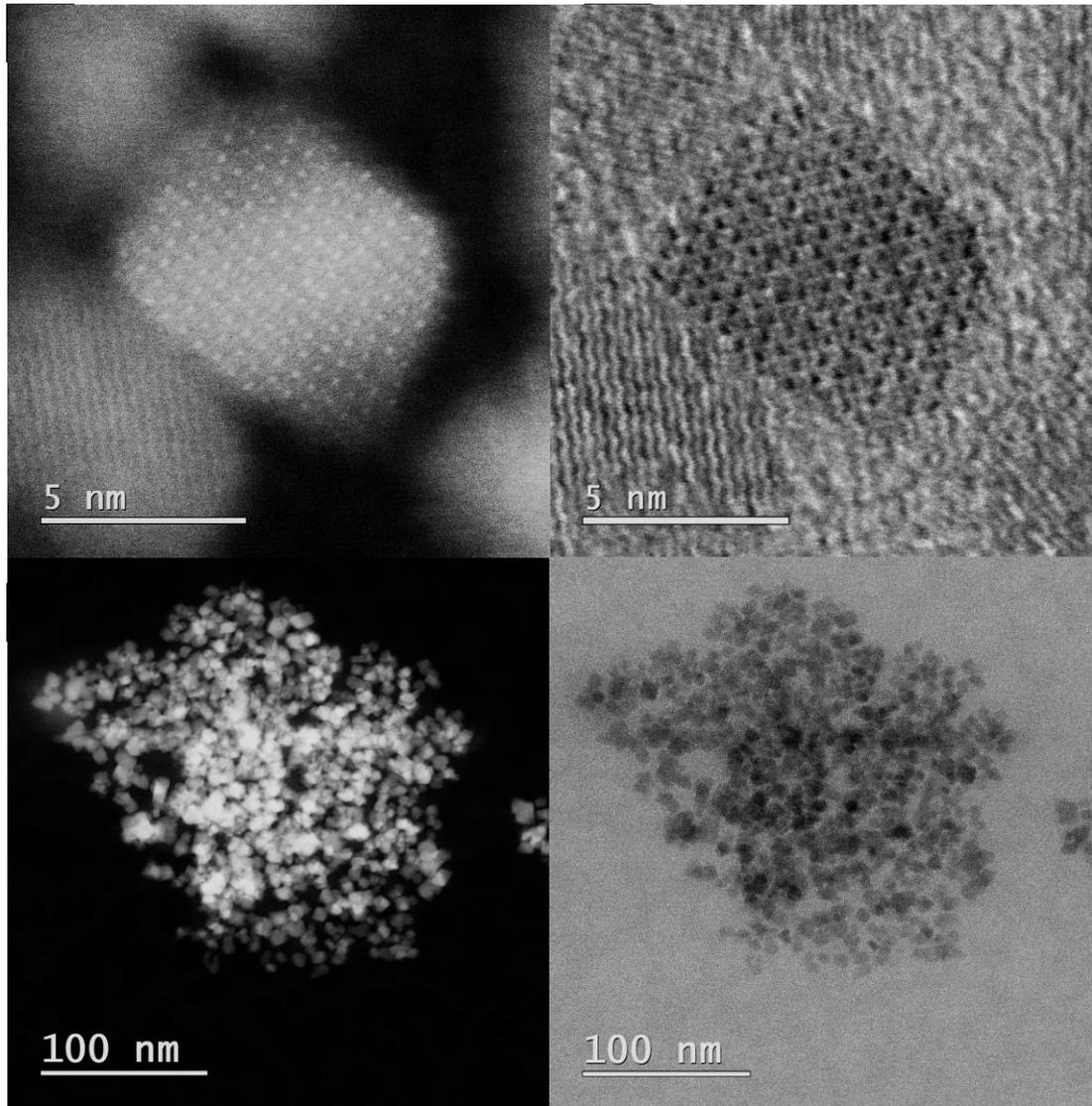
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -35.6	Peak 1: -35.6	100.0	5.15
Zeta Deviation (mV): 5.15	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.271	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : Good



**Figura 23.** Potencial z obtenido para la muestra de nanopartículas de magnetita sin funcionalizar sintetizadas por coprecipitación.

Para llevar a cabo la caracterización morfológica de las nanopartículas de magnetita, se utilizó un microscopio de transmisión electrónica (TEM), debido a que en la literatura se manejan diámetros de partícula entre 5-10 nm. En la figura 24 en panel A se aprecia la imagen de una nanopartícula de magnetita obtenida en alta resolución y se aprecia un diámetro de partícula de aproximadamente 6-7 nanómetros. También se puede observar el arreglo atómico de los átomos de hierro, los cuales al tener un mayor diámetro que los átomos de oxígeno se aprecian de forma más clara y brillante en fondo oscuro. Por otra parte, la imagen del panel B, es la misma que la del panel A, pero obtenida en campo claro. En el panel C y D se aprecia la misma imagen obtenida en campo claro y campo oscuro a menor magnificación y se aprecia el diámetro y morfología obtenido para las nanopartículas de magnetita sin recubrir.

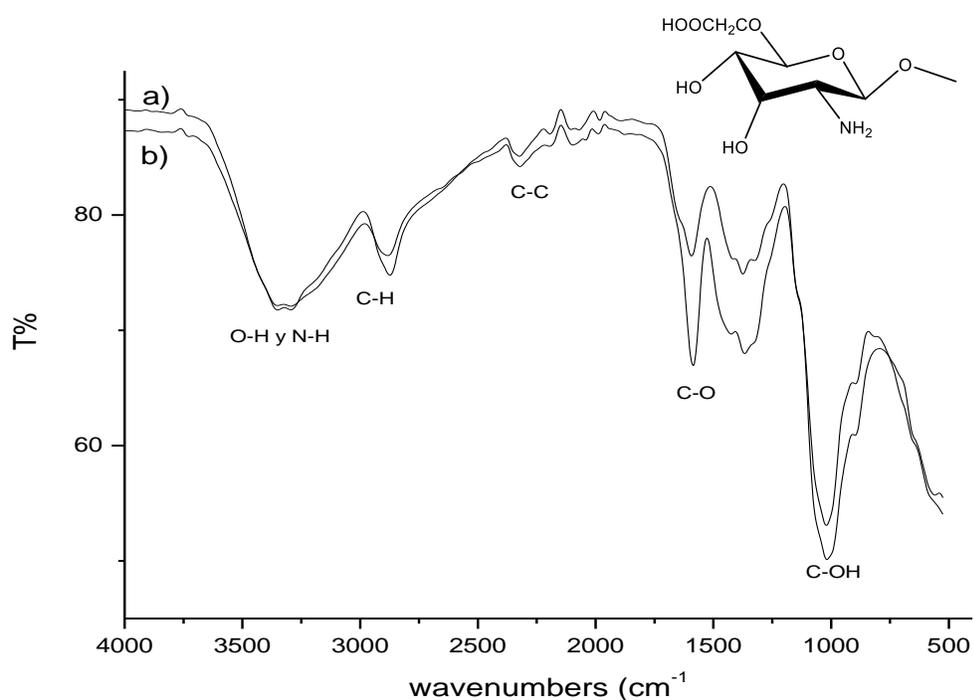


**Figura 24.** Micrografías obtenidas por TEM de las nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método de coprecipitación a 90 °C en campo oscuro y en campo claro.

En conclusión, se logró obtener la síntesis de las nanopartículas que se utilizaran como núcleo para el sistema de encapsulación.

#### VII.4 Síntesis y caracterización de o-carboximetilquitosano

Para llevar a cabo la funcionalización de las nanopartículas de magnetita, se procedió a realizar la síntesis de un derivado del polímero quitosano de bajo peso molecular mediante una metodología reportada y se caracterizó por espectroscopia de infrarrojo y por resonancia magnética nuclear. Por lo tanto, se pudo corroborar por medio de la comparación de los espectros obtenidos y los reportados en la literatura para este tipo de polímero (X. G. Chen & Park, 2003).



**Figura 25.** Espectro FTIR de los polímeros a) quitosano y el sintetizado b) o-carboximetil quitosano con estructura similar, pero con la incorporación de grupos -COOH.

En la figura 25 se observa el espectro de a) quitosano y b) o-carboximetil quitosano, para ambos espectros se aprecian las mismas bandas de absorción correspondientes a los diferentes tipos de estiramiento y de manera característica se aprecian las vibraciones de tensión C-H de grupos -CH<sub>2</sub>- en una región cercana a 3000 (2800-3000) cm<sup>-1</sup> y en 3500 cm<sup>-1</sup> bandas de absorción correspondientes al estiramiento N-H y O-H

presentes en quitosano. Así mismo el estiramiento de C-H del grupo -CH<sub>3</sub> en 2800-3000 cm<sup>-1</sup>. En 1400 cm<sup>-1</sup> un pico asignado al estiramiento de la vibración del grupo -COO-. En 1500 cm<sup>-1</sup> un pico de absorción del estiramiento del C=O. Para poder diferenciar y encontrar la modificación realizada al quitosano se logra hacer mediante la presencia del enlace -C-O-, que en este caso se encuentra en 1080-1200 cm<sup>-1</sup>, este resultado indica la sustitución del grupo hidroxilo del quitosano.

Por otra parte, se llevó a cabo la caracterización por resonancia magnética nuclear de protón para identificar las diferentes señales correspondientes a los diferentes tipos de protón presentes en la estructura del o-carboximetil quitosano (X. G. Chen & Park, 2003)(Figura 26).

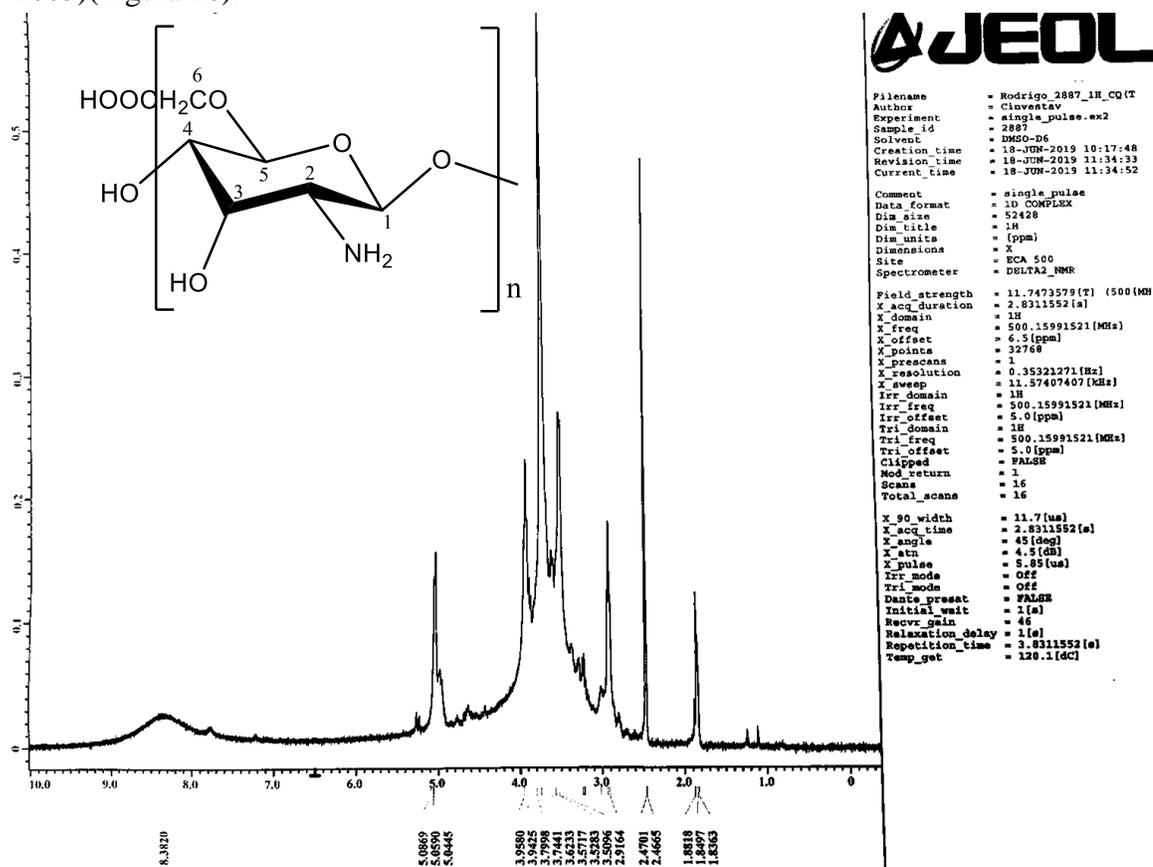


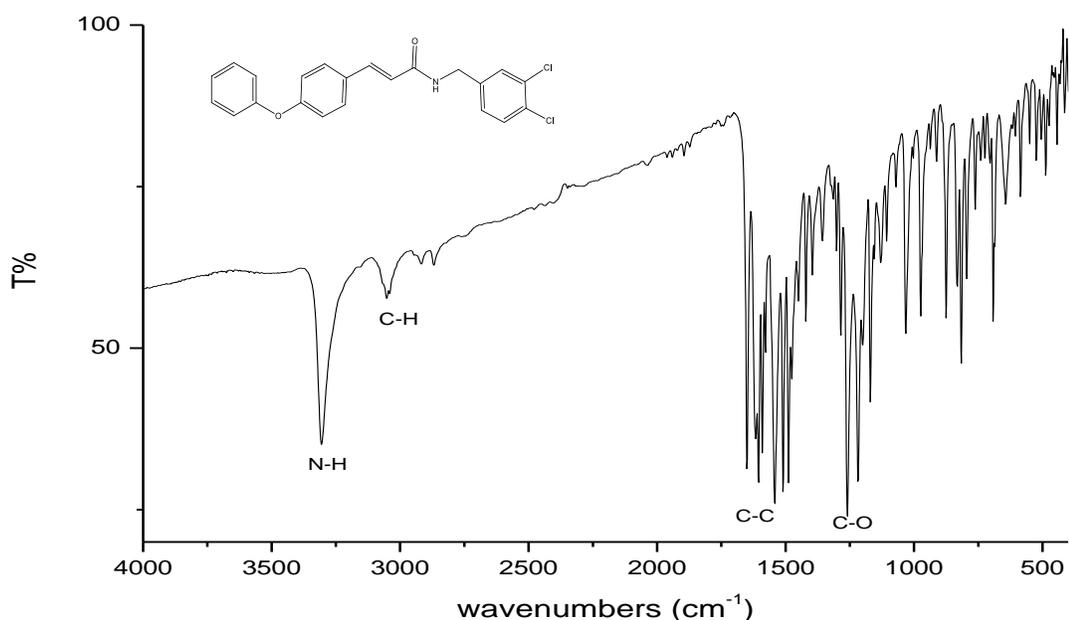
Figura 26. Espectro de RMN de H1 correspondiente al polímero sintetizado o-carboximetilquitosano.

La estructura del o-carboximetil quitosano presenta diferente tipo de protones y por la cercanía de estos tipos de protones a menos de uno o dos enlaces con otros tipos de

protones es q se presenta un sistema un poco más complejo de señales, pero algunos de ellos es posible observarlos en el espectro, como por ejemplo el protón H3 en un desplazamiento de 3.9 ppm y el protón H6 en un desplazamiento de 3.8 ppm, que nos indica que esta sustituido con el grupo carboxi metil.

#### VII.5 Nanopartículas poliméricas de LQM-755 con o-carboximetil quitosano

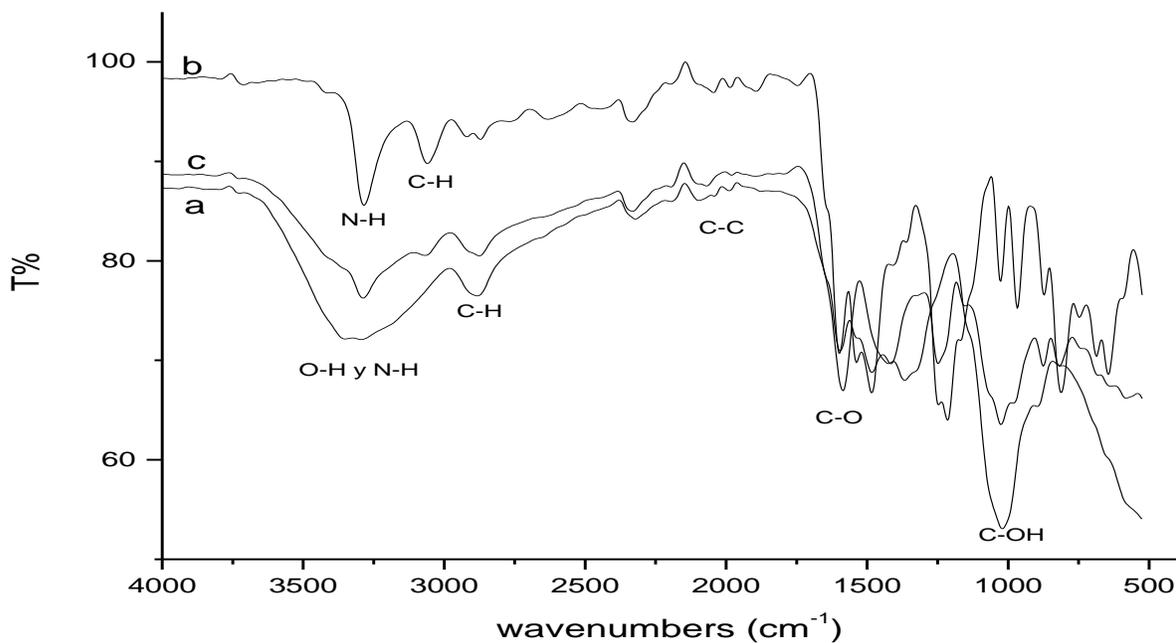
Para determinar la mejor eficiencia de encapsulamiento de LQM-755 y las mejores características para las nanopartículas se siguieron dos distintas metodologías; la primera consistió en realizar la encapsulación del fármaco en presencia de cloruro de calcio como agente encapsulador y empleando el polímero previamente modificado de quitosano (o-carboximetil quitosano), además de variar las condiciones de reacción como tiempo, agitación, temperatura y la concentración de los diferentes reactivos. En la figura 27 se observan las señales correspondientes al compuesto LQM-755 que fue el que se seleccionó para encapsular debido al efecto significativo que tuvo para disminuir la viabilidad celular de la línea de cáncer de pulmón A549. De manera característica, se aprecian en la región de 3250-3400  $\text{cm}^{-1}$  las vibraciones de tensión correspondientes al grupo N-H del compuesto. Por otra parte, en la región de 3000-3100  $\text{cm}^{-1}$  se aprecian las bandas de absorción correspondientes al estiramiento C-H de la molécula. La parte compleja con picos entre 500-1500  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a los diferentes tipos de estiramiento de la parte aromática de la estructura. Este espectro es importante para poder caracterizar su presencia en las nanopartículas sintetizadas.



**Figura 27.** Espectro FTIR del compuesto LQM-755 donde se aprecian las señales correspondientes al compuesto el cual fue proporcionado por el Dr. Enrique Ángeles (FES-Cuautitlán).

En la siguiente figura 28 se muestra el espectro de FT-IR correspondiente a las nanopartículas poliméricas de o-carboximetil quitosano encapsulando al compuesto LQM-755. El espectro a) corresponde al polímero por separado o-carboximetil quitosano, donde se distinguen las bandas de absorción que corresponden a la estructura del polímero, como las vibraciones correspondientes a N-H y al grupo O-H y por esa razón se aprecia de esa forma el pico más ancho, ya que, ambos se encuentran en una región cercana. El pico del estiramiento del C-H presente en la estructura se aprecia en una región cercana a  $3000\text{ cm}^{-1}$ , como ya se tenía caracterizado previamente. Por otra parte, el espectro b) corresponde al análogo LQM-755 que muestra sus señales características, así como la zona aromática compleja descrita al inicio que corresponde a grupos de picos en una región entre  $500\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, si se distingue el pico de absorción de N-H presente en esta estructura y que a diferencia del espectro a) en este caso es debido al grupo amino presente en LQM-755 y no hay grupos OH en la estructura del análogo, por esa razón se aprecia un pico menos ancho. En el caso del espectro c) corresponde a las nanopartículas generadas con LQM-755 y o-carboximetil

quitosano. Por lo cual se aprecian las mismas vibraciones de tensión obtenidas por separado para cada uno de los componentes de este tipo de nanopartículas. Lo que nos indica que tenemos la formación de las nanopartículas con todos los componentes: polímero quitosano, o-carboximetil quitosano y LQM-755.

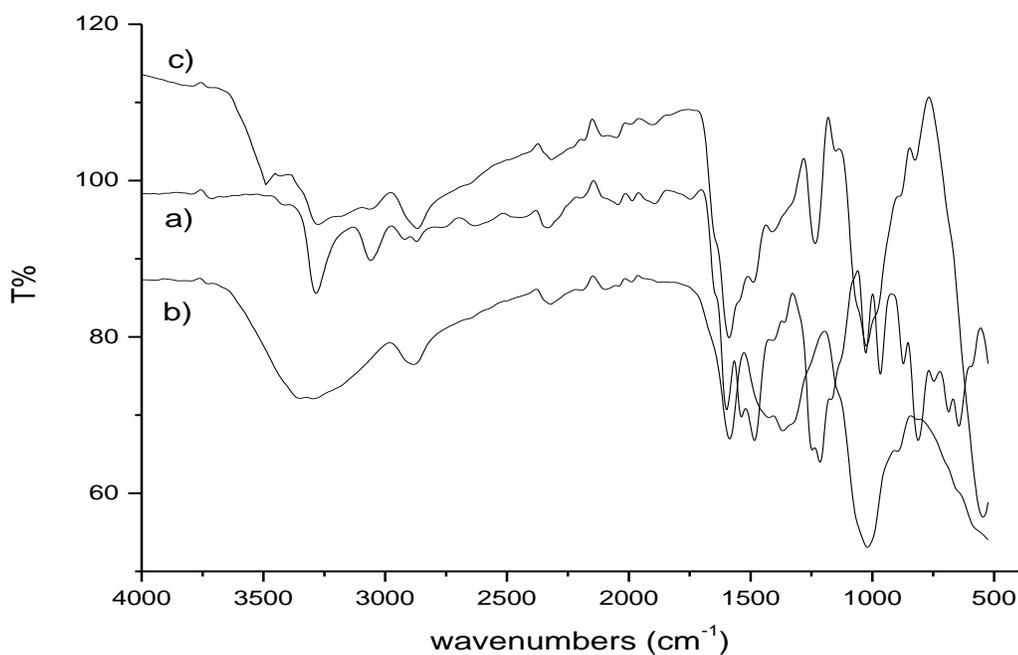


**Figura 28.** Espectro FTIR de las muestras; a) polímero o-carboximetil quitosano, b) compuesto LQM-755 y c) nanopartículas de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 empleando el agente gelificante  $\text{CaCl}_2$ .

#### VII.6 Nanopartículas poliméricas de LQM-755/ magnetita/o-carboximetil quitosano

Puesto que las nanopartículas sintetizadas solamente con él o-carboximetil quitosano y LQM-755 tenían diferente diámetro y tamaños superiores a los 300 nanómetros se decidió emplear una segunda alternativa de encapsulación modificando la metodología ya descrita. Se procedió a atrapar nanopartículas de magnetita y el LQM-755 por medio de una técnica de encapsulación empleando cloruro de calcio. Previamente se sintetizo

y se purificaron las nanopartículas de magnetita por la técnica de coprecipitación empleando como sales cloruro ferroso tetra hidratado y cloruro férrico hexa hidratado y como base hidróxido de sodio a una concentración de 5 M. Posteriormente en la misma fase se encapsularon las nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el

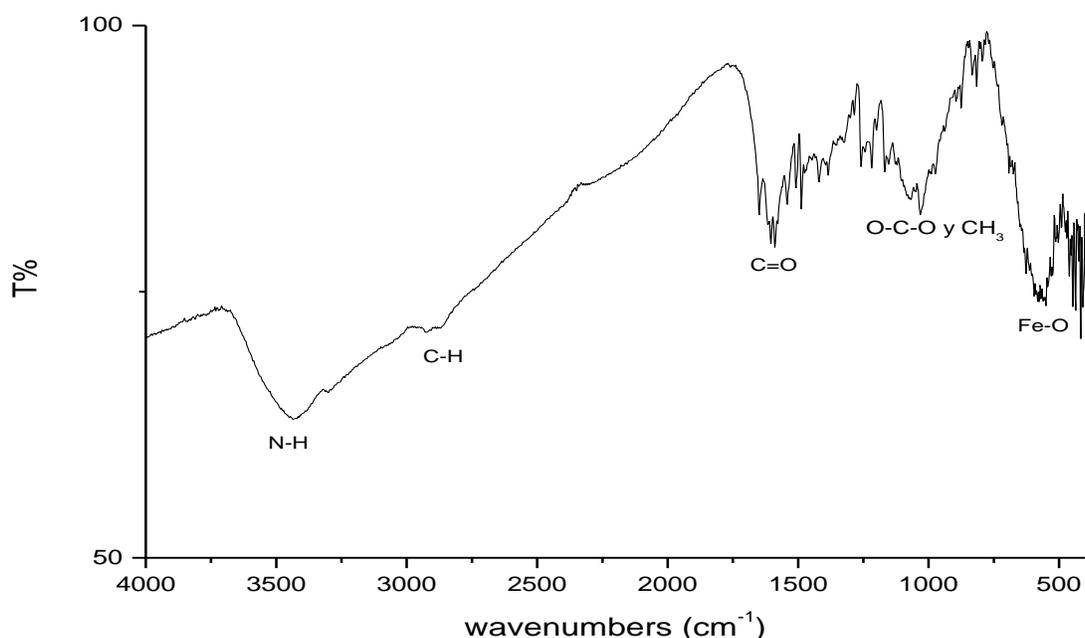


polímero o-carboximetil quitosano y la purificación se realizó con agua bidestilada y con ayuda de un magneto de neodimio.

**Figura 29.** Espectro FTIR de las muestras; a) compuesto LQM-755, b) o-carboximetil quitosano y c) nanopartículas de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 y nanopartículas de magnetita empleando como agente gelificante CaCl<sub>2</sub>.

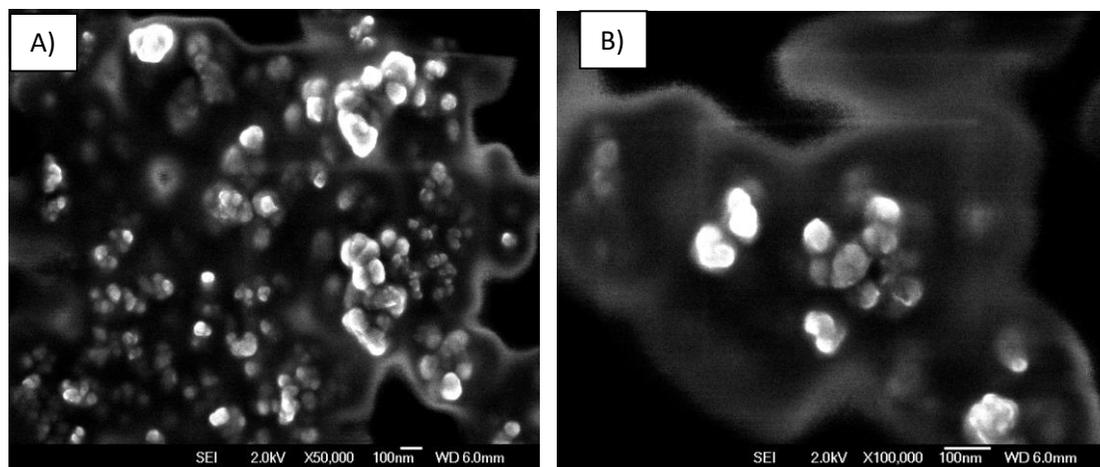
En la figura 29 se encuentra el espectro de FT-IR de las nanopartículas generadas de o-carboximetil quitosano encapsulando a las nanopartículas de magnetita y el análogo LQM-755. El espectro a) corresponde al análogo LQM-755, donde para poder identificarlo característicamente se aprecian el pico correspondiente al grupo N-H, entre 3250-3500 cm<sup>-1</sup> y el estiramiento del C-H en la región entre 3000-3100 cm<sup>-1</sup>. El espectro b) corresponde al polímero o-carboximetil quitosano que de forma similar como ya se encuentra reportado las principales vibraciones de tensión características

para este polímero, en la zona de  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$  el pico ancho de los grupos N-H y O-H y por lo cual se aprecia una curva ancha a diferencia del espectro de LQM-755 donde el pico del N-H en la misma región genera una curva menos ancha. La curva c) corresponde al espectro de la muestra de las nanopartículas con los tres componentes: LQM-755, o-carboximetil quitosano y nanopartículas de magnetita, sin embargo, no se nota la señal correspondiente al enlace de O-Fe, por lo que se realizó otra lectura en otro equipo de FT-IR (figura 30).



**Figura 30.** Espectro FTIR de nanopartículas poliméricas a base de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 y nanopartículas de magnetita empleando como agente gelificante  $\text{CaCl}_2$ .

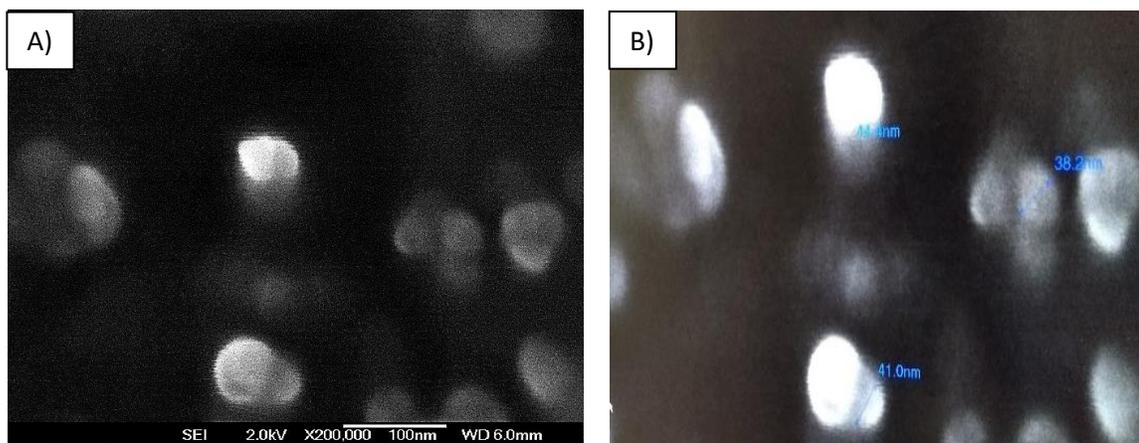
La figura 30 muestra el espectro de infrarrojo de las nanopartículas poliméricas encapsulando a nanopartículas de magnetita y el análogo LQM-755, el cual fue obtenido en un equipo de FT-IR diferente. Las bandas de absorción correspondientes a los diferentes componentes del sistema aparecen en el espectro, por ejemplo, las vibraciones de tensión correspondientes al N-H en la región de  $3500\text{ cm}^{-1}$ , el pico del C-H cercano a  $3000\text{ cm}^{-1}$  y la zona compleja de las uniones C-C de los grupos aromáticos del o-carboximetil quitosano y el LQM-755, así como en la banda de absorción correspondiente al enlace de Fe-O entre  $500-600\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 31.** Micrografías obtenidas por SEM de las nanopartículas poliméricas de o-carboximetil quitosano/ magnetita/ LQM-755.

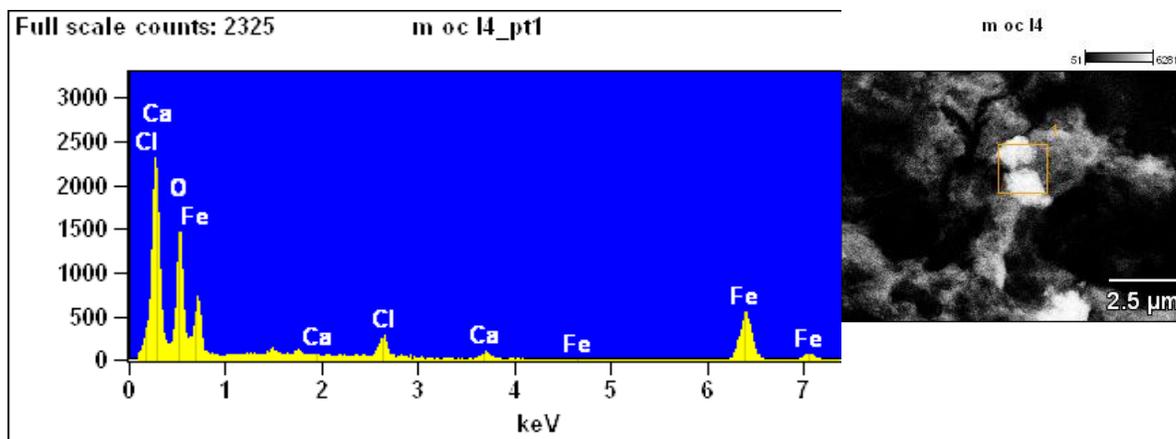
Las micrografías de la figura 31 corresponden a las nanopartículas generadas por el método de gelación iónica empleando  $\text{CaCl}_2$  como agente gelificante. Las imágenes fueron tomadas a un potencial de 2 kV y una magnificación de x50 000 para el panel a) y en el panel b) una magnificación de x100 000. Ambas micrografías a una escala de 100 nm y en fondo oscuro. La muestra fue tomada a partir de una suspensión con las nanopartículas; depositando 40 uL sobre una cinta de carbón, para posteriormente poner en un desecador y montarla sobre un soporte para muestra del microscopio. En el panel a) se aprecian nanopartículas aglomeradas de un diámetro aproximado a los 50 nm. Los conglomerados tienen un tamaño similar y están formados por aproximadamente 5 o 6 nanopartículas aún más pequeñas. En el panel b) se tiene una magnificación de x100 000, por lo que se puede observar mejor la composición de los conglomerados formados por más de 3 nanopartículas de tamaños menores a los 50 nm.

En la figura 32 se muestran dos micrografías correspondientes a la misma muestra, pero con una mayor magnificación. En este caso la magnificación de x200 000 permite visualizar en el panel a) que el diámetro de las nanopartículas es menor a 50 nm. Por otra parte, en el caso del panel b) se muestra la medición de algunas nanopartículas donde se aprecia el diámetro que tienen algunas de ellas y en todos los casos, el diámetro es menor a 50 nm. Sin embargo, parece apreciarse que aún están formadas por nanopartículas aún más pequeñas. En la bibliografía el tamaño esperado para la formación de nanopartículas poliméricas a partir de quitosano y o-carboximetil quitosano es de aproximadamente 100-200 nm. En este caso en particular con imágenes obtenidas por SEM, se encontró que empleando como núcleo nanopartículas de magnetita se puede obtener un diámetro inferior a los 50 nm.



**Figura 32.** Micrografías obtenidas por SEM de las nanopartículas poliméricas de o-carboximetil quitosano/quitosano/ magnetita/ LQM-755 a una magnificación de x200 000.

Respecto a la parte morfológica las imágenes obtenidas por SEM nos indica que las nanopartículas son semi esféricas y que están formadas en su interior por una o más nanopartículas de magnetita atrapadas junto con el fármaco.



**Figura 33.** Espectro de EDS y composición elemental de la muestra nanopartículas poliméricas de o-carboximetil quitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el agente gelificante  $\text{CaCl}_2$ .

Para determinar la composición de las nanopartículas se hizo un análisis elemental de la muestra preparada para SEM y el análisis se llevó a cabo en una zona donde se encontraban las nanopartículas como se muestra en la figura 33. El resultado obtenido muestra los picos correspondientes a los diferentes átomos que componen la muestra. La muestra analizada está formada por el polímero o-carboximetil quitosano que contiene: carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno. Para el caso del núcleo de magnetita se tiene átomos de hierro y oxígeno. Finalmente, el análogo de CAPE está formado por carbono, hidrogeno, oxígeno y cloro. En la gráfica únicamente se encuentran algunos picos solamente para aquellos átomos de la muestra que tienen un mayor número de electrones, por esa razón se aprecia únicamente los picos correspondientes a hierro, cloro, oxígeno y calcio. El calcio encontrado en la muestra posiblemente sea residuo del agente gelificante  $\text{CaCl}_2$ .

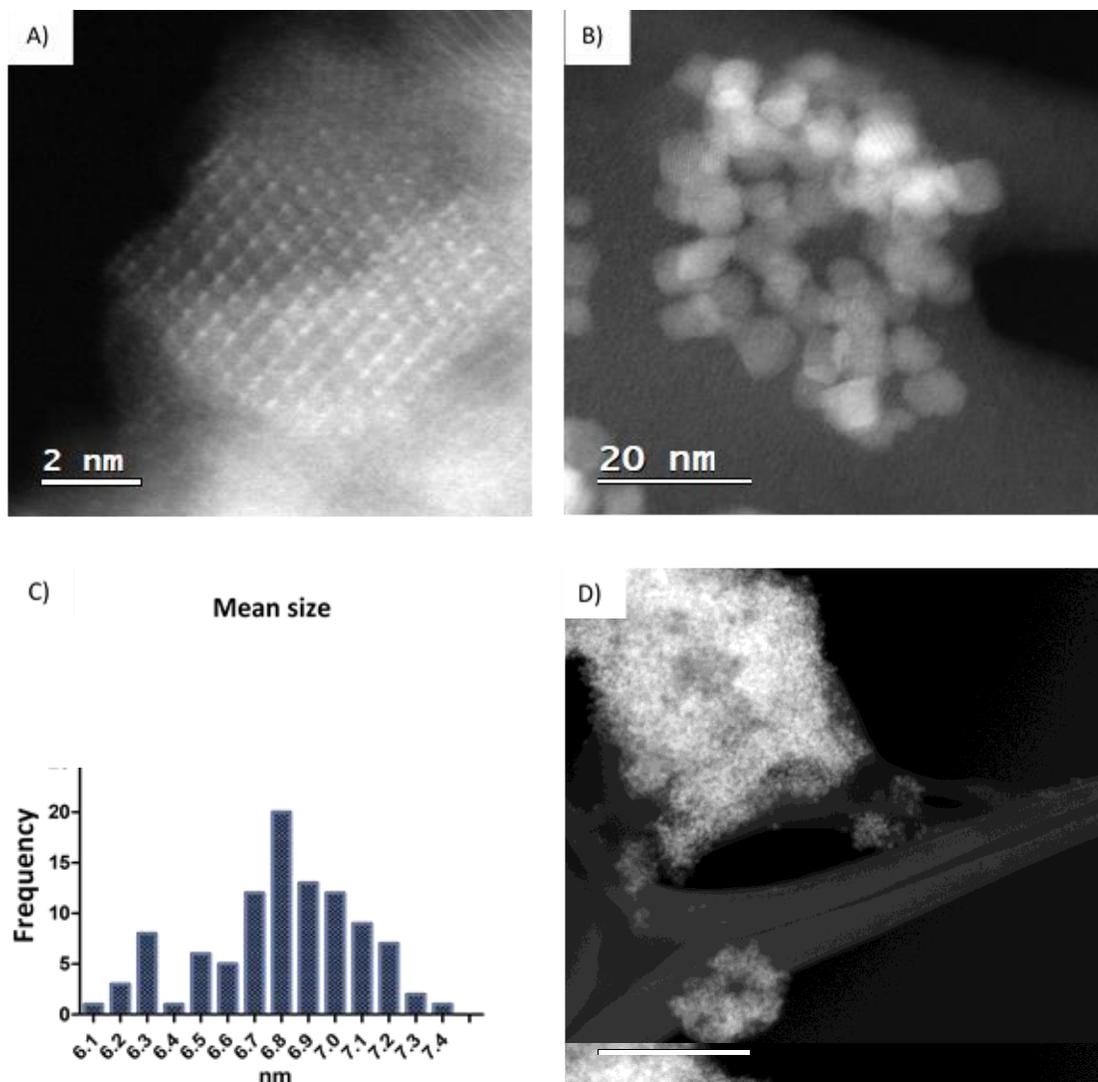
En la tabla 2 siguiente se encuentran los porcentajes por átomo de la misma muestra analizada por EDS en zona. De manera clara se observa un mayor porcentaje para oxígeno y esto debido a que el oxígeno está presente en todos los componentes del sistema, es decir, en la magnetita, el quitosano, el o-carboximetil quitosano y el LQM-755. Además, el núcleo magnético tiene un diámetro superior, por lo que, es de esperar un aumento en los porcentajes de los átomos que lo forman, que son hierro y oxígeno. Respecto al porcentaje de calcio encontrado, puede deberse como se mencionó con

anterioridad a residuos presentes del reactivo  $\text{CaCl}_2$  que se utilizó como agente gelificante. El porcentaje de cloro encontrado corresponde a los dos átomos de cloro presentes en la estructura del análogo LQM-755, aunque no se descarta que una fracción de este mismo porcentaje pertenezca al  $\text{CaCl}_2$  debido a que también se encontró residuos de calcio.

Tabla 2. Porcentajes de composición elemental a partir del análisis de EDS de la muestra nanopartículas poliméricas de o-carboximetil quitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755.

Element Line	ZAF	Element Wt. %	Wt. % Error	Atom %	Atom % Error	Compnd Wt. %
O K	1.695	40.95	+/-0.45	69.52	+/- 0.77	40.95
Cl K	1.171	4.92	+/-0.22	3.77	+/- 0.17	4.92
Ca K	1.022	1.98	+/-0.21	1.34	+/- 0.14	1.98
Fe K	1.097	52.15	+/-1.09	25.37	+/- 0.53	52.15
		-----		-----		-----
<b>Total</b>		100		100		100

Continuando con la caracterización de este sistema, se obtuvieron micrografías por microscopia de TEM, como se muestra en la figura 34. Las imágenes generadas a diferente magnificación para tener un mayor alcance. En el panel A) se muestra la imagen de una nanopartícula que corresponde al núcleo de magnetita, ya que se alcanza a apreciar el arreglo atómico de los átomos de hierro y que van a generar un mayor brillo por tener más cantidad de electrones que el oxígeno. La escala para este panel fue de 2 nm, por lo que el diámetro aproximado de esta nanopartícula es de 5-7 nm. Cabe mencionar que la parte orgánica que rodea al núcleo de las nanopartículas de magnetita, no se aprecia con claridad en imágenes de TEM por la composición, sin embargo, en el análisis de EDS, se observa la presencia de los componentes.

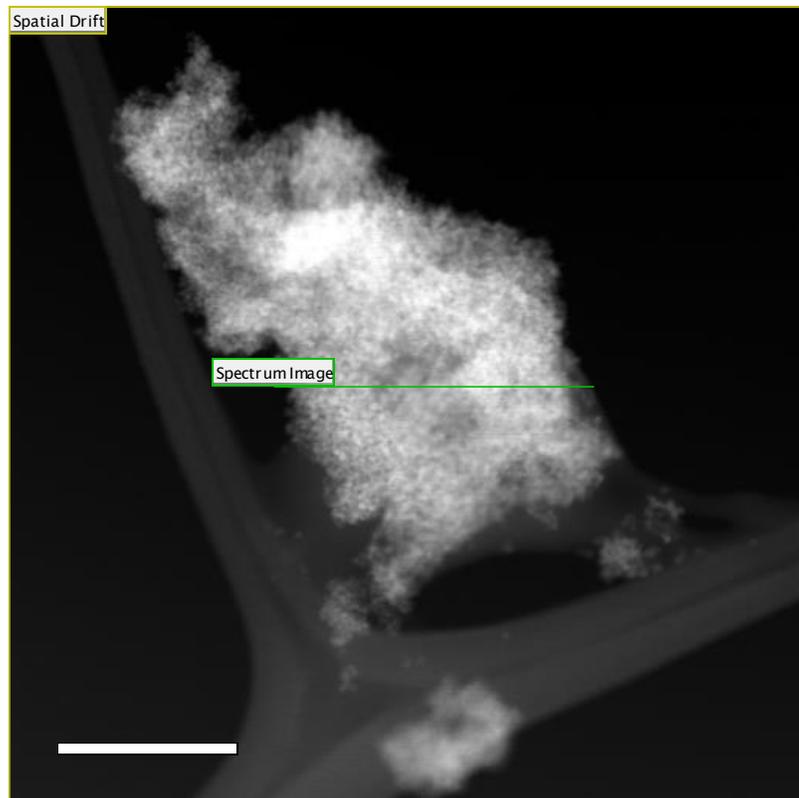


**Figura 34.** Micrografías obtenidas por TEM del sistema de nanopartículas formado por o-carboximetil quitosano/quitosano/magnetita/LQM-755.

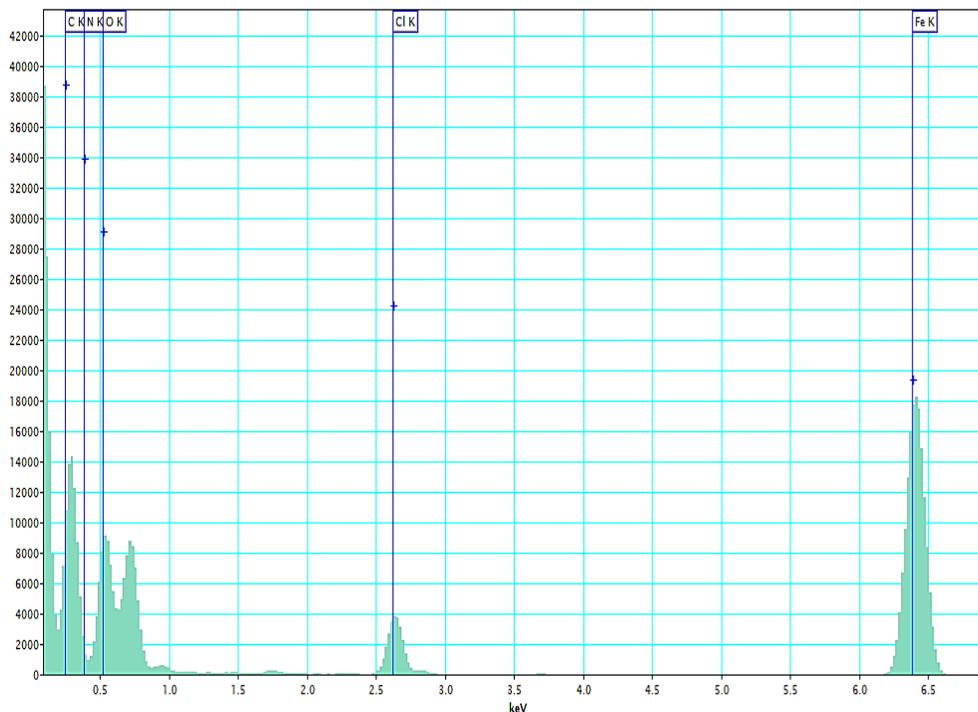
El panel B) es una micrografía de la misma rejilla, pero a una menor magnificación y una escala de 20 nm, por esa razón se ven más nanopartículas que el caso del panel A). En la imagen se alcanza a apreciar nanopartículas de un tamaño y diámetro similar entre ellas y una parte difusa que las rodea que podría ser la parte orgánica de las nanopartículas, ya que, esta capa está formada por el polímero y el análogo de CAPE que contiene átomos de carbono, oxígeno, hidrógeno y cloro. Por lo que, posiblemente sea la razón por la que estas nanopartículas se ven de esta forma a diferencia de las imágenes presentadas anteriormente en la caracterización de nanopartículas de magnetita sin funcionalizar, las cuales se apreciaban de una forma más nítida y en el

caso de la imagen de una nanopartícula de magnetita sola, el arreglo estructural de los átomos de hierro se apreciaba más nítido que estas imágenes. El panel C) contiene una cuantificación de una zona donde se encontraban nanopartículas dispersas para poder determinar el diámetro promedio. El mayor número de nanopartículas que se cuantificaron tienen un diámetro promedio de 6.8 nm. La cantidad de nanopartículas cuantificadas fueron 100. El panel D) es una micrografía a una magnificación menor y una escala de 200 nm de la muestra de nanopartículas, en la que se aprecia que todas tienen un diámetro y una distribución similares.

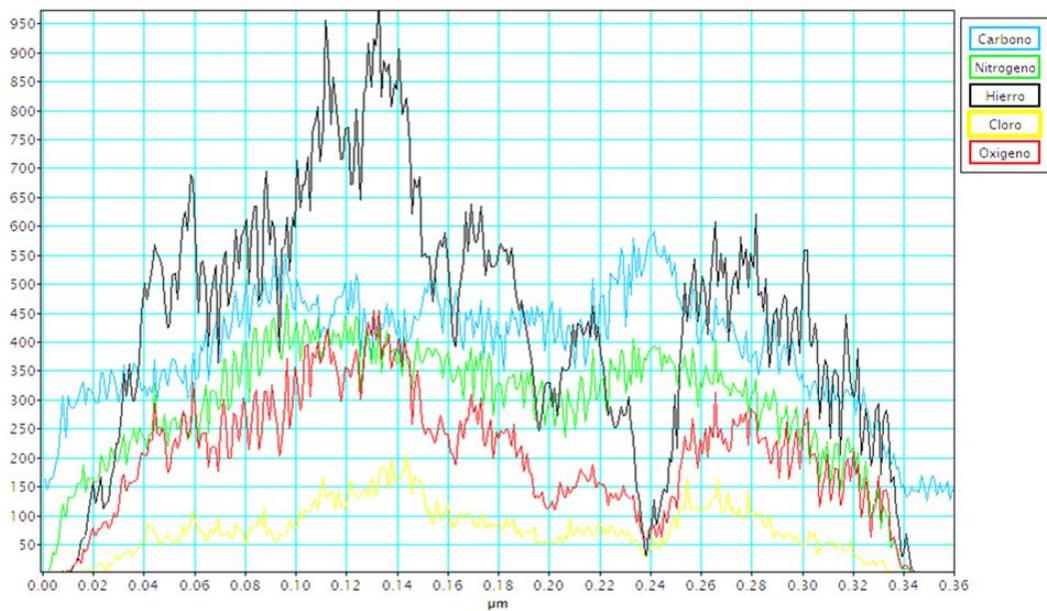
Para determinar la composición de la muestra se llevó a cabo un análisis de EDS sobre la misma muestra utilizada para las micrografías y la gráfica se muestra en la figura 36. El análisis realizado fue lineal (figura 33). El resultado arrojado muestra los picos correspondientes a los átomos de hierro que corresponden al núcleo magnético, así como también aparece el pico de cloro, lo cual nos indica la presencia del análogo LQM-755. Por otra parte, también aparecen los picos de los átomos de oxígeno, carbono y nitrógeno que pueden corresponder a la parte orgánica de la muestra, es decir, están presentes en ambos polímeros de quitosano y en el análogo LQM-755.



**Figura 35.** Espectro de EDS lineal y composición elemental de la muestra nanopartículas.



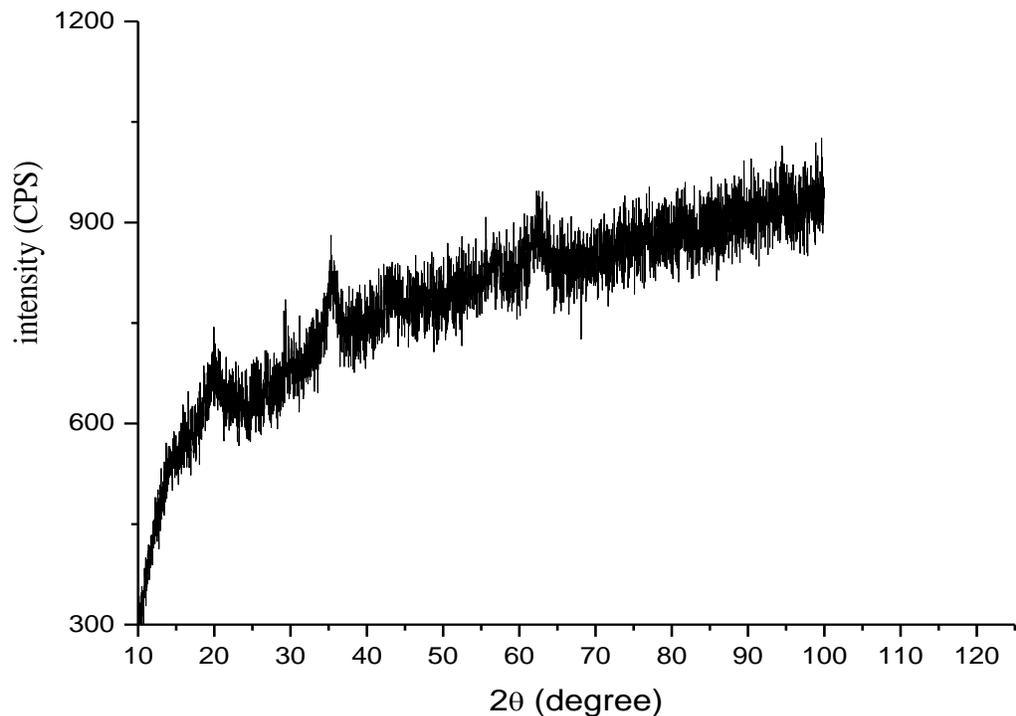
**Figura 36.** Espectro de EDS lineal y composición elemental de la muestra nanopartículas poliméricas de o-carboximetilquitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el agente gelificante  $\text{CaCl}_2$ ; obtenido con el microscopio de TEM.



**Figura 37.** Composición elemental de la muestra nanopartículas poliméricas de o-carboximetilquitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el agente gelificante  $\text{CaCl}_2$ ; obtenido con el microscopio de TEM.

La figura 37 contiene una gráfica que representa la intensidad de la señal correspondiente a cada uno de los átomos presentes sobre la muestra de nanopartículas que pudieron ser detectados en el análisis de EDS realizado por el microscopio de TEM. La mayor intensidad se tiene para el átomo de hierro de la magnetita, el cual es el elemento con mayor peso molecular y mayor número de electrones presente en la muestra. En el caso del hierro se encuentra en mayor proporción, ya que, forma el núcleo sólido del sistema propuesto. La señal con menor intensidad corresponde al átomo de cloro presente en el análogo LQM-755 y esto debido a que se encuentra en menor proporción recordando que rodea al núcleo de magnetita y otra fracción está atrapada en la red formada por los entrecruzamientos de quitosano y o-carboximetil quitosano.

Continuando con la caracterización de este sistema nano particulado se llevó a cabo el análisis de XRD para determinar que no hubiera modificación del núcleo de la magnetita. El patrón de XRD obtenido por el equipo se muestra en la figura 38. La muestra se analizó en polvo, partiendo de una alícuota separada durante la síntesis de las nanopartículas. Cabe mencionar que se utilizó un equipo diferente para la medición de esta muestra en comparación con el patrón de XRD obtenido para las nanopartículas de magnetita sin funcionalizar debido a que no estaba disponible.

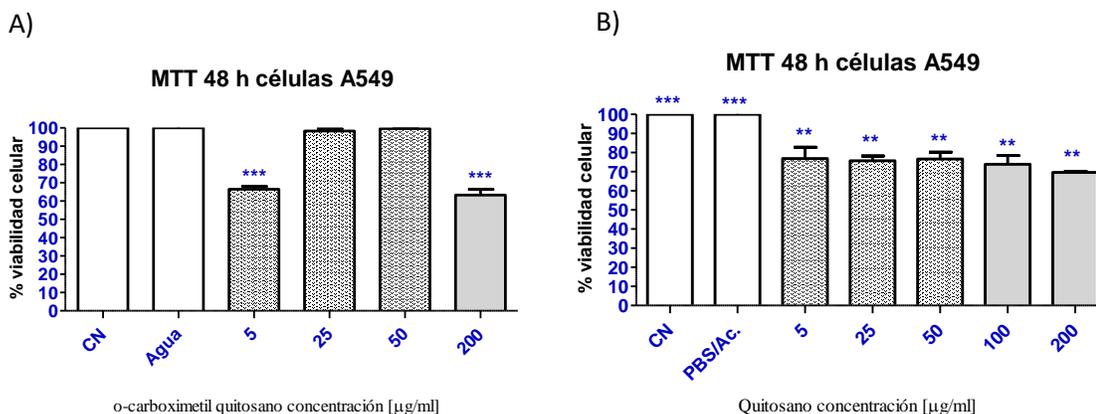


**Figura 38.** Se presenta el patrón por DRX de las nanopartículas poliméricas a base de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 y nanopartículas de magnetita empleando como agente gelificante  $\text{CaCl}_2$ .

Como era de esperarse los picos generados por la muestra coinciden con los reportados para magnetita, lo que sugiere que no hubo modificación del núcleo magnético. Por otra parte, los picos tienen un mayor ruido debido a la poca cantidad de muestra que se analizó o posiblemente al tiempo de duración del análisis.

#### VII.7 Ensayos de viabilidad celular (MTT) con quitosano y o-carboximetilquitosano

Para descartar el efecto que pudiera tener el quitosano y o-carboximetilquitosano; se procedió a realizar ensayos de viabilidad celular por medio de la técnica de MTT a diferentes concentraciones de 5, 10, 50, 100 y 200 mg a las 48 horas, de los cuales no se tenían antecedentes sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549.



**Figura 39.** Ensayo de viabilidad celular por la técnica de MTT en un tiempo de 48 horas con la línea celular A549, a) polímero o-carboximetil quitosano a diferentes concentraciones en ug/mL empleando como solvente agua desionizada, b) polímero quitosano a diferentes concentraciones en ug/mL empleando como solvente una mezcla de PBS y ácido acético al 0.005%.

Los resultados se muestran en la figura 39; la gráfica A) corresponde a o-carboximetil quitosano en la cual se empleó como vehículo agua bidestilada. La grafica B) es el quitosano y en este caso como es parcialmente soluble en agua se tuvo que utilizar una mezcla de PBS/ácido acético al 0.005%. En la gráfica A) el o-carboximetil quitosano tuvo efecto estadísticamente significativo a la concentración de 5 ug/ml y a 200 ug/ml respecto al control y al vehículo. Por su parte el quitosano de la gráfica B) tuvo un efecto estadísticamente significativo en las diferentes concentraciones empleadas respecto al control y al vehículo. Además, el efecto observado para quitosano es constante y cercano a un 25% de inhibición de la viabilidad celular en la línea de cáncer A549 a pesar de incrementar la concentración. El o-carboximetil quitosano tuvo un efecto similar al quitosano, pero únicamente a la concentración de 5 y 200 ug/ml. Estos resultados pueden indicar que se podría tener un efecto sinérgico empleando el LQM-755 como agente cancerígeno.

### VII.8 Síntesis y caracterización de o-carboximetilquitosano a baja temperatura

Para resolver el problema de solubilidad de las nanopartículas, se procedió a modificar la síntesis del carboximetilquitosano de bajo peso molecular mediante una metodología reportada, en la cual se trabaja a temperaturas cercanas a 0°C por 24 horas para la

alcalinización del quitosano. El polvo obtenido se purificó y se caracterizó por espectroscopia de infrarrojo, obteniéndose una completa solubilidad del polímero en agua.

#### VII.9 Nanopartículas poliméricas de LQM-755 con o-carboximetilquitosano a baja temperatura

Para reproducir la síntesis empleada anteriormente en la formación de nanopartículas con el polímero, se emplearon las mismas concentraciones de carboximetilquitosano, LQM-755,  $\text{CaCl}_2$  y agua desionizada. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados, ya que la eficiencia de encapsulación del compuesto disminuyó considerablemente.

#### VII.10 Nanopartículas poliméricas de LQM-755/magnetita/quitosano/o-carboximetilquitosano a baja temperatura

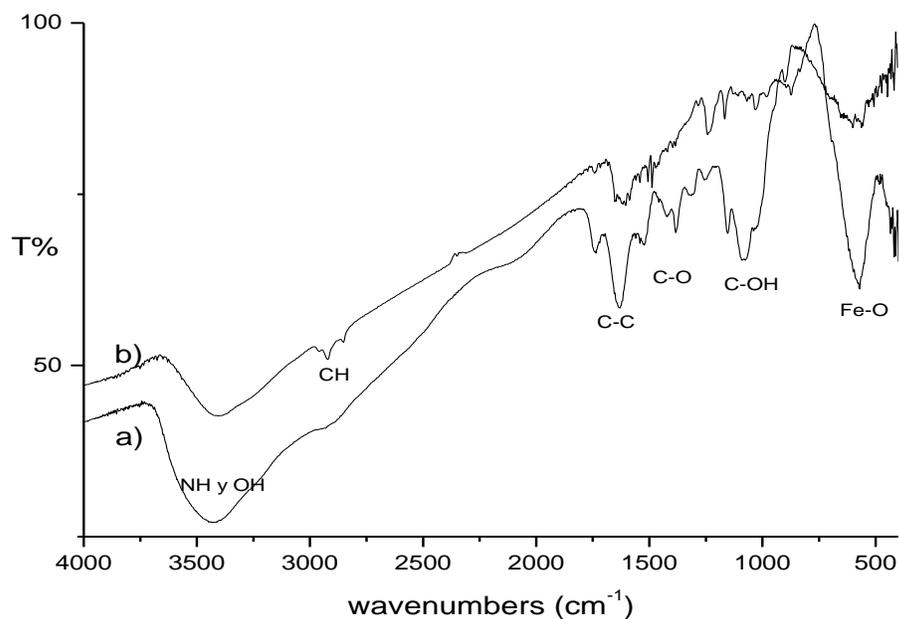
Para mejorar la eficiencia de encapsulación del fármaco, se empleó una metodología diferente ya reportada, pero con algunas modificaciones propuestas en este trabajo. La metodología consiste en emplear dos polímeros con grupos funcionales diferentes que en este caso es el quitosano y el o-carboximetil quitosano que solo difieren estructuralmente en la incorporación de un grupo carboxilo en la posición donde se ubica un grupo hidroxilo respecto al quitosano. y con el uso del agente TPP (tripolifosfato de sodio) (Anitha et al., 2009). El TPP permite cambiar de agente gelificante, es decir en sustitución al  $\text{CaCl}_2$  que se usó en las nanopartículas sintetizadas previamente y que proporciona diferente tipo de iones con carga y que permiten llevar a cabo la unión de los diferentes grupos para generar un entrelazado y formar las nanopartículas. Por otra parte, la caracterización del sistema es más precisa, ya que, los residuos generados, así como reactivos sin reaccionar, no contienen átomos que puedan interferir con el análisis elemental, a diferencia del  $\text{CaCl}_2$ .

La variación en la metodología propuesta difiere en el uso de nanopartículas de magnetita como soporte para ayudar a controlar el tamaño de partícula, además de mejorar la purificación de las nanopartículas empleando un imán de neodimio para

evitar usar diálisis. Por otro lado, una de las ventajas podría ser el uso de las propiedades magnéticas del núcleo magnético para ayudar a focalizar las nanopartículas en el área de interés, que en el caso del cáncer de pulmón sería ejercer un campo magnético sobre los pulmones para concentrar el fármaco en estos mismos.

Después de llevar a cabo la síntesis, el resultado obtenido es un polvo café oscuro el cual fue puesto en suspensión una parte para su caracterización por SEM y la otra parte se dejó en polvo para caracterizar por XRD y FT-IR. Las nanopartículas en suspensión se dispersaron mejor que las nanopartículas sintetizadas empleando  $\text{CaCl}_2$  como agente gelificante, por lo que se espera tengan mejor resultado en células y en el modelo animal.

Los resultados de FT-IR indican que se logró obtener un sistema con todos los componentes. Por otra parte, se obtuvieron imágenes de SEM, las cuales indican que se obtuvo una morfología casi uniforme de las nanopartículas. También se realizaron estudios de EDS para determinar la composición de las nanopartículas.

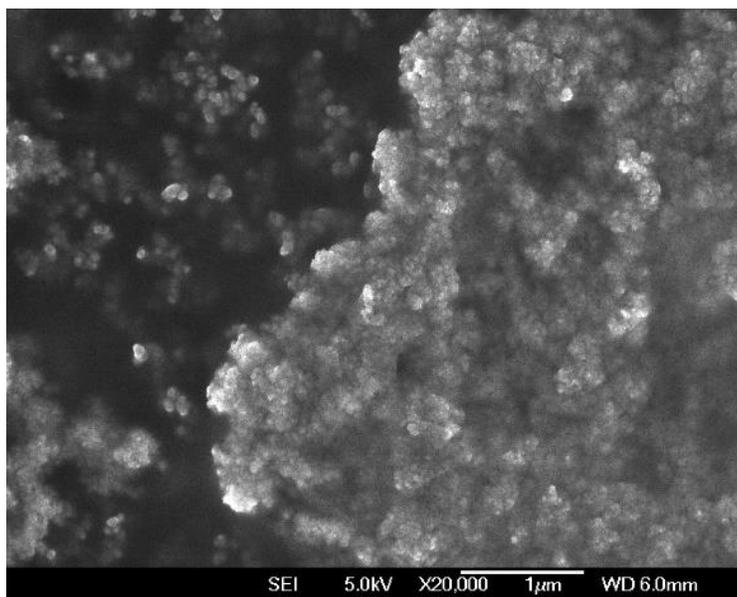


**Figura 40.** Espectro FTIR de las muestras; a) o-carboximetil quitosano y b) nanopartículas de o-

carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 y nanopartículas de magnetita empleando como agente gelificante TPP.

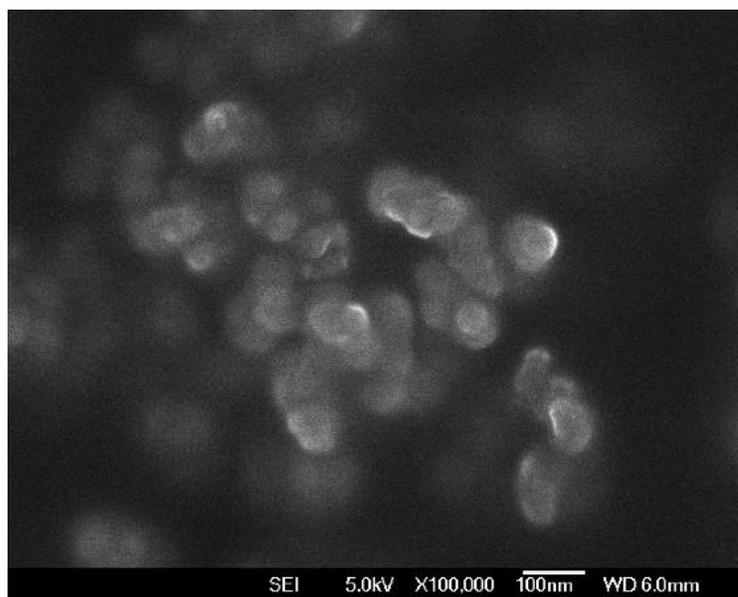
En la figura 40 se tiene el espectro de FT-IR del sistema de nanopartículas formado empleando como agente gelificante al TPP y de forma similar que los espectros mostrados anteriormente para cada uno de los diferentes componentes del sistema, se pueden apreciar las bandas correspondientes a cada uno de los grupos característicos, como el caso del enlace NH y OH en la región cercana a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , el grupo CH cercano a los 3000  $\text{cm}^{-1}$  esto para el espectro a) que representa al o-carboximetil quitosano y el b) que corresponde a las nanopartículas formadas con todos los componentes. La diferencia entre ambos espectros se dé nota en la presencia de la banda que corresponde al enlace Fe-O de la magnetita y que se encuentra en la región de 500-600  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro b). Por lo cual, nos indica que tenemos los grupos que corresponden a cada uno de los componentes en la síntesis.

A continuación, se presentan las micrografías obtenidas por microscopia de SEM para esta muestra de nanopartículas. En la figura 41 se presenta una micrografía en fondo oscuro, con un voltaje de 5 kV, una magnificación de x20 000 y una escala de 1  $\mu\text{m}$ ; donde se aprecia la morfología obtenida para estas nanopartículas.



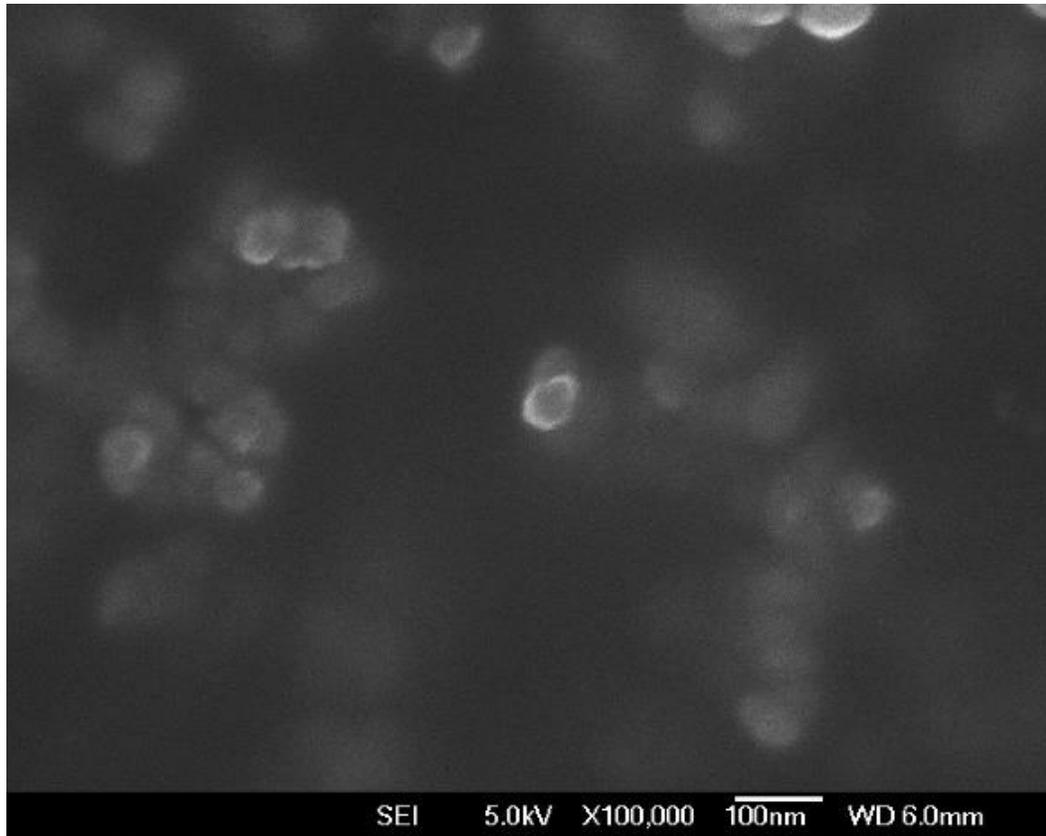
**Figura 41.** Micrografía obtenida por SEM del sistema de nanopartículas formado por o-carboximetil quitosano/quitosano/magnetita/LQM-755 empleando como agente gelificante TPP.

En la figura 42 las nanopartículas se aprecian aglomeradas, sin embargo, puede ser debido al método de preparación de la muestra, ya que, para esta muestra se tomó una alícuota de 40 uL de una suspensión de nanopartículas y se dejó caer sobre cinta de carbón. La muestra se dejó secando en un desecador durante 24 horas y se procedió a montar la muestra en un soporte para el microscopio de SEM. En este caso las nanopartículas se precipitaron y se pudieron haber encimado a causa de que el desecador fue secando el agua contenida en la gota de la muestra. La morfología semiesférica obtenida para cada una de las nanopartículas es muy similar. En esta imagen es difícil determinar el diámetro promedio, pero se nota que tienen un tamaño menor a los 100 nm. En la micrografía de la figura 43 se observa una imagen a 5 kV, una magnificación de x100 000, una escala de 100 nm y se obtuvo en fondo oscuro. Las nanopartículas observadas tienen una morfología similar semiesférica y tienen un diámetro cercano o menor a los 50 nm. Además, tienen una aparente aglomeración entre ellas mismas que puede ser producto de la preparación de las muestras o en función a las propiedades magnéticas que tienen estas mismas, considerando que en ausencia de movimiento este tipo de nanopartículas pueden tener tendencia a precipitarse y aglomerarse.



**Figura 42.** Micrografía obtenida por SEM con un voltaje de 5 KV y una magnificación de x100 000 del sistema de nanopartículas formado por o-carboximetil quitosano/quitosano/magnetita/LQM-755 empleando como agente gelificante TPP.

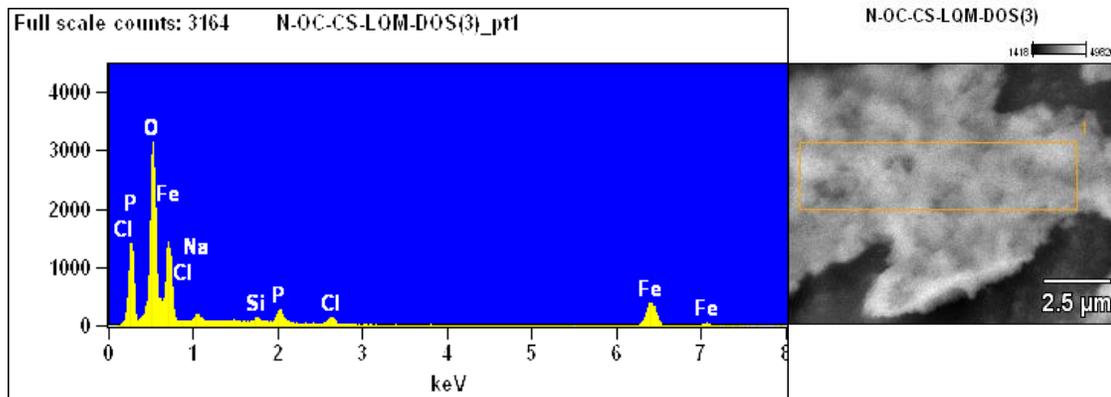
La última micrografía visualiza bajo las mismas condiciones que la micrografía anterior, pero en una diferente zona, lo que permite ver la morfología y el diámetro de estas nanopartículas obtenidas.



**Figura 43.** Micrografía obtenida por SEM con un voltaje de 5 KV y una magnificación de x100 000 del sistema de nanopartículas formado por o-carboximetil quitosano/quitosano/magnetita/LQM-755 empleando como agente gelificante TPP.

Continuando con la caracterización de esta muestra de nanopartículas, se llevó a cabo un análisis de EDS en el microscopio de SEM y los resultados de la composición elemental de una zona seleccionada se aprecian en la figura 44. El análisis elemental muestra los picos característicos de hierro, el cual corresponde a la magnetita. Además, aparecen picos que corresponden a la presencia de oxígeno, el cual está presente tanto en los polímeros quitosano y o-carboximetil quitosano, así como en la magnetita y en el compuesto LQM-755. Por otra parte, se observan picos de sodio y de fósforo que corresponden a los iones generados del TPP disociado. Para confirmar la incorporación

del fármaco en la nanopartícula se aprecian picos de cloro, que está presente en la estructura del análogo y que en este caso es únicamente del LQM-755, ya que, no se utilizó  $\text{CaCl}_2$  para esta síntesis.



**Figura 44.** Espectro de EDS y composición elemental de la muestra nanopartículas poliméricas de o-carboximetilquitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el agente gelificante TPP.

Tabla 3. Cuantificación de la composición elemental obtenida del espectro de EDS de la muestra de nanopartículas poliméricas de o-carboximetilquitosano encapsulando nanopartículas de magnetita y LQM-755 con el agente gelificante TPP.

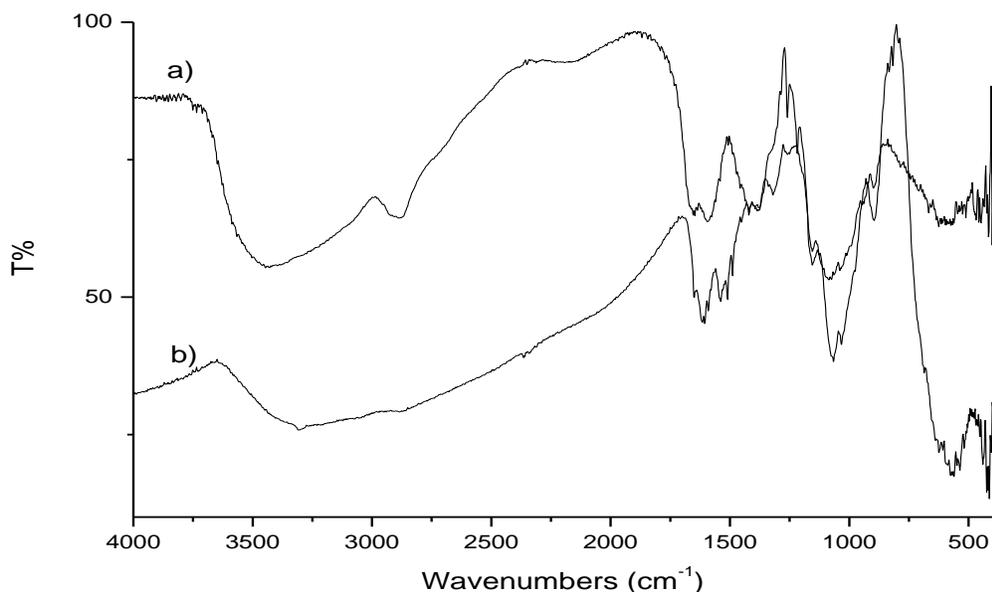
Element Line	ZAF	Elemento Wt. %	Wt. % Error	Atom %	Atom % Error	Compnd Wt. %
O K	1.482	1.59S	---	4.77	+/- 0.03	---
Na K	2.822	4.02	+/-0.52	8.41	+/- 1.09	4.02
Si K	1.358	1.39	+/-0.12	2.38	+/- 0.20	2.98
P K	1.248	4.49	+/-0.28	6.96	+/- 0.43	4.49
Cl K	1.103	2.66	+/-0.27	3.6	+/- 0.36	2.66
Fe K	1.022	85.85	+/-1.91	73.88	+/- 1.64	85.85
		-----		-----		-----
<b>Total</b>		100		100		100

La tabla 3 contiene la cuantificación del análisis elemental de la misma zona que se analizó y muestra el porcentaje de cada uno de los átomos presentes en la muestra. En este caso, el mayor porcentaje se obtuvo para hierro y eso es lo esperado, ya que, el núcleo de las nanopartículas es la magnetita. En cambio, el porcentaje de cloro es menor, sin embargo, esto es normal, porque en la síntesis planteada la cantidad que se utiliza de fármaco respecto al polímero representa un 2% y respecto a la cantidad de

magnetita un 20-30%. Adicionalmente la estructura del LQM-755 solo contiene dos átomos de cloro, por lo que el porcentaje encontrado en el análisis elemental es coherente.

#### VII.11 Nanopartículas poliméricas de LQM-755/ magnetita/o-carboximetilquitosano a baja temperatura

Se procedió a realizar el mismo proceso de encapsulamiento para todos los componentes del sistema con la única variante del polímero sintetizado a baja temperatura. El o-carboximetil quitosano sintetizado a baja temperatura, es totalmente soluble en agua a diferencia del o-carboximetil quitosano sintetizado a 50 grados °C que sólo es parcialmente soluble. Los resultados obtenidos indicaron una disminución en la eficiencia de encapsulación del fármaco por lo que se procedió a emplear una nueva metodología de encapsulación.



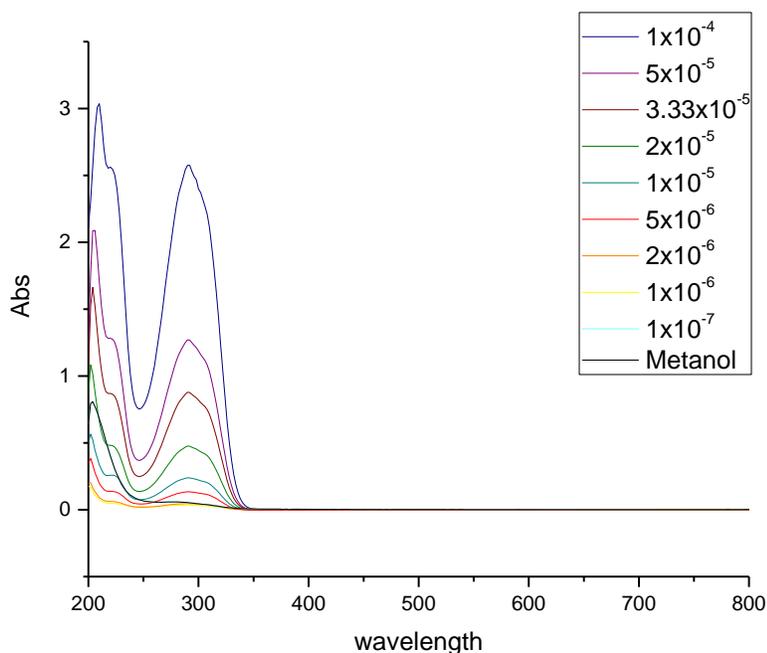
**Figura 45.** Espectro FT-IR de las muestras; a) o-carboximetil quitosano sintetizado a baja temperatura y b) nanopartículas de o-carboximetil quitosano encapsulando el compuesto LQM-755 y nanopartículas de magnetita empleando como agente gelificante TPP.

La figura 45 muestra el espectro de FT-IR de a) el OCMQ sintetizado a baja temperatura, en el espectro se aprecian las vibraciones de tensión características de este

polímero, como, por ejemplo, la banda de absorción en  $3500\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo N-H y el O-H de la estructura y por esa razón el pico se ve ancho. También se aprecia el estiramiento correspondiente al grupo C-H en la región cercana a  $3000\text{ cm}^{-1}$ . El espectro b) muestra las bandas de absorción de las nanopartículas formadas por OCMQ/Quitosano/magnetita/LQM-755; considerando que las bandas absorción de OCMQ y de quitosano son las mismas, sólo el caso del enlace entre C-O y C=O que aparecen en el espectro para el OCMQ picos más intensos.

#### VII.12 Eficiencia de encapsulación

Se llevó a cabo la determinación de la eficiencia de encapsulación por espectroscopia de UV-Vis. Previamente en la figura 44, se aprecia la curva de calibración correspondiente al compuesto LQM-755. Por otra parte, la determinación de la concentración presente en las nanopartículas se lleva a cabo por un método indirecto, ya que es complejo determinar la absorbancia cuando se tienen diferentes componentes presentes en la muestra, que en este caso es el quitosano, el OCMQ, el LQM-755 y las nanopartículas de magnetita que tienen un mayor tamaño que los otros componentes. Por esta razón, después de llevar a cabo la reacción de encapsulación final con todos los componentes, se guarda las aguas madre de esta reacción, y es lo que se utiliza para cuantificar la concentración presente en el volumen que no reacciono y de esta manera determinar indirectamente lo que se encuentra encapsulado en la nanopartícula.



**Figura 46.** Curva de calibración para la concentración del compuesto LQM-755 empleando como vehículo metanol por la técnica de U. V.-vis.

El blanco empleado para este ensayo fue metanol, ya que el análogo LQM-755 es completamente soluble en este solvente. En los ensayos in vitro el solvente empleado fue DMSO, sin embargo, este compuesto es perfectamente soluble en metanol y parcialmente soluble en etanol. En la figura 46, para obtener la gráfica patrón y poder obtener la ecuación de la recta, se tomaron los picos más altos correspondientes a cada una de las diferentes concentraciones. El valor máximo para la concentración fue de  $1 \times 10^{-4}$ , ya que a mayor concentración la lectura en el equipo hace imposible la cuantificación por la saturación de la muestra. Por otro lado, la lectura más baja correspondiente a la menor concentración fue de  $1 \times 10^{-7}$ , ya que, a concentraciones más bajas, la absorbancia es casi indetectable para el equipo.

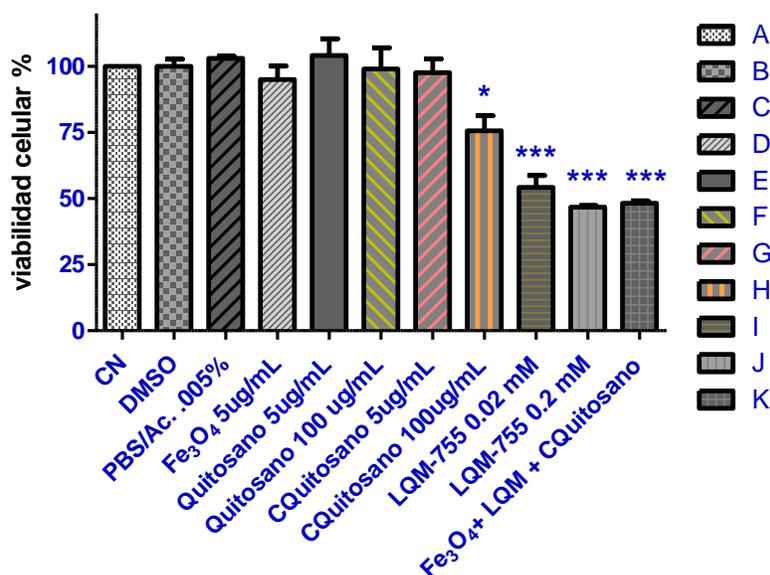
La muestra obtenida de las aguas madre tuvo que ser diluida, debido a que está saturada del compuesto LQM-755. Sin embargo, estos factores de dilución se contemplaron para poder hacer una aproximación más precisa de la concentración cargada en la nanopartícula, que fue de aproximadamente un 70-80%.

El método empleado sugiere una atracción de los átomos de hierro por los átomos de oxígeno presentes en el análogo LQM-755, posteriormente la incorporación de ambos polímeros quitosano y OCMQ rodean estas nanopartículas y al momento de agregar el agente gelificante, que para este trabajo se emplearon dos ( $\text{CaCl}_2$  y TPP), se atrapa todo aquello que rodea a las nanopartículas de magnetita. Por esta razón, y después de apreciar las imágenes de SEM y TEM, se considera que es la forma en que se generan estas nanopartículas.

### VII.13 Ensayo de viabilidad celular (MTT) con nanopartículas de quitosano/o-carboximetilquitosano/ magnetita/ LQM-755

Para determinar el efecto de las nanopartículas sintetizadas y cargadas con LQM-755, se llevó a cabo un estudio de viabilidad celular por la técnica de MTT a las 24 horas sobre la línea de células de cáncer de pulmón A549. Para determinar el efecto de cada uno de los componentes de la nanopartícula, se decidió nuevamente evaluar por separado cada material y los resultados se muestran en la Figura 47. Como control se manejó diferentes preparaciones, ya que, algunos de los materiales no son solubles en agua desionizada, como el caso del polímero quitosano y el LQM-755.

**MTT 24h células A549**

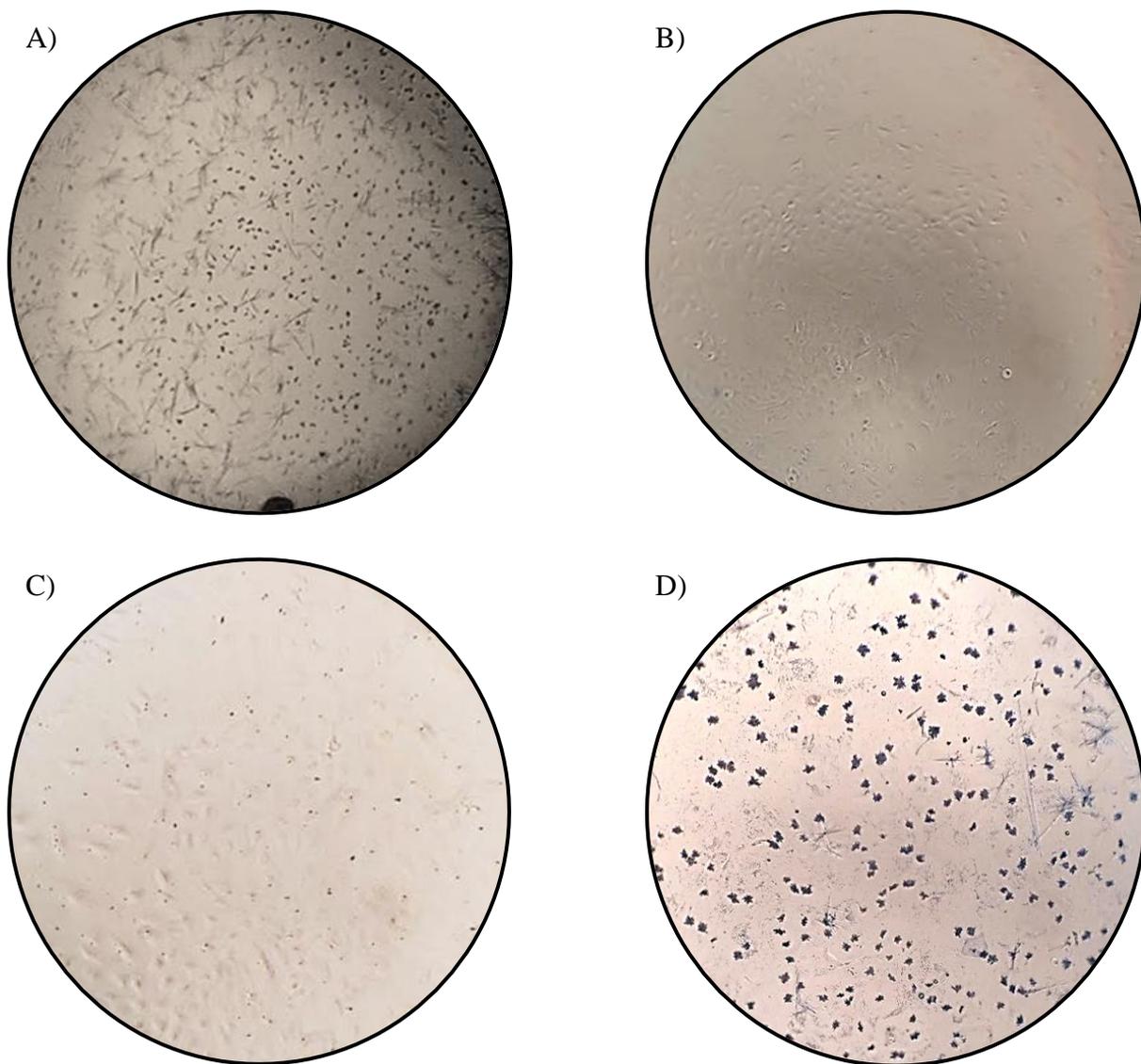


**Figura 47.** Ensayo de viabilidad celular por la técnica de MTT en un tiempo de 24 horas con la línea celular A549, A, B, C son los respectivos controles; D corresponde a únicamente nanopartículas de magnetita sin recubrir a una concentración de 5 ug/mL; E, F corresponden al polímero quitosano sin modificar disuelto en una mezcla de PBS/ácido acético al 0.005% para poder disolverlo; G y H es el polímero modificado o-carboximetil quitosano disuelto en agua desionizada; I y J es el compuesto LQM-755 administrado por separado y disuelto en DMSO a diferentes concentraciones; K son las nanopartículas formadas por magnetita y el fármaco LQM-755 a una concentración aproximada de 0.02 mM recubiertas con los polímeros quitosano/o-carboximetil quitosano.

En la figura 47, la barra A corresponde al control, es decir, las células sin administrar nada, la barra B son células en DMSO, y la barra C son células en una mezcla de PBS/Ácido acético ya que, el quitosano no es soluble en el medio de cultivo. Para estos tres casos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa. La barra D corresponde a células administradas con nanopartículas de magnetita sin funcionalizar a una concentración de 5 ug/mL que es la concentración aproximada que se utilizó en las nanopartículas y tampoco se encontró un efecto significativo respecto al grupo control. Las barras E y F, corresponden a células administradas con el polímero quitosano a una concentración de 5 y 100 ug/mL y no se encontró disminución en la viabilidad celular de manera significativa. Las barras G y H son células administradas con el OCMQ a concentraciones de 5 y 100 ug/mL y en este caso si se encontró un efecto significativo para la concentración de 100 ug/mL respecto a los controles. Un efecto cercano al 20% de inhibición de la viabilidad celular. Las barras I y J corresponden a células administradas con el compuesto LQM-755 a una concentración de 0.02 y 0.2 mM; en ambos casos se encontró un efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad celular en un 50% para el caso de la concentración de 0.02 mM y un poco superior para la concentración de 0.2 mM. Finalmente, la barra K son células administradas con el sistema completo de nanopartículas poliméricas formadas por todos los componentes (magnetita, quitosano, OCMQ y LQM-755) y se obtuvo un efecto similar al 50% de inhibición sobre la viabilidad celular. Cabe mencionar que la concentración empleada para cada uno de los componentes es aproximada; en el caso de los polímeros y la magnetita es fracción en peso de quitosano y magnetita empleada en ug y para el caso del LQM-755 cargado en nanopartículas; se ajustó de acuerdo con la concentración de análogo sin reaccionar presente en las aguas madre y la

concentración empleada en la barra K corresponde a 0.02 de LQM-755 en la nanopartícula.

Después de determinar la eficacia empleando los componentes por separado, se encontró que se obtuvo un mayor efecto sobre la viabilidad celular cuando se tiene presente los tres componentes en la nanopartícula propuesta. Por otra parte, se tomaron imágenes de algunos de los pozos donde se llevó a cabo la administración para el ensayo de MTT. La figura 48 tiene 4 paneles de los principales grupos. El panel A son células A549 administradas con el análogo LQM-755 a una concentración de 0.02 mM disuelto en DMSO.



**Figura 48.** Imágenes obtenidas con microscopio óptico normal con aumento de 40x 24 horas después de administrar diferentes grupos sobre la línea de células de cáncer de pulmón A549. A) Compuesto LQM-755 disuelto en DMSO a una concentración de 0.02 mM. B) Grupo control sin administrar. C) Nanopartículas de magnetita disueltas en agua desionizada a una concentración de 5 ug/mL D) Compuesto LQM-755 administrado a una concentración de 0.2 mM.

En el panel A de la imagen 48 se observan los cristales formados por el compuesto sin disolver, ya que el compuesto es soluble en DMSO, sin embargo, una vez que el compuesto se encuentra en medio acuoso una parte se precipita y forma cristales como se aprecian en la imagen en forma de estrellas. Los puntos negros corresponden a células muertas recordando que este grupo no fue administrado con nanopartículas de magnetita, solo LQM-755 disuelto en DMSO. El panel B son las imágenes de las células de cáncer de pulmón sin administrar. En la imagen se aprecia la morfología característica para este tipo de células epiteliales reportado por ATCC. Por otro lado, el panel C corresponde al grupo administrado únicamente con nanopartículas de magnetita sin funcionalizar a una concentración de ug/mL. En esta imagen se puede observar algunos puntos negros formados por nanopartículas de magnetita, este tipo de partículas sin funcionalizar tienen tendencia a aglomerarse y precipitarse, por lo que podría ser lo que se aprecia en la imagen, ya que, después de hacer el estudio de viabilidad por MTT no se encontró efecto estadísticamente significativo comparado con el control. El panel D son las imágenes de células cancerosas de pulmón administradas con una concentración diez veces superior del compuesto LQM-755 que la observada en el panel A.

#### VII.14 Modelo de xenoinjerto con células A549 en ratones NSG

Para llevar a cabo el modelo de xenoinjerto sobre ratones NSG se utilizaron  $2 \times 10^6$  de células de la línea de cáncer de pulmón A549. No se tienen antecedentes de este modelo con el tipo de células en la cepa NSG, por lo que se decidió utilizar una menor cantidad de células de las que habitualmente se usan para ratones inmuno deprimidos de aproximadamente 10 millones de células para la cepa nu/nu. Como se aprecia en la figura 49, el modelo tiene una duración de 6 semanas, ya que, sin administrar ningún fármaco el tumor alcanza un centímetro y medio de diámetro en este tiempo, por lo que siguiendo los protocolos de manejo de animales se procede al sacrificio para evitar que

los animales tengan un mayor sufrimiento. En los primeros 10 días después de la inoculación de las células no se aprecia la formación del tumor, sin embargo, a los 14 se aprecia la formación del botón de aproximadamente 3-4 mm de diámetro. Por otra parte, al paso de la cuarta semana después de la inoculación, el crecimiento del tumor es exponencial al paso de los días. En la figura 47, el panel A muestra una imagen de un ratón después de 14 días de haber sido inoculado y sin tratamiento. El panel B corresponde al mismo ratón a las tres semanas de haber sido inoculado, con un diámetro de más de 5 mm. El panel C) es el mismo ratón, pero pasadas cuatro semanas de haber sido inoculado y sin tratamiento, el diámetro mide poco más de 1 cm. El modelo en general se comportó de manera similar en los ratones y sin generar metástasis en otros órganos. Por lo que, fue muy reproducible para llevar a cabo las administraciones de los diferentes grupos.

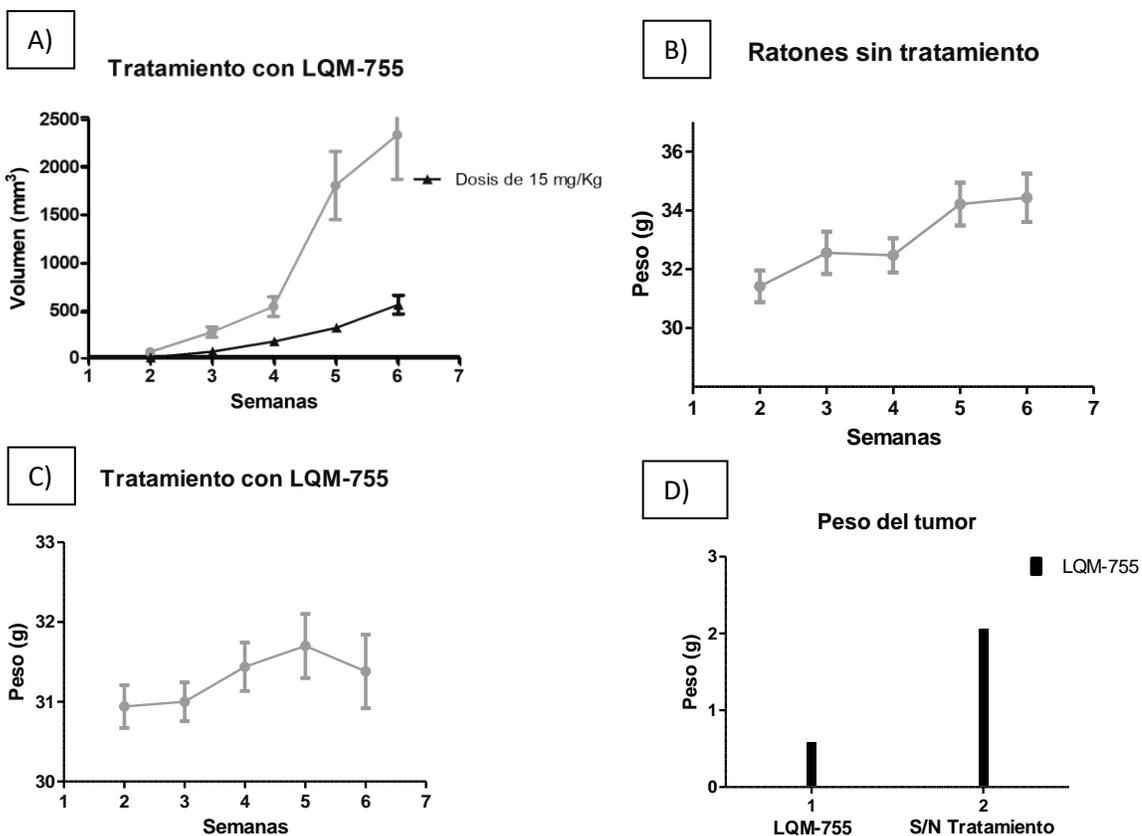


**Figura 49.** Evolución del tumor en un ratón sin administrar al paso de 3 semanas después de haber sido inoculados con  $2 \times 10^6$  de células de cáncer de pulmón A549 en el flanco derecho.

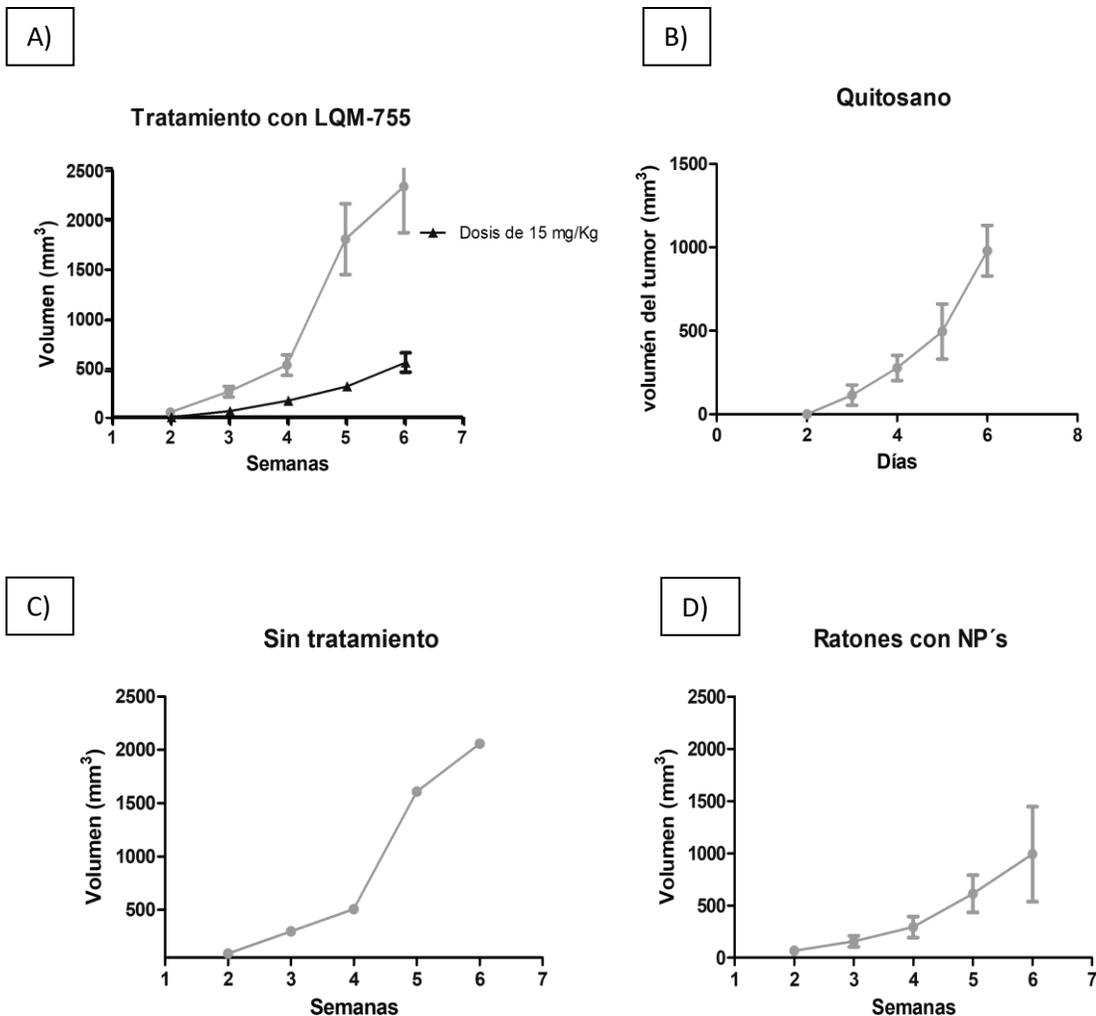
#### VII.15 Modelo de xenoinjerto con células A549 administrados con LQM-755

Para determinar la eficacia del compuesto LQM-755 en ratones, se administró una dosis similar a una reportada para un modelo en ratas previamente con otro análogo de CAPE y que había generado resultados importantes sobre cáncer de hígado. La dosis empleada fue de 15 mg/Kg de peso del ratón. En el panel A) de la figura 50 se presentan dos curvas, la primera corresponde a ratones no administrados y la segunda representa a ratones administrados con la dosis de 15 mg/Kg de peso. Pasadas las seis semanas se aprecia un diámetro menor para ratones administrados que para ratones sin tratamiento.

Cabe mencionar que en ambos casos hay una tendencia de aumento en el diámetro del tumor. En la figura 51 se tiene los resultados en los diferentes grupos evaluados. En el panel A, se aprecia la gráfica de la evolución del tumor para ratones administrados únicamente con el compuesto LQM-755, la gráfica B) corresponde a ratones administrados con el polímero quitosano; la gráfica C) corresponde a ratones sin administrar, y finalmente el panel D) contiene los resultados correspondientes a los ratones tratados con el sistema de nanopartículas propuesto. Los resultados obtenidos demuestran que la evolución del tamaño tumoral se ve disminuido en el caso de los ratones tratados con LQM-755. El quitosano por otra parte, no genero ningún efecto sobre el desarrollo del tumor al paso de los días. Respecto a los ratones administrados vía intraperitoneal con el sistema de nanopartículas propuesto, se aprecia un menor desarrollo del tumor, pero no similar al efecto observado administrando el fármaco por separado, esto puede deberse a que la concentración del fármaco cargado en la nanopartícula puede haber sido menor a la que se pretendió utilizar, ya que, los métodos para la determinación de la concentración son indirectos.



**Figura 50.** Resultados obtenidos empleando el modelo de xenoinjerto en ratones de la cepa NSG administrados con los diferentes grupos de estudio. A) Evolución del diámetro tumoral en ratones administrados con LQM-755 con una dosis de 15 mg/Kg y ratones sin administrar. B) Evaluación del peso en gramos del tumor en ratones sin administrar. C) Resultados del peso del tumor en gramos al paso de 6 semanas en ratones administrados con LQM-755. D) Gráfica comparativa del peso tumoral en ratones administrados con LQM-755 y ratones sin administrar.



**Figura 51.** Resultados obtenidos empleando el modelo de xenoinjerto en ratones de la cepa NSG administrados con los diferentes grupos de estudio. A) Evolución del diámetro tumoral en ratones administrados con LQM-755 con una dosis de 15 mg/Kg y ratones sin administrar. B) Ratones administrados con quitosano. C) Ratones sin tratamiento. D) Ratones administrados con el sistema de nanopartículas propuesto.

## VIII. CONCLUSIONES

El análogo LQM-717 no presento una diferencia significativa en las curvas concentración respuesta con la línea de cáncer A549, por lo que no tendría caso realizar estudios posteriores sobre cáncer de pulmón; sin embargo, si se tienen antecedentes importantes para este compuesto en otros tipos de cáncer, como, por ejemplo, cáncer de hígado, por lo que no se descarta su uso en otras enfermedades.

Se determinó el efecto antiproliferativo del compuesto LQM-755 en células de cáncer de pulmón A549. El efecto fue similar al reportado por el compuesto CAPE sobre la misma línea de células de cáncer de pulmón, por lo que podría ser una alternativa para pruebas posteriores como posible agente anticancerígeno.

Se sintetizó y se caracterizó de manera satisfactoria la magnetita siguiendo los métodos de síntesis consultados en la literatura. El método de coprecipitación es uno de los métodos más empleados para la síntesis de magnetita por su bajo costo y por llevar a cabo síntesis amigable con el medio ambiente, ya que solo genera nanopartículas y moléculas de agua como producto, así como cloruro de sodio.

La síntesis de nanopartículas magnetita con el polímero quitosano y o-carboximetil quitosano se llevó a cabo con un buen rendimiento, como primer paso para la obtención de las nanopartículas poliméricas con el compuesto a evaluar que fue el LQM-755 por los buenos resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular.

Se sintetizo de o-carboximetilquitosano a baja temperatura, debido a que las primeras nanopartículas obtenidas con este polímero con un proceso de alcalinización a temperatura ambiente, género que no fueran del todo solubles en un ambiente acuoso, por lo que la dispersión no fue la adecuada. Las nanopartículas sintetizadas con él o-carboximetil quitosano a baja temperatura, presentaron una mayor solubilidad en el medio para las pruebas de viabilidad celular.

La síntesis de nanopartículas poliméricas con quitosano y o-carboximetil quitosano obtenido a baja temperatura se llevó a cabo con un buen rendimiento y se logró demostrar la encapsulación del análogo seleccionado que fue el LQM-755.

Se pudo determinar la concentración de LQM-755 presente en las nanopartículas por medio de espectroscopía UV-Vis. Aunque es un método indirecto se logró tener una estimación de la concentración del compuesto LQM-755 presente en las nanopartículas, para poder llevar estudios posteriores. Existen otros métodos para la determinación de la concentración en las nanopartículas, sin embargo, depende de la naturaleza de la nanopartícula, elementos que la conforman, así como los procesos de síntesis empleados para tratar de obtener estos valores, por lo que técnicas como TGA, UV-vis, RMN y espectrometría de masas, son las más empleadas pero, no todas las nanopartículas son candidatas para poder hacer uso de algunos de estos métodos, por esa razón, aun se continua en el desarrollo y búsqueda de métodos que permitan obtener estos valores de concentración de fármacos en la nanopartícula de una forma más precisa.

Se llevo a cabo la estandarización del modelo de xenoinjerto en ratones inmunodeprimidos de la cepa NSG y se administraron los grupos experimentales. El modelo de xenoinjerto en esta cepa de ratones con células de cáncer A549 no ha sido reportada con anterioridad, por lo que, se estableció un protocolo empleando un menor número de células cancerosas para poder permitir que el modelo durara al menos mes y medio. Esto se estableció para poder llevar a cabo un tratamiento y poder evaluar en tiempo determinado la administración del fármaco y tener una mayor certeza del efecto obtenido.

El efecto obtenido en ratones administrados con el compuesto LQM-755 fue positivo, ya que permitió determinar que los tumores no continuaron desarrollándose a la misma velocidad que en el caso de los ratones sin administrar, donde los tumores después de mes y medio tenían un diámetro mayor a 1.5 cm. Por lo que el tiempo de sobrevivencia para ratones administrados seguramente seria mayor que para ratones con cáncer, que es algo que se busca con el desarrollo de nuevos fármacos, ya que la expectativa de vida después del diagnóstico de cáncer de pulmón es menor a 3 años. Sin embargo, faltan estudios posteriores para determinar el mecanismo de este compuesto y aumentar

la eficacia con el uso de las nanopartículas, además de disminuir los efectos tóxicos que puedan presentarse recordando que este compuesto también genera efecto citotóxico en fibroblastos normales.

## IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda llevar a cabo estudios posteriores para determinar el mecanismo de acción del análogo LQM-755 y compararlo con el obtenido cuando está encapsulado en nanopartículas.

Llevar a cabo diferentes condiciones de reacción para determinar la que permita obtener un mayor rendimiento de encapsulación del compuesto LQM-755.

Buscar nuevos métodos para determinar la concentración del fármaco cargado en nanopartícula, descartando espectrometría de masas y RMN, ya que la naturaleza de la nanopartícula no permite el uso de estas técnicas.

Llevar a cabo estudios en esta misma cepa de ratones, pero generando cáncer directamente en el pulmón y utilizar otra vía de administración, para poder simular más a lo que ocurre realmente con este tipo de cáncer de pulmón en condiciones normales.

Generar un método de administración con nebulizador con las nanopartículas para evaluar el efecto directamente en los pulmones.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Anitha, A., Divya Rani, V. v., Krishna, R., Sreeja, V., Selvamurugan, N., Nair, S. v., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2009). Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 672–677. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.028>
- Bai, X., Kong, M., Xia, G., Bi, S., Zhou, Z., Feng, C., Cheng, X., & Chen, X. (2017). Systematic investigation of fabrication conditions of nanocarrier based on carboxymethyl chitosan for sustained release of insulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.181>
- Chang, A. (2011). Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer*, 71(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.08.022>
- Chen, M., Yamamuro, S., Farrell, D., & Majetich, S. A. (2003). Gold-coated iron nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Applied Physics*, 93(10), 7551–7553. <https://doi.org/10.1063/1.1555312>
- Chen, M.-F., Wu, C.-T., Chen, Y.-J., & Chen, W.-C. (2004). Cell Killing and Radiosensitization by Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in Lung Cancer Cells. *Journal of Radiation Research*, 45(2), 253–260. <https://doi.org/10.1269/jrr.45.253>
- Chen, X. G., & Park, H. J. (2003). Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. *Carbohydrate Polymers*, 53(4), 355–359. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00051-1)
- Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. (2004). *New England Journal of Medicine*, 350(4), 351–360. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031644>
- Daou, T. J., Pourroy, G., Bégin-Colin, S., Grenèche, J. M., Ulhaq-Bouillet, C., Legaré, P., Bernhardt, P., Leuvrey, C., & Rogez, G. (2006). Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 18(18), 4399–4404. <https://doi.org/10.1021/cm060805r>
- Deng, Y., Wang, L., Yang, W., Fu, S., & Elaïssari, A. (2003). Preparation of magnetic polymeric particles via inverse microemulsion polymerization process.

- Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 257(1), 69–78.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(02\)00987-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-8853(02)00987-3)
- Du, J., & Jing, C. (2011). Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag SERS substrate and its application in environmental Cr(VI) analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 358(1), 54–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.02.044>
- Fu, R., Jin, X., Liang, J., Zheng, W., Zhuang, J., & Yang, W. (2011). Preparation of nearly monodispersed Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> composite particles from aggregates of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 21(39), 15352–15356. <https://doi.org/10.1039/C1JM11883H>
- Galip Yildiz, O., Soyuer, S., Saraymen, R., & Eroglu, C. (2008). *Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on radiation induced lung injury in rats.*
- Goenka, S., Sant, V., & Sant, S. (2014). Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 173, 75–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.017>
- Jadhav, N. v., Prasad, A. I., Kumar, A., Mishra, R., Dhara, S., Babu, K. R., Prajapat, C. L., Misra, N. L., Ningthoujam, R. S., Pandey, B. N., & Vatsa, R. K. (2013). Synthesis of oleic acid functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.02.035>
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. v., Tokura, S., Tamura, H., & Selvamurugan, N. (2010). Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. In *Progress in Materials Science* (Vol. 55, Issue 7, pp. 675–709). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2010.03.001>
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Jolivet, J.-P., Chanéac, C., & Tronc, E. (2004). Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chemical Communications*, 5, 481–483. <https://doi.org/10.1039/B304532N>
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064–2110. <https://doi.org/10.1021/cr068445e>

- Macías-Pérez, J. R., Beltrán-Ramírez, O., Vásquez-Garzón, V. R., Salcido-Neyoy, M. E., Martínez-Soriano, P. A., Ruiz-Sánchez, M. B., Ángeles, E., & Villa-Treviño, S. (2013). The effect of caffeic acid phenethyl ester analogues in a modified resistant hepatocyte model. *Anti-Cancer Drugs*, *24*(4).  
[https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Fulltext/2013/04000/The\\_effect\\_of\\_caffeic\\_acid\\_phenethyl\\_ester.8.aspx](https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Fulltext/2013/04000/The_effect_of_caffeic_acid_phenethyl_ester.8.aspx)
- Metallic Nanoparticles*. (n.d.).
- Mizutani, N., Iwasaki, T., Watano, S., Yanagida, T., Tanaka, H., & Kawai, T. (2008). Effect of ferrous/ferric ions molar ratio on reaction mechanism for hydrothermal synthesis of magnetite nanoparticles. *Bulletin of Materials Science*, *31*(5), 713–717. <https://doi.org/10.1007/s12034-008-0112-3>
- Mulvaney, P., Liz-Marzán, L. M., Giersig, M., & Ung, T. (2000). Silica encapsulation of quantum dots and metal clusters. *Journal of Materials Chemistry*, *10*(6), 1259–1270. <https://doi.org/10.1039/B000136H>
- Murtaza, G., Karim, S., Akram, M. R., Khan, S. A., Azhar, S., Mumtaz, A., & bin Asad, M. H. H. (2014). Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. In *BioMed Research International* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/145342>
- Muzzarelli, R. A. A. (1988). Carboxymethylated Chitins and Chitosans. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 8).
- Oan, J., Chiller, H. S., Avid, D., Arrington, H., Handra, C., Elani, P. B., Orey, C., Anger, L., Lan, A., Andler, S., Ames, J., Rook, K., Unming, J., Hu, Z., & Ohnson, P. H. D. J. (2002). The New England Journal of Medicine COMPARISON OF FOUR CHEMOTHERAPY REGIMENS FOR ADVANCED NON-SMALL-CELL LUNG CANCER Background We conducted a randomized study to. In *J Med* (Vol. 346, Issue 2). [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
- Oropeza, S., Corea, M., Gómez-Yáñez, C., Cruz-Rivera, J. J., & Navarro-Clemente, M. E. (2012). Zero-valent iron nanoparticles preparation. *Materials Research Bulletin*, *47*(6), 1478–1485.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.02.026>
- Ozturk, G., Ginis, Z., Akyol, S., Erden, G., Gurel, A., & Akyol, O. (2012). The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Review of melanomas, lung and prostate cancers. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *16*, 2064–2068.

- Paumier, A., & le Péchoux, C. (2010). Radiotherapy in small-cell lung cancer: Where should it go? *Lung Cancer*, *69*(2), 133–140.  
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.04.019>
- Pileni, M.-P., & Duxin, N. (2001). Micelle technology for magnetic nanosized alloys and composites. *Chemical Innovation*, *30*, 25–33.
- Quiñones, J. P., Peniche, H., & Peniche, C. (2018). Chitosan based self-assembled nanoparticles in drug delivery. In *Polymers* (Vol. 10, Issue 3). MDPI AG.  
<https://doi.org/10.3390/polym10030235>
- Rodriguez, E., & Lilenbaum, R. C. (2010). Small Cell Lung Cancer: Past, Present, and Future. *Current Oncology Reports*, *12*(5), 327–334.  
<https://doi.org/10.1007/s11912-010-0120-5>
- Sandler, A. B., Nemunaitis, J., Denham, C., von Pawel, J., Cormier, Y., Gatzemeier, U., Mattson, K., Manegold, Ch., Palmer, M. C., Gregor, A., Nguyen, B., Niyikiza, C., & Einhorn, L. H. (2000). Phase III Trial of Gemcitabine Plus Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Locally Advanced or Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *18*(1), 122. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.1.122>
- Santos, D. P., Ruiz, M. A., Gallardo, V., Zanoni, M. V. B., & Arias, J. L. (2011). Multifunctional antitumor magnetite/chitosan-L-glutamic acid (core/shell) nanocomposites. *Journal of Nanoparticle Research*, *13*(9), 4311–4323.  
<https://doi.org/10.1007/s11051-011-0378-z>
- Schulte, J., & Dutta, J. (2005). Nanotechnology in environmental protection and pollution. *Science and Technology of Advanced Materials*, *6*(3–4), 219–220.  
<https://doi.org/10.1016/j.stam.2005.03.009>
- SCHWARZER, H.-C., & PEUKERT, W. (2004). TAILORING PARTICLE SIZE THROUGH NANOPARTICLE PRECIPITATION. *Chemical Engineering Communications*, *191*(4), 580–606. <https://doi.org/10.1080/00986440490270106>
- Sellers, K., Mackay, C., Bergeson, L. L., Clough, S. R., Hoyt, M., Chen, J., Henry, K., & Hamblen, J. (2008). *Nanotechnology and the Environment*. CRC Press.  
<https://books.google.com.ec/books?id=4OY1JzUiHgC>
- Sun, S., & Zeng, H. (2002). Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, *124*(28), 8204–8205.  
<https://doi.org/10.1021/ja026501x>

- Thompson. (n.d.). *The Health Consequences of Smoking*.
- Upadhyaya, L., Singh, J., Agarwal, V., & Tewari, R. P. (2014). The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 186, pp. 54–87). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.043>
- Wang, J., Peng, Z., Huang, Y., & Chen, Q. (2004). Growth of magnetite nanorods along its easy-magnetization axis of [110]. *Journal of Crystal Growth*, 263(1), 616–619. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2003.11.102>
- Wiesner, M. R., & Bottero -Y, J. (2007). *Environmental nanotechnology: Applications and impacts of nanomaterials*. McGraw-Hill. [https://heronet.epa.gov/heronet/index.cfm/reference/download/reference\\_id/1239631](https://heronet.epa.gov/heronet/index.cfm/reference/download/reference_id/1239631)
- Wozniak, A. J., Crowley, J. J., Balcerzak, S. P., Weiss, G. R., Spiridonidis, C. H., Baker, L. H., Albain, K. S., Kelly, K., Taylor, S. A., Gandara, D. R., & Livingston, R. B. (1998). Randomized trial comparing cisplatin with cisplatin plus vinorelbine in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, 16(7), 2459–2465. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.7.2459>
- Zhang, L., He, R., & Gu, H. C. (2006). Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science*, 253(5), 2611–2617. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.05.023>
- Zheng, M., Han, B., Yang, Y., & Liu, W. (2011). Synthesis, characterization and biological safety of O-carboxymethyl chitosan used to treat Sarcoma 180 tumor. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.038>

# Physicochemical properties of pullulan/chitosan/graphene oxide composite films

Ramón Román-Doval,<sup>a,d</sup> Alejandro Gómez-Sánchez,<sup>b,c</sup> Elmer Joel Millán-Casarrubias,<sup>b</sup> Evgen Prokhorov,<sup>c</sup> Fernando Montejo-Alvaro,<sup>d</sup> Andres de Luna Bugallo,<sup>e</sup> Montserrat Hernández-Iturriaga,<sup>a</sup> Marla Leal-Cervantes,<sup>a</sup> Gabriel Luna-Barcenas<sup>c,\*</sup> and Sandra Mendoza<sup>a,\*</sup>

## Abstract

We report the production of pullulan (Pul)/chitosan (Chi)/graphene oxide (GO) composite films (CF-Pul/Chi + GO). We observed that the addition of GO increases the film's roughness while keeping good GO dispersion. Both the strong interactions between Pul and Chi and the formation of hydrogen bonds between Chi and GO seem to be responsible for the formation of the composite film. The dielectric constant, Young's modulus and the tensile strength of the CF-Pul/Chi + GO films exhibit maximum values at 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO concentration. At GO concentrations higher than 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the interfacial layers between the polymer matrix and GO overlap, affecting the value of the dielectric constant and the mechanical properties of the films. Moreover, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay carried out on LL47 fibroblast cells reveals that the CF-Pul/Chi + 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO films are not cytotoxic. In this regard, CF-Pul/Chi 50/50 + 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO has remarkable properties to be considered for a safe film with potential uses in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

© 2022 Society of Industrial Chemistry.

**Keywords:** pullulan; chitosan; graphene oxides; biocomposite

## INTRODUCTION

Composite polymeric films have been widely used for various applications such as tissue engineering, cosmeceuticals, food packaging and as conductive films for different purposes.<sup>1–3</sup> The composition of the films defines their physical and chemical properties which are often chosen on the basis of the application foreseen. While sometimes the combination of polymers produces homogeneous blends resulting in films with improved properties, at other times the film properties are inadequate for the application area and therefore other support materials such as microparticles and nanoparticles are employed. The choice of these particles will also depend on the properties which need to be improved and, in this context, chitosan (Chi) and pullulan (Pul) were selected in this work so that a composite polymeric film from generally recognized as safe (GRAS) components could be prepared, characterized and eventually used for different purposes.

In this context, Pul is a polysaccharide synthesized by *Aureobasidium pullulans* that exhibits high hydrophilic, mechanical strength and thermal stability properties. Furthermore, Pul does not cause toxicological, mutagenic and carcinogen effects in humans.<sup>4</sup> On the other hand, Chi is another polysaccharide with antimicrobial activity, acceptable mechanical properties, low oxygen permeability and surfactant properties.<sup>5,6</sup>

Chi/Pul films<sup>4,6</sup> and nanoparticles<sup>7</sup> have been developed. Although blending polymers is a common and versatile method to improve polymer film properties,<sup>8,9</sup> polymer nanocomposites

have been explored using nanoparticles and nanocrystals to enhance the thermal, mechanical, dielectric, antibacterial and barrier properties of films.<sup>10–12</sup> Graphene oxides (GOs) are nanomaterials that have been incorporated into polymeric matrices such as polypropylene, polyvinyl alcohol, polystyrene, polyvinylidene fluoride, Chi and silicone foam, amongst others.<sup>13–17</sup> The polymer

\* Correspondence to: S. Mendoza, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Santiago de Querétaro C.P. 76010, Querétaro Mexico. E-mail: smendoza@uaq.mx (Mendoza); or G. Luna-Barcenas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Querétaro, Libramiento Norponiente #2000, Fracc. Real de Juriquilla, C.P. 76230, Querétaro Mexico. E-mail: gabriel.luna@investav.mx (Luna-Barcenas)

a Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro, Mexico

b Programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México, Mexico

c Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Querétaro, Querétaro, Mexico

d Instituto Tecnológico Del Valle de Etla, Tecnológico Nacional de México, Oaxaca, México

e Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

composites reinforced with GO exhibited considerable improvements in tensile strength, elastic modulus, thermal stability and dielectric properties. These enhancements are observed at moderate loadings as a result of the structure of GO and the large interfacial area.<sup>9,18–20</sup> Based on the relevant literature, the polymeric mixture of Pul and Chi shows good affinity (which depends on the amino groups of the Chi<sup>4,6–8</sup>) and therefore addition of GO to the Pul/Chi blend should result in films with improved physicochemical properties. There are few studies dealing with Pul/Chi blending and, so far, we have not found studies of Pul/Chi composites loaded with GO. In this context, this study aims to develop a Pul/Chi nanocomposite with low concentrations of GO to strengthen the mechanical properties of the composite. Our results describe the film-forming, mechanical, dielectric and swelling properties. Also, the antimicrobial and cytotoxic properties of the composites were evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Pul was supplied from TCI America (Portland, OR, USA); Chi (300 kDa, 82% degree of deacetylation), graphene oxide nanocolloid (2 mg mL<sup>-1</sup>) and acetic acid (ACS reagent, >99.7 %) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). A normal lung human cell line (LL47 (MaDo) CCL-135) was acquired from American Type Culture Collection (ATCC). The LL47 cell line was grown in a monolayer culture.

### Preparation of the composite film

Pul/Chi composite films with GO (CF-Pul/Chi + GO) were prepared by the casting/solvent evaporation technique. To obtain the polymeric solutions, Pul was dissolved in deionized water (9% w/v) and Chi (1% concentration, w/v) was dissolved in a solution of acetic acid (2%). Polymeric blend solutions were prepared at different ratios (Pul/Chi, 75/25, 50/50, 25/75 v/v %), stirred using an ULTRA-TURRAX (IKA, T18 basic) for 7 min at 22 000 rpm, dispersed 10 mL into a polystyrene Petri plate and dried in the oven at 50 °C for 24 h. The films were labeled Pul/Chi 75/25, 50/50, 25/75.

To prepare composites containing GO, the oxide suspensions were added to the Pul/Chi blend solutions to reach concentrations of 2 and 3 µg mL<sup>-1</sup> GO. Six colloidal solutions were used to prepare the GO composite films (Pul/Chi 75/25 + 2GO, 50/50 + 2GO, 25/75 + 2GO and 75/25 + 3GO, 50/50 + 3GO, 25/75 + 3GO).

### Morphology

The morphologies of the composite films (CF) with and without GO (CF-Pul/Chi + GO and CF-Pul/Chi) were determined using field emission SEM (JEOL, JSM-7610F) at 2 kV and AFM (Bruker Innova). Post-process imaging was achieved employing Gwydion software in order to delete polynomial backgrounds in the films' roughness determination and to align adjacent rows.

### Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy

Molecular interactions of the composite films were evaluated by ATR-FTIR spectroscopy (Spectrum GX, PerkinElmer). Spectra were obtained from an average of 30 scans in the wavenumber interval between 4000 cm<sup>-1</sup> and 650 cm<sup>-1</sup>.

### Swelling test

To perform the swelling test, the weights of composite film samples were measured before immersing in distilled water. Subsequently, the swollen samples were weighed after water removal from the surface with filter paper (5, 15, 20 and 25 min). Equation (1) was used to calculate water absorption:

$$\%Sw = \frac{W_f - W_0}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

where %Sw is the swelling degree,  $W_f$  is the swollen weight of the composite film and  $W_0$  is the composite film's weight before immersing.

### Tensile strength testing

The mechanical properties of the composite films were measured in a Texture Analyzer (Stable Micro Systems). Samples were chopped according to the ASTM D638 epsilon configuration for mechanical tests. The samples were kept straight by the clamps when examined at a speed of 1 mm s<sup>-1</sup>. The gauge length was 50 mm and the initial stress range was set from 0 to 10 MPa. The data were analyzed to determine the strength in the form of the stress-strain curve and elastic modulus.

### Dielectric testing

Dielectric spectroscopy measurements were made as previously described.<sup>21</sup> Briefly, the samples were measured in the frequency range from 40 Hz to 110 MHz utilizing an Agilent Precision Impedance Analyzer 4249A. The amplitude of the measuring signal was 100 mV.

### Antibacterial testing

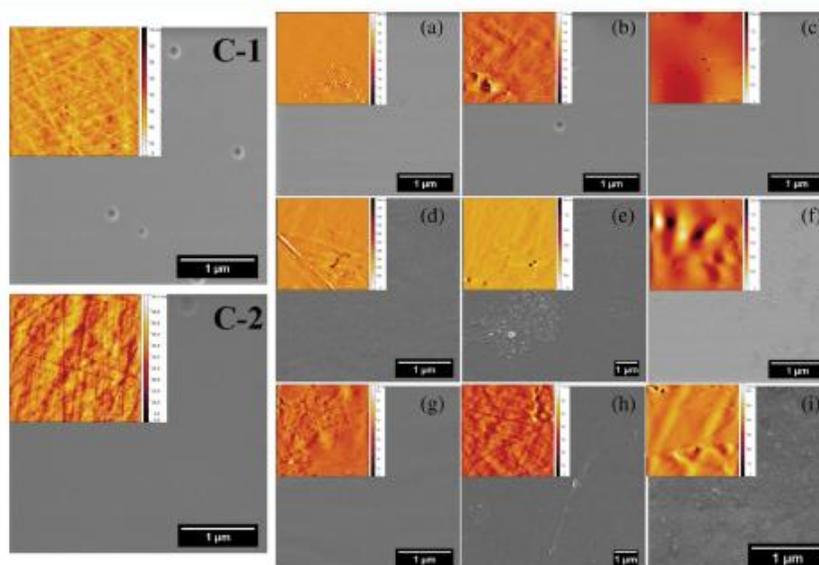
The antibacterial activities of the CF were tested against *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115). The strain was grown in trypticase soy broth (Neogen, Mexico) twice at 36 °C/24 h intervals before cells from the 18 h culture were collected by centrifugation and resuspended in saline solution (0.85% NaCl). One milliliter of the bacterial suspension (ca 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) was added to 10 mL of trypticase soy agar (Neogen), homogenized, poured into a Petri dish and allowed to solidify at room temperature. Squares (2 × 2 cm) of each CF previously sterilized using ultraviolet radiation were placed on the inoculated agar surface, and plates were incubated at 36 ± 1 °C for 48 h. The resulting zones of growth inhibition (mm) around the CF samples were measured. The evaluation was performed three times.

### Cell culture and in vitro cytotoxicity assay

The LL47 human normal lung fibroblast line was grown in culture medium F-12 K (Kaighn's modification of Ham's F-12 medium) complemented with 15% fetal bovine serum (FBS) and 1% (w/v) penicillin and streptomycin, incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Cells were released from the monolayer by 0.25% in phosphate-buffered saline before the biocompatibility assay.

The *in vitro* cytotoxicity of CF-Pul/Chi + GO samples was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The CF samples were sterilized by ultraviolet irradiation in a biosafety cabinet for 1 h on both top and bottom sides; then the CF films were added to the 24-well tissue culture. The LL47 fibroblasts were seeded (1 × 10<sup>5</sup> cells well<sup>-1</sup>) and incubated for 48 and 72 h respectively.

The cell viability assay was performed with 125 µL MTT solution in each well with cells. Subsequently, the 24-well plates were



**Figure 1.** SEM micrographs and AFM images of films: (C-1) pullulan, (C-2) chitosan; (a) *CF-Pul/Chi* 75/25, (b) *CF-Pul/Chi* 50/50, (c) *CF-Pul/Chi* 25/75, (d) *CF-Pul/Chi* 75/25 + 2GO, (e) *CF-Pul/Chi* 50/50 + 2GO, (f) *CF-Pul/Chi* 25/75 + 2GO; (g) *CF-Pul/Chi* 75/25 + 3GO, (h) *CF-Pul/Chi* 50/50 + 3GO, (i) *CF-Pul/Chi* 25/75 + 3GO.

incubated at 37 °C for 3 h. Immediately, the culture medium was replaced with 300  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide to every well treated with MTT; then they were softly stirred using an orbital shaker for 15 min at 130 rpm to promote solvation of the MTT crystals. The culture medium F-12 K supplemented with 15% FBS was utilized as a blank. Finally, the absorbance was read at 590 nm on a microplate reader (Bio-Rad™ model 680). The cell viability was estimated and presented as a percentage of control optical density values. Each MTT test was performed three times.

#### Statistical analysis

The experiments were carried out in triplicate for subsequent statistical analysis by one-way ANOVA and Tukey multiple comparison tests, employing the GraphPad Prism 7.0 software. The values were considered significant for  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

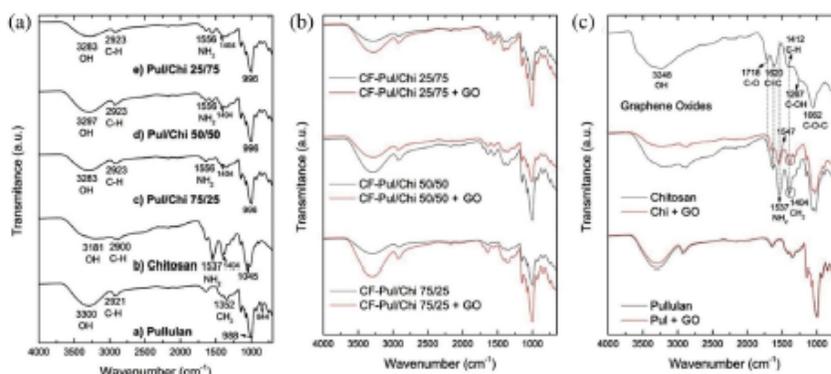
### Microstructure

Nanocomposite films of Pul and Chi containing GO were obtained by casting. The morphology and topography of the composite films were analyzed using SEM and AFM techniques (Fig. 1). Uniform and homogeneous microstructures with no signs of GO agglomerations were observed for all *CF-Pul/Chi* films and for *CF-Pul/Chi* 75/25 + GO (Figs 1(a)–1(d) and 1(g)). Their appearance was similar to the control films of Pul (Fig. 1(C1)) and Chi (Fig. 1(C2)), confirming the homogeneous distribution and miscibility of the components. For *CF-Pul/Chi* 50/50 and *CF-Pul/Chi* 25/75 + GO, agglomerations were observed (Figs 1(e), 1(f), 1(h) and 1(i)). Then, an increasing Chi concentration resulted in decreasing GO dispersion.<sup>22</sup>

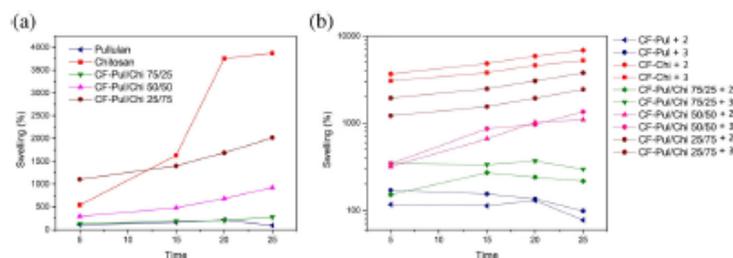
Figure 1 also shows the AFM images recorded in contact mode for the different films. The AFM study was carried out with the target to have more information on how GO is integrated into the composite films. The surface roughness values extracted from the AFM images are shown in Table 1. As expected, higher arithmetic mean height ( $S_a$ ) values were obtained for *CF-Pul/Chi* 25/75 + GO. Furthermore, *CF-Pul/Chi* 75/25, 50/50 + 2GO and 50/50 + 3GO demonstrated the lowest  $S_a$  values which means that GO is better distributed in these polymeric matrices.<sup>23,24</sup>

**Table 1.** Roughness obtained by AFM

Samples	Square height (Sq), nm	Arithmetic mean height ( $S_a$ ), nm
Pul	4.262	3.303
Chi	5.309	4.237
<i>CF-Pul/Chi</i> 75/25	3.352	1.465
<i>CF-Pul/Chi</i> 50/50	18.46	13.08
<i>CF-Pul/Chi</i> 25/75	14.087	9.945
<i>CF-Pul/Chi</i> 75/25 + 1GO	9.587	6.758
<i>CF-Pul/Chi</i> 50/50 + 1GO	15.678	6.815
<i>CF-Pul/Chi</i> 25/75 + 1GO	25.511	17.169
<i>CF-Pul/Chi</i> 75/25 + 2GO	9.246	6.643
<i>CF-Pul/Chi</i> 50/50 + 2GO	11.084	5.676
<i>CF-Pul/Chi</i> 25/75 + 2GO	36.91	24.392
<i>CF-Pul/Chi</i> 75/25 + 3GO	5.618	3.825
<i>CF-Pul/Chi</i> 50/50 + 3GO	6.49	4.537
<i>CF-Pul/Chi</i> 25/75 + 3GO	20.793	15.229



**Figure 2.** (A) The FTIR analysis shows spectra of (a) Pul, (b) Chi, (c) CF-Pul/Chi 75/25, (d) CF-Pul/Chi 50/50 and (e) CF-Pul/Chi 25/75. (B) The FTIR spectra of CF-Pul/Chi 75/25, 50/50, 25/75 and CF-Pul/Chi 75/25, 50/50, 25/75 + 3GO. (C) The FTIR spectra of Pul, Pul + GO, Chi, Chi + GO and GO.



**Figure 3.** The behavior of the swelling degree of CF-Pul/Chi films with different GO concentrations.

#### Fourier transform infrared spectroscopy

Figure 2(A) shows the FTIR spectra of the samples under study. The IR spectra of Pul display the characteristic bands at 3300 and 1640  $\text{cm}^{-1}$  attributed to the vibrational modes of OH; 2921  $\text{cm}^{-1}$  and 1352  $\text{cm}^{-1}$  designated to C–H and  $\text{CH}_2$ ; 988  $\text{cm}^{-1}$  attributed to  $\alpha$ -(1,6)-glycosidic bonds; 844  $\text{cm}^{-1}$  for  $\alpha$ -glucopyranose units and 759  $\text{cm}^{-1}$  attributed to  $\alpha$ -(1,4)-glycosidic bonds.<sup>4,6,25,26</sup> The FTIR Chi spectrum shows bands at 3181  $\text{cm}^{-1}$  assigned to OH, 2900  $\text{cm}^{-1}$  for C–H, 1635  $\text{cm}^{-1}$  assigned to C=O, 1537  $\text{cm}^{-1}$  attributed to  $\text{NH}_2$ , 1404  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to  $\text{CH}_2$  and 1045  $\text{cm}^{-1}$  designated to the C–O bond.<sup>4,6,25</sup> In the CF-Pul/Chi films, the spectra demonstrated that the amine band of Chi is shifted from 1537 to 1556  $\text{cm}^{-1}$ , and the OH bands of Pul and Chi changed from 3300 and 3181 to 3283  $\text{cm}^{-1}$  in the CF-Pul/Chi 75/25 and 25/75 and 3297  $\text{cm}^{-1}$  for CF-Pul/Chi 50/50. It can also be noticed that the C–H band for Chi is shifted from 2900 to 2923  $\text{cm}^{-1}$  in the composite films probably due to a change of vibration from asymmetric to symmetric stretching. These results indicate that strong interactions between Pul's hydroxyl groups and Chi's amino groups are taking place.

Figure 2(B) shows the spectra of CF-Pul/Chi without and with 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO, where no band shifting was observed. However, there is a change in the band intensity of CF-Pul/Chi which could be overlapping with GO bands. Figure 2(C) shows the spectra of GO, Chi, Pul, a representative spectrum of Pul with GO, and a representative spectrum of Chi with GO. The spectrum of Pul and of Pul + GO did not show any interaction between Pul and

GO. When Chi and Chi + GO spectra are compared, the band at 1537  $\text{cm}^{-1}$ , which is related to  $\text{NH}_2$  vibration, is shifted to 1547  $\text{cm}^{-1}$  and the band at 1713  $\text{cm}^{-1}$  (associated with the C=O stretch of the carboxylic group) disappears. Furthermore, the vibration of  $\text{CH}_2$  of Chi changes from asymmetric to symmetric, and the spectrum bands are downshifted. These results are related to the formation of hydrogen bonds between the Chi and GO.<sup>27,28</sup>

#### Swelling

Swelling experiments of CF-Pul/Chi and CF-Pul/Chi + GO samples were carried out to observe the affinity between Pul and Chi along with GOs. Figure 3(A) shows the curves of the swelling degree of films without GO. As expected, the Pul film showed the lowest percentage swelling values since this polysaccharide is water soluble, and as the Chi concentration increases the water resistance of the film improves. When GO is added to the film, swelling increases. Accordingly, the Chi films show swelling of ca 500% to 3900% in the time frame of the experiment, whereas the Chi films with GO perform swelling by about 3000%–7500%. This behavior can be explained by the GO interactions with water molecules through hydroxyl groups and by the polycation Chi nature, which tends to form OH bonds with the water. Furthermore, it is evident that swelling values are lower for CF-Pul/Chi 50/50 + 2GO and CF-Pul/Chi 75/25 + 3GO; this is due to the strong intermolecular interactions between the Pul/Chi chains with GO as noticed in the FTIR study. The effect of high swelling in the CF-

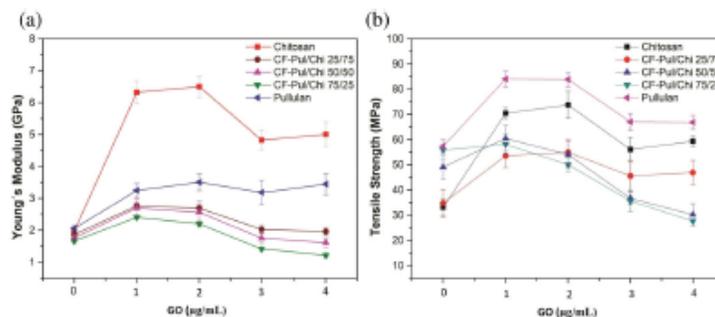


Figure 4. (A) Young's modulus of CF-Pul/Chi + GO; (B) tensile strength of CF-Pul/Chi + GO.

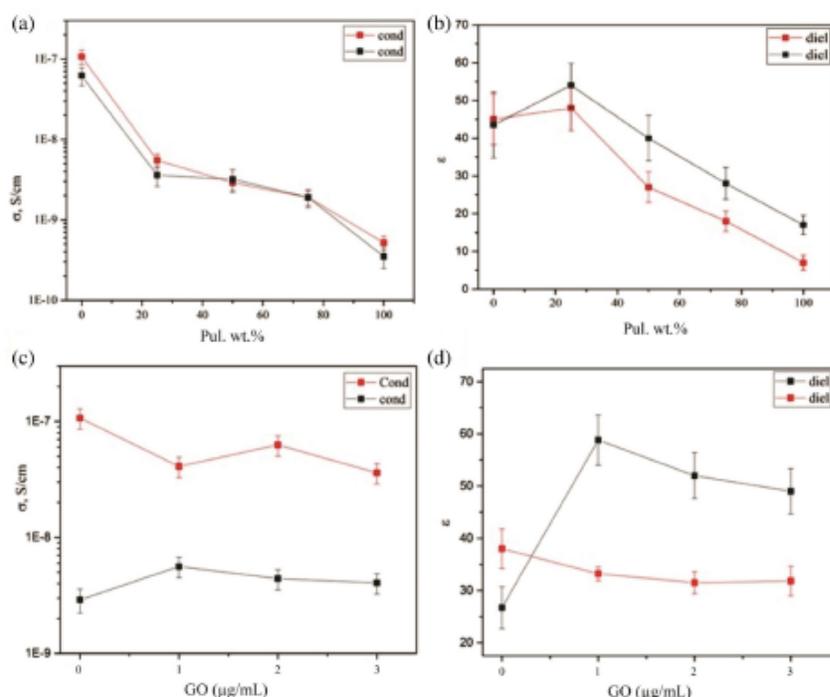


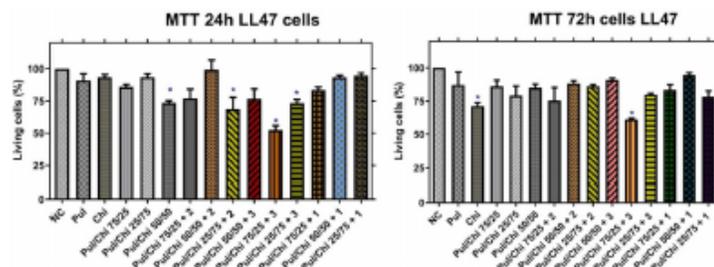
Figure 5. (A), (B) Pullulan concentration (wt%) dependence on dielectric constant and conductivity. CF-Pul/Chi (red) and CF-Pul/Chi + 3GO films (black). (C), (D) GO concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dependence on conductivity and dielectric constant. Chi film (red) and CF-Pul/Chi 50/50 (black).

Pul/Chi + GO can be related to the low molecular interaction that exists between the GO and the polymer matrix. This could be due to the strong interaction between Pul and Chi and the poor affinity between Pul and GO. In this regard, CF-Pul/Chi 50/50 showed good affinity between Pul and Chi rendering a decrease in swelling.

#### Mechanical and dielectric properties

To have a better understanding of the reinforcement performance of GO on CF-Pul/Chi, experiments used 1, 2, 3 and 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$

$\text{mL}^{-1}$  GO. Figures 4(A) and 4(B) show the GO effect on Young's modulus ( $E$ ) and the tensile strength (TS) of the composite films.  $E$  values of  $1.972 \pm 0.108$  GPa and  $2.055 \pm 0.105$  GPa were obtained for Chi and Pul films, respectively. When GOs are incorporated in the Chi or Pul films, significant increases of  $E$  are observed. However, the increase is not concentration dependent; similar values of  $E$  are observed when 1 and 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO were added, while lower values are obtained for 3 and 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO. The films obtained with blends of Chi and Pul exhibited lower  $E$  values than Chi and Pul films when GO was added. Regarding TS,



**Figure 6.** Cytotoxicity profiles of CF-Pul/Chi + GO when incubated with LL47 cell line determined by MTT assay. The cell's viability is expressed relative to control cells. The results are expressed as mean  $\pm$  SD.

values of  $33.103 \pm 3.4$  and  $57.334 \pm 2.6$  MPa were determined for Chi and Pul, respectively. A similar trend to  $E$  was observed. Lower values of TS were obtained for the blending films when GO was added.

The mechanical results evidenced that Pul/Chi + GO composites are more flexible and less strong than Pul and Chi films. Tensile strength values of CF-Pul/Chi 50/50 were lower than the reported values for a film of Pul/Chi 1:1 obtained by the casting solvent technique at pH 3, 3.5 and 4 (69.7, 69.3, 69.5 MPa).<sup>4</sup> CF-Pul/Chi 50/50 + 1GO showed higher  $E$  ( $E = 1.04$  GPa) and similar tensile strength (61.3 MPa) to the reported values for carboxymethylcellulose/Chi 50/50 + 0.75GO composite obtained by the thermomechanical method.<sup>29</sup>

Figure 5(A) shows the dependence of the percentage of pullulan and the percentage of GO on the conductivity and dielectric constant. As expected, the conductivity of Pul/Chi films decreases with increase of the weight percentage of Pul, since Pul is less conductive than Chi. Similar values are observed for Pul/Chi + 3GO; thus this amount of GO does not affect the conductivity of the nanocomposites.

The dielectric constant of neat Chi is ca 45 and of neat Pul is ca 5 (Fig. 5(B)). As in the case of conductivity, as the concentration of Pul increases, the dielectric constant value of the film diminishes. The addition of  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$  GO increases the dielectric constant value for all the Pul ratios, due to interfacial polarization on GO boundaries.

Figure 5 also shows the dependence of the conductivity (Fig. 5(C)) and dielectric constant (Fig. 5(D)) on GO ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in Chi and Pul/Chi 50/50 films. The conductivity was not GO concentration dependent and no significant changes were observed. The dielectric constant ( $\epsilon$ ) values for Chi films do not show significant changes as the GO concentration increases; however, the CF-Chi/Pul 50/50 has a significant increase in dielectric constant with  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  GO. Further increase of GO concentration resulted in a diminishing  $\epsilon$ . The dielectric constant of composite materials depends on the polymer matrix, filler ratio, and interfacial layer between filler and dielectric matrix.<sup>30,31</sup> It has been established that the dependence of the dielectric constant on GO filler concentration is non-monotonic and can exhibit an extreme as a function of dielectric filler percentage. The maximum appears when the volume fraction of the dielectric filler shows the percolation threshold. Interfacial layers overlap, thereby reducing the interfacial volume fraction that effectively decreases the value of the dielectric constant. Such an effect is observed in the Pul/Chi matrix with dielectric GO fillers.

As in the case of mechanical property evaluation, the concentration of  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  GO resulted in the highest values. According to

the literature<sup>32,33</sup> mechanical properties depend on the interfacial layer. After the percolation threshold, the interfacial areas surrounding the GO overlap suggesting percolation in the high-density clusters which influence the mechanical properties.<sup>32</sup>

Based on the dielectric study we propose a model which includes, additional to the Chi/Pul matrix and GO fillers, an interfacial layer between filler and dielectric matrix with higher dielectric constant than the polymer matrix. Therefore, the decrease of interface volume fraction (at the percolation threshold) resulting from the overlap of the interfacial layers promoted a decrease of the dielectric constant of the material. This model (decreasing interface volume) not only allows us to explain the maximum in mechanical properties (which involves a similar dependence on the interfacial layer) but is also important for composite applications such as food packaging and tissue regeneration. Such a maximum in mechanical properties has been observed in many polymer nanocomposites but, from our point of view, without clear explanations. Furthermore, we found that in the films with a concentration of GO near the percolation threshold ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  GO) a significant enhancement of the mechanical properties takes place (without compromising the cytotoxicity). The correlation between dielectric properties, mechanical properties and the concentration of fillers may prove useful in the design and optimization of polymer-based nanocomposites for different applications by performing relatively simple dielectric measurements.

#### Antimicrobial susceptibility testing

*Listeria monocytogenes* is one of the most important bacteria related to food-borne diseases in humans associated with the consumption of ready-to-eat food. CF samples did not show inhibition of *Listeria monocytogenes* growth. None of the CF-Pul/Chi + GO showed inhibition zones around the CF films. However, when CF-Pul/Chi 50/50 + 1GO and CF-Pul/Chi 50/50, 25/75 + 2 and  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$  GO were removed from the agar, inhibition of bacteria growth was observed on the inoculated agar located below the FC films. In previous studies, the antimicrobial activity of Chi films with different molecular weights (470–1106 kDa) was evaluated against *Listeria monocytogenes*, showing the best results at concentrations below 1% using low molecular weight Chi dissolved in acetic acid.<sup>34,35</sup>

According to the literature, the antimicrobial activity of Chi is influenced by the grade of polymerization, Chi type, pH and molecular weight. The Chi structure confers high hydrophilicity owing to the high number of amino and hydroxyl groups. However, when dissolved in an acidic medium, the charged amino groups promote the interaction with negatively charged cell

membranes of the microorganisms which results in cell aggregation causing growth inhibition. Many researchers report the dependence of growth inhibition concerning the described variables and the concentration of the Chi solution, which is normally below 1%; in addition, the effect of inhibition will also depend on the susceptibility of the type of bacteria.<sup>36,37</sup>

#### Cytotoxicity assay

The determination of the film cytotoxicity is an important stage to identify potential harmful effects of the CF in the case of GO migration. The *in vitro* cytotoxicity assay described in the International Organization for Standardization (ISO) 10993-1:2009 is aimed to protect humans from any possible biological risk issuing from the use of biocomposites through the qualitative and quantitative measurement of the viability of target cultured cells. Therefore, we decided to evaluate the cytotoxic potential of Pul, Chi, CF-Pul/Chi and Pul/Chi + GO over LL47 fibroblast cells at 24 and 72 h.

Figure 6 shows the MTT assay results. The well plate (NC) was taken as reference (100%) to verify whether the addition of GO improves cell viability or induces cytotoxicity. The MTT results show that CF-Pul/Chi + 3GO exhibits lower cell viability compared to samples with 1 and 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO. These results indicate that the cell viability in these preparations is dependent on the concentration of GO. On the other hand, there was no significant difference between the CF-Pul/Chi and NC cell viability at 72 h. Previous reports showed that over 80.0% of cell viability is classified as non-cytotoxic, between 60.0% and 40.0% is moderately cytotoxic, whereas lower than 40.0% is reported as strongly cytotoxic.<sup>38, 39</sup> In this regard, CF-Pul/Chi + 1GO and 2GO are not cytotoxic for normal human lung cells while CF-Pul/Ch + 3GO showed weak cytotoxicity, suggesting that the CF-Pul/Chi + 1GO and 2GO could be safe to employ in the pharmaceutical, medical and food industries.

#### CONCLUSIONS

The physical properties of CF-Pul/Chi at different ratios were analyzed. The FTIR studies suggest that hydrogen bonding between hydroxyl groups of Pul and amino groups of Chi dominate the molecular interactions. The dielectric constant, Young's modulus and tensile strength of CF-Pul/Chi + GO are not GO concentration dependent and exhibit maximum values at 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO. At GO concentrations higher than 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  the interfacial layers overlap, thus minimizing the interfacial volume fraction which effectively decreases the value of the dielectric constant and mechanical properties. It is evident that addition of 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO promotes screening molecular interactions in CF-Pul/Chi 50/50 so that both the tensile strength and Young's modulus increase by ca 46.6% and 217%, respectively. Moreover, the MTT assay carried out on LL47 fibroblast cells reveals that the CF-Pul/Chi + 1GO and +2GO films are not cytotoxic. In this regard, CF-Pul/Chi 50/50 + 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO can be considered a safe film with potential uses in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CONACYT for the postdoctoral scholarship awarded to Dr Ramón Román-Doval. We are grateful to Alfredo Muñoz Salas for help in electrical measurements, and Reina Araceli Mauricio Sánchez, Martín Adelaido Hernández Landaverde,

José Eleazar Urbina Álvarez and Verónica Flores Casa mayor for their assistance in FTIR, XRD, field emission SEM and tensile test measurements, respectively.

#### REFERENCES

- Marsh K and Bugusu B, *J Food Sci* **72**:R39–R35 (2007).
- Murugesan S and Scheibel T, *J Polym Sci* **59**:1610–1642 (2021). <https://doi.org/10.1002/pol.20210251>.
- Martínez-Camacho AP, Cortez-Rocha MO, Castillo-Ortega MM, Burgos-Hernández A, Ezquerro-Brauer JM and Plascencia-Jatomea M, *Polym Int* **60**:1663–1669 (2011).
- Wu J, Zhong F, Li Y, Shoemaker CF and Xia W, *Food Hydrocoll* **30**:82–91 (2013).
- Zhong Y, Song X and Li Y, *Carbohydr Polym* **84**:335–342 (2011).
- Li Y, Yokoyama W, Wu J, Ma J and Zhong F, *RSC Adv* **5**:105844–105850 (2015).
- Cevher E, Salomon SK, Makrakis A, Li XW, Brocchini S and Alpar HO, *J Microencapsul* **32**:755–768 (2015).
- Tabasum S, Noreen A, Maqsood MF, Umar H, Akram N, Chatha SAS *et al.*, *Int J Biol Macromol* **120**:603–632 (2018).
- Meng Q and Hu J, *Compos A: Appl Sci Manuf* **40**:1661–1672 (2009).
- Lim HN, Huang NM and Loo CH, *J Non Cryst Solids* **358**:525–530 (2012).
- Zuo PP, Feng HF, Xu ZZ, Zhang LF, Zhang YL, Xia W *et al.*, *Chem Cent J* **7**:39 (2013).
- Jeevahan J and Chandrasekaran M, *J Mater Sci* **54**:12290–12318 (2019).
- Wang D, Zhang X, Zha JW, Zhao J, Dang ZM and Hu GH, *Polymer* **54**:1916–1922 (2013).
- Zhang L, Wang Z, Xu C, Li Y, Gao J, Wang W *et al.*, *J Mater Chem* **21**:10399–10406 (2011).
- Li W, Tang XZ, Zhang HB, Jiang ZG, Yu ZZ, Du XS *et al.*, *Carbon* **49**:4724–4730 (2011).
- Xu Z, Zhang J, Shan M, Li Y, Li B, Niu J *et al.*, *J Membr Sci* **458**:1–13 (2014).
- Verdejo R, Barroso-Bujans F, Rodríguez-Pérez MA, De Saja JA and López-Manchado MA, *J Mater Chem* **18**:2221–2226 (2008).
- Wang X, Yang C and Liu P, *Synth Met* **162**:2349–2354 (2012).
- Yang B, Zuo X, Chen P, Zhou L, Yang X, Zhang H *et al.*, *ACS Appl Mater Interfaces* **7**:137–143 (2015).
- Liu M, Zhang R and Chen W, *Chem Rev* **114**:5117–5160 (2014).
- Sanchez AG, Prokhorov E, Luna-Barcenas G, Mora-García AG, Kovalenko Y, Miñoz EMR *et al.*, *Mater Chem Phys* **217**:151–159 (2018).
- Mun S, Decker EA and McClements DJ, *Langmuir* **21**:6228–6234 (2005).
- Ahmed J, Mulla M and Arfat Y, *Food Hydrocoll* **71**:141–148 (2017).
- Khan YH, Islam A, Sarwar A, Gull N, Khan SM, Munawar MA *et al.*, *Carbohydr Polym* **146**:131–138 (2016).
- Socrates G, *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. John Wiley & Sons, Hoboken (2004).
- Zhu G, Sheng L and Tong Q, *Food Hydrocoll* **35**:341–347 (2014).
- Yang X, Tu Y, Li L, Shang S and Tao XM, *ACS Appl Mater Interfaces* **2**:1707–1713 (2010).
- Zhang D, Yang S, Chen Y, Liu S, Zhao H and Gu J, *Polymers* **10**:294 (2018).
- Chen P, Xie F, Tang F and McNally T, *Int J Biol Macromol* **158**:420–429 (2020).
- Todd MG and Shi FG, *J Appl Phys* **94**:4551–4557 (2003).
- Vo HT and Shi FG, *Microelectron J* **33**:409–415 (2002).
- Padmanabhan V, *J Chem Phys* **139**:144904 (2013).
- Baxter SC, Burrows BJ and Fralick BS, *Probab Eng Mech* **44**:35–42 (2016).
- Beverly RL, Janes ME, Prinyawiwatwala W and No HK, *Food Microbiol* **25**:534–537 (2008).
- Sudarshan NR, Hoover DG and Knorr D, *Food Biotechnol* **6**:257–272 (1992).
- Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C and Zou X, *Carbohydr Res* **339**:2693–2700 (2004).
- Coma V, Martial-Gros A, Garreau S, Copinet A, Salin F and Deschamps A, *J Food Sci* **67**:1162–1169 (2002).
- Román-Doval R, Tellez-Cruz MM, Rojas-Chávez H, Cruz-Martínez H, Carrasco-Torres G and Vázquez-Garzón VR, *J Mater Sci* **54**:3342–3353 (2019).
- Zhu G, Wang F, Gao Q, Xu K and Liu Y, *Res Chem Intermed* **40**:1583–1593 (2014).