



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Programa de Magíster en Ciencias con mención en Química

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOTRANSPORTADORES DE FÁRMACOS EN BASE A
Fe₃O₄ Y DENDRÍMEROS PAMAM.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en
Química

GLORIA CAROLINA CHÁVEZ VALENCIA
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

Profesor Guía: Joel Alderete Triviños
Dpto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción
Profesor Co-Guía: Cristian Campos Figueroa
Dpto. de Físico Química, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción



***“Si quieres ir rápido camina solo, pero
si quieres llegar lejos, ve acompañado.”***

Proverbio africano

Agradecimientos

Deseo agradecer inmensamente por el apoyo brindado en todo este trayecto, desde antes de ser tesista y a lo largo del desarrollo de ésta, por la paciencia, confianza, sinceridad y entrega de conocimientos a mis Profesores Guía y Co-guía, al Dr. Joel Alderete Triviños y Dr. Cristian Campos Figueroa. A los miembros de la comisión evaluadora, Dra. Catherine Sepúlveda Muñoz, Dr. Francisco Muñoz Muñiz y Dr. Nicolás Yutronic Sáez, por haber aceptado ser parte de esta comisión y por la disposición dada para las correcciones y/o comentarios.

Sin olvidar, también a la Dra. Cecilia Torres Muñoz, quien me brindo ayuda en la parte de conocimientos (en programas) y la paciencia debido a muchas dudas que surgían durante ese proceso de aprendizaje.

A mis compañeros y amigos de laboratorio de BDM, parte de ellos ya graduados, pero siempre agradecida ya que siempre brindaron su colaboración/explicación las veces que fuese necesaria, en algunos casos llegaba aburrir de tanta pregunta y el ánimo cuando algo no resultaba, sin olvidar también de haber compartido alegrías, risas, bobadas, música y viajes, a Karen, Pabla, Carola, Nicolas, Fabio, Felipe y no olvidar a quienes recién comienzan, por el cariño brindado a Kelly y Solange.

Agradecer a todo el personal de laboratorio, donde más de una vez fui a molestar por material o reactivo, al Laboratorio de Orgánica, Físico-química, Analítica, y sobre todo a Química General, donde Pamela y Don Rafael, quienes siempre se reían cuando me veían y preguntaban ¿Qué necesitas ahora?, el cariño hacia ellos es grande, conociéndolos desde las ayudantías de pregrado hasta ahora.

No puedo dejar de mencionar a quien fue mi compañero de estudios, Elizardo, aquel que sin conocerlo me abrió las puertas de su casa y permitir conocer su familia, quien cada vez que podía me incentivaba seguir estudiando sin flaquear. También de mencionar a amistades que se forman en este transcurso de estudios a Loreto por su alegría y generosidad, a Liliana por su preocupación y empatía, a Claudio por su buena disposición, apoyo y confianza.

A mis amistades de la vida, quienes siempre brindaban su apoyo ya sea por medio de conversaciones, mensajes o un abrazo, tal vez no nos veíamos lo suficiente pero siempre con el cariño que nos caracteriza, aquella amistad que independiente del tiempo nada cambia, amistades incondicionales; Pamela, Astrid, Lilian, Marcela, Perla, Ervin, Fabián.

Por último, agradecer a mi Familia, a mi Madre Lucia, quien en un comienzo le costó darme el apoyo pero vio mis ganas de seguir estudiando, aquel sueño personal, muchas gracias por TODO, faltarían hojas por seguir agradeciéndote, quienes más componen esta Familia son mi Hermana Soledad y mis Hermanos Hugo y Luis con sus respectivas parejas Eduardo, Cecilia y Margarita, sin olvidar mis dos grandes alegrías, mis sobrinas Cecilia y Catalina, donde todos me preguntaban ¿cómo vas?, ¿te queda poco?, da la pelea, etc.

Dentro de este periodo de estudios, han pasado muchas cosas en la Familia, como una de ellas fue la pérdida de mi abuelita Luisa, quien jamás se entero de este proceso de estudios, pero siempre pendiente de ti hasta los últimos minutos, venía a la universidad y cuidaba de ti cuanto más pude, de eso no me arrepiento. Además ha habido decaídas de Salud (hospitalizaciones), pero aquello ha hecho que la familia se una aún más y apoyándonos como cada uno pudiese, más aún cuando existe un dolor de ya casi 11 años, una pérdida física, desde ahí que valoramos y nos queremos cada día más como Familia, no hay día o instancia que me acuerde de ti Janito, mi Hermano, mi Protector, a quien le dije que lo sentía como un Padre, se que nos acompañas y estas bien, sin dolor, como alguna vez soñé, pedaleando en tu bicicleta. Recuerdo que habías dicho sobre mí, de lo importante que yo estudiará, acá estamos terminando una etapa más, gracias porque desde pequeña me enseñaste matemáticas y en cuanto más pudiste.

Infinitas Gracias a cada uno de los que mencione y a quienes por alguna razón se me haya olvidado...Gracias por el apoyo brindado, animo, paciencia, confianza, sinceridad, cariño, consejos, alegrías, etc. de haber sido participe de esta tesis, colaborando emocionalmente y en el desarrollo de ésta.

RESUMEN

Los nanotubos de magnetita, Fe_3O_4 , tienen la capacidad de ser materiales ferrimagnéticos o superparamagnéticos. Esta propiedad ha sido de especial interés en los últimos años, para aplicaciones en diferentes campos de la nanociencia, pero en particular en la preparación de materiales para la adsorción, transporte y liberación controlada de fármacos. Por otro lado, los dendrímeros, en particular los derivados de poli-(amidoamina) (PAMAM) son macromoléculas altamente ramificadas, monodispersas los que han sido ampliamente estudiados como sistemas nanotransportadores de fármacos. Una de las principales desventajas de ambos materiales es la limitada capacidad de carga que muestran frente a algunos fármacos de interés en el tratamiento de enfermedades crónicas. Además del limitado control que se tiene en los procesos de liberación cuando estos sistemas se usan como nanotransportadores de fármacos.

Dada las características de ambos sistemas, esta tesis contempló el estudio de un sistema híbrido NT- Fe_3O_4 acoplado a dendrímero PAMAM de tercera generación para la encapsulación de dos fármacos: piroxicam (PRX) y silibinina (SIL). La preparación del nanomaterial híbrido se llevó a cabo a partir de síntesis hidrotermal de los óxidos de hierro, la que permitió obtener los nanotubos de Fe_3O_4 a partir de la reducción térmica de los nanotubos de Fe_2O_3 en presencia de flujo de H_2 . Finalmente el acople del dendrímero PAMAM a la superficie del nanotubo se realizó mediante una inmovilización covalente, mediada por un agente de acople. El nanomaterial híbrido fue caracterizado por termogravimetría, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, susceptibilidad magnética e isoterma de adsorción-desorción de N_2 a -196°C , además de espectroscopia FT-IR con lo que se demostró la efectiva inmovilización de PAMAM a un contenido de 16% en masa. El material híbrido (Fe_3O_4 -PAMAM) mantiene la forma nanotubular y las propiedades magnéticas del soporte inorgánico de partida. En los experimentos de adsorción se empleó NT- Fe_3O_4 como adsorbente control. Para ambos adsorbentes, Fe_3O_4 -PAMAM y NT-

Fe_3O_4 , se determinaron las cinéticas de adsorción para dos fármacos modelos piroxicam (PRX) y silibinina (SIL). Para ambos materiales la adsorción de los fármacos mostraron ajustarse a cinéticas de pseudo-primer orden y la cantidad máxima de adsorción de fármaco se vio mejorada junto con un aumento en la velocidad de adsorción por la presencia de PAMAM en la superficie del material híbrido.



ABSTRACT

Magnetite nanotubes, Fe_3O_4 , have the capacity to be ferrimagnetic or superparamagnetic materials. This property has been of special interest in last years, for applications in different fields of nanoscience, but in particular in the preparation of materials for the adsorption, transport and controlled release of drugs. On the other hand, dendrimers, in particular the derivatives of poly-(amidoamine) (PAMAM) are macromolecules highly branched and monodisperse which have been widely studied as drug nanocarriers systems. One of the main disadvantages of both materials is their limited load capacity showed against some drugs of interest in the treatment of chronic diseases. In addition, these systems present an uncontrolled drug release in the liberation processes when they are used as drug nanocarriers.

Considering the characteristics of both systems, this thesis contemplated the study of a hybrid system NT- Fe_3O_4 coupled with PAMAM dendrimer of the third generation for the encapsulation of two drugs: piroxicam (PRX) and silybin (SIL). The preparation of the hybrid nanomaterial was carried out from hydrothermal synthesis of iron oxides, which allowed obtaining NT- Fe_3O_4 from the thermal reduction of the nanotubes of Fe_2O_3 in the presence of H_2 flow. Finally, the coupling of the PAMAM dendrimer to the surface of the nanotube was performed by covalent immobilization, mediated by a coupling agent. The hybrid nanomaterial was characterized by thermogravimetry, X-ray diffraction, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, magnetic susceptibility measurements, and N_2 adsorption-desorption isotherm at -196°C , in addition FT-IR spectroscopy analysis demonstrated the effective immobilization of PAMAM to a content of 16% by mass. The hybrid material (NT Fe_3O_4 -PAMAM) maintains the nanotubular form and the magnetic properties of the starting inorganic support. In the adsorption experiments, NT- Fe_3O_4 was used as the control adsorbent. For both adsorbents, NT- Fe_3O_4 -PAMAM and NT- Fe_3O_4 , adsorption kinetic were determined for two drug models piroxicam (PRX) and silybin (SIL). For both materials, the

adsorption of the drugs was adjusted to pseudo-first-order kinetics, and the maximum amount of drug adsorption was improved along with an increase in adsorption rate by the presence of PAMAM on the surface of the hybrid material.



TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PROBERVIO	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Nanomateriales magnéticos	3
1.2 Dendrímeros	8
1.3 Nanomateriales híbridos óxido inorgánico/PAMAM	12
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GENERALE	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. PARTE EXPERIMENTAL	15
4.1 Síntesis de los nanotransportadores	15
4.1.1 Síntesis de nanotubos de magnetita (Fe_3O_4)	15
4.1.2 Funcionalización de NT- Fe_3O_4 con el agente de acople 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano	15
4.1.3 Acoplamiento de NT- Fe_3O_4 -GPTMS con dendrímero PAMAM	16
4.2 Caracterización de los sistemas	17
4.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)	17
4.2.2 Difracción de Rayos X (DRX)	18
4.2.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	20
4.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	21
4.2.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)	22
4.2.6 Isotermas de Adsorción-Desorción de N_2 a -196°C	23

4.2.7	Magnetización del material	24
4.2.8	Adsorción de Fármacos en Nanotubo Fe_3O_4 y en nanotransportador híbrido Fe_3O_4 -PAMAM	26
5.	DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	28
5.1	Caracterización de los nanomateriales	28
5.1.1	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier	28
5.1.2	Análisis Termogravimétrico	29
5.1.3	Isotermas de Adsorción-Desorción de N_2 a -196°C	31
5.1.4	Difracción de Rayos X	33
5.1.5	Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión	34
5.1.6	Propiedades magnéticas	37
5.2	Estudios de la adsorción de Fármacos en Nanotubo Fe_3O_4 y en nanotransportador híbrido Fe_3O_4 -PAMAM	40
5.2.1	Fármacos de interés	40
5.2.2	Adsorción de PRX	44
5.2.3	Adsorción de SIL	49
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	54
	REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Algunos tipos de nanomateriales utilizados en el transporte de fármacos y para diagnóstico e imagen [17].	2
Figura 2. Esquemas de asociación componente orgánico en soportes sólidos. (a) Adsorción; (b) Adsorción por formación de pares iónicos y (c) Anclaje por enlace covalente.	6
Figura 3. Esquema de anclaje del AAC en el soporte [42].	7
Figura 4. Esquema general de la estructura de un dendrímero.	9
Figura 5. Dendrímero PAMAM de tercera generación (G3).	10
Figura 6. Sistema de reacción para realizar las modificaciones superficiales de NT-Fe ₃ O ₄ .	16
Figura 7. Esquema del equipamiento de un FT-IR.	18
Figura 8. Difracción de Rayos X producida por los diferentes planos de un cristal.	19
Figura 9. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión.	21
Figura 10. Esquema de un microscopio electrónico de barrido.	22
Figura 11. Representación esquemática de un sólido poroso [71].	23
Figura 12. Representación de curva de magnetización para un material ferromagnético [74].	25
Figura 13. Esquema del sistema de adsorción de fármacos en los nanotransportadores NT-Fe ₃ O ₄ y NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	27
Figura 14. Espectro FT-IR de (a) NT-Fe ₃ O ₄ , (b) NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	28
Figura 15. Termogramas de los materiales realizados en atmósfera de O ₂ . (a) NT- Fe ₃ O ₄ , (b) NT-Fe ₃ O ₄ -GPTMS y (c) NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	30
Figura 16. Isotherma de adsorción/desorción de N ₂ a -196°C para (a) NT-Fe ₃ O ₄ y (b) NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	32
Figura 17. Difractograma de rayos X para (a) NT α-Fe ₂ O ₃ , (b) NT-	34

	Fe ₃ O ₄ y (c) NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	
Figura 18.	Imágenes de SEM de los materiales (a) NT-Fe ₃ O ₄ , (b) NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	35
Figura 19.	Micrografías de TEM de NT-Fe ₃ O ₄ (a, b), NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM (e, f) y las curvas de distribución del largo (c, g) y diámetro externo (d, h), para ambos NT-Fe ₃ O ₄ y NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM, respectivamente.	36
Figura 20.	Curva de magnetización obtenida para NT-Fe ₃ O ₄ (a, b) y NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM (c, d) utilizando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) a 17°C.	39
Figura 21.	Estructuras de los fármacos de interés: (a) Piroxicam y (b) Silibinina.	40
Figura 22.	Cinética y ajustes de modelos cinéticos de adsorción para PRX en los nanotransportadores NT-Fe ₃ O ₄ y NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	45
Figura 23.	Esquema propuesto para la adsorción de PRX en los sistemas sintetizados. (A) Fe ₃ O ₄ -NT y (B) Fe ₃ O ₄ -NT-PAMAM.	45
Figura 24.	Gráfico de adsorción de PRX en los nanotransportadores sintetizados considerando un modelo de difusión intrapartícula en tres etapas.	48
Figura 25.	Cinética y ajustes de modelos cinéticos de adsorción para SIL en los nanotransportadores NT-Fe ₃ O ₄ y NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	49
Figura 26.	Gráfico de adsorción de SIL en los nanotransportadores sintetizados considerando un modelo de difusión intrapartícula en tres etapas.	52

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Impacto en la masa molecular y en el tamaño de los dendrímeros PAMAM según crece la generación [48].	11
Tabla 2. Porcentaje de pérdida de masa y material acoplado GPTMS y PAMAM (G3) al NT-Fe ₃ O ₄ .	31
Tabla 3. Superficie específica, tamaño promedio de poro y volumen de poro determinadas por las de BET y BJH [73, 86] para los materiales en base a NT-Fe ₃ O ₄ sintetizados.	33
Tabla 4. Resumen de parámetros magnéticos para los materiales preparados a 17°C.	37
Tabla 5. Modelos cinéticos para la adsorción de PRX en los adsorbentes NT-Fe ₃ O ₄ y NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	46
Tabla 6. Modelo de difusión intra-partícula para la adsorción de PRX en los adsorbentes NT-Fe ₃ O ₄ y NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM, considerando dos etapas determinantes en la adsorción del fármaco y una tercera de equilibrio.	49
Tabla 7. Modelos cinéticos para la adsorción de SIL en los adsorbentes NT-Fe ₃ O ₄ y NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM.	51
Tabla 8. Modelo de difusión intra-partícula para la adsorción de SIL en los adsorbentes NT-Fe ₃ O ₄ y NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM, considerando dos etapas determinantes en la adsorción del fármaco y una tercera de equilibrio.	53

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una amplia gama de fármacos disponibles para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades. En el tratamiento de un proceso fisiopatológico, se espera que la administración de los medicamentos se realice de forma tal que alcance su lugar de acción con una determinada concentración. No obstante, algunos medicamentos muestran una escasa solubilidad en el plasma sanguíneo así como también en el medio inter-intracelular. Por lo general solo el 1% de la dosis administrada llega al sitio diana, mientras que el resto del fármaco se distribuye a través del resto de células y tejidos. Esta desventaja impone la administración de altas dosis de fármacos para lograr un aumento de su concentración local, lo que provoca numerosos efectos toxicológicos e inmunológicos indeseables [1-3].

Esta limitante está siendo superada gracias al desarrollo de una variedad de transportadores de fármacos los que actúan por asociación física y/o química entre la sustancia activa y el transportador. Entre las múltiples ventajas que pueden aportar los transportadores de fármacos se destaca el control de las concentraciones plasmáticas y de la distribución tisular, gracias a que protege la sustancia activa contra la inactivación (química, enzimática o inmunológica) desde el lugar de administración hasta el sitio de acción [2, 4-7]. Los sistemas transportadores han sido clasificados de acuerdo a su naturaleza química o a su tamaño, pero en las últimas décadas son aquellos denominados nanotransportadores los que han mostrado los resultados más promisorios en el desarrollo de sistemas vectorizados de transporte y liberación de fármacos para el tratamiento específico de enfermedades.

Los nanotransportadores son sistemas que se caracterizan por ser de tamaño nanométrico, donde sus medidas pueden fluctuar entre 1 y 100 nm, en una o más de sus dimensiones [8, 9] (ver Figura 1). La adsorción del fármaco ocurre generalmente al interior de cavidades del nanotransportador las cuáles permiten

alojar las moléculas de fármaco, en un fenómeno que se describe como encapsulación [10, 11]. Dentro de los nanotransportadores de fármacos que cumplen con estos requisitos se encuentran aquéllos que se basan en sistemas inorgánicos, orgánicos y aquéllos denominados híbridos que son una mezcla de ambos.

De la familia de transportadores basados en nanomateriales (NM) inorgánicos se pueden mencionar algunos como: nanotubos de carbono (CNTs) [12], nanotubos de óxidos inorgánicos como TiO_2 [13] y Al_2O_3 [14], nanopartículas de óxidos inorgánicos como SiO_2 [15] y Fe_3O_4 [16], entre otros. La principal característica de estos sistemas es su nula solubilidad en el plasma sanguíneo. La habilidad de adsorber fármacos de estos materiales, viene dada principalmente porque disponen de un área superficial y porosidad que permiten el alojamiento del fármaco al interior de los poros, lo que ralentiza su liberación una vez internalizado en el huésped.



Figura 1. Algunos tipos de nanomateriales utilizados en el transporte de fármacos y para diagnóstico e imagen [17].

Los NM orgánicos también se han considerado una buena alternativa para su uso como sistemas nanotransportadores de fármacos de los que se pueden mencionar a los dendrímeros [18], micelas [19], polímeros [20] y liposomas [21], entre otros. A diferencia de los materiales inorgánicos, los nanomateriales orgánicos pueden

actuar de forma soluble o insoluble en el plasma sanguíneo. El principio de adsorción se basa en la diferencia de afinidad del fármaco frente al medio dispersante. De forma general fármacos que son poco solubles en agua se adsorben de forma efectiva en sistemas que posean cavidades hidrófobas.

Los sistemas nanotransportadores híbridos nacen de la necesidad de combinar propiedades de los sistemas inorgánicos y/o orgánicos con el fin de producir un NM que muestre una alta sinergia entre ambos componentes en el proceso de adsorción y liberación de fármacos [13,14, 22]. Dependiendo de la naturaleza del sistema híbrido, se pueden clasificar en: híbridos inorgánico/inorgánico [23], híbridos inorgánico/orgánico [24] e híbridos orgánico/orgánico [25].

1.1 Nanomateriales magnéticos

Dentro de los NM inorgánicos más interesantes, se encuentran las nanoestructuras de óxidos de hierro. El óxido de hierro existe en la naturaleza en tres fases, magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [26]. La magnetita presenta las propiedades más interesantes entre todos los demás óxidos de hierro, debido a la presencia de cationes de hierro en dos estados de valencia (Fe^{2+} y Fe^{3+}) en su estructura cúbica centrada en la cara de tipo espinela (AB_2O_4) inversa. En ella, el oxígeno forma un empaquetado cúbico compacto donde la mitad de los cationes Fe^{3+} ocupan sitios tetraédricos (A) mientras que la otra mitad de Fe^{3+} y los cationes Fe^{2+} ocupan los sitios octaédricos (B) [27], lo cual le confiere susceptibilidad magnética.

El número de cationes Fe^{3+} en cada sitio de la red cristalina (tetraédrico y octaédrico) es el mismo, pero con direcciones opuestas del espín magnético, por lo tanto, los momentos magnéticos de los cationes Fe^{3+} se anulan entre sí, como resultado, los cationes Fe^{2+} son los responsables del momento magnético neto en la magnetita. Por lo cual, la magnetita posee un comportamiento ferrimagnético, es decir los espines magnéticos son antiparalelos y sus magnitudes son desiguales.

El comportamiento de este material magnético puede cambiar drásticamente dependiendo del tamaño. A medida que el tamaño de la estructura disminuye, los multidominios magnéticos cambian hasta obtener una estructura conformada por un solo dominio magnético [27-29], dando como resultado una nueva propiedad magnética denominada superpara-magnetismo. Esta propiedad se define como la capacidad de ciertos NM magnéticos, que poseen alta susceptibilidad y saturación de magnetización bajo la influencia de un campo magnético, las que pierden completamente una vez que se elimina el campo magnético, lo que resulta una remanencia magnética y coercitividad de cero [30]. Debido a su baja toxicidad y alta biocompatibilidad además de la alta estabilidad mecánica, térmica y química, la magnetita ha atraído mucho la atención para aplicaciones biomédicas tales como: resonancia magnética, hipertermia magnética, terapia del cáncer, liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos, entre otras [29-32].

Muchos esfuerzos también se han llevado a cabo en la síntesis y propiedades de las nanoestructuras de óxido de hierro con morfologías bien definidas, como nanocristales, poliedros, cubos, varillas, tubos, entre otros [26]. Varios métodos sintéticos han sido reportados para la preparación de nanopartículas de óxido de hierro que incluyen: co-precipitación, irradiación de ultrasonido, síntesis solvotermal, síntesis hidrotérmal, microemulsión, síntesis vía microondas y la descomposición térmica [33]. La síntesis hidrotérmal es una ruta de precipitación en fase acuosa que se lleva a cabo en reactores que soportan altas presiones y temperaturas, la que se emplea ampliamente para sintetizar nanoestructuras funcionales con formas específicas [26, 27], ya que es un proceso simple y de alto rendimiento, con el cual se obtienen nano-arquitecturas de tamaño y morfología reproducible [31].

Jia y colaboradores han reportado un proceso sencillo para producir nanoanillos de Fe_3O_4 , en el cual se utiliza la ruta hidrotérmal con la participación de los aniones dobles SO_4^{2-} y H_2PO_4^- como controladores de la morfología para producir Fe_2O_3 como base estructural, el cual es sometido a un tratamiento de reducción en

atmósfera de H_2 para producir el material en base a magnetita [34]. Este método abre la posibilidad de crear una gama de estructuras tridimensionales variando las relaciones de iones $SO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ durante el tratamiento de síntesis hidrotérmal [34]. Se ha demostrado que los iones SO_4^{2-} , tienen el efecto de aumentar el tamaño de partícula debido a que aumenta la superficie de las nanoestructuras Fe_2O_3 formadas [35]. La presencia de iones $H_2PO_4^-$ es el factor crucial que induce la formación de una estructura tubular, producto de la adsorción selectiva de iones fosfato en la superficie de las partículas de Fe_2O_3 y su capacidad de coordinar con los iones férricos [36]. Estas estructuras tubulares o nanotubos magnéticos (NT- Fe_3O_4) no sólo conservan el fondo y la forma de una nanovarilla, también proporcionan cavidad interna que lo proyectan como un material que permite la encapsulación y liberación controlada de fármacos, oligómeros, supramoléculas y/o macromoléculas, entre otras especies [37], las cuales se pueden transportar de forma segura en el sistema *in vivo* evitando la degradación hidrolítica o la precipitación de fármacos hidrófobos durante la entrega en el sitio específico.

La principal ventaja de los NT- Fe_3O_4 como transportadores de fármacos es que pueden poseer la propiedad del para- o superpara-magnetismo para realizar un seguimiento de la administración de fármacos. El traslado de los NTs puede ser controlado por un campo magnético externo dirigiéndolo de forma específica a los sitios fisiológicos de acción [38]. La combinación de las propiedades magnéticas con una estructura tubular hace de los NT- Fe_3O_4 un candidato ideal como nanotransportador empleado en aplicaciones biomédicas. La principal limitante para el empleo de este tipo de sistemas es el tipo de moléculas que pueden ser adsorbidas, ya que en general se ha observado que moléculas de pequeño tamaño no son adsorbidas en forma eficiente [34, 39].

Una forma de poder superar la baja capacidad de adsorción de fármacos por parte de los NT- Fe_3O_4 es generando sistemas híbridos que sean capaces de incorporar una segunda unidad que incrementen su capacidad de adsorción. Esto se puede conseguir recubriendo al NT- Fe_3O_4 con un segundo componente, generalmente de

naturaleza orgánica, obtenido de una fuente natural o sintética, proveyendo nanoestructuras híbridas con propiedades mejoradas frente a sus componentes puros. La asociación del componente orgánico con el NM inorgánico puede realizarse empleando 3 rutas, tal como se muestra en la Figura 2.

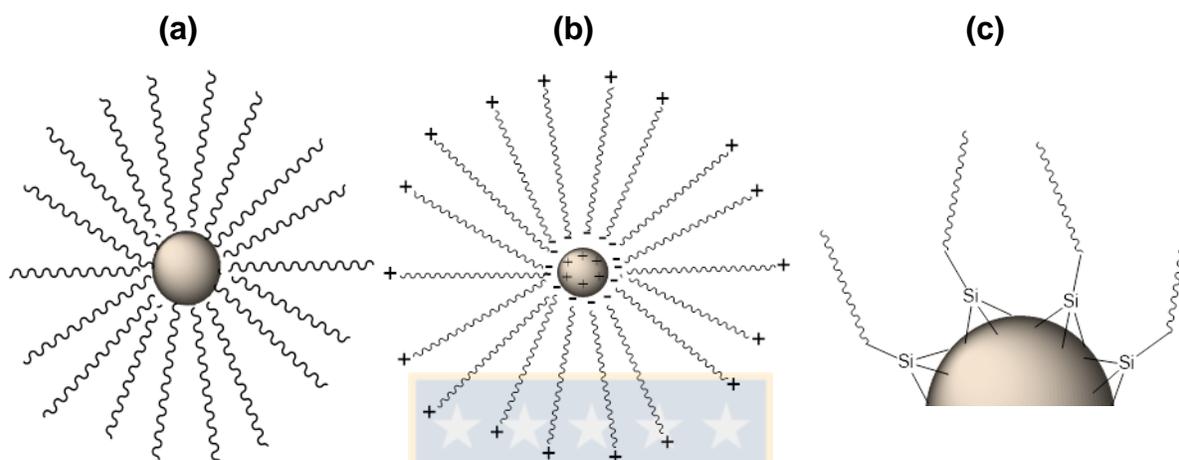


Figura 2. Esquemas de asociación componente orgánico en soportes sólidos. (a) Adsorción; (b) Adsorción por formación de pares iónicos y (c) Anclaje por enlace covalente.

La asociación por formación de enlaces covalentes ha sido la técnica más prometedora, y puede llevarse a cabo gracias al uso de moléculas intermediarias denominadas agentes de acople, los cuales son capaces de modificar la superficie de un sólido inorgánico y a su vez unirse covalentemente al estabilizante a través de una función orgánica reactiva. Algunos agentes de acople (AAC) se pueden clasificar en cuatro grupos: ácidos carboxílicos, polímeros, silanos y moléculas organofosforadas. Los AAC del tipo silano son los más utilizadas en los NM inorgánicos, la fórmula general de este tipo AAC muestra dos clases de funcionalidades ($R_1-(CH_2)_n-Si-(R_2)_3$). Los grupos R_1 representan al grupo orgánico funcional como NH_2 , SH , epoxi, metacrilato etc., y los grupos R_2 representan a un grupo funcional hidrolizable tal como OCH_3 , OCH_2CH_3 o Cl [40, 41].

Debido a que la superficie de NM inorgánicos, de tipo óxido, poseen grupos hidroxilos (-OH) éstos se utilizan como sitios de reacción para el proceso de anclaje. El proceso de acoplamiento se logra a través de la reacción química, entre los grupos trialcóxido del AAC y los grupos hidroxilos superficiales del NM inorgánico [41], tal como se muestra en el esquema de la Figura 3.

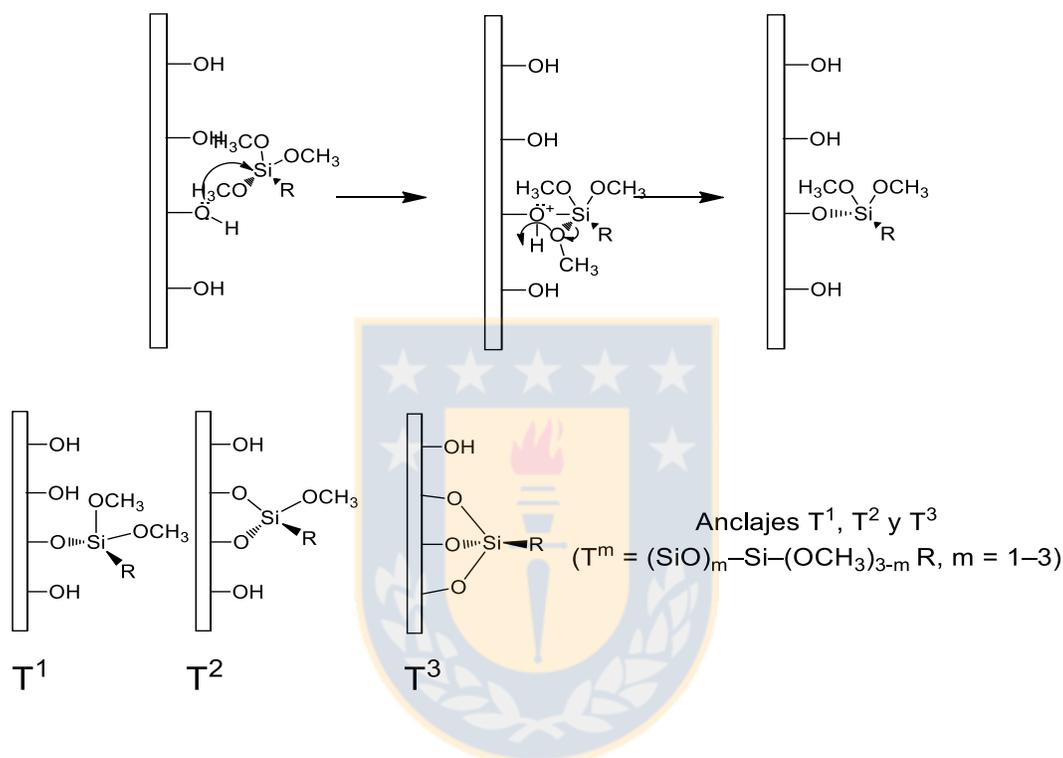


Figura 3. Esquema de anclaje del AAC en el soporte [42].

Dependiendo de la naturaleza de la molécula orgánica a anclar, hay dos formas de incorporarla en la superficie del soporte: anclaje de AAC en la superficie del NM y posterior reacción con la molécula de interés o reacción previa entre molécula y AAC para realizar el posterior anclaje en la superficie del NM.

En este contexto se ha propuesto que la utilización de sistemas nanotransportadores híbridos podrían mejorar las variadas limitaciones que presentan la mayoría de los sistemas nanotransportadores basados en materiales inorgánicos con baja capacidad de adsorción. Algunos sistemas híbridos

propuestos para la adsorción de fármacos han sido: nanopartículas de sílice funcionalizadas con polímeros que contienen guanidina, donde se ha estudiado el comportamiento de carga y liberación de doxorubicina y sulfasalazina [22]; nanopartículas de ZnO-poli(N-isopropilacrilamida) en las cuales se ha estudiado la liberación del fármaco doxorubicina en células tumorales [43]; nanotubos de carbono-dendrímico, los cuales han permitido el aumento significativo de la solubilidad del fármaco carvedilol [44], nanotubos de TiO₂ y Al₂O₃ acoplados a dendrímeros PAMAM cuyo objetivo es combinar las propiedades de adsorción y liberación de metotrexato, silibinina y curcumina [13, 14].

1.2 Dendrímicos

En el último tiempo, ha habido un creciente interés en el uso de macromoléculas sintéticas, en base a polímeros de masa molar controlada y estructura química definida como vectores en la administración controlada de fármacos y otras aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico, donde se destacan los dendrímeros [45]. Los dendrímeros son una clase de macromoléculas poliméricas de forma globular, altamente ramificadas y monodispersas, que constan de un núcleo central a partir del cual se originan una serie de ramificaciones. La palabra dendrímico deriva del término griego *dendron*, que significa árbol, y *meros*, es decir, parte. La estructura de un dendrímico incluye tres partes: un núcleo central, unidades ramificadas, y grupos superficiales. Las unidades ramificadas están dispuestas en capas denominadas generaciones (G) y la zona de la cual emergen estas ramificaciones se conoce como nodo [23] tal como se muestra en la Figura 4. El tamaño de los dendrímeros varía entre 10-130 Å de diámetro dependiendo de la generación del dendrímico [45-47]. A pesar de su gran tamaño molecular muestran una muy baja polidispersidad en comparación con los polímeros sintéticos tradicionales [48].

La principal ventaja de los dendrímeros es que, de acuerdo a su estructura química, poseen cavidades hidrofóbicas, carácter que se acentúa a medida que

crece la generación del dendrímico. Esta propiedad favorece la adsorción de fármacos poco solubles en su interior, destacándolos como agentes de transporte para fármacos poco solubles [49-52].

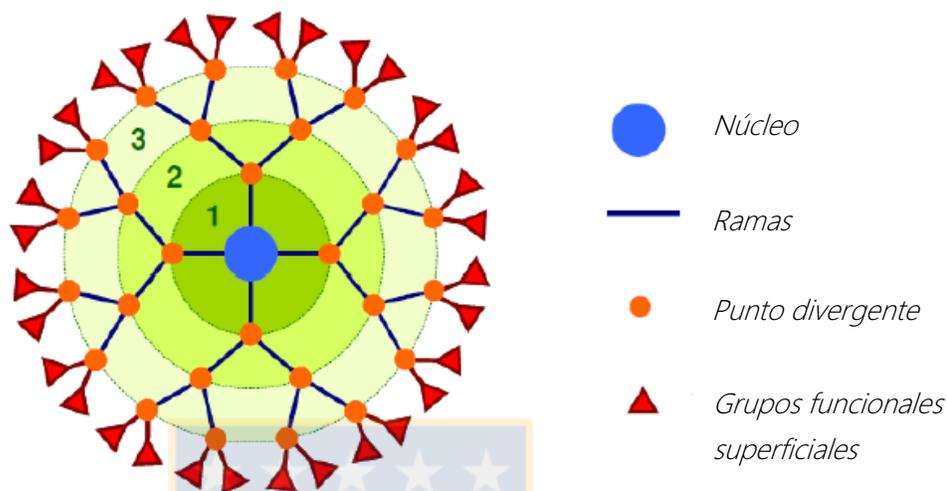


Figura 4. Esquema general de la estructura de un dendrímico.

Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, estos nanotransportadores poseen en su superficie un número definido de grupos funcionales (amino, carboxilo, hidroxilo, etc.) los que le confieren una gran versatilidad, ya que no sólo poseen capacidad para la adsorción de fármacos en la cavidad interna de la macromolécula, sino que al mismo tiempo, los grupos funcionales superficiales permiten realizar modificaciones brindándoles una alta capacidad de vectorización [17, 53].

Los dendrímeros poliamidoaminas (PAMAM) fueron la primera familia de dendrímeros sintetizados y caracterizados [54], siendo uno de los materiales de mayor interés en estudios de nanotransportadores en relación a su biocompatibilidad. Los dendrímeros PAMAM están constituidos por un núcleo de 1,2-etilendiamina y ramificaciones de poliamidoamina [48]. En solución acuosa, estos polímeros se comportan como polielectrolitos, ya que las aminas terciarias presentes en la cavidad interna (pK_a 3.0 – 6.0) y las aminas primarias superficiales del dendrímico

(pK_a 9,4 – 9,7) pueden ser protonadas a diferentes pH [13, 51], lo cual conlleva a un cambio en la conformación, tamaño y carga del dendrímero. Los dendrímeros PAMAM están disponibles comercialmente hasta la décima generación (G10). Los de baja generación (G1-G3) son poco sensibles a los cambios frente a variaciones de pH, poseen conformaciones abiertas [55] y cavidades internas que permiten la encapsulación de fármacos hidrófobos, mientras que los grupos superficiales están disponibles para interacciones electrostáticas o conjugación covalente. En la Figura 5 se observa un dendrímero PAMAM de tercera generación (G3).

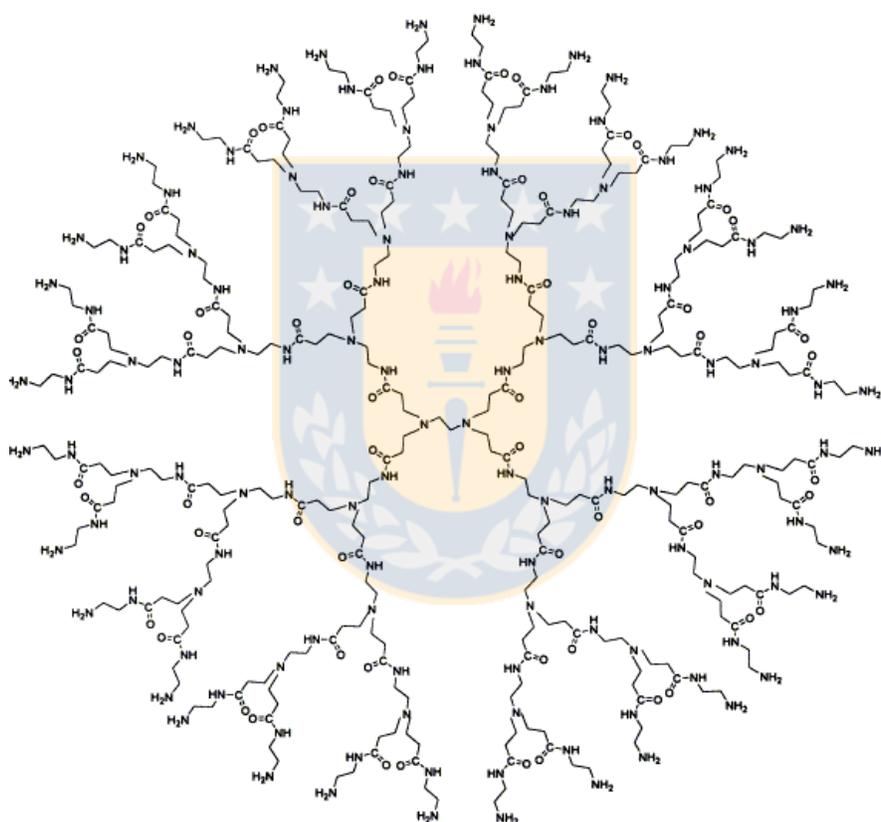


Figura 5. Dendrímero PAMAM de tercera generación (G3). Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 1 se puede observar algunas propiedades de los PAMAM. A medida que aumenta la generación del dendrímero hay un aumento progresivo de su

tamaño (aprox. 1,0 nm en cada generación) y como consecuencia se observa un incremento exponencial en el número de grupos aminos superficiales.

Los dendrímeros PAMAM han demostrado ser efectivos como nanotransportadores de fármacos pues poseen baja citotoxicidad, son biodegradables y no inmunogénicos por lo menos hasta la generación 5 [56, 57].

Tabla 1. Impacto en la masa molecular y en el tamaño de los dendrímeros PAMAM según crece la generación [48].

Dendrímeros PAMAM generación	Masa molecular (kDa)	Diámetro en nanómetros (nm)	Número de grupos en superficie
0	0,517	1,5	4
1	1,430	2,2	8
2	3,256	2,9	16
3	6,909	3,6	32
4	14,215	4,5	64
5	28,826	5,4	128
6	58,048	6,7	256
7	116,493	8,1	512
8	233,383	9,7	1024
9	467,162	11,4	2048
10	934,720	13,5	4096

Algunos ejemplos reportados en bibliografía han demostrado el aumento de la solubilidad de algunos fármacos poco solubles en medio acuoso como: nifedipina, adsorbida en PAMAM-G3 y PAMAM-G4 [58], ácido mefenámico adsorbida en PAMAM-G2 y PAMAM-G3 [51], piroxicam en PAMAM-G3 [59], metotrexato y adriamicina en complejos PAMAM-G3-pegilado y PAMAM-G4-pegilado [60], entre otros.

La principal aplicación de los PAMAM como nanotransportadores ha sido en la adsorción y liberación de fármacos antineoplásicos [61]. Lamentablemente los sistemas PAMAM no muestran especificidad como para considerarlos potenciales candidatos para terapias dirigidas en el tratamiento de enfermedades sin ser previamente vectorizados. Es por esto que la investigación que se ha desarrollado en los últimos 10 años ha estado focalizada en la síntesis de nanotransportadores PAMAM modificados con algunas moléculas capaces de conferirle especificidad en orden a aumentar la liberación de los fármacos adsorbidos en la zona donde se encuentran los receptores farmacológicos, para así disminuir al mínimo su concentración en otras zonas del organismo [62, 63]. Además, variados estudios han mostrado que los dendrímeros PAMAM poseen una limitada capacidad de adsorción de fármacos, sólo de unos cuantos miligramos de fármaco por gramo de dendrímero. Esto, unido a la rápida liberación de las moléculas de fármacos bajo condiciones fisiológicas, impone el desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de nanotransportadores de fármacos en base a dendrímeros PAMAM.

1.3 Nanomateriales híbridos óxido inorgánico/PAMAM

Dada la capacidad de adsorber fármacos del sistema PAMAM y su habilidad de poder sufrir modificaciones en sus grupos aminos superficiales, es que se ha considerado como un componente que mejoraría la capacidad de adsorción de fármacos poco solubles en sistemas inorgánicos. De acuerdo a la experiencia del grupo de investigación, se sabe que la preparación de nanotransportadores híbridos, en base a nanotubos de TiO_2 y Al_2O_3 acoplados con dendrímeros PAMAM G3, han demostrado un incremento en la capacidad de adsorción de fármacos poco solubles como metotrexato, silibinina y curcumina [13, 14].

En base a las evidencias previas reportadas en relación al empleo de materiales híbridos en base a nanotubos de óxidos inorgánicos acoplados a dendrímeros PAMAM y las características de NM del tipo NT- Fe_3O_4 , es que se ha propuesto la síntesis, caracterización y evaluación de la capacidad de adsorción de fármacos

de materiales en base a NT-Fe₃O₄ acoplados a PAMAM G3, los que podrían constituir sistemas con una capacidad de adsorción superior respecto del NT-Fe₃O₄ además de exhibir propiedades para- o superpara-magnéticas que le conferirían la capacidad de ser magneto-dirigido a los sitios de acción. Se espera realizar la inmovilización por medio de la unión covalente entre el NT-Fe₃O₄ y PAMAM mediada por un agente de acople de tipo 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMS). Los estudios de adsorción se hicieron con dos fármacos poco solubles como modelos: silibinina (SIL) y piroxicam (PRX) empleando como adsorbentes NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM G3.



2. HIPÓTESIS

La inmovilización covalente del dendrímero PAMAM de tercera generación en un NT magnético en base a Fe_3O_4 permitirá adsorber efectivamente fármacos que poseen baja solubilidad en agua.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Sintetizar un nanotransportador híbrido Fe_3O_4 -PAMAM (G3) con la capacidad de adsorber fármacos con baja solubilidad en agua.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar y caracterizar una nanoestructura magnética, basada en nanotubos de Fe_3O_4 , obtenidos por una reducción de nanotubos Fe_2O_3 .
- Funcionalizar la nanoestructura magnética con agente de acople por medio de enlaces covalentes.
- Obtener un nanomaterial híbrido, basado en la inmovilización covalente del dendrímero PAMAM en la nanoestructura magnética funcionalizada.
- Estudiar la adsorción de los fármacos piroxicam y silibinina en el nanomaterial híbrido.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Síntesis de los nanotransportadores

4.1.1 Síntesis de nanotubos de magnetita (Fe₃O₄)

Para la obtención de estos nanotubos magnéticos, primero se realizó la síntesis de nanotubos de hematita (α -Fe₂O₃) como precursor de forma, los que fueron obtenidos por tratamiento hidrotermal de una mezcla de disoluciones de FeCl₃·6H₂O (J.T.Baker®) NH₄H₂PO₄ (Sigma-Aldrich®) y Na₂SO₄ (Merck®) de acuerdo al trabajo reportado por Jia y colaboradores [34]. Las relaciones molares empleadas de la sal precursora y los agentes directores de estructura fueron FeCl₃:NH₄H₂PO₄:Na₂SO₄ 36:1,2:1 las que se prepararon en agua desionizada y se llevaron a un autoclave de 100 mL de capacidad. La mezcla se calentó a 220°C durante 48h. El precipitado obtenido se separó por centrifugación y se lavó tres veces con agua desionizada y etanol absoluto (Merck®), respectivamente. Después el sólido se secó en una estufa a vacío por 12h a 80°C, para obtener los nanotubos de Fe₂O₃. Finalmente, los NT-Fe₃O₄ fueron obtenidos por reducción de los NT-Fe₂O₃ a 360°C bajo flujo continuo de H₂ 5%v/v en Ar durante 5h en una rampa de calentamiento de 1°C/min. El rendimiento de la síntesis fue de un 91%.

4.1.2 Funcionalización de NT-Fe₃O₄ con el agente de acople 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano

Los NT-Fe₃O₄ se dispersaron en tolueno (Merck®) seco, el cual fue previamente desgasificado con N₂ por 1h en un reactor de vidrio provisto de agitación mecánica y atmósfera controlada (ver Figura 6). Al tolueno se agregó 1 g de NT- Fe₃O₄ formando una dispersión negra, la que se calentó hasta alcanzar la temperatura de ebullición. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se inyectó el agente de acople 3-glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMS 98% Aldrich®) en relación 1 mL GPTMS por 1 g de soporte [13, 14]. La reacción se mantuvo a reflujo por 24h. Una

vez obtenido NT-Fe₃O₄-GPTMS, se lavó con acetona (Merck®) para eliminar el exceso de GPTMS y se secó en estufa a vacío por 12h a 40°C. El rendimiento de la reacción acople se determinó por medio de análisis termogravimétrico el cual se adjunta en la sección 5.1.2.



Figura 6. Sistema de reacción para realizar las modificaciones superficiales de NT-Fe₃O₄. Fuente: Elaboración propia.

4.1.3 Acoplamiento de NT-Fe₃O₄-GPTMS con dendrímero PAMAM

En un reactor de vidrio provisto de agitación mecánica (Figura 6) se agregaron 0,50 g de NT-Fe₃O₄-GPTMS con 25 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®) seco, generándose una dispersión negra que se agitó durante 1h en N₂ a 40°C. Posteriormente se disolvió 86,3 mg de dendrímero PAMAM G3 (20% m/m en metanol, Sigma-Aldrich®) seco en 5 mL de DMSO seco y se agregó al sistema de reacción el cual se mantuvo en agitación mecánica y a 40°C por un periodo de 48h. El material obtenido se lavó exhaustivamente con metanol (Merck®), para eliminar los restos de DMSO y PAMAM adsorbidos. Por último, el sólido NT-Fe₃O₄-PAMAM se secó al vacío a 40°C por un periodo de 24h. El rendimiento de la reacción conjugación se determinó por medio de análisis termogravimétrico el cual se adjunta en la sección 5.1.2.

4.2 Caracterización de los sistemas

4.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

Un espectro IR se obtiene al pasar radiación IR a través de una muestra y determinar que fracción de esta radiación incidente ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada banda en el espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula. Los espectros en la región infrarroja están asociados a las transiciones entre niveles de energía vibracional; estos niveles corresponden a vibraciones, tensión-contracción (*stretching*) y flexiones (*bending*) de los enlaces y otros movimientos complejos de las moléculas [64]. La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre $14290\text{-}10\text{ cm}^{-1}$. El intervalo que abarca la espectroscopia infrarroja puede dividirse en tres regiones: IR cercano (NIR): $14290\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales.

En los experimentos comunes de FT-IR, un haz de luz infrarroja atraviesa la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida a cada longitud de onda. Esto puede lograrse barriendo el espectro con un haz de luz monocromático, el cual cambia su longitud de onda a través del tiempo o usando una transformada de Fourier para medir todas las longitudes de onda a la vez, como se muestra en la Figura 7. A partir de esto, se obtiene un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual permite una interpretación de la naturaleza de los enlaces químicos presentes. La técnica de FTIR se ha utilizado para estudiar materiales de tamaño nanoescala, como moléculas funcionales injertadas covalentemente en nanotubos de carbono [65], y nanotubos de TiO_2 acoplados a dendrímero PAMAM [13].

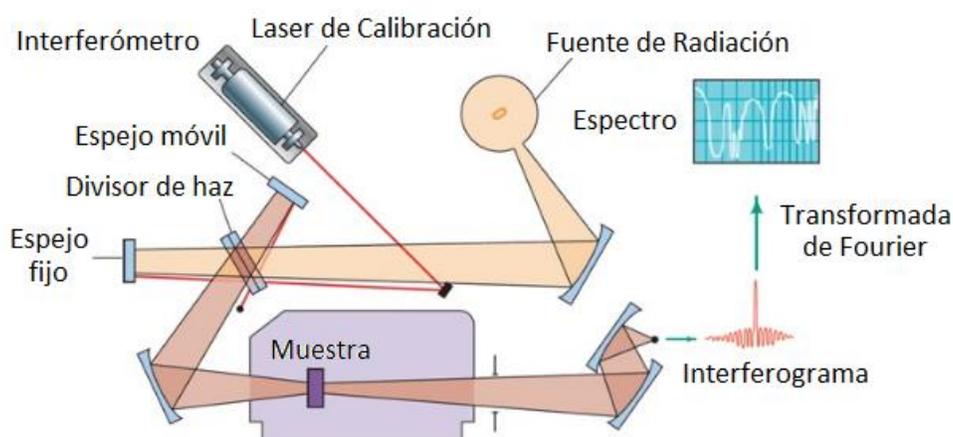


Figura 7. Esquema del equipamiento de un FT-IR. Fuente: Elaboración propia.

Equipamiento:

Los materiales puros e híbridos se analizaron en el equipo Nicolet marca Nexus FT-IR, en la zona del IR medio, usando como blanco pastilla KBr. Para ello se homogeneizó 1 mg de muestra en 100 mg KBr, seguido por la obtención de la pastilla en prensa hidráulica, por último se colocó en el portamuestra la pastilla y se midió el espectro a temperatura ambiente barriendo números de onda en el intervalo medio ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) y con un número de acumulaciones de 64 scan.

4.2.2 Difracción de Rayos X (DRX)

Los rayos X son una forma de radiación electromagnética que tiene elevada energía y corta longitud de onda; del orden de los espacios interatómicos de los sólidos. Cuando un haz de rayos X atraviesa un sólido, la radiación se dispersa al interactuar con los electrones de los átomos. En este caso, cada capa de átomos refleja parte del haz de rayos X; los haces reflejados en las capas sucesivas de átomos del sólido pueden presentar ondas que en una determinada dirección, concuerdan en fase con las ondas reflejadas por otras capas, es decir se produce una interferencia constructiva, a este fenómeno se le llama difracción de rayos X.

La difracción de rayos X se puede describir simplemente como la reflexión de un haz de rayos X incide sobre los planos cristalinos de una muestra sólida, empleando la ley de Bragg, tal como se muestra en la Figura 8 [64].

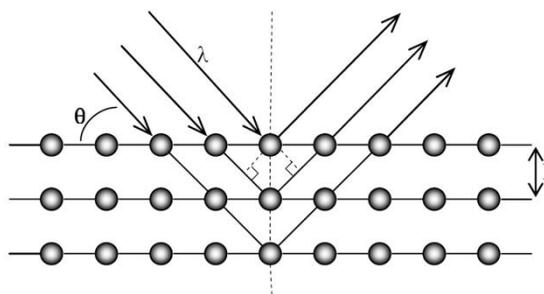


Figura 8. Difracción de Rayos X producida por los diferentes planos de un cristal.
Fuente: Elaboración propia.

La técnica de difracción más común utiliza una muestra pulverizada o policristalina consistente en muchas partículas diminutas y orientadas al azar que se exponen a una radiación de rayos X monocromática. Como cada partícula de polvo es un cristal, teniendo una gran cantidad de ellos orientados libremente se asegura que algunas partículas estén orientadas adecuadamente para que sus planos cristalográficos cumplan las condiciones para la difracción, y de esta forma obtener perfiles de difracción típicos de cada material.

Equipamiento:

En este estudio se utilizó el difractómetro Rigaku modelo Geigerflex II empleando el método de polvo y usando como estándar interno silicio (cuarzo). La muestra, previamente pulverizada, se coloca en un porta objeto para ser irradiado con la línea $\kappa_{\alpha 1}$ del anticátodo de Fe (λ : 1.9360 Å) a 35kV y 15mA, usando un filtro de manganeso para eliminar la línea de κ_{β} .

4.2.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La técnica más utilizada para la caracterización de nanomateriales es la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la que ofrece imágenes directas de los nanomateriales con una resolución espacial hasta el nivel de las dimensiones atómicas 10^{-9} m [66]. El fundamento del TEM se basa en un haz de electrones que manejados a través de lentes electromagnéticas se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío. Electrones que atraviesan la muestra son recogidos y focalizados por la lente objetivo generando una imagen intermedia ampliada. La imagen es ampliada aún más gracias a las lentes proyectoras, las cuales controlan la ampliación de la imagen en la pantalla fluorescente, como se muestra de forma esquemática en la Figura 9 [67]. El TEM mejora los análisis morfológicos y estructurales de nanomateriales, además proporciona una mejor resolución espacial y la capacidad para mediciones analíticas adicionales [66].

Equipamiento

Las muestras analizadas fueron previamente tratadas tomando una pequeña porción del sólido el que se molió y disgregó en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino. Éste se dispersó en una mezcla de etanol/agua (50 %v/v) y se sembró en una gradilla de cobre recubierta por una capa de carbón y colodión. Las muestras fueron analizadas en un microscopio TEM, modelo JEOL JEM -1200EX II, con una resolución de 5Å a 120Kv, las imágenes obtenidas fueron trabajadas en el software ImageJ donde se determinaron los diámetros promedio, y el largo promedio de las partículas empleando la data estadística entregada directamente por el software.

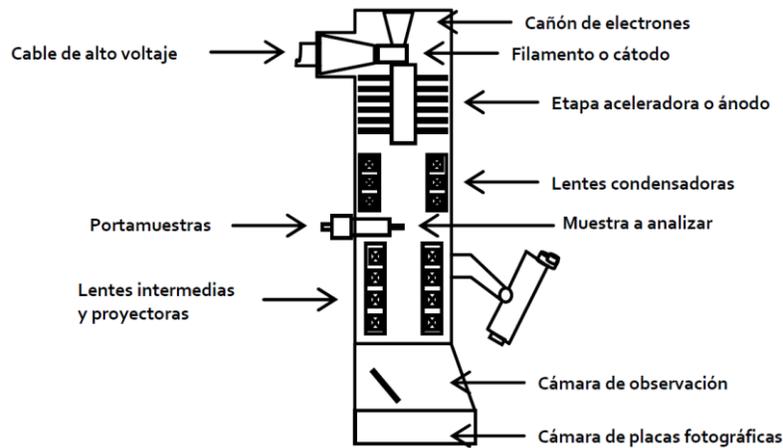


Figura 9. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión. Fuente: Elaboración propia.

4.2.4 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido (SEM) es una técnica que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado, además del procesamiento y análisis de imágenes obtenidas. Las principales utilidades del SEM son su alta resolución, la gran profundidad de campo que resuelve una imagen tridimensional de la muestra y la relativa sencillez de preparación de las muestras [66, 68]. La imagen entregada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que barre un área determinada sobre la superficie de la muestra, tal como se muestra la Figura 10. La técnica consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que, captadas con detectores adecuados, proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra.

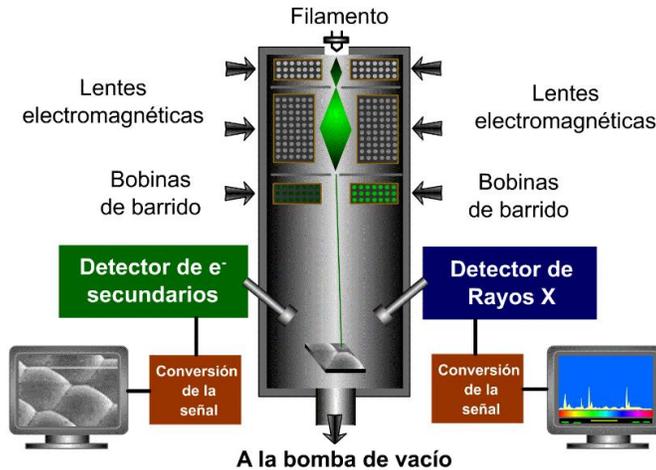


Figura 10. Esquema de un microscopio electrónico de barrido. Fuente: Elaboración propia.

Equipamiento

Los materiales se analizaron tomando 10 mg de muestra, depositándolos en un porta objeto de aluminio y posteriormente fue analizado en microscopio SEM, modelo JEOL JSM-6380LV.

4.2.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que consiste en la medida continua, en función de la temperatura, de la ganancia o pérdida de la masa de un compuesto en una atmósfera determinada [69]. Este análisis suministra información acerca de la estabilidad térmica y la composición porcentual de la muestra original. La instrumentación utilizada en termogravimetría se denomina termobalanza y consta básicamente de cinco elementos: balanza de precisión, horno calefactor controlado por un programador, sensor de temperatura (termopar), sistema de admisión de gases y sistema de adquisición de datos. Las condiciones requeridas para la balanza son análogas a cualquier balanza analítica: exactitud, sensibilidad y reproducibilidad.

Equipamiento

Las muestras fueron llevadas a un analizador térmico modelo TGA/SDTA 851e. Los perfiles de descomposición térmica se barrieron entre 25-1000°C a una velocidad de calentamiento de 5°C min⁻¹ en un flujo de 20 mL·min⁻¹ de N₂ u O₂ empleando un crisol de Al₂O₃.

4.2.6 Isotermas de Adsorción-Desorción de N₂ a -196°C

La caracterización superficial de materiales porosos; como óxidos metálicos, zeolitas o polímeros orgánicos; mediante isotermas de adsorción-desorción permite determinar parámetros tales como: el área superficial, el volumen y la distribución del tamaño de poros [13, 70]. Cualquier material sólido que contiene cavidades, canales o intersticios puede ser considerado como poroso (Figura 11). Los poros se pueden clasificar en cerrados y abiertos. Los cerrados son aquellos que influyen en propiedades macroscópicas como densidad o resistencia mecánica, pero no son accesibles a procesos de adsorción. Los abiertos, a su vez, se pueden clasificar según su forma o manera de conexión con el exterior. La rugosidad de la superficie externa de la muestra se distingue de la porosidad en que su profundidad es menor que su anchura.

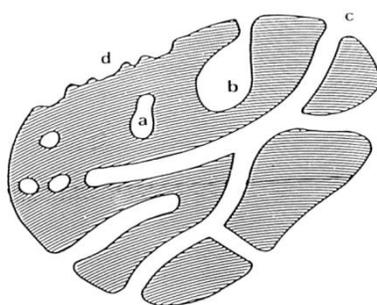


Figura 11. Representación esquemática de un sólido poroso [71].

La estructura porosa se analiza mediante isotermas de adsorción de gases. Esta consiste en la adsorción física de un gas (adsorbato) sobre un sólido (adsorbente) a una temperatura dada para distintas presiones relativas de gas.

Los adsorbatos más utilizados son el N_2 , CO_2 , CO , NO , benceno y algunos hidrocarburos alifáticos de cadena corta. La adsorción de N_2 a $-196^\circ C$ (77 K) es la más utilizada, debido a que cubre todo el rango de porosidad e interacciona débilmente con la mayoría de los sólidos. Además, la misma isoterma puede ser utilizada para el análisis del tamaño de poro y para superficie específica empleando una variedad de modelos. El modelo más usado es el de Brunauer-Emmett-Teller (BET), el cual se basa en dos hipótesis principales: a) la superficie del adsorbente se supone uniforme y no porosa, b) las moléculas del gas se adsorben sobre la superficie en capas sucesivas, completas o no, en equilibrio dinámico entre sí y con las moléculas del gas [72, 73].

Equipamiento

Los valores de superficie específica, se obtuvieron a partir de las isotermas de adsorción de nitrógeno a $-196^\circ C$, realizados en un equipo automático Micromeritics modelo ASAP 2010 en el rango de presión relativa de 0,05-0,3. Se utilizó el método BET para calcular las superficies específicas utilizando la parte lineal del gráfico de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC. El volumen de poro y las distribuciones de tamaño de poro fueron calculados a partir de las ramas de desorción de las isotermas, utilizando el método de Barret-Joyner-Halenda (BJH).

4.2.7 Magnetización del material

Cuando un material se expone a un campo magnético, el giro de sus electrones producen un momento magnético paralelo al campo al que está expuesto; esto es, en el material se ha inducido una magnetización (M) que es proporcional al campo magnético externo (H).

En la Figura 12, se observa la curva de magnetización de un material ferromagnético, que corresponde a un gráfico de la magnetización (M) frente a un campo aplicado (H). Inicialmente a medida que aumenta la intensidad del campo aplicado H , M también aumenta hasta alcanzar el punto de saturación M_s . Entonces, cuando la intensidad del campo H comienza a disminuir por debajo del punto de saturación, M no lo hace en la misma proporción que antes, sino que a valores correspondientes a la curva superior. Este comportamiento se conoce como histéresis, y se produce porque los dominios magnéticos que se alinean con un incremento del campo no vuelven a su orientación original si el campo es menor. Cuando el campo aplicado H regresa al valor cero, el material aun presenta magnetización, denominada magnetización remanente M_r . Para eliminar la magnetización remanente se debe aplicar un campo H_c en sentido contrario al campo inicialmente aplicado, conocido como campo coercitivo. Si se continúa aumentando el campo, se produce otra saturación en dirección contraria. Si desde esa posición se disminuye el campo aplicado se vuelve a repetir el mismo comportamiento dando lugar aún ciclo de histéresis [74].

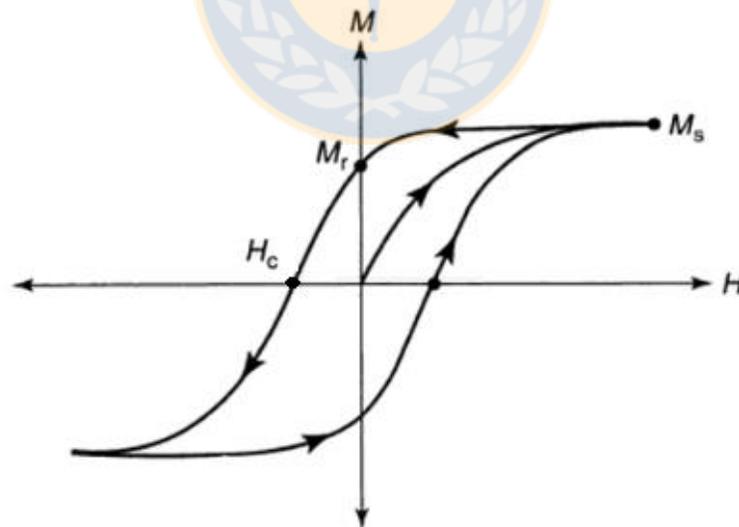


Figura 12. Representación de curva de magnetización para un material ferromagnético [74].

Los parámetros M_s , M_r y H_c obtenidos a partir de la curva de magnetización corresponden a propiedades intrínsecas de un material, aunque los últimos dos parámetros mencionados, no solo depende del tipo del material sino además del tamaño y forma del material, temperatura y defecto del material [75].

Con la finalidad de comparar el comportamiento magnético de diferentes materiales frente a un campo aplicado, éstos se pueden clasificar en; diamagnético, paramagnético, ferromagnético (Figura 12), ferrimagnético, superparamagnético, antiferromagnético. El instrumento más utilizado en los análisis de materiales magnéticos es el magnetómetro de muestra vibrante (VSM), diseñado para la medición de la magnetización y del cual se obtiene el ciclo de histéresis [76, 77].

Equipamiento

Para las curvas de magnetización se pesaron 10 mg de las muestras, las que se depositaron en cápsula de policarbonato. Dicha cápsula fue llevada al portamuestra del magnetómetro de muestra vibrante (VSM) modelo MLVSM9 MagLab 9T, Oxford Instrument. Todas las mediciones se realizaron a 17°C.

4.2.8 Adsorción de Fármacos en Nanotubo Fe_3O_4 y en nanotransportador híbrido Fe_3O_4 -PAMAM

Los ensayos se diseñaron para seguir la adsorción del fármaco en función del tiempo. Para ello en un vaso de precipitado, colocado sobre una placa agitadora con control de temperatura, se contactan 200 mL de una disolución acuosa de SIL (0,05 mg/mL) con 10 mg del nanotransportador, dispersos en 2 mL de agua desionizada y colocados en el interior de bolsa de diálisis (Thermo Scientific SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO, 22mm) tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 13. La cinética de la adsorción se siguió por medio de espectroscopia de UV-visible, tomando alícuotas de 1,0 mL y monitoreadas a una longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{m\acute{a}x}$) del fármaco (288 nm) cada una hora empleando un espectrofotómetro UV-VIS (UV2310II *Spectrophotometer*) hasta

que no se detecta variación en las lecturas absorbancia en función.

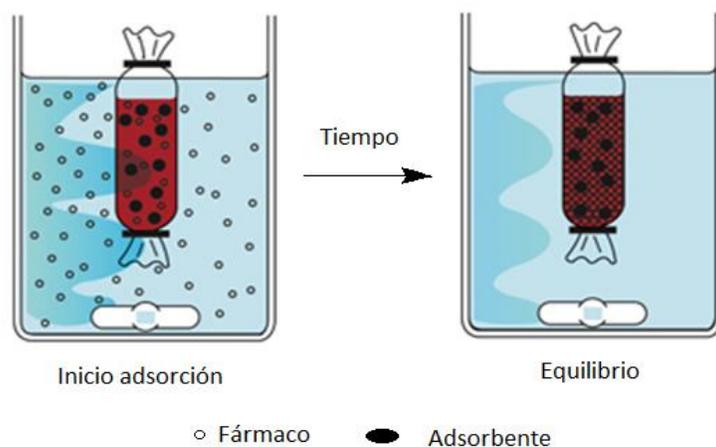


Figura 13. Esquema del sistema de adsorción de fármacos en los nanotransportadores NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

El mismo procedimiento fue empleado para evaluar la capacidad de encapsulación de piroxicam (PRX) donde se empleó una concentración inicial de 0,01 mg/mL y las medidas de absorbancia se siguieron a $\lambda_{\text{máx}} = 350$ nm. Todas las medidas de absorbancia se realizaron por triplicado y la cuantificación se realizó empleando las respectivas curvas de calibración de cada fármaco. Para ambos sistemas, NT-Fe₃O₄ y Fe₃O₄-PAMAM, las medidas de encapsulación se realizaron por duplicado.

5. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Caracterización de los nanomateriales

5.1.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

La caracterización espectroscópica por FT-IR entrega información sobre los grupos superficiales existente en una muestra. En la Figura 14, se observa el espectro de NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM. En el caso de NT-Fe₃O₄ se observa una banda a 574 cm⁻¹ que corresponde al stretching del enlace de Fe-O de la magnetita, seguido por la banda ubicada entre 945-980 cm⁻¹ asociada al bending del enlace Fe-O-H, atribuido a los grupos hidroxilos adsorbidos en la superficie de NT-Fe₃O₄. El bending a 1628 cm⁻¹ se asigna a la vibración de las moléculas de H₂O fisisorbidas sobre la superficie de la magnetita [78], por último, entre 3090-3430 cm⁻¹ se observa una banda ancha correspondiente al stretching de los grupos Fe-OH superficiales [79, 80].

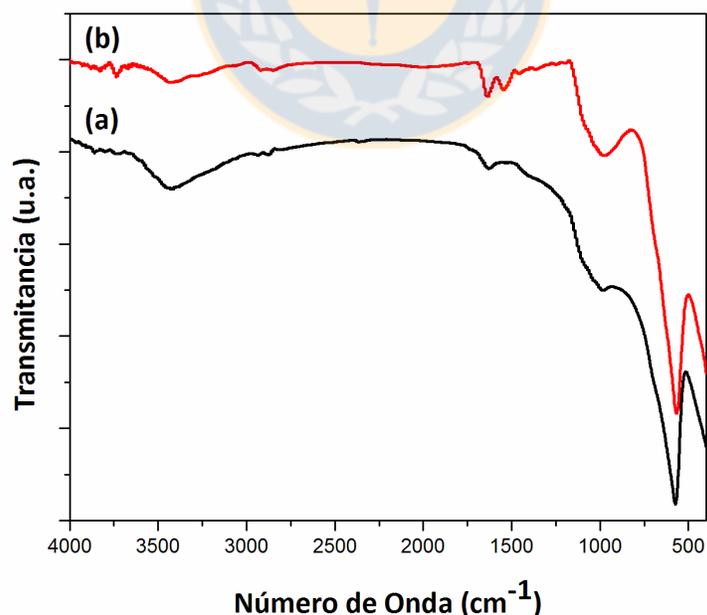


Figura 14. Espectro FT-IR de (a) NT-Fe₃O₄, (b) NT-Fe₃O₄-PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

El NT-Fe₃O₄-PAMAM, tiene un espectro similar al NT-Fe₃O₄, pero se pueden identificar la banda asociada al bending N-H de las aminas primarias del PAMAM a 1541 cm⁻¹, mientras que a 1638 cm⁻¹ se observa una banda atribuida al grupo carbonilo (C=O) de las amidas que componen ramas de crecimiento internas del dendrímero. Las bandas entre 2849-2912 cm⁻¹ corresponden a los stretching de los grupos metileno (-CH₂-) presentes en el agente de acople GPTMS y en la cadena alifática del dendrímero PAMAM [13, 81]. Por último la banda de vibración atribuida de los grupos -NH₂ terminales se solapa con la señal de los grupos -OH de la superficie del NT-Fe₃O₄. Con lo anterior, se verifica la presencia del dendrímero PAMAM y la superficie del NT-Fe₃O₄, utilizando como agente de acople GPTMS.

5.1.2 Análisis Termogravimétrico

Por medio del estudio de TGA se ha podido determinar la cantidad de PAMAM conjugada en el sólido NT-Fe₃O₄. En la Figura 15 se muestran las curvas de pérdida de masa porcentual en función de la temperatura para los tres sistemas preparados. En el caso de NT-Fe₃O₄ se observa una curva continua hasta alrededor de los 200°C donde comienza la pérdida de materia que corresponde a desorción de agua fuertemente fisisorbida en el material. En una segunda etapa, a 500°C se detecta la pérdida en masa atribuida a la oxidación de las especies Fe²⁺ a Fe³⁺ con la consecuente pérdida de agua [82, 83].



Posterior a 650°C se detecta una continua pérdida de masa la que se asume corresponde a la deshidroxilación de las especies Fe-OH remanentes de la formación de Fe₂O₃. Cuando al material se le inmoviliza el agente de acople GPTMS, se observa un perfil de pérdida en masa diferente al material de partida. La temperatura de inicio es de alrededor de 250°C en la cual comienza la combustión de la materia orgánica atribuida al anclaje del agente de acople en la

superficie de NT-Fe₃O₄, finalizando alrededor de los 430°C. En la zona del termograma, que denota la oxidación de las especies Fe²⁺ a Fe³⁺, se observa un desplazamiento a 550°C atribuido a la estabilización superficial que le confieren los enlaces Fe-O-Si que se han formado durante el proceso de anclaje [84, 85].

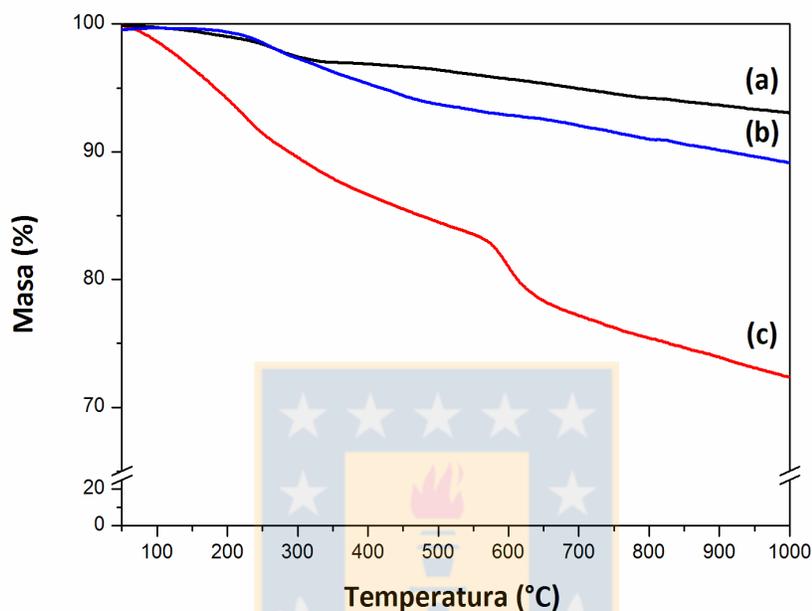
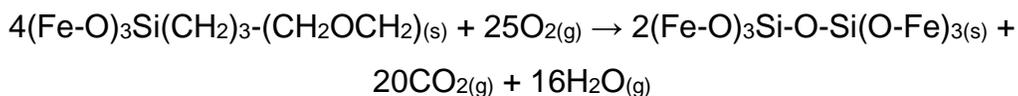


Figura 15. Termogramas de los materiales realizados en atmósfera de O₂. (a) NT-Fe₃O₄, (b) NT-Fe₃O₄-GPTMS y (c) NT-Fe₃O₄-PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

La diferencia en las masas remanentes entre ambas curvas ha permitido estimar la cantidad de GPTMS que se ha inmovilizado en NT-Fe₃O₄, el cual se resume en la Tabla 2. Sólo se puede determinar un estimado por esta técnica pues se sabe que las especies Fe-O-Si presente en la muestra se pueden sustituir en la matriz del NT-Fe₃O₄ durante el proceso produciendo la mineralización del GPTMS.



Lo que al mismo tiempo podría provocar el desplazamiento de la oxidación de las especies Fe^{2+} a temperaturas superiores.

Tabla 2. Porcentaje de pérdida de masa y material acoplado GPTMS y PAMAM (G3) al NT- Fe_3O_4 . Fuente: Elaboración propia.

Material	(%)	($\mu\text{mol/g}$)	($\mu\text{mol/m}^2$)
NT- Fe_3O_4 -GPTMS	3,9	165	6,6
NT- Fe_3O_4 -PAMAM	16,8	24,3	0,97

Por último, para el material híbrido, NT- Fe_3O_4 -PAMAM muestra un perfil de pérdida de masa continua desde los 75°C en adelante atribuido a la desorción de H_2O fisisorbida, la que se incrementa respecto de los materiales precursores atribuidos a la alta capacidad de adsorber agua por parte del dendrímero inmovilizado en superficie. Por sobre los 250°C comienza una segunda etapa de pérdida en masa, la que corresponde a la calcinación de la materia orgánica conferida por GPTMS-PAMAM, la que ocurre en dos etapas: 1) combustión de la materia orgánica alifática (250°C) y 2) a la combustión asociada a los enlaces amidas de la ramas de crecimiento de PAMAM (450°C), la que al mismo tiempo se acopla con la oxidación de la especie Fe^{2+} del material inorgánico. Comparando los resultados obtenidos para NT- Fe_3O_4 y NT- Fe_3O_4 -GPTMS se puede estimar el contenido de PAMAM conjugado a la nanoestructura, lo cual se resume en la Tabla 2. Con estos resultados se puede inferir que la reacción de inmovilización ha afectado el contenido en masa del material el que se puede atribuir a la conjugación de PAMAM en los NT- Fe_3O_4 .

5.1.3 Isotermas de Adsorción-Desorción de N_2 a -196°C

Las isotermas de adsorción/desorción de N_2 a -196°C de los materiales NT- Fe_3O_4 y NT- Fe_3O_4 -PAMAM se presentan en la Figura 16. Ambas isotermas son del tipo IV, de acuerdo a la calificación BDDT, típica de sólidos mesoporosos y con ciclo de histéresis tipo H1 [72, 73], características de capilares de forma tubular con

abertura en sus extremos. En la Tabla 3 se resumen los valores de superficies específicas (S_{BET}), distribuciones de tamaño promedio de poro de los materiales (d_{Poros}) y volumen total (V_{Poros}), mostrando que la funcionalización con GPTMS seguido por la inmovilización con dendrímero PAMAM en la superficie del NT- Fe_3O_4 provoca una disminución de los valores.

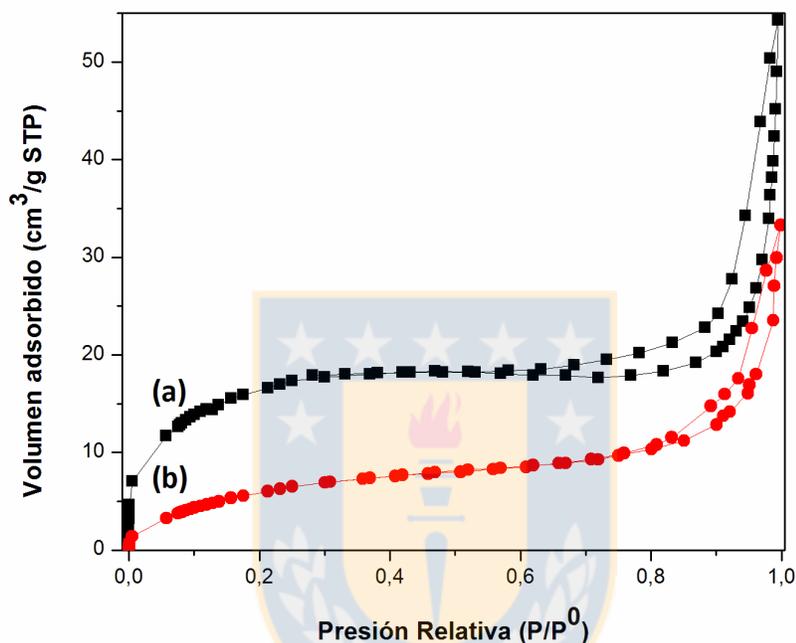


Figura 16. Isotherma de adsorción/desorción de N_2 a $-196^\circ C$ para (a) NT- Fe_3O_4 y (b) NT- Fe_3O_4 -PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

Lo anterior se debe a que el GPTMS y PAMAM, producen el cubrimiento parcial de la superficie del material tubular NT- Fe_3O_4 , lo que lleva a que los poros se cierren o tapen, estrechando sus cavidades y haciendo que el proceso de desorción ocurra a menores presiones relativas. Lo descrito con anterioridad, concuerda con el cambio en el ciclo de histéresis, gracias a una disminución del diámetro promedio de poro o bien un aumento en el grosor de la pared del material tubular. Esto es una evidencia experimental de la modificación superficial del nanotubo, la que presumiblemente ocurre de forma preferente en la superficie interna del material.

Tabla 3. Superficie específica, tamaño promedio de poro y volumen de poro determinadas por las de BET y BJH [73, 86] para los materiales en base a NT-Fe₃O₄ sintetizados. Fuente: Elaboración propia.

Material	S_{BET} (m²g⁻¹)	d_{Poro} (nm)*	V_{Poro} (cm³g⁻¹)*
NT-Fe ₃ O ₄	59	33	0,1
NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM	25	19	0,05

*condiciones normales Presión y temperatura

5.1.4 Difracción de Rayos X

En la Figura 17, se muestran los perfiles de DRX para de NT α-Fe₂O₃, NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM. El primer material corresponde a NT α-Fe₂O₃, debido a la síntesis previa de nanotubos de hematita, precursor de los nanotubos de magnetita. Se observan las difracciones propias de la hematita, la cual coincide con su estructura hexagonal (JCDS 33-0664) [87-89]. Además en la figura 17 se observa la desaparición y aparición de picos desde el primer al segundo material, en este último aparecen los picos de la magnetita, esto indica la reacción de reducción de la hematita a magnetita con el consecuente cambio estructural.

Los materiales NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM se detectan las difracciones típicas para Fe₃O₄ con estructura cristalina del tipo magnetita la cual corresponde a una estructura cúbica centrada en la cara de tipo espinela (AB₂O₄) inversa (JCPDS 19-0629) [29, 79, 80]. La modificación superficial con agente de acople seguido por el acoplamiento con dendrímero PAMAM, no provoca cambios en la estructura cristalina del material NT-Fe₃O₄.

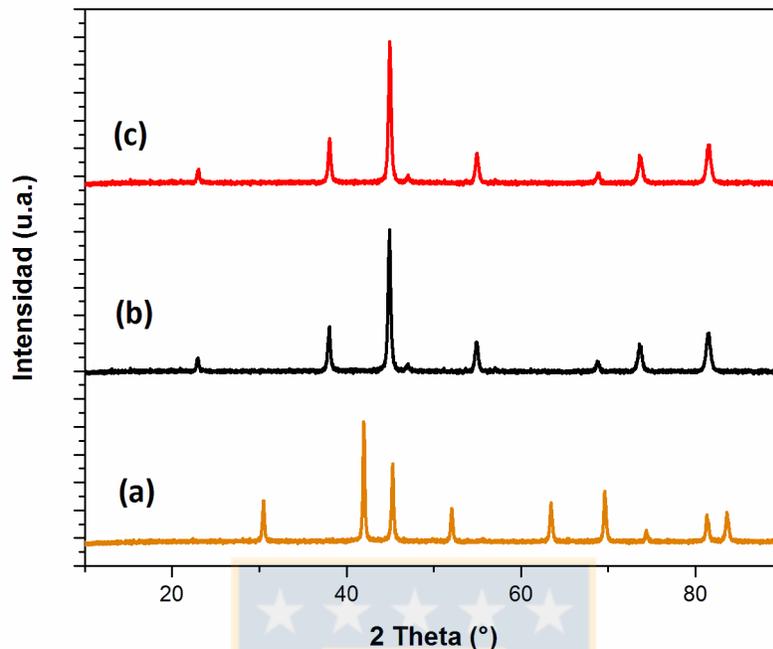


Figura 17. Difractograma de rayos X para (a) NT α - Fe_2O_3 , (b) NT- Fe_3O_4 y (c) NT- Fe_3O_4 -PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

5.1.5 Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión

La estructura tubular de estos materiales se siguió por medio de microscopía electrónica de barrido y transmisión. En relación a la morfología superficial se puede observar en la Figura 18, que en ambos materiales muestran la forma típica de materiales nanotubulares huecos, lo cual ratifica los resultados en la forma de los ciclos de histéresis observados en la caracterización por isothermas de adsorción de N_2 a -196°C (Figura 16). En relación a la modificación superficial del material NT- Fe_3O_4 con GPTMS y PAMAM, se mantiene la morfología del material inorgánico, en acuerdo con la caracterización por DRX.

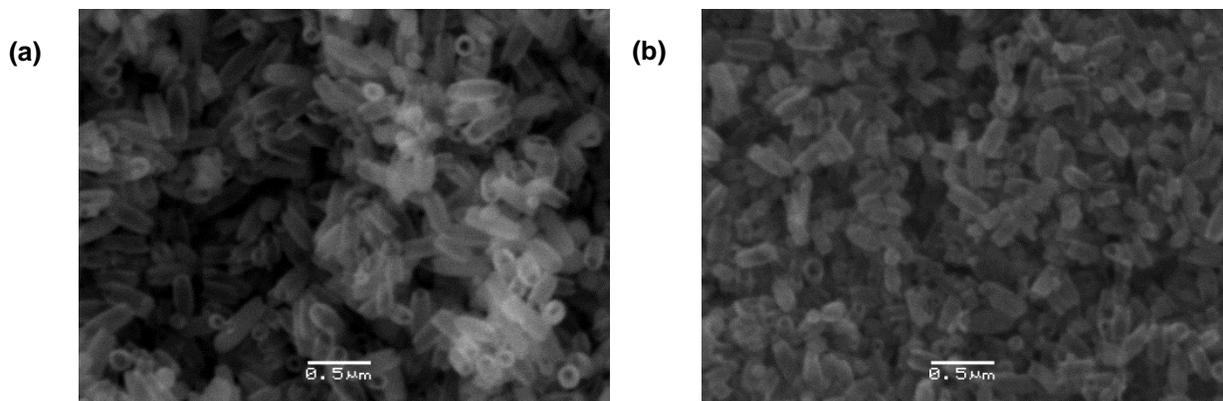


Figura 18. Imágenes de SEM de los materiales (a) NT-Fe₃O₄, (b) NT-Fe₃O₄-PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

Para poder determinar de forma directa los tamaños partícula, longitud y diámetro de NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM se ha realizado la caracterización por TEM y sus respectivas micrografías se muestran en la Figura 19. Al igual que en el caso de SEM se observan nanoestructuras que muestran una morfología definida de tipo tubular con una cavidad regular abierta en sus extremos.

A través del conteo de los nanotubos y la medición directa de sus tamaños se han determinado las curvas de distribución para el largo y diámetro externo de los nanotubos tal como se muestra en la Figura 19. Los valores promedio del largo fueron del orden de 280 y 286 nm y los diámetros externos fueron 151 y 159 nm para NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM respectivamente. Al comparar las imágenes y sus correspondientes dimensiones obtenidas, se puede observar que la morfología del material no se ve afectada al modificar la superficie del NT-Fe₃O₄ durante el proceso de conjugación con el dendrímero PAMAM.

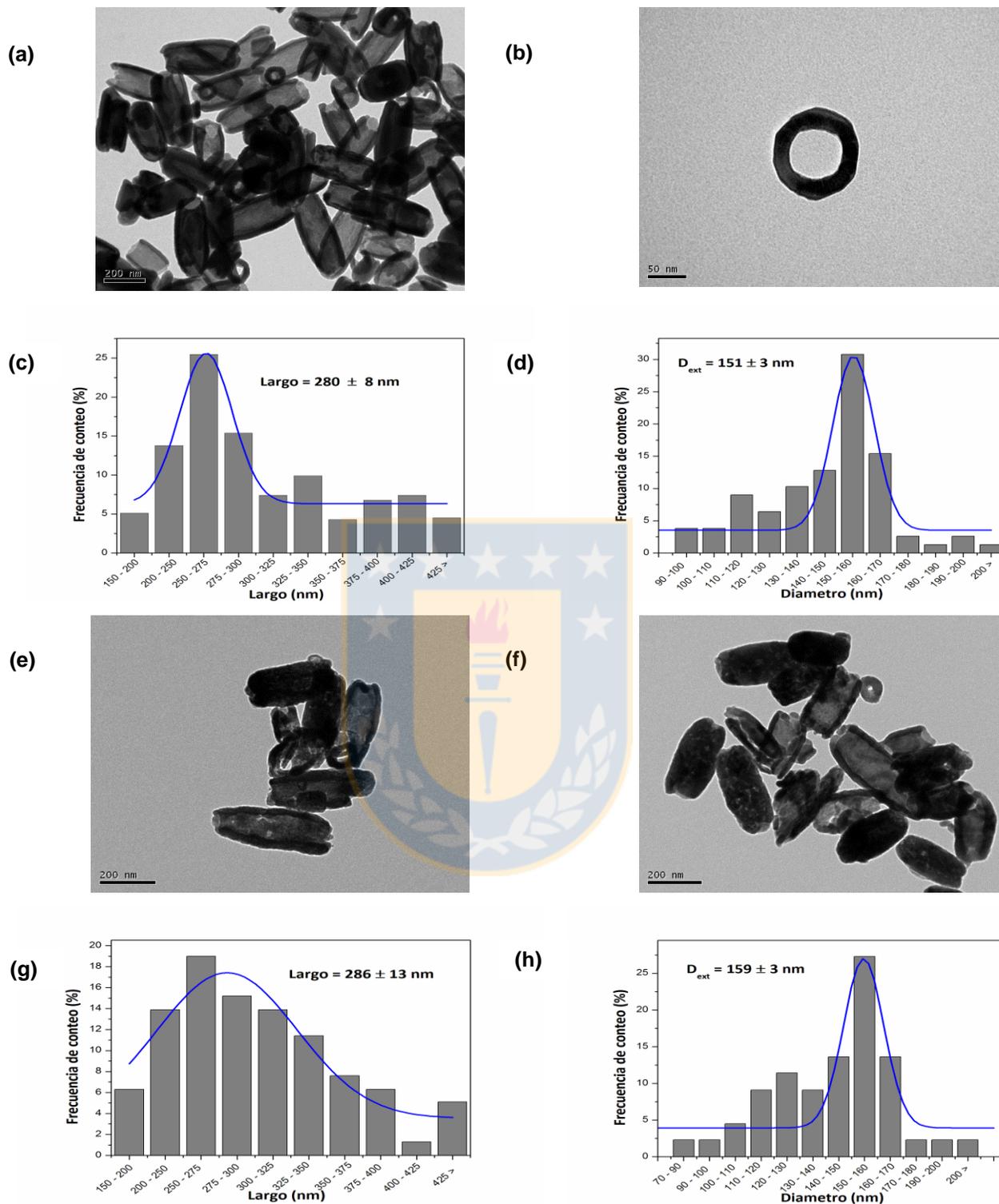


Figura 19. Micrografías de TEM de NT-Fe₃O₄ (a, b), NT-Fe₃O₄-PAMAM (e, f) y las curvas de distribución del largo (c, g) y diámetro externo (d, h), para ambos NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM, respectivamente. Fuente: Elaboración propia.

5.1.6 Propiedades magnéticas

Las propiedades magnéticas de NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM fueron estudiadas por medio de un análisis VSM y las curvas de magnetización se muestran en la Figura 20, dando como resultado para ambos materiales la propiedad ferrimagnética. Aquello se debe a que la fórmula de la magnetita Fe₃O₄, puede escribirse en la forma Fe³⁺[Fe²⁺Fe³⁺]O₄ según la fórmula general AB₂O₄ de tipo espinela inversa. Donde la mitad de los cationes Fe³⁺ ocupan sitios tetraédricos mientras que la otra mitad de Fe³⁺ y los cationes Fe²⁺ ocupan los sitios octaédricos. Los cationes de Fe³⁺ se distribuyen, por tanto, en dos posiciones diferentes en la estructura pero con direcciones opuestas de espín magnético, por lo tanto, los momentos magnéticos de los cationes Fe³⁺ se anulan entre sí, mientras que los momentos magnéticos de los cationes Fe²⁺, que posee espín de menor magnitud comparado con Fe³⁺, son los responsables del momento magnético neto en la magnetita [27, 77, 90]. De la gráfica de la Figura 20 se observa que el ciclo de magnetización muestra un ciclo de histéresis de similares características. Este resultado permite suponer que la modificación con el agente de acople GPTMS y posterior anclaje de PAMAM no perturbó las propiedades magnéticas del soporte durante la síntesis. De la Figura 20 se pueden extraer el valor de la magnetización remanente (M_r) y coercitividad (H_c) en ausencia del campo aplicado y el valor de magnetización de saturación (M_s) los cuales se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de parámetros magnéticos para los materiales preparados a 17°C. Fuente: Elaboración propia.

Material	M_s (emu/g)	M_r (emu/g)	H_c (Oe)
Fe ₃ O ₄ <i>bulk</i>	92	-	< 100
NT-Fe ₃ O ₄	67	16	249
NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM	58	10	240

Los valores de M_s que se encuentran en los materiales nanoestructurados son generalmente más pequeños que la magnetita *bulk*, lo cual puede ser atribuido al aumento de efectos superficiales y a la presencia de dendrímero PAMAM. A su vez se han reportado valores experimentales para M_s en nanopartículas de magnetita que abarcan entre 30-50 emu/g, inferior al valor del mineral magnetita; 90 emu/g [39, 91-93]. Por el contrario los valores de H_c encontrados para ambas nanoestructuras son mayores al ser comparado con la magnetita *bulk*, debido a la disminución del tamaño de partícula.



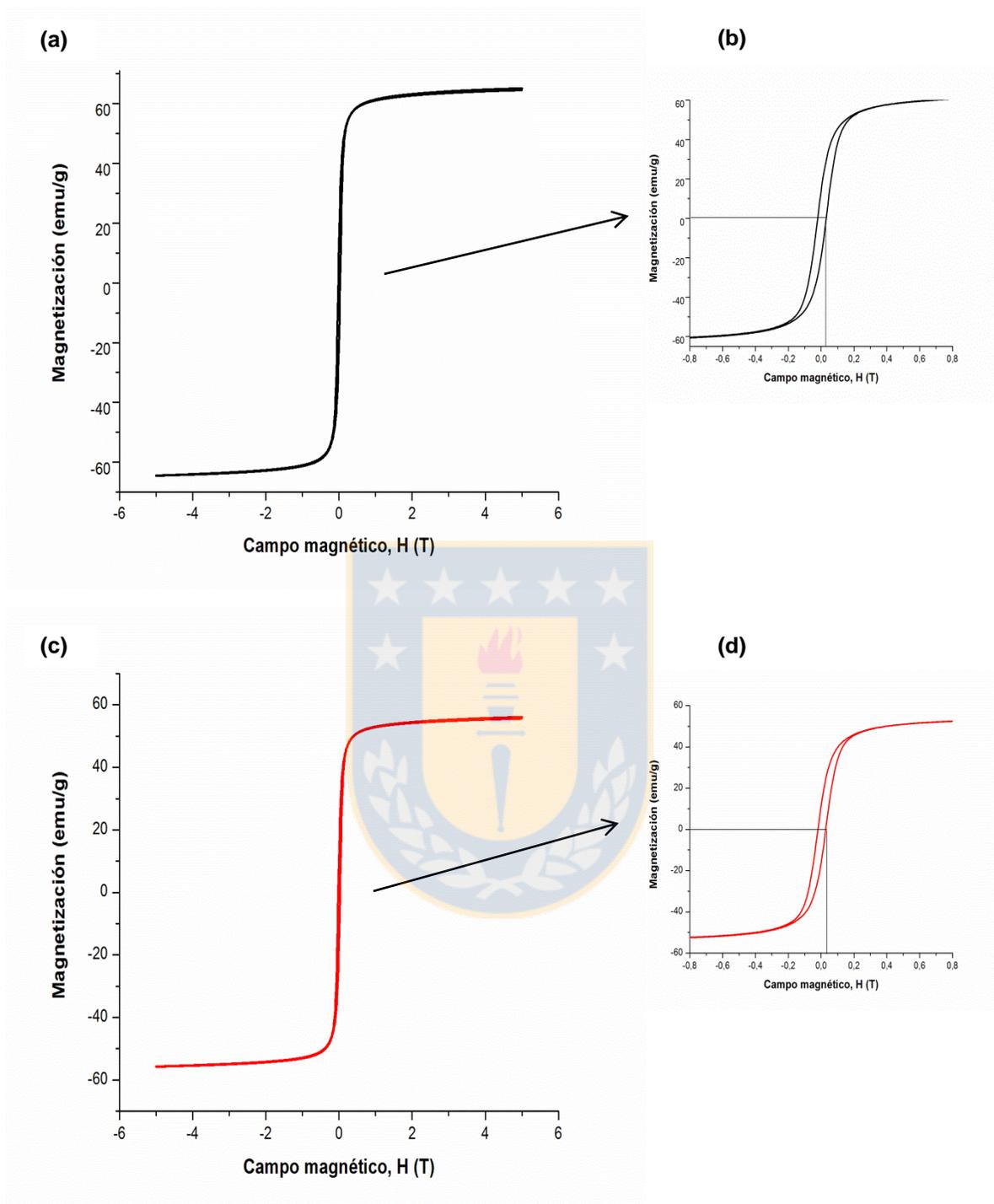


Figura 20. Curva de magnetización obtenida para NT-Fe₃O₄ (a, b) y NT-Fe₃O₄-PAMAM (c, d) utilizando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) a 17°C. Fuente: Elaboración propia.

5.2 Estudios de la adsorción de Fármacos en Nanotubo Fe₃O₄ y en nanotransportador híbrido Fe₃O₄-PAMAM

5.2.1 Fármacos de interés

Luego de la caracterización de los materiales puro e híbrido se procedió a realizar en cada uno de ellos la adsorción de fármacos. Esto con la finalidad de determinar el tiempo y capacidad máxima de adsorción mediante estudios de cinética de adsorción.

En esta investigación se ha decidió emplear dos clases de fármacos poco solubles para estudiar la capacidad de adsorción de los nanotransportadores sintetizados. El piroxicam (PRX, M: 331,348 g/mol) es una clase de fármaco antiinflamatorio no esterooidal, perteneciente al grupo oxicam [94, 95], como se observa en la Figura 21 (a), posee un grupo enólico (pK_a : 1,8) y un grupo piridínico (pK_a : 6,3) [96, 97]; presenta propiedades analgésicas, antipiréticas, a su vez alivia dolores para la artritis reumatoide, la artrosis y los síntomas de la dismenorrea [59].

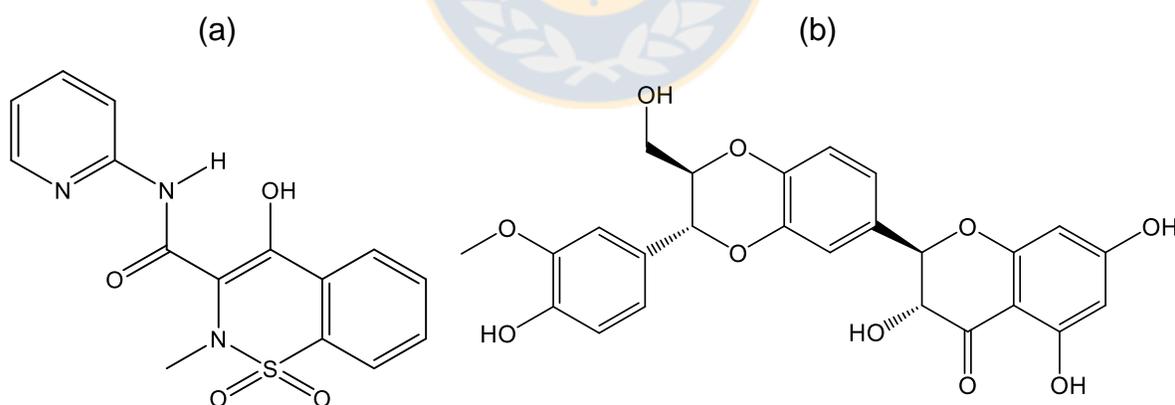


Figura 21. Estructuras de los fármacos de interés: (a) Piroxicam y (b) Silibinina. Fuente: Elaboración propia.

No obstante, PRX provoca efectos secundarios, principalmente úlceras gástricas, además, es prácticamente insoluble en agua [98, 99]. Para reducir estos efectos existen investigaciones que tienen relación con el transporte y liberación de fármacos, que pueden cargar eficazmente el fármaco para apuntar hacia el sitio de acción, aumentando la eficacia terapéutica, y reducir al mínimo los efectos secundarios, donde sistemas de microesferas de albúmina de suero bovino han sido utilizadas para la liberación piroxicam [100].

El otro fármaco de interés estudiado es la silibinina (SIL, M: 482,44 g/mol) que es un flavonoide polifenólico natural que se aísla de la planta de cardo de leche *Silybum marianum*. Posee cinco grupos hidroxilos, un grupo carbonilo y tres grupos fenilos, tal como se muestra en la Figura 21 (b). Esta molécula tiene varios grupos ionizables con sus respectivos pK_{a1} : 7,0; pK_{a2} : 8,77; pK_{a3} : 9,57; pK_{a4} : 11,66 [101]; y ha sido ampliamente utilizada por sus efectos hepatoprotectores. Sin embargo, la eficacia de silibinina como fármaco está muy limitada debido a su escasa solubilidad en agua y una baja biodisponibilidad después de su administración oral. A fin de superar los defectos de la silibinina libre, muchos enfoques se han adoptado como son los sistemas de entrega liposomal, de transporte lipídicos nanoestructurados, de complejo silibinina-fosfolípido y nanosuspensiones [102].

Es importante notar que los estudios de la cinética de adsorción, son determinantes en términos de conocer cómo varía la concentración de fármaco adsorbida en función del tiempo para una proporción fármaco:adsorbente dada. La cinética de adsorción permite conocer el tiempo en que se realiza el proceso de adsorción y ha de practicarse antes de la determinación de una isoterma de adsorción. Puesto que se trabaja con disolución, se debe en cuenta los factores que influyen en el proceso, ya que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio está en función de las características del adsorbente y del adsorbato, de la química de la disolución, de la temperatura y del pH. La data de la cinética de adsorción de los fármacos en los nanotransportadores se ajustó a los modelos

cinéticos de pseudo-primer orden, pseudo-segundo orden y cinéticas que involucran quimisorción [103-106], para ambos nanotransportadores en presencia de los fármacos PRX y SIL.

De forma general se puede decir que el modelo de pseudo-primer orden, o modelo de Lagergren, se basa en la suposición de que cada molécula de adsorbato se adsorbe en un sitio del adsorbente, lo cual en términos de cinética de reacción se expresa como:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1 \cdot (q_s - q_t) \quad (1)$$

y la forma integrada de esta ecuación queda definida como:

$$q_t = q_s(1 - e^{-k_1 t}) \quad (2)$$

donde la q_e y q_t ($\text{mg}_{\text{farm}}/\text{g}_{\text{ads}}$) son la cantidad máxima de fármaco adsorbida una vez alcanzado el equilibrio ($t \rightarrow \infty$) y la cantidad de fármaco adsorbida al tiempo t , respectivamente, y k_1 (h^{-1}) es la constante cinética de pseudo-primer orden.

Para el caso del modelo de pseudo-segundo orden, o modelo de Ho, desarrollado por Ho y McKay [107], supone que el adsorbato se adsorbe en dos sitios activos del adsorbente. En este caso, la ecuación de la cinética de adsorción se expresa como:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 \cdot (q_s - q_t)^2 \quad (3)$$

y la forma integrada de esta ecuación queda definida como:

$$q_t = \frac{k_2 \cdot q_s^2 \cdot t}{1 + k_2 \cdot q_s \cdot t} \quad (4)$$

donde k_2 ($\text{g}_{\text{ads}}/\text{mg}_{\text{farm}}\cdot\text{h}$) es la constante cinética de adsorción de pseudo-segundo orden. Es importante mencionar que ambos modelos cinéticos se basan en la homogeneidad de la superficie del adsorbente y donde sólo se considera la cantidad de sitios involucrados en el proceso. Esto se puede interpretar en términos cinéticos en que la energía de activación asociada a la adsorción del fármaco en la superficie es constante y única en todos los sitios del adsorbente. No obstante, cuando la superficie es heterogénea en los sitios de adsorción se observa que los modelos propuestos pueden perder validez. En estos casos se prefiere emplear el modelo de Elovich, de aplicación general en procesos de quimisorción, el cual supone que los sitios activos del adsorbente son heterogéneos y por ello exhiben diferentes energías de activación, basándose en un mecanismo de reacción de segundo orden para un proceso de reacción heterogénea. Este modelo ha mostrado resultados satisfactorios en la identificación del mecanismo controlante en procesos de adsorción de un soluto en fase líquida a partir de un sólido adsorbente [106, 108] y queda descrito matemáticamente como:

$$\frac{dq_t}{dt} = \alpha \cdot e^{-\beta q_t} \quad (5)$$

y la forma integrada de esta ecuación queda definida como:

$$q_t = \frac{1}{\beta} \cdot \ln(\beta \cdot \alpha \cdot t) \quad (5)$$

donde α ($\text{mg}_{\text{farm}}/\text{g}_{\text{ads}}\cdot\text{h}$) es la constante de velocidad inicial de adsorción y β está relacionado con la superficie cubierta y la energía de activación por quimiadsorción ($\text{mg}_{\text{farm}}/\text{g}_{\text{ads}}$), denominada constante de velocidad de desorción.

Finalmente, debe considerarse también alguna hipótesis sobre el mecanismo de difusión de los fármacos al interior de la estructura de los nanotransportadores. Un modelo aceptado en la literatura es el de difusión intraparticular en el interior de

los poros de la partícula de adsorbente, el que se basa en el transporte de soluto a través de la estructura interna de los poros de adsorbente y la difusión propiamente dicha en el sólido, lo que conlleva a asumir que el adsorbente posee una estructura porosa homogénea. Weber y Morris (1963) concluyeron que en un proceso controlado por la adsorción en los poros, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración del soluto. La difusión intraparticular se caracteriza por la dependencia entre la adsorción específica y la raíz cuadrada del tiempo, siendo la pendiente la velocidad de difusión intraparticular.

Con base en lo anterior, la ecuación que define la difusión intraparticular viene dada por:

$$q_t = k_i \cdot t^{1/2} + C_i \quad (5)$$

Donde k_i ($\text{mg}_{\text{farm}}/\text{g}_{\text{ads}} \cdot \text{h}^{1/2}$) es la constante de velocidad de difusión intraparticular y C_i entrega información sobre el grosor de la capa de adsorbato [105]. Esta ecuación ha sido utilizada por diferentes investigadores para determinar si la difusión intraparticular es la etapa controlante de la dinámica de adsorción de especies iónicas [109, 110].

5.2.2 Adsorción de PRX

Las cinéticas de adsorción de ambos nanotransportadores para PRX se muestran en la Figura 22. Para ellos se realizaron ajustes no lineales de la data experimental y los valores obtenidos, los cuales se reportan en la Tabla 5. Los fármacos son moléculas capaces de establecer interacciones supramoleculares con nanomateriales, las que dependerán de los grupos funcionales que posean, del solvente en el cual se encuentran disueltos y el pH del medio. Las interacciones supramoleculares más frecuentes son las electrostáticas, enlaces de hidrógeno, van der Waals e hidrofóbicas [111, 112].

En el caso de los nanotransportadores empleados en este estudio, se observa que ambos materiales adsorben PRX y los datos experimentales se ajustan a una cinética de pseudo-primer orden. Se ha elegido este modelo porque las funciones estadísticas de coeficiente de correlación (R^2) y el test de chi-cuadrado (χ^2) el cual es una prueba de hipótesis que compara la distribución observada de los datos con una distribución esperada de los datos. Ambos cálculos se realizaron mediante el software Origin Pro 8.0 mediante la función de análisis no lineal donde se ajustaron los tres modelos estudiados.

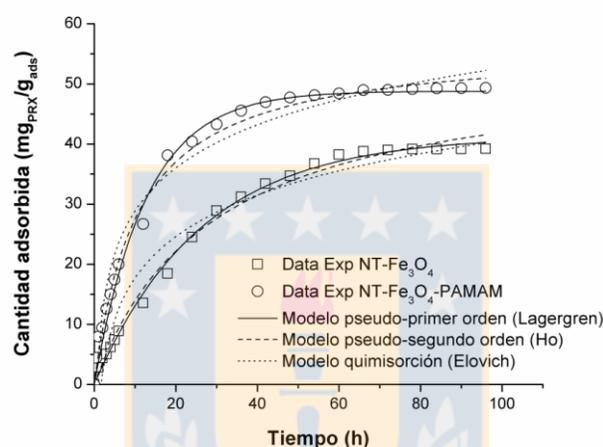


Figura 22. Cinética y ajustes de modelos cinéticos de adsorción para PRX en los nanotransportadores NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

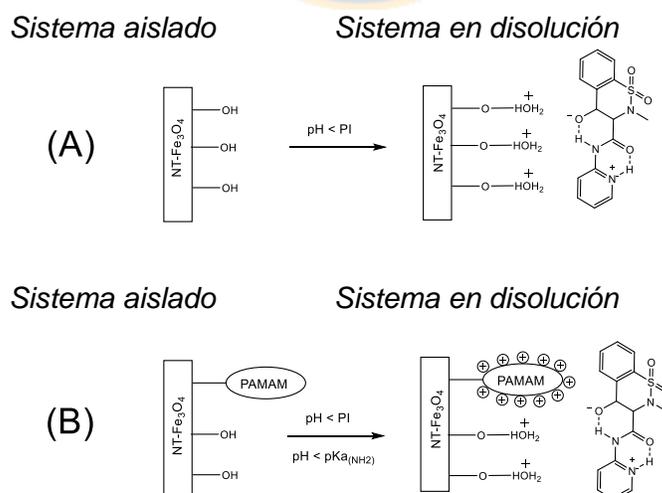


Figura 23. Esquema propuesto para la adsorción de PRX en los sistemas sintetizados. (A) Fe₃O₄-NT y (B) Fe₃O₄-NT-PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Modelos cinéticos para la adsorción de PRX en los adsorbentes NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

Adsorbente	NT-Fe₃O₄	NT-Fe₃O₄-PAMAM
$q_{e, \text{exp}}$ (mg _{PRX} /g _{ads})	39,1	48,7
Pseudo primer-orden (Modelo de Lagergren)		
q_e (mg _{PRX} /g _{ads})	41,3	48,8
k_1 (h ⁻¹)	0,038	0,079
R ²	0,9964	0,9911
χ^2	0,817	2,87
Pseudo segundo-orden (Modelo de Ho)		
q_e (mg _{PRX} /g _{ads})	53,9	56,6
k_2 (g _{Ads} /mg _{PRX} ·h)	6,49x10 ⁻⁴	1,68x10 ⁻³
R ²	0,9921	0,9935
χ^2	1,79	2,10
Quimisorción (Modelo de Elovich)		
α (mg _{PRX} /g _{ads} ·h)	5,95	16,29
β (mg _{PRX} /g)	0,100	0,097
R ²	0,9501	0,9613
χ^2	10,30	10,85

Cabe mencionar que de acuerdo a los reportes Rozou y col. [96] el fármaco PRX al pH de adsorción se encuentra en su forma zwitteriónica. El Fe₃O₄ es un material inorgánico que muestra un pI de 6,8 [113]. A las condiciones de adsorción estudiadas, el pH del agua fue de 6,0, luego la superficie del NT-Fe₃O₄ se encuentra cargada de forma positiva esperándose que la interacción del fármaco con el adsorbente sea mediada por interacciones electroestáticas, tal como se muestra en el esquema de la Figura 23.

Con la incorporación del PAMAM a la fase inorgánica se observa un incremento de un 25% en la capacidad de adsorción de PRX. Esto se puede interpretar en

términos moleculares haciendo la aproximación de los moles disponibles de PAMAM en función de la cantidad adsorbida en comparación a NT-Fe₃O₄ sin modificar. Desde la Tabla 2 se sabe que hay una cantidad de 24,3 μmol de PAMAM por gramo de adsorbente, debido a que el incremento en la adsorción fueron 9,6 mg de PRX (o 29,0 μmol de PRX) se puede asumir una estequiometría PRX/PAMAM = 1,19. De acuerdo a reportes previos publicados por nuestro grupo de investigación se sabe que PRX, a pH 7,0, se adsorbe efectivamente en la estructura PAMAM alcanzando una estequiometría PRX/PAMAM = 23 [59]. En este caso, pH 6,0, no hay cambios significativos en la estructura del fármaco ni en la del dendrímero, por lo que debería haberse esperado un incremento significativo de la adsorción de PRX en relación al nanotransportador NT-Fe₃O₄. Sin embargo, este efecto no fue observado en el nanotubo híbrido, funcionalizado con PAMAM. Con estos resultados se puede asumir que la afinidad del PRX mucho mayor por la adsorción en el material inorgánico que por la adsorción en los bolsillos de la cavidades internas del PAMAM.

En relación a los resultados cinéticos, se observa un aumento en la pseudo-constante cinética de adsorción siendo $k_{1(NT-Fe_3O_4)} < k_{1(NT-Fe_3O_4-PAMAM)}$. Para poder interpretar el fenómeno en forma mecanística, la data experimental se ha ajustado al modelo de difusión intrapartícula de Weber-Morris el que se muestra en la Figura 24. En esta figura se puede observar tres segmentos lineales, lo cual indica que el proceso de adsorción de PRX en los nanotubos procede en tres etapas, para ambos sistemas. Una situación similar ha sido observada, en el caso de la cinética de adsorción de cefalosporina en micropartículas poliméricas, por Cigu y colaboradores, quienes han descritos las diferentes etapas de la siguiente forma[105]:

- a) Adsorción del adsorbato en la superficie del adsorbente
- b) Difusión intrapartícula desde la zona externa a la superficie del adsorbente
- c) Equilibrio de adsorción donde quedan muy pocos sitios disponibles para la adsorción

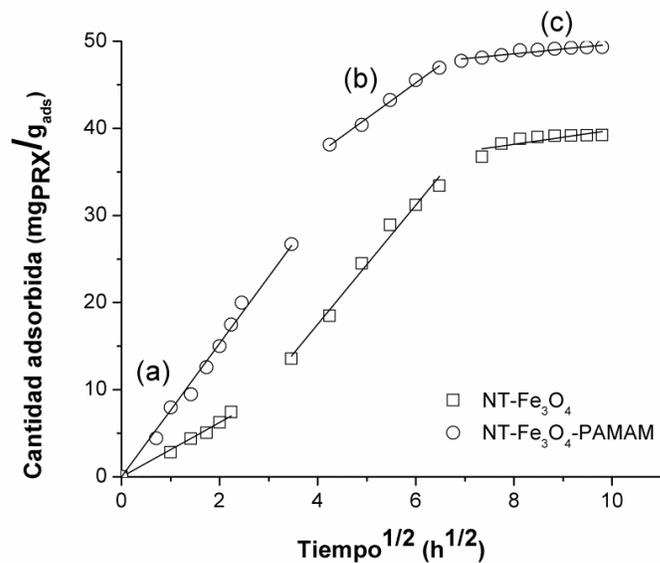


Figura 24. Gráfico de adsorción de PRX en los nanotransportadores sintetizados considerando un modelo de difusión intrapartícula en tres etapas. Fuente: Elaboración propia.

Ambos sistemas muestran el mismo perfil de difusión intrapartícula y los valores de las constantes de velocidad para las etapas (a) y (b) presentan valores relativamente bajos aunque difieren levemente, tal como se resume en la Tabla 6. En el caso de NT-Fe₃O₄ se observa que la etapa limitante corresponde a la adsorción de PRX en la superficie del nanomaterial a diferencia de NT-Fe₃O₄-PAMAM donde se observa que la etapa limitante es la difusión intrapartícula. Esta diferencia se puede explicar debido a que PAMAM posee grupos -NH₂ superficiales, que al pH de adsorción están protonados (ver Figura 23), lo que incrementa la carga eléctrica superficial del nanotransportador, este hecho podría provocar un aumento en la velocidad inicial de adsorción de PRX, si los efectos electroestáticos gobiernan la velocidad de reacción en esta etapa, considerando que el PRX presenta una estructura dipolar a pH 6.0. Sin embargo, en la etapa subsiguiente, caracterizada por la adsorción gradual de PRX, las moléculas de PAMAM unidas covalentes a la superficie de NT-Fe₃O₄ dificultan el proceso de difusión intrapartícula provocando una caída en la constante $k_{(b)}$.

Tabla 6. Modelo de difusión intra-partícula para la adsorción de PRX en los adsorbentes NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM, considerando dos etapas determinantes en la adsorción del fármaco y una tercera de equilibrio. Fuente: Elaboración propia.

Adsorbente	NT-Fe ₃ O ₄	NT-Fe ₃ O ₄ -PAMAM
Modelo de difusión intrapartícula (Modelo de Weber-Morris)		
$k_{(a)}$ (mg _{PRX} /g _{ads} .h ^{1/2})	3,11	7,66
$R_{(a)}^2$	0,9879	0,9903
$k_{(b)}$ (mg _{PRX} /g _{ads} .h ^{1/2})	6,83	4,09
$R_{(b)}^2$	0,9872	0,9944

5.2.3 Adsorción de SIL

En la Figura 25, se muestran las gráficas cinéticas para la adsorción de SIL en los dos nanotransportadores sintetizados. Las consideraciones de ajuste de los modelos cinéticos se hicieron de la misma forma que para los estudios realizados con PRX y los valores obtenidos se resumen en la Tabla 7.

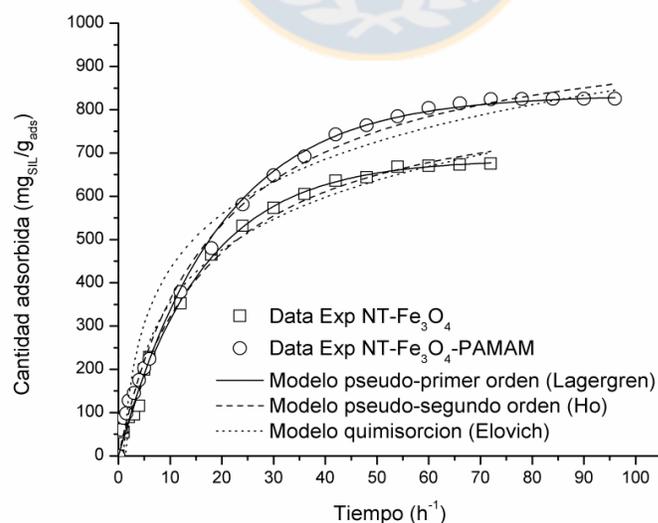


Figura 25. Cinética y ajustes de modelos cinéticos de adsorción para SIL en los nanotransportadores NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

El comportamiento de los sistemas frente a la adsorción de SIL muestra la misma tendencia que la observada en el caso de PRX. Ambos nanomateriales adsorben SIL y la capacidad máxima se ve incrementada por la presencia de PAMAM. Sin embargo, en este caso ambos sistemas nanotransportadores presentan una gran afinidad por el fármaco, obteniéndose cargas máximas superiores a 650 mg de SIL por gramo de nanomaterial, valores muy superiores a los obtenidos en el caso de PRX.

El fármaco SIL se encuentra como molécula neutra al pH de adsorción (pK_{a1} : 7,0; pK_{a2} : 8,77; pK_{a3} : 9,57; pK_{a4} : 11,66). Para la adsorción en NT-Fe₃O₄ se espera que las fuerzas que están predominando en la adsorción del fármaco sean del tipo Van der Waals y enlace de hidrógeno entre los grupos funcionales de SIL y los grupos hidroxilos de la NT-Fe₃O₄. Por otro lado las contribuciones hidrofóbicas también deberían jugar un rol importante en la adsorción del fármaco en estos nanomateriales, especialmente en el sistema híbrido NT-Fe₃O₄-PAMAM. En el caso del PAMAM estudios recientes realizados en nuestro grupo de investigación han mostrado la gran afinidad que presenta el dendrímero por SIL, y experimentos NOESY han demostrado la adsorción de las moléculas de SIL en las cavidades internas del PAMAM.

Así, para el material NT-Fe₃O₄-PAMAM se observa un incremento significativo de la adsorción en relación al material inorgánico. En este caso, el fármaco SIL interacciona no solo con NT-Fe₃O₄ sino que también con el dendrímero presente. Si se hace el cálculo entre la cantidad adsorbida de SIL en presencia de PAMAM (150,4 mg o 311,7 μ mol por gramo de adsorbente, respectivamente) se obtiene una relación molar de SIL/PAMAM = 12,8. Considerando esta evidencia puede suponerse que el fármaco en el adsorbente NT-Fe₃O₄-PAMAM no sólo se adsorbe en la superficie del óxido inorgánico, sino que también se está adsorbiendo en las cavidades del PAMAM, con estequiometrías similares a las observadas para otros fármacos insolubles previamente estudiados por nuestro grupo [51, 59].

Tabla 7. Modelos cinéticos para la adsorción de SIL en los adsorbentes NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM. Fuente: Elaboración propia.

Adsorbente	NT-Fe₃O₄	NT-Fe₃O₄-PAMAM
$q_{e, \text{exp}}$ (mg _{SIL} /g _{ads})	675,0	825,4
Pseudo primer-orden (Modelo de Lagergren)		
q_e (mg _{SIL} /g _{ads})	685,3	883,7
k_1 (h ⁻¹)	0,052	0,062
R ²	0,9975	0,9956
χ^2	165,6	441,5
Pseudo segundo-orden (Modelo de Ho)		
q_e (mg _{SIL} /g _{ads})	870,6	1023,3
k_2 (g _{Ads} /mg _{SIL} ·h)	6,73x10 ⁻⁵	5.35x10 ⁻⁵
R ²	0,9936	0,9954
χ^2	420,9	457,6
Quimisorción (Modelo de Elovich)		
α (mg _{SIL} /g _{ads} ·h)	131,9	195,6
β (mg _{SIL} /g)	5,69x10 ⁻³	5,48x10 ⁻³
R ²	0,9695	0,9510
χ^2	1818,4	4594,5

En relación a los modelos de adsorción se observa que ambos sistemas se ajustan mejor a cinéticas de pseudo-primer orden con respecto a la adsorción de SIL con coeficientes de correlación y test de chi-cuadrado confiables para el modelo. Las constantes pseudo primer-orden son similares para ambos sistemas, $k_{1(\text{NT-Fe}_3\text{O}_4)} \sim k_{1(\text{NT-Fe}_3\text{O}_4\text{-PAMAM})}$, y del mismo orden de magnitud que las determinadas en el caso de la adsorción de PRX. En la Figura 25, se observa que el máximo de adsorción de SIL se alcanza a tiempos superiores a 50 horas para ambos adsorbentes.

Para entender de manera más acabada la forma en que operan los fenómenos cinéticos de adsorción, se ha realizado el ajuste de Weber-Morris para el modelo de difusión de intrapartícula el que se muestra en la Figura 26, el cual nuevamente revela un proceso de adsorción en tres etapas, y los valores de las constantes de velocidad para las etapas (a) y (b) presentan valores relativamente altos, como se resume en la Tabla 8.

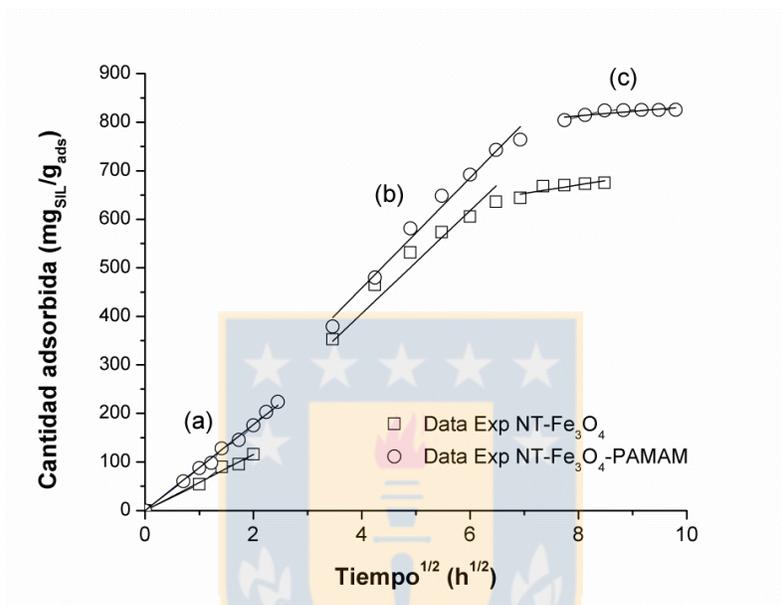
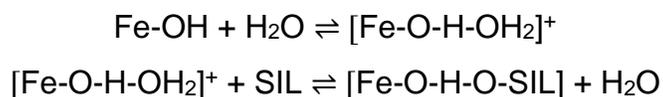


Figura 26. Gráfico de adsorción de SIL en los nanotransportadores sintetizados considerando un modelo de difusión intrapartícula en tres etapas. Fuente: Elaboración propia.

Considerando que a pH 6,0 el NT- Fe₃O₄ se encuentra en su forma protonada, SIL para adsorberse en la superficie del material deberá desplazar ese equilibrio para ocupar un sitio de la superficie tal como se muestra en el siguiente esquema:



Este equilibrio es el que determina la cinética del proceso de adsorción en el caso del adsorbente NT-Fe₃O₄. En el caso del nanotransportador híbrido, también se

observa que la etapa de adsorción es la limitante de la velocidad del proceso. Comparando ambos sistemas, se detecta que $k_{(a)(NT-Fe_3O_4)} \sim k_{(a)(NT-Fe_3O_4-PAMAM)}$. Esta diferencia se puede atribuir a la presencia del dendrímero PAMAM en el caso del nanotransportador híbrido. En términos de naturaleza superficial, se espera que la asociación SIL-PAMAM incremente la velocidad del proceso con respecto al nanotransportador inorgánico.

Tabla 8. Modelo de difusión intra-partícula para la adsorción de SIL en los adsorbentes NT-Fe₃O₄ y NT-Fe₃O₄-PAMAM, considerando dos etapas determinantes en la adsorción del fármaco y una tercera de equilibrio. Fuente: Elaboración propia.

Adsorbente	NT-Fe₃O₄	NT-Fe₃O₄-PAMAM
Modelo de difusión intrapartícula (Modelo de Weber-Morris)		
$k_{(a)}$ (mg _{SIL} /g _{ads} .h ^{1/2})	57,7	88,5
$R_{(a)}^2$	0,9881	0,9935
$k_{(b)}$ (mg _{SIL} /g _{ads} .h ^{1/2})	105,9	113,5
$R_{(b)}^2$	0,9803	0,9828

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se logró sintetizar los nanotubos de magnetita, NT-Fe₃O₄, obtenidos por la reducción de los nanotubos de hematita, α-Fe₂O₃, sintetizados a partir de tratamiento hidrotermal. Se verificó la estructura de la magnetita, su forma tubular y propiedades magnéticas a través de las técnicas de caracterización difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión y medidas de susceptibilidad magnética, respectivamente.

El nanotubo inorgánico obtenido sirvió de soporte para la conjugación de dendrímero de poli-(amidoamina) de tercera generación el cual se logró inmovilizar en la superficie de NT-Fe₃O₄ con un contenido del 16% en masa respecto del material híbrido. El proceso de inmovilización no perturbó las propiedades del soporte inorgánico en relación a las propiedades magnéticas, cristalinas o de tamaño y forma.

Los materiales obtenidos fueron capaces de actuar como adsorbentes de los fármacos piroxicam y silibinina, siendo éste último quien mostró incrementar la capacidad de adsorción en presencia de PAMAM. Para ambos sistemas y fármacos, se determinaron las curvas cinéticas de adsorción donde se logró determinar que independiente del fármaco, ambos nanotransportadores muestran ajustarse a cinéticas de pseudo-primer orden. Finalmente, la presencia de PAMAM no sólo potencia la capacidad de adsorción en los fármacos testeados, sino que también acelera la etapa de adsorción superficial con respecto a la determinada para el adsorbente NT-Fe₃O₄ por medio del modelo de difusión de Weber-Morris.

Para el fármaco piroxicam, se observó que la adsorción fue mediada principalmente por interacciones del tipo electroestáticas entre la forma zwitteriónica de piroxicam y la superficie de los nanotransportadores. La etapa limitante de la cinética adsorción para el caso de NT-Fe₃O₄ fue la adsorción

superficial y en el caso de NT-Fe₃O₄-PAMAM fue la etapa de difusión intrapartícula.

Finalmente para el fármaco silibinina, se observó que la adsorción fue mediada por las fuerzas de tipo Van der Waals y enlace de hidrógeno entre los grupos funcionales de SIL y los grupos hidroxilos de NT-Fe₃O₄. Por otro lado las contribuciones hidrofóbicas también juegan un rol importante en la adsorción del fármaco en estos nanomateriales, especialmente en el sistema híbrido NT-Fe₃O₄-PAMAM. Por último, se determinó que la capacidad de adsorción se vio directamente mejorada por la asociación PAMAM-SIL la que alcanzó una relación molar SIL/PAMAM = 12. En ambos casos se observó que la etapa limitante de la cinética de adsorción fue la adsorción superficial de SIL en los adsorbentes.



REFERENCIAS

- [1] A.Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K.H. Markiewicz, H. Car, *Pharmacological Reports* 64 (2012) 1020-1037.
- [2] S. Parveen, R. Misra, S.K. Sahoo, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8 (2012) 147-166.
- [3] V. Grazu, M. Moros, C. Sánchez-Espinel, M.d.I.F. Jesus, V. Grazu, *Frontiers of Nanoscience*, Elsevier, 2012, pp. 337-440.
- [4] F. Danhier, O. Feron, V. Préat, *Journal of Controlled Release* 148 (2010) 135-146.
- [5] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler, *Journal of Controlled Release* 200 (2015) 138-157.
- [6] J.H. Lee, Y. Yeo, *Chemical Engineering Science* 125 (2015) 75-84.
- [7] S. Manchun, C.R. Dass, P. Sriamornsak, *Life Sciences* 90 (2012) 381-387.
- [8] J.H.E. Arts, M. Hadi, A.M. Keene, R. Kreiling, D. Lyon, M. Maier, K. Michel, T. Petry, U.G. Sauer, D. Wahrheit, K. Wiench, R. Landsiedel, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 70 (2014) 492-506.
- [9] K.A. Pramod, C.P. Sunny, *Nanobiomaterials Handbook*, CRC Press, 2011, pp. 1-24.
- [10] A. Khorsand, S. Jamehbozorgi, R. Ghiasi, M. Rezvani, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* 72 (2015) 120-127.
- [11] V. López-Dávila, A.M. Seifalian, M. Loizidou, *Current Opinion in Pharmacology* 12 (2012) 414-419.
- [12] P.-C. Lee, C.-L. Peng, M.-J. Shieh, *Journal of Controlled Release* 225 (2016) 140-151.
- [13] C.C. Torres, C.H. Campos, C. Díaz, V.A. Jiménez, F. Vidal, L. Guzmán, J.B. Alderete, *Materials Science and Engineering: C* 65 (2016) 164-171.
- [14] C.H. Campos, C.F. Díaz, J.L. Guzmán, J.B. Alderete, C.C. Torres, V.A. Jiménez, *Macromolecular Chemistry and Physics* 217 (2016) 1712-1722.
- [15] D. Chang, Y. Gao, L. Wang, G. Liu, Y. Chen, T. Wang, W. Tao, L. Mei, L.

- Huang, X. Zeng, *Journal of Colloid and Interface Science* 463 (2016) 279-287.
- [16] J. Zaloga, M. Pöttler, G. Leitinger, R.P. Friedrich, G. Almer, S. Lyer, E. Baum, R. Tietze, R. Heimke-Brinck, H. Mangge, F. Dorje, G. Lee, C. Alexiou, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 101 (2016) 152-162.
- [17] R.S. Dhanikula, P. Hildgen, *Bioconjugate Chemistry* 17 (2006) 29-41.
- [18] A. Kesavan, P. Ilaiyaraja, W. Sofi Beaula, V. Veena Kumari, J. Sugin Lal, C. Arunkumar, G. Anjana, S. Srinivas, A. Ramesh, S.K. Rayala, D. Ponraju, G. Venkatraman, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 96 (2015) 255-263.
- [19] S. Biswas, P. Kumari, P.M. Lakhani, B. Ghosh, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 83 (2016) 184-202.
- [20] M.L. Tebaldi, R.M. Belardi, S.R. Montoro, *Design and Applications of Nanostructured Polymer Blends and Nanocomposite Systems*, William Andrew Publishing, Boston, 2016, pp. 171-186.
- [21] D. Bansal, A. Gulbake, J. Tiwari, S.K. Jain, *International Journal of Biological Macromolecules* 82 (2016) 687-695.
- [22] A.S. Timin, E.V. Balantseva, S.Y. Khashirova, E.V. Rummyantsev, T.Y. Osadchaya, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 477 (2015) 26-34.
- [23] J. Gautier, E. Allard-Vannier, E. Munnier, M. Soucé, I. Chourpa, *Journal of Controlled Release* 169 (2013) 48-61.
- [24] S.L. Leung, Z. Zha, C. Cohn, Z. Dai, X. Wu, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 121 (2014) 141-149.
- [25] Y. Liu, Y. Ng, M.R. Toh, G.N.C. Chiu, *Journal of Controlled Release* 220, Part A (2015) 438-446.
- [26] G. Xu, L. Li, Z. Shen, Z. Tao, Y. Zhang, H. Tian, X. Wei, G. Shen, G. Han, *Journal of Alloys and Compounds* 629 (2015) 36-42.
- [27] M.F. Horst, V. Lassalle, M.L. Ferreira, *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 9 (2015) 746-769.
- [28] T.J. Bastow, A. Trinchi, M.R. Hill, R. Harris, T.H. Muster, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321 (2009) 2677-2681.

- [29] S. Bagheri, D. Ramimoghadam, A. TermehYousefi, S.B. Abd Hamid, *International Journal of Hydrogen Energy* 40 (2015) 16178-16183.
- [30] G. Kandasamy, D. Maity, *International Journal of Pharmaceutics* 496 (2015) 191-218.
- [31] D.S. Keerthana, K. Namratha, K. Byrappa, H.S. Yathirajan, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 378 (2015) 551-557.
- [32] M. Darroudi, M. Hakimi, E. Goodarzi, R. Kazemi Oskuee, *Ceramics International* 40 (2014) 14641-14645.
- [33] G. Sharma, P. Jeevanandam, *RSC Advances* 3 (2013) 189-200.
- [34] C.-J. Jia, L.-D. Sun, F. Luo, X.-D. Han, L.J. Heyderman, Z.-G. Yan, C.-H. Yan, K. Zheng, Z. Zhang, M. Takano, N. Hayashi, M. Eltschka, M. Kläui, U. Rüdiger, T. Kasama, L. Cervera-Gontard, R.E. Dunin-Borkowski, G. Tzvetkov, J. Raabe, *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008) 16968-16977.
- [35] N. Mizutani, T. Iwasaki, S. Watano, T. Yanagida, T. Kawai, *Current Applied Physics* 10 (2010) 801-806.
- [36] C.-J. Jia, L.-D. Sun, Z.-G. Yan, L.-P. You, F. Luo, X.-D. Han, Y.-C. Pang, Z. Zhang, C.-H. Yan, *Angewandte Chemie* 117 (2005) 4402-4407.
- [37] Z.-G. Yue, W. Wei, Z.-X. You, Q.-Z. Yang, H. Yue, Z.-G. Su, G.-H. Ma, *Advanced Functional Materials* 21 (2011) 3446-3453.
- [38] S.J. Son, X. Bai, S.B. Lee, *Drug Discovery Today* 12 (2007) 650-656.
- [39] S.J. Son, J. Reichel, B. He, M. Schuchman, S.B. Lee, *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 7316-7317.
- [40] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (Third edition), Academic Press, Boston, 2013, pp. 535-548.
- [41] S. Mallakpour, M. Madani, *Progress in Organic Coatings* 86 (2015) 194-207.
- [42] P. Yu, J. He, L. Yang, M. Pu, X. Guo, *Journal of Catalysis* 260 (2008) 81-85.
- [43] X. Zheng, T. Wang, H. Jiang, Y. Li, T. Jiang, J. Zhang, S. Wang, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 8 (2013) 278-286.
- [44] L. Tan, J. Liu, W. Zhou, J. Wei, Z. Peng, *Materials Science and Engineering: C* 45 (2014) 524-529.
- [45] E.R. Gillies, J.M.J. Fréchet, *Journal of the American Chemical Society* 124

(2002) 14137-14146.

[46] S. Khoee, K. Hemati, *Polymer* 54 (2013) 5574-5585.

[47] U. Gupta, O. Perumal, S.G.K.T.L. Deng, *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier, Oxford, 2014, pp. 243-257.

[48] U. Boas, P.M.H. Heegaard, *Chemical Society Reviews* 33 (2004) 43-63.

[49] U. Gupta, H.B. Agashe, A. Asthana, N.K. Jain, *Biomacromolecules* 7 (2006) 649-658.

[50] A. Shakhbazau, I. Isayenka, N. Kartel, N. Goncharova, I. Seviaryn, S. Kosmacheva, M. Potapnev, D. Shcharbin, M. Bryszewska, *International Journal of Pharmaceutics* 383 (2010) 228-235.

[51] P.A. Barra, L. Barraza, V.A. Jiménez, J.A. Gavín, J.B. Alderete, *Macromolecular Chemistry and Physics* 215 (2014) 372-383.

[52] P.M. Patel, R. Patel, D. Wadia, R.M. Patel, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 10 (2015) 306-313.

[53] L. Mei, Z. Zhang, L. Zhao, L. Huang, X.-L. Yang, J. Tang, S.-S. Feng, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (2013) 880-890.

[54] S.n. Svenson, D.A. Tomalia, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 2106-2129.

[55] L. Porcar, Y. Liu, R. Verduzco, K. Hong, P.D. Butler, L.J. Magid, G.S. Smith, W.-R. Chen, *The Journal of Physical Chemistry B* 112 (2008) 14772-14778.

[56] E. Markatou, V. Gionis, G.D. Chryssikos, S. Hatziantoniou, A. Georgopoulos, C. Demetzos, *International Journal of Pharmaceutics* 339 (2007) 231-236.

[57] K. Borowska, S. Wołowieca, A. Rubaj, K. Głowniak, E. Sieniawska, S. Radej, *International Journal of Pharmaceutics* 426 (2012) 280-283.

[58] S. Kavyani, S. Amjad-Iranagh, H. Modarress, *The Journal of Physical Chemistry B* 118 (2014) 3257-3266.

[59] P.A. Barra, L. Barraza, V.A. Jiménez, J.A. Gavín, J.B. Alderete, *Structural Chemistry* 25 (2014) 1443-1455.

[60] C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, T. Takagishi, *Bioconjugate Chemistry* 11 (2000) 910-917.

- [61] A.K. Patri, J.F. Kukowska-Latallo, J.R. Baker Jr, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 2203-2214.
- [62] D. Luong, P. Kesharwani, R. Deshmukh, M.C.I. Mohd Amin, U. Gupta, K. Greish, A.K. Iyer, *Acta Biomaterialia* 43 (2016) 14-29.
- [63] X. Xu, J. Li, S. Han, C. Tao, L. Fang, Y. Sun, J. Zhu, Z. Liang, F. Li, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 88 (2016) 178-190.
- [64] P.-C. Lin, S. Lin, P.C. Wang, R. Sridhar, *Biotechnology Advances* 32 (2014) 711-726.
- [65] C. Baudot, C.M. Tan, J.C. Kong, *Infrared Physics & Technology* 53 (2010) 434-438.
- [66] J.B. Hall, M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, S.E. McNeil, *Nanomedicine* 2 (2007) 709-803.
- [67] D.B. Williams, C.B. Carter, *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, Springer US, Boston, MA, 2009, pp. 3-22.
- [68] H. Wang, P.K. Chu, S. Bose, *Characterization of Biomaterials*, Academic Press, Oxford, 2013, pp. 105-174.
- [69] M. Rudolph, J. Eler, U.A. Peuker, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 397 (2012) 16-23.
- [70] T. Zhao, W. Luo, Y. Deng, Y. Luo, P. Xu, Y. Liu, L. Wang, Y. Ren, W. Jiang, *Nano Energy* 26 (2016) 16-25.
- [71] F. Rouquerol, J. Rouqueron, K. Sing, *Adsorption by Powders and Porous Solids*, Academic Press, 1999.
- [72] M. Naderi, *Progress in Filtration and Separation*, Academic Press, Oxford, 2015, pp. 585-608.
- [73] J. Rouquerol, F. Rouquerol, P. Llewellyn, G. Maurin, K.S.W. Sing, *Adsorption by powders and porous solids: principles, methodology and applications*, Academic press, 2014.
- [74] C.P. Poole, F.J. Owens, *Introducción a la nanotecnología*, Editorial Reverte, 2007.
- [75] J.L. Kirschvink, D.S. Jones, B.J. MacFadden, *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism*, Springer US, 2013.

- [76] T.M. El-Alaily, M.K. El-Nimr, S.A. Saafan, M.M. Kamel, T.M. Meaz, S.T. Assar, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 386 (2015) 25-30.
- [77] D.J. Dunlop, Ö. Özdemir, *Treatise on Geophysics (Second Edition)*, Elsevier, Oxford, 2015, pp. 255-308.
- [78] A. Savić, D. Čokeša, S. Lazarević, B. Jokić, D. Janačković, R. Petrović, L.S. Živković, *Powder Technology* 301 (2016) 511-519.
- [79] S. Rajput, C.U. Pittman Jr, D. Mohan, *Journal of Colloid and Interface Science* 468 (2016) 334-346.
- [80] M. Kumari, C.U. Pittman Jr, D. Mohan, *Journal of Colloid and Interface Science* 442 (2015) 120-132.
- [81] Y. Mansourpanah, Z. Jafari, *Reactive and Functional Polymers* 93 (2015) 178-189.
- [82] S. Sundar, R. Mariappan, S. Piraman, *Powder Technology* 266 (2014) 321-328.
- [83] P. Roonasi, A. Holmgren, *Applied Surface Science* 255 (2009) 5891-5895.
- [84] J. Safari, Z. Zarnegar, *Journal of Molecular Structure* 1072 (2014) 53-60.
- [85] K.L. Pickering, S. Raa Khimi, S. Ilanko, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 68 (2015) 377-386.
- [86] A.K. Ladavos, A.P. Katsoulidis, A. Iosifidis, K.S. Triantafyllidis, T.J. Pinnavaia, P.J. Pomonis, *Microporous and Mesoporous Materials* 151 (2012) 126-133.
- [87] V.M.d.S. Rocha, M.d.G. Pereira, L.R. Teles, M.O.d.G. Souza, *Materials Science and Engineering: B* 185 (2014) 13-20.
- [88] J.Z. Marinho, R.H.O. Montes, A.P. de Moura, E. Longo, J.A. Varela, R.A.A. Munoz, R.C. Lima, *Materials Research Bulletin* 49 (2014) 572-576.
- [89] P.M. Huang, Y. Li, M.E. Sumner, *Handbook of Soil Sciences: Properties and Processes*, Second Edition, Taylor & Francis, 2011.
- [90] C. Klein, C.S. Hurlbut, *Manual de mineralogía*, Reverte, 1996.
- [91] Y.-F. Lin, J.-L. Chen, C.-Y. Xu, T.-W. Chung, *Chemical Engineering Journal* 250 (2014) 409-415.
- [92] A.K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* 26 (2005) 3995-4021.

- [93] C. Sun, J.S.H. Lee, M. Zhang, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 1252-1265.
- [94] N. Rai, M. Sarkar, S. Raha, *Pharmacological Reports* 67 (2015) 1215-1223.
- [95] Z. Lavrič, J. Pirnat, J. Lužnik, U. Puc, Z. Trontelj, S. Srčič, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104 (2015) 1909-1918.
- [96] S. Rozou, A. Voulgari, E. Antoniadou-Vyza, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21 (2004) 661-669.
- [97] H.-S. Gwak, J.-S. Choi, H.-K. Choi, *International Journal of Pharmaceutics* 297 (2005) 156-161.
- [98] R.P. Aquino, G. Auriemma, M. d'Amore, A.M. D'Ursi, T. Mencherini, P. Del Gaudio, *Carbohydrate Polymers* 89 (2012) 740-748.
- [99] I.E. Shohin, J.I. Kulinich, G.V. Ramenskaya, B. Abrahamsson, S. Kopp, P. Langguth, J.E. Polli, V.P. Shah, D.W. Groot, D.M. Barends, J.B. Dressman, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103 (2014) 367-377.
- [100] R. Silva, H. Ferreira, A.C. Carvalho, A.C. Gomes, A. Cavaco-Paulo, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 92 (2012) 277-285.
- [101] M. Meloun, D. Burkořnová, T. Syrový, A. Vrána, *Analytica Chimica Acta* 486 (2003) 125-141.
- [102] D. Zheng, Y. Wang, D. Zhang, Z. Liu, C. Duan, L. Jia, F. Wang, Y. Liu, G. Liu, L. Hao, Q. Zhang, *Cancer Letters* 307 (2011) 158-164.
- [103] Q. Wang, R. Liu, X. Shen, L. Zou, D. Wu, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14 (2014) 2871-2877.
- [104] N. Caliskan, A.R. Kul, S. Alkan, E.G. Sogut, I. Alacabey, *Journal of Hazardous Materials* 193 (2011) 27-36.
- [105] T.A. Cigu, S. Vasiliu, S. Racovita, C. Lionte, V. Sunel, M. Popa, C. Cheptea, *European Polymer Journal* 82 (2016) 132-152.
- [106] M. Özacar, İ.A. Şengil, *Process Biochemistry* 40 (2005) 565-572.
- [107] Y.S. Ho, G. McKay, *Process Biochemistry* 34 (1999) 451-465.
- [108] A.B. Pérez-Marín, V.M. Zapata, J.F. Ortuño, M. Aguilar, J. Sáez, M. Lloréns, *Journal of Hazardous Materials* 139 (2007) 122-131.
- [109] B.F. Urbano, I. Villenas, B.L. Rivas, C.H. Campos, *Chemical Engineering*

Journal 268 (2015) 362-370.

[110] J. Pérez, L. Toledo, C.H. Campos, B.L. Rivas, J. Yañez, B.F. Urbano, Chemical Engineering Journal 287 (2016) 744-754.

[111] J.W. Steed, D.R. Turner, K. Wallace, Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry, Wiley, 2007.

[112] A. Buczkowski, D. Waliszewski, P. Urbaniak, B. Palecz, International Journal of Pharmaceutics 505 (2016) 1-13.

[113] M. Kosmulski, Advances in Colloid and Interface Science.

