



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**DISEÑO DE NANOMATERIALES BIOCOMPATIBLES EN
BASE A NANOESFERAS DE SÍLICA Y NANOVARILLAS
DE ALÚMINA PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
DOXORRUBICINA
POR CARLOS ALBERTO REYES ESCOBAR**

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía

Cristian H. Campos Figueroa

Universidad Concepción, Sede
Concepción

Profesora Co-Guía

Cecilia C. Torres Muñoz

Universidad Andrés Bello, Sede
Concepción

Diciembre, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
1.1. Abstract	3
2. INTRODUCCIÓN	5
3. HIPOTESIS	10
4. OBJETIVOS	10
4.1. Objetivo general:	10
4.2. Objetivos específicos:	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS	11
5.1. Síntesis de materiales	11
5.1.1. Síntesis de Nanoesferas de sílica mesoporosas (MSN)	11
5.1.2. Síntesis de nanovarillas de óxido de aluminio (ANW)	12
5.1.3. Síntesis de sólidos funcionalizados	12
5.2. Caracterización fisicoquímica	14
5.2.1. Fisisorción de Nitrógeno	14
5.2.2. Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	17
5.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA)	19
5.2.4. Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)	21
5.2.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS)	22
5.3. Curva de calibración de doxorubicina	23
5.4. Isotherma de adsorción de doxorubicina	24
5.5. Cinética de liberación de doxorubicina	26
5.6. Ensayos de Biocompatibilidad	28
5.6.1. Ensayos de hemólisis	28
5.6.2. Ensayo de adsorción inespecífica de proteínas (NSPA)	31
5.6.3. Ensayos de viabilidad celular	32
6. RESULTADOS	36
6.1. Nanopartículas de sílica mesoporosas (MSN)	36
6.1.1. Caracterización	36
6.1.1.1. Fisisorción de Nitrógeno	36
6.1.1.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	37
6.1.1.3. Análisis termogravimétrico (TGA)	39
6.1.1.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	41
6.1.1.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS)	42
6.1.2. Isotherma de adsorción de Doxorubicina	43
6.1.3. Cinética de liberación de doxorubicina en PBS	46
6.1.3.1. PBS a pH 7,4	46
6.1.3.2. PBS a pH 5,0	46
6.1.4. Ensayos de Biocompatibilidad	50

6.1.4.1.	Ensayo de Hemólisis	50
6.1.4.2.	Adsorción inespecífica de proteínas.....	51
6.1.4.3.	Viabilidad Celular.....	53
6.1.4.3.1.	Línea celular HEK293	53
6.1.4.3.2.	Línea celular PC12.....	54
6.2.	Nanovarillas de alúmina (ANW)	56
6.2.1.	Caracterización.....	56
6.2.1.1.	Fisisorción de Nitrógeno	56
6.2.1.2.	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	58
6.2.1.3.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	60
6.2.1.4.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	61
6.2.1.5.	Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	62
6.2.2.	Isoterma de adsorción de doxorubicina	63
6.2.3.	Liberación de doxorubicina.....	65
6.2.3.1.	PBS a pH 7,4.....	65
6.2.3.2.	PBS a pH 5,0.....	66
6.2.4.	Ensayos de Biocompatibilidad	68
6.2.4.1.	Ensayo de Hemólisis	68
6.2.4.2.	Adsorción inespecífica de proteínas.....	69
6.2.4.3.	Viabilidad Celular.....	71
6.2.4.3.1.	Línea celular HEK293	71
6.2.4.3.2.	Línea celular PC12.....	72
7.	DISCUSIÓN	74
8.	CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	87
9.	GLOSARIO.....	90
10.	BIBLIOGRAFÍA	92
11.	ANEXOS	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1.1.1-1. Promedios de área específica y diámetro de poro obtenidos de la isoterma de adsorción-desorción de N ₂ a -196°C de los nanomateriales en base a MSN.	36
Tabla 6.1.1.2-1. Grupos químicos de MSN asociados a bandas de IR.....	38
Tabla 6.1.1.3-1. Masa residual, grafting y densidad de sitios inmovilizados en los nanomateriales en base a MSN.	40
Tabla 6.1.1.5-1. Valores de diámetro hidrodinámico de MSN en PBS a pH 7,4.	42
Tabla 6.1.2-1. Parámetros del modelo de Langmuir para Isoterma de adsorción en los nanomateriales en base a MSN.	44
Tabla 6.1.3.1-1. Parámetros obtenidos de la cinética de liberación ajustando modelo de liberación de primer orden a pH 7,4.	46
Tabla 6.1.3.2-1. Parámetros obtenidos de la cinética de liberación ajustada a cinética de primer orden a pH 5,0.	48
Tabla 6.1.4.1-1. Porcentaje de Hemólisis provocada por los sistemas de MSN a la concentración de 500 ppm.	50
Tabla 6.1.4.2-1. Concentración relativa de IgG de Bovino cuando se contacta con los sistemas de MSN.	51

Tabla 6.1.4.2-2. Concentración relativa de HSA al entrar en contacto con los sistemas de MSN.....	52
Tabla 6.1.4.3.2-1. Valores de viabilidad de MSN cargadas con DOX usando distintas concentraciones de dispersión.	55
Tabla 6.2.1.1-1. Promedios de área específica y diámetro de poro obtenidos de la isoterma de adsorción-desorción de N ₂ a -196°C de los nanomateriales en base a ANW.....	56
Tabla 6.2.1.2-1. Grupos químicos de ANW asociados a bandas IR.	58
Tabla 6.2.1.3-1. Masa residual, grafting y densidad de sitios inmovilizados en los nanomateriales en base a ANW.....	60
Tabla 6.2.1.5-1. Valores de diámetro hidrodinámico de ANW en PBS 7,4.	62
Tabla 6.2.2-1. Datos obtenidos ajustando las isothermas de adsorción al modelo de Freundlich	64
Tabla 6.2.3.1-1. Concentración de DOX liberada y linealidad del ajuste al modelo de liberación de primer orden.....	66
Tabla 6.2.3.2-1. Concentración de DOX liberada y ajuste al modelo de liberación de primer orden.	67
Tabla 6.2.4.1-1. Valores de hemólisis % generada por ANW a 500 ppm	68

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Reacción de PEG con ISO en tolueno y argón.	13
Figura 2. Adición del PEG-ISO a la superficie del nanomaterial por reflujo en tolueno.	13
Figura 3. Esquema de llenado de la superficie con el aumento de presión del adsorbato.	15
Figura 4. Representación esquemática de un sistema de fisisorción con N ₂ o He.	16
Figura 5. Representación esquemática del funcionamiento de la espectroscopia IR con FT.	17
Figura 6. Representación esquemática de una termobalanza.	19
Figura 7. Esquema general de un TEM.	21
Figura 8. Representación esquemática de la técnica DLS.	22
Figura 9. Ionización de doxorrubicina en medio acuoso y su respectiva solubilidad dependiente del pH.	23
Figura 10. Espectro de emisión y excitación de doxorrubicina.	24
Figura 11. Equilibrio del fármaco entre la superficie del sólido y el solvente. ...	25
Figura 12. Soluciones de DOX en etanol en concentraciones crecientes (derecha a izquierda) luego de ser contactado con el nanomaterial.	26
Figura 13. Sistema de diálisis para medición de la liberación de doxorrubicina.	27

Figura 14. Esquema general para realizar en ensayo de hemólisis.....	30
Figura 15. Composición proteica en peso % del plasma humano.	31
Figura 16. Reducción de Resazurina a Resorufina.....	33
Figura 17. Esquema de microplacas de 96 pocillos con células y Resazurina.	34
Figura 18. Adsorción-desorción de N ₂ a -196°C por los sistemas preparados en base a MSN.	36
Figura 19. Espectro de FTIR para los materiales preparados en base a MSN.	38
Figura 20. Termograma de MSN.	40
Figura 21. Micrografías de TEM para MSN.barra de referencia de 200 nm	41
Figura 22. Micrografías de TEM para MSN.barra de referencia de 20 nm	41
Figura 23. Distribución del diámetro hidrodinámico de MSN en PBS a pH 7,4 a 500 ppm.	42
Figura 24. Isotherma de adsorción de DOX en MSN. Rango de concentraciones de DOX desde 0,5 ppm hasta 10 ppm, temperatura de 25°C.....	43
Figura 25. Cinética de liberación de DOX en PBS a pH 7,4 y 37°C para los materiales en base a MSN. Ampliación para los sistemas MSN-PEG550 y MSN-PEG2000.	46
Figura 26. Cinética de liberación de DOX en PBS a pH 5.0 y 37°C para los materiales en base a MSN. Ampliación para los sistemas MSN-PEG550 y MSN-PEG2000	48
Figura 27. Gráfico del ensayo de hemólisis para los materiales en base a MSN. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C.	50

Figura 28. Concentración relativa de IgG de Bovino al contactar con los sistemas en base a MSN. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C....	51
Figura 29. Concentración relativa de HSA cuando se contactar con los sistemas en base a MSN. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C.....	52
Figura 30. Viabilidad de células HEK293 incubadas con los nanomateriales en base a MSN. Condiciones: Medio para HEK293, 37°C por 48 horas de incubación.....	53
Figura 31. Viabilidad celular de PC12 incubadas con los nanomateriales en base a MSN. Condiciones: medio de cultivo PC12, 37°C por 48 horas de incubación.....	54
Figura 32. Viabilidad celular de PC12 incubados con los nanomateriales en base a MSN cargadas con DOX. los nanomateriales en base a MSN.	55
Figura 33. Adsorción-desorción de N ₂ a -196°C por los sistemas preparados en base a ANW.....	56
Figura 34. Espectro de FTIR para los materiales preparados en base a ANW.	58
Figura 35. Termograma de ANW.....	60
Figura 36. Micrografías de ANW con una barra de referencia de 50 nm.	61
Figura 37. Distribución diámetro hidrodinámico de ANW en PBS a pH 7,4 a 250 ppm.....	62
Figura 38. Isotherma de adsorción de DOX en ANW. Rango de concentraciones de DOX desde 5 ppm hasta 200 ppm, temperatura de 25°C.....	63

Figura 39. Cinética de liberación de DOX en PBS a pH 7,4 y 37°C para los materiales en base a ANW.	65
Figura 40. Cinética de liberación de DOX en PBS a pH 5.0 y 37°C para los materiales en base a ANW.	66
Figura 41. Gráfico del ensayo de hemólisis para los materiales en base a ANW.	68
Figura 42. Concentración relativa de IgG de Bovino al contactar con los sistemas en base a ANW. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C ...	69
Figura 43. Concentración relativa de HSA cuando se contactaron con los sistemas en base a ANW. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C ...	70
Figura 44. Viabilidad de células HEK293 incubadas con los nanomateriales en base a ANW. Condiciones: Medio para HEK293, 37°C por 48 horas	71
Figura 45. Viabilidad celular de PC12 incubadas con los nanomateriales en base a ANW. Condiciones: medio de cultivo PC12, 37°C y 48 horas de incubación.....	72
Figura 46 Viabilidad celular de PC12 incubados con los nanomateriales en base a ANW cargadas con DOX.	73
Figura 47. Densidad de PEG en la superficie de un nanomaterial, se observan 3 estados conformacionales.	75

1. RESUMEN

Aumentar la biocompatibilidad de nanomateriales y modificar el comportamiento de la cinética de liberación de fármacos poco solubles es un desafío de la comunidad científica. Particularmente en la última década materiales a escala nanométrica presentan un elevado potencial como *carrier* de sustancias activas para fines biomédicos. Es por esto, que, la administración controlada de fármacos para tratar tejidos enfermos se presenta como una de las técnicas más prometedoras. No obstante, estas estrategias requieren un diseño racional que permitan mejorar la eficiencia y controlar la liberación del principio activo.

En este trabajo de tesis se estudió la liberación controlada del fármaco anticancerígeno doxorubicina (DOX) utilizando nanoesferas de sílica mesoporosas (MSN) y nanovarillas de alúmina (ANW) modificadas superficialmente con polietilenglicol metil éter (PEG). Para esto, los nanomateriales se sintetizaron y se modificaron covalentemente con PEG de 550 Da y 2000 Da, respectivamente. obteniendo 6 grupos experimentales, MSN prístina, 2 diferentes MSN-PEG, ANW prístina y 2 diferentes ANW-PEG. Todos los sistemas fueron caracterizados por técnicas fisicoquímicas, posteriormente cargados con DOX y se estudió la cinética de liberación del fármaco en medio fisiológico simulado. Se evaluó la biocompatibilidad de los materiales realizando ensayos de hemólisis, ensayo de interacción con proteínas del suero y viabilidad

celular. Los resultados sugieren que los nanomateriales tienen diferencias en la capacidad de adsorción y liberación de DOX, y también, se observó una discrepancia en la cinética de la liberación entre los materiales prístinos y modificados superficialmente con PEG. Lo anterior se atribuye a la que la presencia del PEG en la superficie modifica la liberación de la DOX al medio líquido. La biocompatibilidad de los sistemas modificados con PEG aumentaron con respecto a los prístinos y los nanomateriales fueron capaces de disminuir la viabilidad celular de una línea celular cancerígena únicamente cuando están cargados con DOX.

1.1. Abstract

Increasing the biocompatibility of nanomaterials and modifying the behavior of the release kinetics of poorly soluble drugs is a challenge for the scientific community. Particularly, in the last decade, materials at the nanometric scale have great potential as carriers of active substances for biomedical purposes. For this reason, the controlled administration of drugs to treat diseased tissues is presented as one of the most promising techniques. However, these strategies require a rational design to improve efficiency and control the release of the active ingredient.

In this work, the controlled release of the anticancer drug doxorubicin (DOX) was studied using mesoporous silica nanospheres (MSN) and alumina nanowires (ANW). Both nanomaterials were surface modified by covalently bonding with polyethylene glycol methyl ether (PEG) at 550 Da and 2000 Da of molecular weight obtaining 6 experimental groups: pristine MSN, 2 different MSN-PEG, pristine ANW, and 2 different ANW-PEG. All the systems were characterized by physicochemical techniques, then loaded with DOX and their drug release kinetic in physiologic simulated medium was studied. Likewise, the biocompatibility of the materials was evaluated by carrying out hemolysis tests, non-specific proteins adsorption and cell viability test. The results suggest that nanomaterials have differences in DOX adsorption and release capacity, and a discrepancy in release

kinetics was observed between pristine and PEG-surface-modified materials. This trend is attributed to the presence of PEG, which modified the diffusion of the drug from the surface to the liquid in the DOX release. The biocompatibility of the PEG-modified systems increased with respect to the pristine ones and the nanomaterials were able to decrease the cell viability of a cancer cell line only when loaded with DOX.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es el nombre de un grupo de patologías caracterizadas por la mitosis descontrolada de células a las que se refieren como células malignas o cancerosas (Chandraprasad et al., 2022), estos grupos celulares desarrollan aberraciones genéticas, se pueden infiltrar en tejidos en un proceso conocido como metástasis (Fidler, 2000). Además, generan angiogénesis específica para las células cancerosas (Nishida et al., 2006; Strieter et al., 2006) lo que genera una mayor disponibilidad de oxígeno y nutrientes captados por el organismo afectado, también producen las condiciones propicias para un ambiente inflamatorio, dañino para el tejido circundante y luego el sistema de órganos afectado por dicha enfermedad.

Normalmente este grupo de patologías es contrarrestado por distintos mecanismos. Uno de los principales es un mecanismo celular, que al reconocer un problema en la replicación, de forma interna realiza apoptosis por vía intrínseca (Galluzzi et al., 2020). Otro mecanismo de defensa importante contra los diferentes tipos de cáncer es el rol que presta el sistema inmunológico mediante la acción de células citotóxicas como células Natural Killer (Paul & Lal, 2017) o células T CD8+ (Farhood et al., 2019). Este tipo de células son capaces de reconocer a un antígeno presente en la superficie de las células cancerosas por medio del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) y posteriormente eliminarlas induciendo apoptosis por vía extrínseca en las células

malignas antes de que supongan un problema para el organismo (Raskov et al., 2021).

Cuando el organismo es incompetente para neutralizar el desarrollo y multiplicación de estas células malignas, es necesario realizar tratamientos terapéuticos empleados en biomedicina, dentro de los principales se encuentran radioterapia (Bomford et al., 2003), inmunoterapia (Waldman et al., 2020) y quimioterapia (Amjad, 2022). La última de las terapias nombradas es ampliamente utilizada como tratamiento en clínica.

La quimioterapia consiste en la introducción de un fármaco anticancerígeno por vía endovenosa u oral, el cual entra en el sistema circulatorio, moviéndose por el torrente sanguíneo e ingresando a las células que reciban este compuesto, de forma inespecífica, afectando tanto tejido funcional como células cancerígenas (Corrie, 2008). Este fármaco sigue las propiedades referentes a la farmacodinamia, biodisponibilidad y farmacocinética las que son específicas para cada fármaco administrado (Ball et al., 2022; LEES et al., 2004; Skorokhod et al., 2007). Un ejemplo es el fármaco Doxorrubicina (DOX) (Cutts et al., 2005; Shimizu et al., 2020; Sritharan & Sivalingam, 2021), el cual posee variados mecanismos de acción anticancerígenos ya sea intercalando la doble hebra de ADN generando aductos lo que provoca un cambio en la torsión de la doble hebra. Asimismo, atrapa la enzima topoisomerasa II en su sitio de clivaje, generando una torsión de la doble hebra exacerbada que incluso puede romper la doble hebra, provocando la muerte celular.

Estos mecanismos están ligados al aumento de especies reactivas de oxígeno y a la susceptibilidad del ADN por estas especies (Yang et al., 2014).

Como este fármaco llega a sitios donde no es requerido, una fracción de la cantidad introducida es desperdiciada y, además, genera daño en el organismo (Al-malky et al., 2020; Luu et al., 2018; Wallace et al., 2020), por lo que se debe administrar una cantidad mayor a la requerida para que la terapia sea efectiva y elimine a las células cancerosas. Por este motivo, varios grupos de investigación trabaja desarrollando nanotransportadores de fármacos anticancerígenos (Banerjee & Sengupta, 2011; Cheng et al., 2021; Hassan et al., 2017; Li et al., 2017) y, así tratar de impedir, entre otras cosas, los efectos secundarios generados por la acción inespecífica del fármaco sobre el organismo. Los nanotransportadores son nanomateriales con la capacidad de adsorber y transportar una molécula específica, en este caso, doxorubicina (Matyszevska, 2014).

Los nanomateriales son sistemas cuya estructura debe poseer alguna de sus dimensiones dentro del rango del nanómetro (10^{-9} m) (Saha et al., 2022), estos pueden clasificarse según su composición química en orgánicos, inorgánicos o híbridos y según su forma de crecimiento en el espacio como nanomateriales 0D, 1D, 2D y 3D (Pokropivny & Skorokhod, 2007), además de otras clasificaciones (Mageswari et al., 2016).

Entre los nanomateriales inorgánicos encontramos basados en metales y óxidos metálicos, en estos últimos aparecen las nanopartículas de Sílica mesoporosas

(MSN) (Manzano & Vallet-Regí, 2020) y nanovarillas de alúmina (ANW) (Ma et al., 2007). Estos nanomateriales se describen como sustancias de baja toxicidad, donde el parámetro a evaluar se denomina biocompatibilidad. La biocompatibilidad de las MSN dependerá principalmente del tamaño de estas nanopartículas, ya que si son muy pequeñas (<100 nm de diámetro) podrán ser endocitadas por las células y si son muy grandes podrán generar algún tipo de daño en la membrana plasmática que dependerá directamente del tipo celular con el que interactúe (Tang et al., 2012) por lo que se recomiendan emplear MSN entre 100 – 200 nm (Bakhshian Nik et al., 2020). Por su parte, los ANW también son utilizados como nanotransportadores, donde se describe una biocompatibilidad similar a las MSN, donde su estructura y método de síntesis determinaran la toxicidad que puedan generar a los diferentes tejidos (Park et al., 2015).

Las nanopartículas o nanoesferas poseen un crecimiento 0D, mientras que las nanovarillas poseen un crecimiento 1D, esto confiere diferentes propiedades de solvatación, distribución y varios otros (Guerrini et al., 2018) (Welch et al., 2016). Comúnmente, para poseer la capacidad de transportar una molécula específica, el nanomaterial debe poseer propiedades texturales y superficiales, como cavidades (Bonanno & Segal, 2011; Mirzaei et al., 2020; Prasad et al., 2021). Al adsorber las moléculas, el transporte de este quimioterapéutico depende de la distribución del nanomaterial en medio acuoso, afinidad de adsorción del fármaco y cinética de liberación de este (Ferreira & Bizeto, 2020).

Emplear estos nanotransportadores como vehículos moleculares de los quimioterapéuticos permite expandir las propiedades de distribución (Tietze et al., 2013) y farmacocinética (Hashida, 2020) debido a que estos vehículos moleculares se pueden modificar superficialmente para cambiar sus propiedades y obtener nuevas características del transportador cargado con el fármaco para los usos que se deseen emplear (Riviere et al., 2018). Una posibilidad de mejorar la biocompatibilidad del nanotransportador es modificándolo superficialmente (Nguyen et al., 2019; Shah & Rajput, 2019) al enlazar covalentemente un polímero como Polietilenglicol metil éter (PEG) a la superficie del material. Esta funcionalización cambiará las propiedades superficiales del nanomaterial dependiendo, en este caso específico, del largo de cadena, impidiendo principalmente una interacción directa entre este transportador con las células presentes en el torrente sanguíneo, células funcionales en tejidos y también algunas biomoléculas presentes en el torrente sanguíneo o líquido intersticial (Walkey & Chan, 2012), ya que al entrar a la sangre podrían generarse complicaciones como hemólisis o generar adsorción con las proteínas del plasma (Vinardell et al., 2015).

Por todo esto, al modificar la superficie de un nanotransportador, no solo se modificarán los parámetros farmacocinéticos, sino que, además, se puede cambiar las propiedades de distribución en medio acuoso y mejorar la biocompatibilidad, optimizando el transporte del fármaco deseado.

3. HIPOTESIS

Modificar superficialmente los nanomateriales inorgánicos con PEG modificará la cinética de liberación de doxorrubicina adsorbida y aumentará la biocompatibilidad con respecto a los nanomateriales prístinos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Obtener nanomateriales inorgánicos en base a MSN y ANW biocompatibles que sean capaces de transportar y liberar de forma controlada doxorrubicina generando un efecto citotóxico sobre células cancerosas.

4.2. Objetivos específicos:

1. Producir nanoesferas de sílica mesoporosas (MSN) y nanovarillas (ANW) de alúmina modificadas superficialmente con poli(etilenglicol) metil éter de 550 y 2000 Da.
2. Caracterizar fisicoquímicamente los nanomateriales obtenidos.
3. Evaluar la capacidad de adsorción y liberación de doxorrubicina de los nanomateriales.
4. Evaluar la interacción de los nanomateriales con modelos de proteínas del suero humano.
5. Evaluar la biocompatibilidad de los nanomateriales en células: eritrocitos, HEK293 y PC12.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Síntesis de materiales

5.1.1. Síntesis de Nanoesferas de sílica mesoporosas (MSN)

Empleando el método soft-template reportado por Miao y colaboradores (Miao et al., 2021) donde se usó bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) que actuó como surfactante, trietanolamina (TEA) y salicilato de sodio para generar una solución levemente básica. La solución preparada, se agitó por 1 hora a 80°C y posteriormente se añadió una solución de tetraetilortosilicato (TEOS) precursora de la polimerización de la nanopartícula de sílica y el agente de entrecruzamiento 1,2-bis(trietoxietil)etano (BTEE) en una proporción molar 4:1 respectivamente. De esta manera se promovió la catálisis básica de la síntesis de esta nanopartícula de sílica. La reacción se mantuvo a 80°C por 10 horas en agitación a 350 rpm. Una vez concluido este proceso, se centrifugó a 9000 rpm por 10 minutos y se recolectó el sólido que corresponde a las nanopartículas de sílica con el surfactante. Posteriormente, se eliminó el templado realizando 3 lavados con una solución de metanol con ácido clorhídrico fumante en una proporción volumétrica de 1000:1 respectivamente. Este ácido causó que el surfactante pierda afinidad por la superficie de la nanopartícula de sílica y se libere al medio de lavado, dejando así los espacios definidos como mesoporos. Luego de esto se recuperó el material por centrifugado y se obtuvieron las nanopartículas de sílica mesoporosas.

5.1.2. Síntesis de nanovarillas de óxido de aluminio (ANW)

Basándose en los reportes del grupo de investigación (Campos et al., 2016) se preparó una solución de nitrato de aluminio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) y ácido canforosulfónico (CSA) en agua, y se ajustó el pH de la solución hasta que alcanzó el valor de 5,4 agregando amoníaco a 1M por goteo mientras se agitaba la solución. El gel obtenido se llevó a un tratamiento hidrotermal empleando reactores de teflón revestidos con una camisa de acero inoxidable a 160°C por 24 horas. Una vez finalizado este proceso se enfrió a temperatura ambiente, se lavó el producto con etanol absoluto mediante centrifugación y se secó a temperatura constante en estufa a vacío a 50°C. El sólido resultante se calcinó en atmósfera de aire dinámico en un reactor tubular de vidrio desde temperatura ambiente hasta los 550°C - a una rampa de calentamiento de 10°C/min - y se mantienen por 6 horas hasta obtener el material.

5.1.3. Síntesis de sólidos funcionalizados

Para modificar superficialmente los materiales se realizó un procedimiento modificado de Lin y colaboradores (Lin & Zhou, 2017). Para esto se hizo reaccionar poli(etilenglicol) metil éter (PEG) con 3-(tri-etoxi-silil) propilisocianato (ISO) cuyo grupo isocianato reaccionó con PEG de 550 Da o 2000 Da, dejando disponible el sitio de unión a la superficie del nanomaterial, tal como se muestra en la figura 1.

Las proporciones dependieron de la masa molar promedio en número usado para modificar. Esta síntesis se llevó a cabo en un tubo de vidrio sellado en atmósfera de argón y en tolueno con agitación magnética por 2 días.

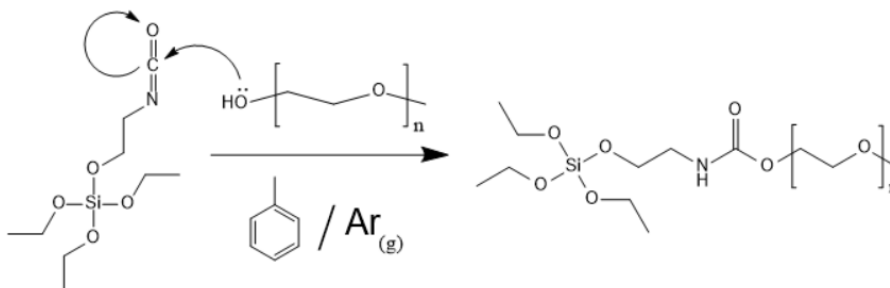


Figura 1. Reacción de PEG con ISO en tolueno y argón.
PEG $n = 12$ para PEG de 550 Da; $n = 45$ para PEG de 2000 Da.

Luego, en un balón de fondo redondo se mezcló el polietilenglicol activado (PEG-ISO) y el nanomaterial a modificar, utilizando tolueno en reflujo por 1 día. Finalmente se centrifugó y se recuperó el nanomaterial modificado. (Morelli et al., 2011), como se muestra en la figura 2, quedando el PEG-ISO covalentemente enlazado a la superficie.

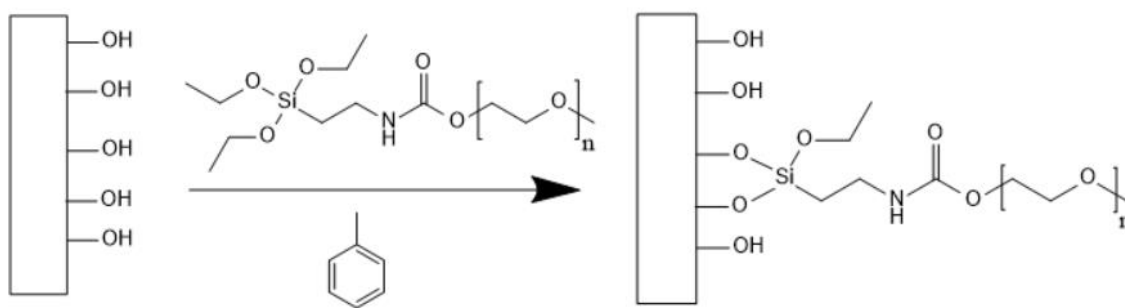


Figura 2. Adición del PEG-ISO a la superficie del nanomaterial por reflujo en tolueno.
PEG $n = 12$ para PEG de 550 Da; $n = 45$ para PEG de 2000 Da.

Como se obtuvieron distintos grupos de nanomateriales, se denotaron de la siguiente manera: ANW o MSN los cuales fueron modificados con poli(etilen)glicol metil éter de 550 dalton, denominado PEG550 y el de 2000 dalton se nombró PEG2000 resultando en los siguientes grupos: MSN prístino o simplemente MSN, MSN-PEG550 y MSN-PEG2000. De la misma forma se nombraron los grupos de ANW.

5.2. Caracterización fisicoquímica

5.2.1. Fisisorción de Nitrógeno

La caracterización superficial de materiales porosos se realiza mediante isothermas de adsorción – desorción de gases, la cual consiste en la adsorción física de un gas (adsorbato) sobre un sólido (adsorbente) cuya interacción en la superficie genera fuerzas de Van der Waals con energías entre 10 KJ/mol a 40 KJ/mol (Pourhakkak et al., 2021). Esta interacción se realiza a una temperatura cercana a la licuefacción del adsorbato a distintas presiones relativas del gas a utilizar. Los adsorbatos más comunes son el N₂, CO₂, CO, NO, benceno y algunos hidrocarburos alifáticos de cadena corta. La adsorción de N₂ a -196°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. A esta temperatura, el N₂

entra en equilibrio entre el estado gaseoso y líquido al condensarse en la superficie del sólido al ser adsorbido.

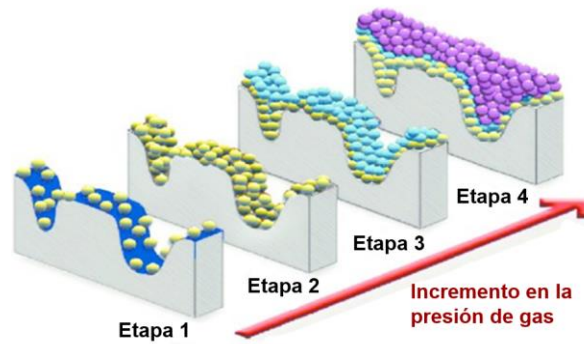


Figura 3. Esquema de llenado de la superficie con el aumento de presión del adsorbato.
Adaptado de (Chen et al., 2015)

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, Emmet y 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 como se muestra en la figura 3.

Con esto se puede determinar parámetros tales como: tamaño superficial, volumen y la distribución de tamaño de poros (Solcova et al., 2006).

Cualquier material sólido que contiene cavidades, canales o intersticios puede ser considerado como poroso.

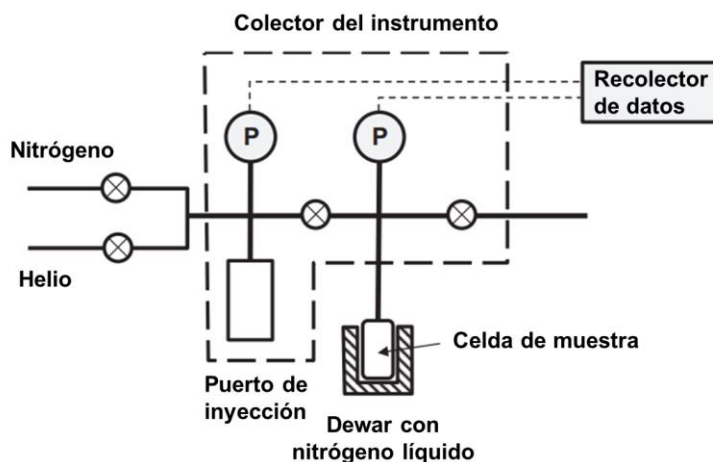


Figura 4. Representación esquemática de un sistema de fisisorción con N_2 o He.
Adaptado de (Yurdakal et al., 2019)

Las medidas de fisisorción fueron realizadas en un equipo Micromeritics TriStar II 3020 cuyo sistema instrumental se representa en la figura 4. Previo al análisis, la muestra se sometió a un tratamiento de limpieza por desgasificación con flujo de $N_{2(g)}$ calentada a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h. Producto de la adsorción de nitrógeno en la superficie de la muestra se genera una diferencia de presión respecto a un tubo de referencia, la cual es registrada por el equipo, y permite detectar los cambios de presión y el volumen de $N_{2(g)}$ adsorbido. Con los datos experimentales y utilizando la ecuación linealizada del modelo BET se obtiene la capacidad de la monocapa, y la superficie específica del sólido. Adicionalmente, la distribución de tamaño y volumen poros se obtiene utilizando la misma data experimental usando el método de Barret – Joyner – Halenda (BJH) (Ensafi et al., 2020).

5.2.2. Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Un espectro Infrarrojo (IR) es obtenido al pasar radiación electromagnética de este espectro a través de una muestra y determinar qué cantidad de esta radiación incidente ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada banda en el espectro posee relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula. La radiación recorre un sistema distribuido de una forma específica para poder realizar el análisis con transformada de Fourier como se muestra en la siguiente figura 5.

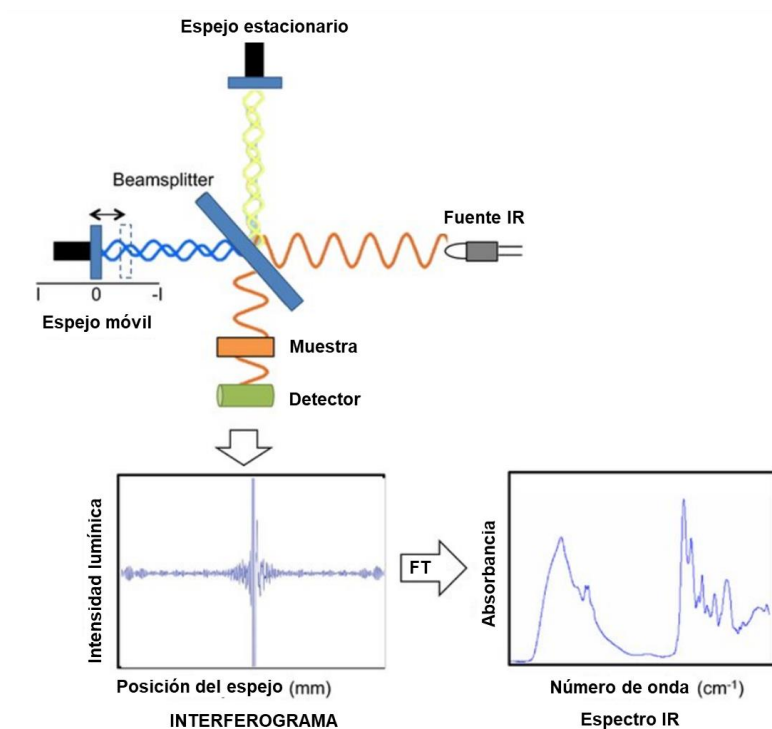


Figura 5. Representación esquemática del funcionamiento de la espectroscopia IR con FT.
Adaptado de (Campanella et al., 2021)

Los espectros en la región infrarroja están asociados a las transiciones entre niveles de energía vibracional los cuales corresponden a vibraciones del tipo tensión-contracción (*stretching*), flexiones varias (*bending*) y otros movimientos que son producidos en los enlaces de las moléculas. La región IR del espectro electromagnético comprende desde $14290 - 10 \text{ cm}^{-1}$.

El intervalo que abarca la espectroscopía IR puede dividirse en tres regiones:

1. IR cercano (NIR): $14290 - 4000 \text{ cm}^{-1}$.
2. IR medio: $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.
3. IR lejano: $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$

Donde el intervalo típicamente más utilizado por la cantidad de aplicaciones es el IR medio. Los experimentos se realizan barriendo un espectro de longitudes de onda con un haz de luz monocromático o midiendo la absorbancia de todas las longitudes de onda a la vez y realizando la Transformada de Fourier (FT) para el análisis (Berthomieu & Hienerwadel, 2009).

Esta técnica se utilizó para estudiar la composición química de la superficie de las MSN y ANW antes y después de modificar con PEG. Los análisis se realizaron en el equipo Nicolet marca Nexus FT-IR, en la zona del IR medio, usando una pastilla de KBr como blanco. Para ello se homogeneizó 1 mg de muestra en 100 mg KBr, seguido por la obtención de una pastilla en una prensa hidráulica, por último, la pastilla se colocó en el porta muestras y se midió el espectro a temperatura ambiente barriendo longitudes de onda en el intervalo medio y con un número de acumulaciones de 64 scan.

5.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que consiste en la medida continua, en función de la temperatura, la ganancia o pérdida de masa de un compuesto en una atmósfera de composición determinada que puede ser oxidante o reductora. Este tipo de análisis entrega información acerca de la estabilidad térmica y la composición porcentual de la muestra original (Hosseinian et al., 2022).

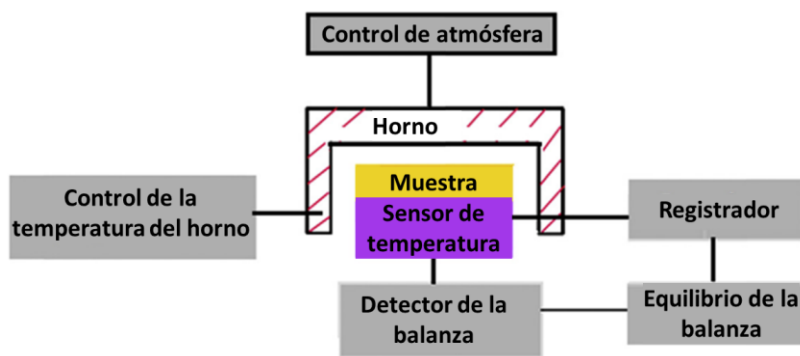


Figura 6. Representación esquemática de una termobalanza.
Adaptado de (Loganathan et al., 2017)

El instrumento en este tipo de análisis se denomina termobalanza y consta de cinco elementos primordiales como se muestra en la figura 6: Balanza de precisión, horno calefactor controlado por un programador, sensor de temperatura (termopar), sistema de admisión de gases y sistema de adquisición de datos (Carucci et al., 2021).

Las condiciones requeridas para la balanza son análogas a cualquier balanza analítica: exactitud, sensibilidad, reproducibilidad.

En este caso, se realizó un aumento gradual de temperatura de 10°C/min en una atmosfera de N₂ (g) donde se registró la pérdida de masa porcentual a cada temperatura de los distintos materiales.

Para determinar el porcentaje de Grafting se realiza utiliza la siguiente ecuación:

$$\%grafting = (\%m_p - \%m_m)_t \quad (1)$$

Donde:

%grafting = diferencia porcentual de materia orgánica acoplada (%)

%m_p = Masa del nanomaterial prístino (%)

%m_m = Masa del nanomaterial modificado (%)

t = temperatura a la que se hace la diferencia, normalmente a 1000°C (°C)

Para determinar la densidad de sitios inmovilizado con PEG se realiza utiliza la siguiente ecuación:

$$densidad\ de\ sitios = \frac{\%grafting}{\bar{M}_{PEG-ISO} \cdot 100 \cdot S_{BET}} \quad (2)$$

Donde:

%grafting = diferencia porcentual de materia orgánica acoplada (%)

$\bar{M}_{PEG-ISO}$ = Masa molar del PEG modificado con el agente de acople ISO.

S_{BET} = Superficie especifica determinada por isothermas de adsorción - desorción de N₂ a -196°C.

5.2.4. Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión es una técnica que permite observar la forma, el tamaño, y el ordenamiento de partículas de unos pocos nanómetros. La técnica consiste en un haz de electrones que es transmitido a una muestra a medida que pasa a través de ella como se muestra en la figura 7. Una imagen es formada a partir de la transmisión de electrones que atraviesa la muestra, magnificada y enfocada por un lente objetivo brindando la imagen de la muestra (Ortiz Ortega et al., 2022b).

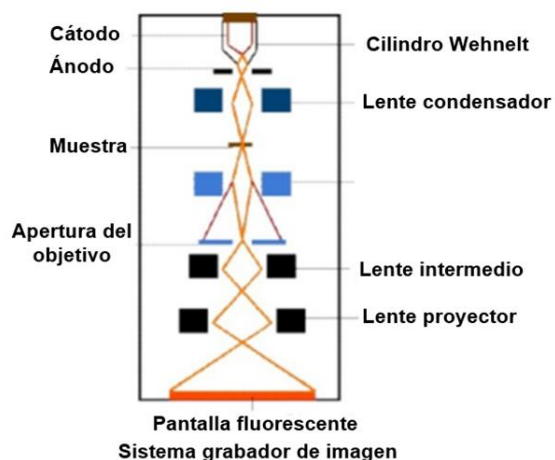


Figura 7. Esquema general de un TEM.
Adaptado de (Neumeier, 2015).

Las micrografías TEM para la confirmación de la efectiva formación de las estructuras de escala nanométrica lo que permite determinar su morfología y tamaño aproximado, estas micrografías estas fueron realizadas en un equipo JEOL con sistema JEM-1200 EXII.

Las muestras fueron preparadas por dispersión alcohólica, que consiste en dispersar la muestra en polvo en etanol, la que se agitó por unos minutos y se complementa con ultrasonido. La dispersión resultante se siembra en una grilla de Cu cubierta de celulosa.

5.2.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Las partículas en una solución pueden interactuar con un haz monocromático y dispersarla dependiendo del tamaño de estas partículas con respecto a la longitud de la onda utilizada, una vez se produce esta interacción se producirán fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada en un ángulo determinado debido al movimiento Browniano producidas por estas partículas de esta forma se analiza la luz dispersada de forma dinámica en el tiempo como se muestra en la siguiente figura 8.

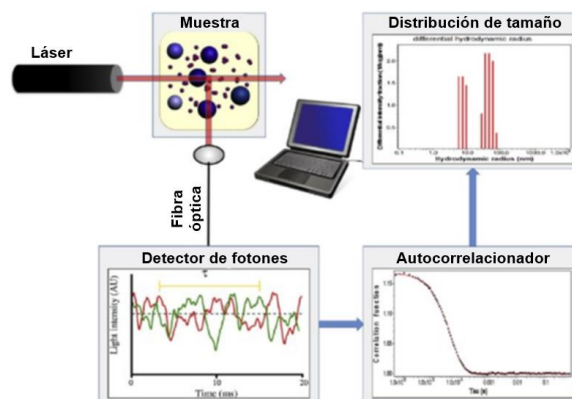


Figura 8. Representación esquemática de la técnica DLS.
Recuperado de (Minton, 2016)

Esta técnica se realizó para conocer la estabilidad de los nanomateriales en solución de PBS a pH 7,4 donde se determinó una concentración óptima para evitar aglomeración. Se hizo pasar un haz de luz a 658 nm por la muestra y la luz dispersada en 90° fue medida, se determinó con esta la distribución de tamaño de los nanomateriales en estas soluciones (Sakho et al., 2017).

5.3. Curva de calibración de doxorrubicina

Mediante espectrofotometría de absorción UV-Visible (Ortiz Ortega et al., 2022a) y espectroscopía de fluorescencia (Ghiran, 2011) se analizaron las curvas de calibración de DOX bajo diferentes condiciones con la finalidad de cuantificar la cantidad de fármaco. Particularmente se estudió el medio y pH: solución acuosa a pH 7,4; PBS a pH 7,4; PBS a pH 5,0 o en etanol. Esto último no afecta la estructura en gran medida de la DOX ya que su punto isoeléctrico está sobre pH 8.2 como se muestra en la figura 9.

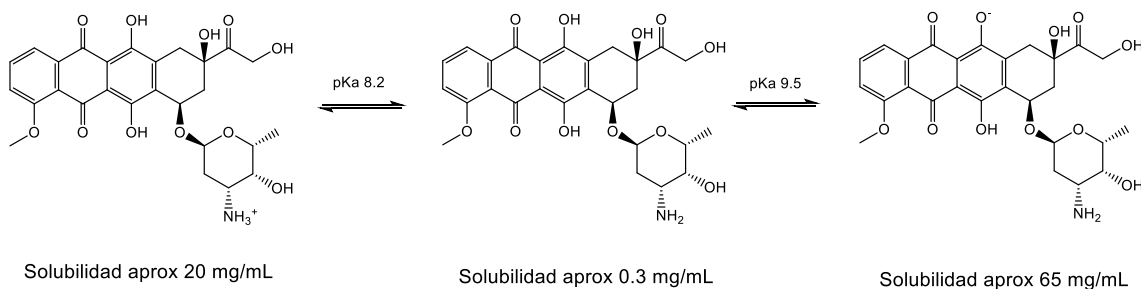


Figura 9. Ionización de doxorrubicina en medio acuoso y su respectiva solubilidad dependiente del pH.
Extraído de (Fülöp et al., 2013)

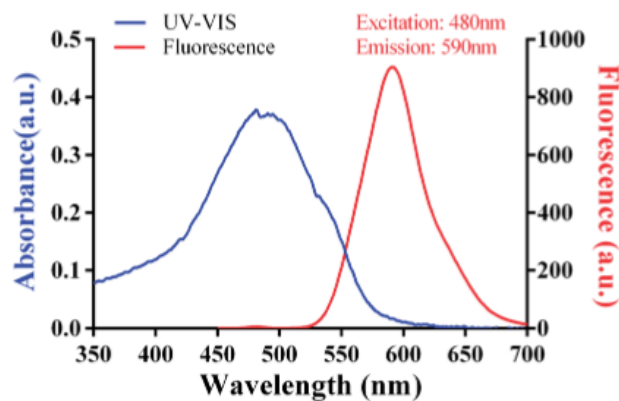


Figura 10. Espectro de emisión y excitación de doxorubicina.
Recuperado de (Liang et al., 2018)

El seguimiento por absorción UV-Vis o fluorescencia se realizó según lo descrito en la Figura 10.

5.4. Isotherma de adsorción de doxorubicina

Un isoterma de adsorción consiste en colocar en contacto un material y una solución de una molécula específica esperando que exista un equilibrio entre la molécula en solución y la molécula adsorbida físicamente por la superficie del material (Figura 11). La isoterma de adsorción de DOX se realizó en etanol para ANW y en H₂O a pH 7,4 para MSN.

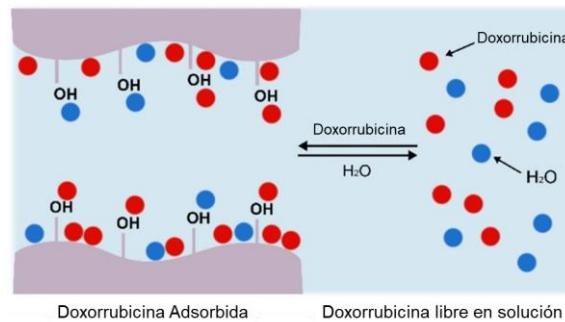


Figura 11. Equilibrio del fármaco entre la superficie del sólido y el solvente.
Adaptado de (Dening et al., 2019)

En un experimento típico se contactó 1 mg de nanomaterial (MSN o ANW) con soluciones crecientes de DOX (desde 0,5 ppm hasta 200 ppm) a 25°C en agitación constante a 20 rpm (Figura 12). Luego de 16 horas de contacto, se evaluó la concentración de DOX en la solución, para determinar por diferencia la cantidad adsorbida por los nanomateriales.

Se determinó Q_e mediante la ecuación 2 y mediante la gráfica Q_e v/s C_e y ajustando a modelos matemáticos descritos (Omokpariola, 2021), destacando principalmente los modelos de Langmuir y Freundlich, así se consiguió determinar la cantidad óptima de fármaco en solución que maximizará la adsorción por cantidad de sólido.



Figura 12. Soluciones de DOX en etanol en concentraciones crecientes (derecha a izquierda) luego de ser contactado con el nanomaterial.

La ecuación que describe la cantidad adsorbida a una cierta concentración por cantidad de sólido es:

$$Q_e = \frac{C_0 - C_e}{m} \times V \quad (3)$$

Q_e: masa de DOX adsorbida en una cantidad de masa de nanomaterial (mg/g)

C₀: concentración de DOX en la solución inicial (mg/L)

C_e: concentración de DOX en la solución luego de contactar con el sólido (mg/L)

V: volumen de la solución contactada con el nanomaterial (L)

m: masa de nanomaterial usada para contactar (g)

5.5. Cinética de liberación de doxorrubicina

Para determinar qué cantidad de fármaco y la velocidad con la que se libera desde un material, se realiza una diálisis con una membrana que permite el intercambio de moléculas pequeñas y agua para separar el fármaco soluble del nanomaterial donde fue adsorbido. Así, se toman muestras de la solución externa

y se mide la concentración del fármaco en diferentes periodos de tiempo desde el sistema en equilibrio como se muestra en la siguiente figura 13.

En este caso particular, una vez adsorbida y cuantificada la DOX encapsulada por los nanomateriales, se colocó el sólido cargado con el fármaco en una membrana de diálisis, esta membrana se sumergió en una solución buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,4 y otro a pH 5,0, en un vaso de precipitado, midiendo 6 sistemas por duplicado a cada pH. Dentro de la membrana se añadió una pequeña cantidad de PBS al mismo pH y el sistema se dejó en agitación por 48 horas a 37°C. Las muestras tomadas fueron de 600 µL.

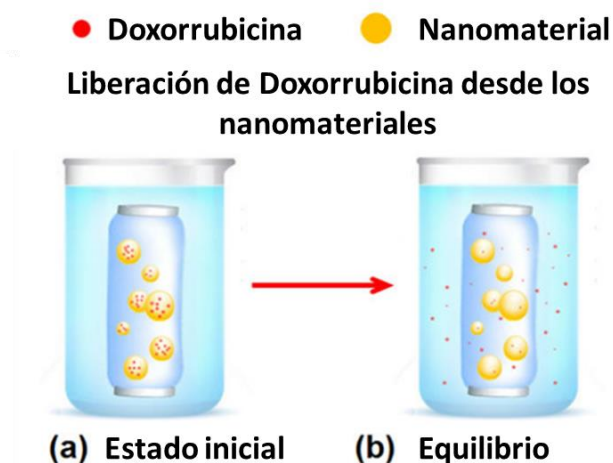


Figura 13. Sistema de diálisis para medición de la liberación de doxorubicina.
Adaptado de (Agrahari et al., 2017)

Se tomaron 4 muestras dentro de la primera hora, luego 5 más hasta las 6 horas y posteriormente se midió la concentración a 24 y 48 horas. Para calcular la concentración de DOX relativa que se liberó de cada nanomaterial se usó:

$$C_r = C_t * \frac{V}{m * Q_e} * 100\% \quad (4)$$

C_r: Concentración relativa de DOX liberada (%)

C_t: Concentración de DOX liberada en el equilibrio (mg/L)

V: Volumen de la solución (L)

m: masa de sólido cargado con DOX (g)

Q_e: cantidad de DOX adsorbida por unidad masa de nanomaterial (mg/g)

Cada muestra de la solución fue evaluada espectrofotométricamente y se graficó para hacer los ajustes matemáticos (Dash et al., 2010).

5.6. Ensayos de Biocompatibilidad

5.6.1. Ensayos de hemólisis

Para confirmar la biocompatibilidad de los nanomateriales sintetizados es importante considerar la interacción de estos con moléculas del torrente sanguíneo como los eritrocitos y observar si estos últimos sufren una cantidad de daño tal que les produzca hemólisis. Esto puede ocurrir antes o después de que

los materiales sean capaces de liberar el fármaco en el tejido deseado por lo que en todo momento deben ser, dentro de lo posible, inocuos para estas células.

En este ensayo, se obtuvieron glóbulos rojos a partir del suero del responsable de este escrito de forma voluntaria, recolectado en tubos con EDTA, estos se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos, se eliminaron los elementos distintos a eritrocitos como capa leucocitaria y suero usando una micropipeta, quedando con aproximadamente 2 mL de glóbulos rojos. Luego se lavó con buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,4 tres veces para eliminar el resto de los elementos presentes y posteriormente se dispersaron los glóbulos rojos para formar una dispersión al 10% v/v en buffer fosfato salino.

De esta dispersión eritrocitaria se tomaron 140 μ L y se contactaron con las dispersiones a distintas concentraciones: 10, 50, 100 y 500 ppm de nanomateriales en PBS hasta 1 mL de solución donde el control negativo de hemólisis se completó con PBS a pH 7,4 mientras el positivo se completaba con agua desionizada hasta 1 mL (Figura 14).

Los sistemas se contactaron por 1 hora a 20 rpm a 37°C, se centrifugaron a 3000 rpm y al tomar el sobrenadante se midió la concentración de hemoglobina disuelta por medición espectrofotométrica a 540 nm (Vélez-Peña et al., 2022).

Un material se consideró hemolítico si supera el 5% de hemólisis siguiendo con la ecuación 5:

$$H = \frac{A_s - A_n}{A_p - A_n} * 100\% \quad (5)$$

H: Hemolisis (%)

A_s: Absorbancia del sobrenadante de la muestra

A_n: Absorbancia del sobrenadante del control negativo

A_p: Absorbancia del sobrenadante del control positivo

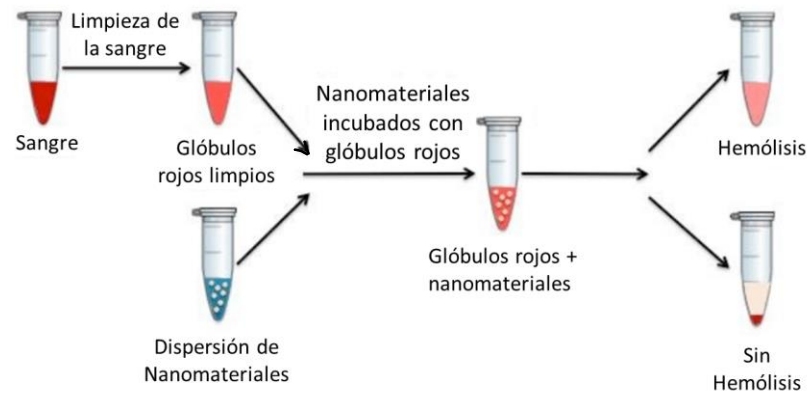


Figura 14. Esquema general para realizar en ensayo de hemólisis.
Adaptado de (Fornaguera & Solans, 2017)

Los análisis estadísticos se realizaron aplicando la prueba t-student para corroborar su significancia estadística. La toma de muestra fue realizada en un laboratorio en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción siguiendo todos los protocolos de bioseguridad.

5.6.2. Ensayo de adsorción inespecífica de proteínas (NSPA)

El plasma sanguíneo humano posee componentes proteicos cuya concentración oscila entre los 60-80 mg/L en condiciones fisiológicas, los que mayoritariamente consisten en albúmina y globulinas (Leeman et al., 2018), donde la fracción gamma, también conocidas como Inmunoglobulinas, varía de forma importante pudiendo aumentar bajo condiciones que activen el sistema inmune adaptativo. Estos dos grupos corresponden aproximadamente al 75% de la composición proteica del plasma como se muestra en la figura 15.

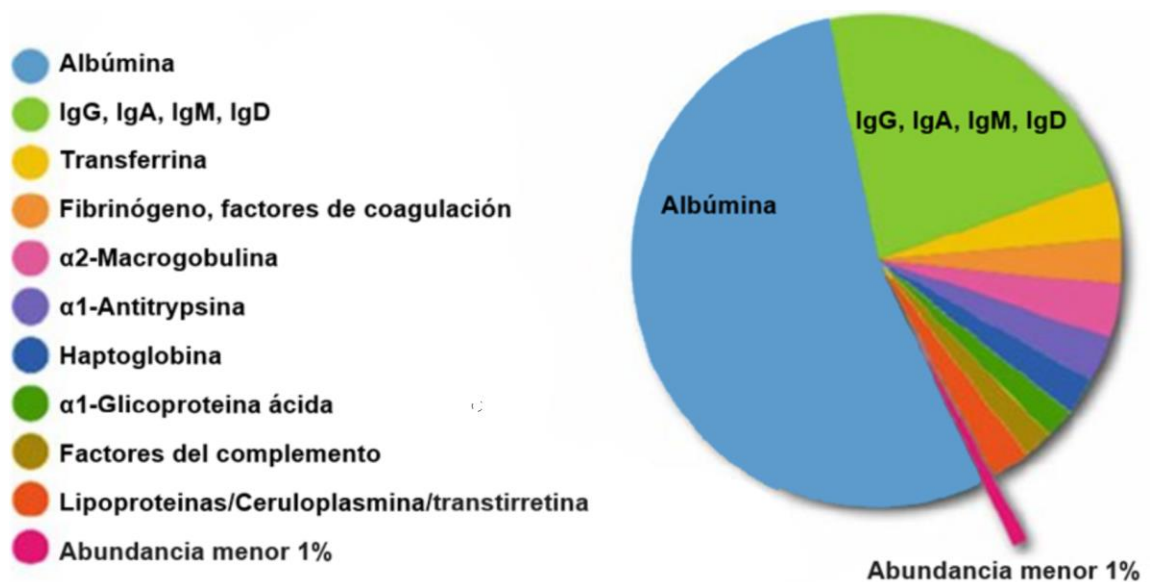


Figura 15. Composición proteica en peso % del plasma humano.
Adaptado de (Jaros et al., 2013)

Este ensayo permite determinar la interacción de los nanomateriales y modelos de las principales proteínas en el plasma sanguíneo para estimar alguna posible complicación a la hora de realizar estos ensayos *in vivo*.

Para esto, se preparó una solución de Albúmina de suero humano (HSA) e Inmunoglobulina γ (gamma) de bovino, obtenidos de Sigma-Aldrich, a una concentración 0,6 mg/mL en buffer fosfato salino a pH 7,4 cada una al igual que las dispersiones de nanomateriales. Se añadió 0,5 mL de dispersión y 0,5 mL de la solución de proteína, se contactó por 16 horas a 37°C a 20 rpm, se centrifugó a 10000 rpm y se midió la concentración relativa de proteínas en cada sobrenadante donde el control tenía 0,5 mL de buffer fosfato salino extra. Esta concentración fue medida usando espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm (Yildirim et al., 2013). Los resultados fueron comparados con la prueba t-student para diferenciar resultados estadísticamente significativos.

5.6.3. Ensayos de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular permiten estudiar la presencia de actividad metabólica de un grupo de células enfocándose generalmente en la presencia de poder reductor en las células en forma de NADH, FADH₂, FMNH₂, NADPH entre otros, esto utilizando un compuesto oxidado que puede permear, por lo menos, a través de la membrana plasmática, como se representa en la figura 16, cuyas

propiedades espectrofotométricas cambian al estar reducida, en este estado es cuando nos interesa medir este compuesto (Stoddart, 2011).

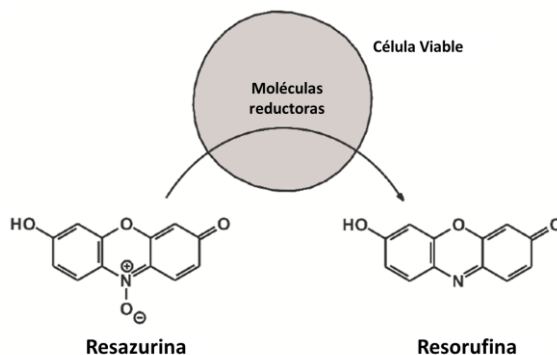


Figura 16. Reducción de Resazurina a Resorufina.
Adaptado de (Rampersad, 2012)

La medición de esta actividad metabólica o identificar si un grupo de células se encuentran viables permitió observar algún tipo de daño o afección provocada por los nanomateriales, que, dentro de lo posible, deben resultar inocuos para las células, pero citotóxicos cuando los materiales transporten DOX.

Para esto se utilizará el compuesto Resazurina bajo el nombre comercial AlamarBlue®, el cual posee un color azul oscuro que puede ser disuelto directamente en medio de cultivo celular y al ser reducido toma una coloración rosada (Figura 17) cuando es Resorufina la cual posee una mayor fluorescencia (Riss et al., 2004).

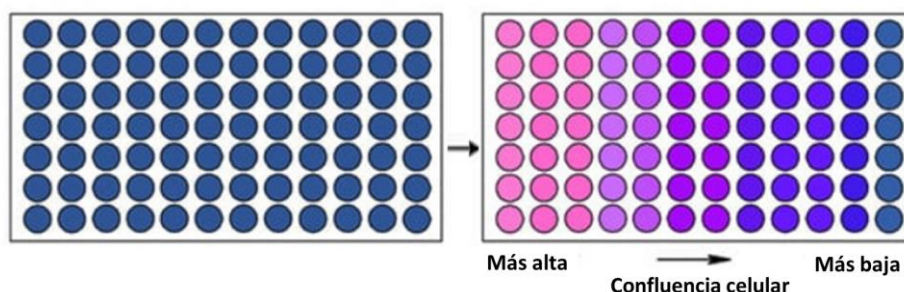


Figura 17. Esquema de microplacas de 96 pocillos con células y Resazurina. La coloración varía a medida de aumenta la concentración de Resorufina por una mayor confluencia celular. Adaptado de (Ligasová & Koberna, 2021).

El protocolo general consistió en realizar cultivos de líneas celulares HEK293, como modelo de células funcionales, o PC12, como modelo de células cancerosas, en placas de 96 pocillos a las cuales se les añadieron los distintos sistemas de nanomateriales prístinos y modificados con polietilenglicol. La línea PC12 se utilizó para medir viabilidad celular con los nanomateriales sin carga y cargados con DOX. Los medios de cultivo que corresponden a las líneas celulares PC12 poseen 5% suero de bovino, 5% suero de equino, 1% penicilina estreptomycin 10.000 U/mL mientras que para HEK293 poseen 10% de suero bovino, todos estos de Gibco™. Ambos cultivos se completan con DMEM/HIGH GLUCOSE de HyClone™. Las líneas celulares se dejaron incubando en una atmosfera de 5% CO₂, resto de aire ambiental a 37°C. Cada cultivo se trabajó en una cámara de flujo laminar con material previamente esterilizada con luz UV por 15 min en una placa de 96 pocillos con una línea celular previamente cultivada en una confluencia aproximada del 50%, el control negativo de viabilidad

correspondió a la adición de 90 μ L de medio de cultivo específico para la línea celular y 10 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), los pocillos para analizar el nanomaterial contenían 10 μ L de dispersión en PBS a pH 7,4 y el control positivo de viabilidad contenía 100 μ L de medio de cultivo. Luego de la incubación con los materiales por 48 horas a 37°C, se retiró el medio de cultivo con una pipeta Pasteur y una bomba de vacío, posteriormente se añadió 100 μ L de una solución de medio de cultivo con reactivo AlamarBlue™ en una proporción volumétrica de 80:1 respectivamente, se dejaron incubar las células con el reactivo por 1 hora y se midió la intensidad de fluorescencia de cada pocillo con excitación a 560 nm y emisión a 590 nm en un lector multiplaca.

Posterior a la medición, se eliminó apropiadamente la placa retirando de la misma forma el medio de cultivo de forma total y dejándola a disposición del laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias biológicas de la Universidad de Concepción. Los valores de fluorescencia fueron normalizados respecto a los valores obtenidos por el control positivo de viabilidad y se utilizó la prueba T-student para señalar diferencias significativas en los resultados.

6. RESULTADOS

6.1. Nanopartículas de sílica mesoporosas (MSN)

6.1.1. Caracterización

6.1.1.1. Fisisorción de Nitrógeno

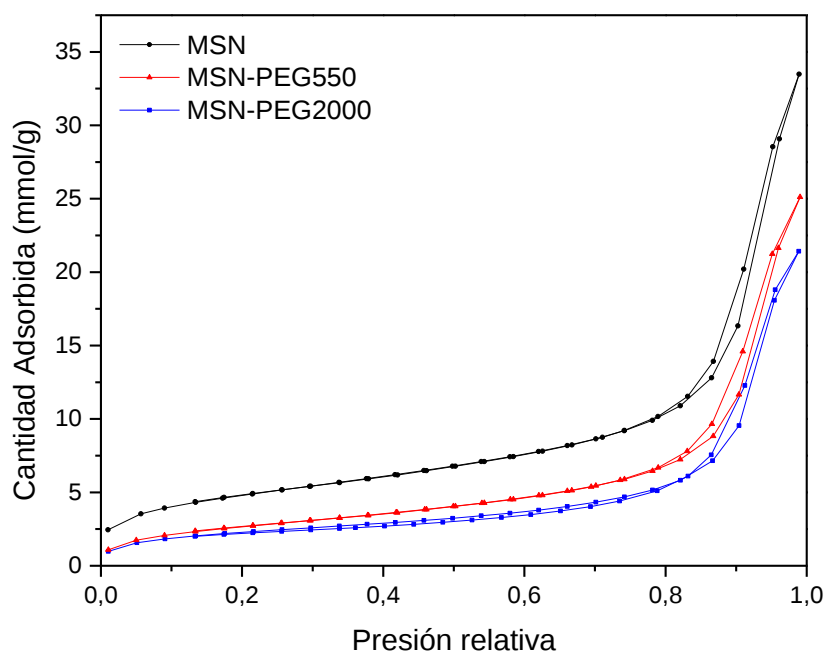


Figura 18. Adsorción-desorción de N₂ a -196°C por los sistemas preparados en base a MSN.

Tabla 6.1.1.1-1. Promedios de área específica y diámetro de poro obtenidos de la isoterma de adsorción-desorción de N₂ a -196°C de los nanomateriales en base a MSN.

Muestra	S_{BET} (m ² g ⁻¹)	d_{Poro} (nm)
MSN	388	12,7
MSN-PEG550	223	13,0
MSN-PEG2000	187	17.0

En la figura 18 se puede observar las isotermas de adsorción-desorción de las nanoesferas de sílice, MSN.

De acuerdo con este análisis el material MSN prístino poseen una superficie específica de aproximadamente $388 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ en donde se ve una disminución en la capacidad de adsorción cuando se modifican con PEG de distinto tamaño, con relación a los MSN-PEG550 y MSN-PEG2000 entre ellos no poseen una diferencia significativa en la superficie específica, pudiendo estar dentro del error de la técnica. Se conserva el ciclo de histéresis del material prístino cuando las MSN son modificadas. La forma de la isoterma corresponde al tipo IV según la clasificación de la IUPAC, esperable para un sistema mesoporoso, con un ciclo de histéresis H1 lo que indica un sistema de capilares cilíndricos uniformes (Zhang et al., 2016). El diámetro promedio del poro presentado en la tabla 6.1.1.1-1 reafirma la síntesis de materiales mesoporosos.

6.1.1.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Mediante el análisis de espectroscopia infrarroja se determinaron las bandas características para los nanomateriales de sílica y sus variaciones cuando estos materiales se modifican superficialmente con PEG como se observa en la siguiente figura 19.

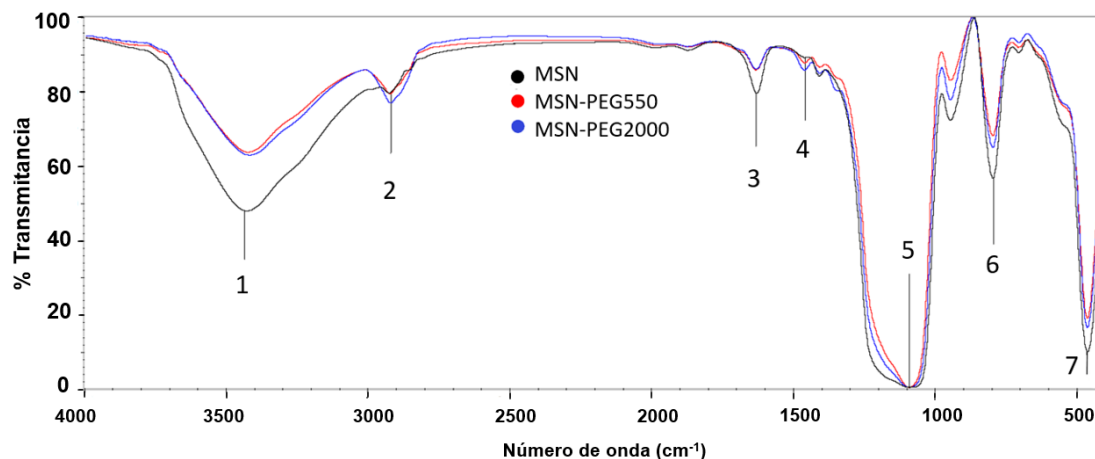


Figura 19. Espectro de FTIR para los materiales preparados en base a MSN

Tabla 6.1.1.2-1. Grupos químicos de MSN asociados a bandas de IR.

Número	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibración asociada
1	3434	Estiramiento de Silanoles superficiales (O-H)
2	2920	Estiramiento C-H
3	1630	Tijera de moléculas de agua
4	1460	Flexión de N-H en PEG-ISO
5	1300-950	Estiramiento asimétrico Si-O-Si
6	795	Estiramiento simétrico Si-O-Si
7	464	Flexión Si-O

En la tabla 6.1.1.2-1, se observan las distintas vibraciones asociadas a MSN en el espectrograma presentado en la figura 19 donde las bandas designadas con los números 5, 6 y 7 fueron contrastadas con (Ma et al., 2021).

Se observa en la figura 19, las MSN prístinas las cuales presentan una banda distintiva a 3400 cm⁻¹ aproximadamente (1) asociada al estiramiento O-H, estos disminuyen de forma particular, a diferencia de las demás bandas, cuando se modifican con PEG-ISO. La banda de 2920 cm⁻¹, correspondiente al estiramiento

C-H se observa en todos los materiales y corresponde a los grupos etano ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) en el agente de entrecruzamiento BTEE. La banda 3 se atribuye a moléculas de agua adsorbidas en la superficie de los nanomateriales, la cual se manifiesta de forma más intensa en la MSN prístina. Las bandas 4 y 5 se asocian a la flexión del grupo N-H del carbamato del PEG-ISO y al estiramiento simétrico de Si-O-Si respectivamente. Por último, las bandas 6 y 7 se asocian con el acoplamiento covalente del PEG-ISO a la superficie de las MSN.

6.1.1.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

En la figura 20 se muestran los perfiles de TGA para los 3 sistemas basados en MSN. Estos resultados muestran una disminución progresiva de la masa donde las MSN modificadas presentan un perfil de termograma similar entre sí, obteniendo una pérdida de masa sustancial desde los 300°C , esto es atribuido a la descomposición térmica del PEG inmovilizado en la superficie de MSN.

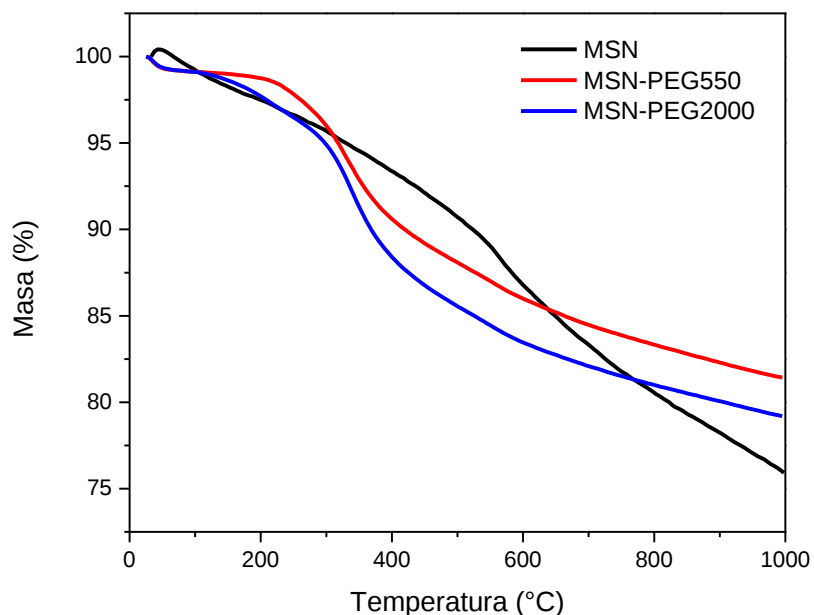


Figura 20. Termograma de MSN.
Condiciones: atmósfera de N₂ a velocidad de calentamiento de 10°C/min desde temperatura ambiente hasta los 1000°C.

Tabla 6.1.1.3-1. Masa residual, grafting y densidad de sitios inmovilizados en los nanomateriales en base a MSN.

Muestra	Masa Residual a 1000°C (%)	Grafting a 500°C (%)	Densidad de sitios (μmol/m ²)
MSN	75,9	---	---
MSN-PEG550	81,4	2,5	0,14
MSN-PEG2000	79,2	5,0	0,12

Por otra parte, el material prístino, desde los 500°C aproximadamente, comienza a disminuir la masa residual de forma importante, terminando con menos masa que la obtenida con las MSN modificadas con PEG. En la tabla 6.1.1.3-1 se observa que el porcentaje de materia orgánica acoplado se debe calcular a los

500°C que es donde se mantiene una pérdida uniforme en los 3 nanomateriales. Según este cálculo, se obtuvo un 5 % m/m de PEG2000-ISO y un 2,5% m/m de PEG550-ISO en la superficie de las MSN. Sin embargo, si se normaliza por la densidad de sitios modificados se puede observar que la densidad de sitios ocupados anclados en ambos materiales es aproximadamente la misma.

6.1.1.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

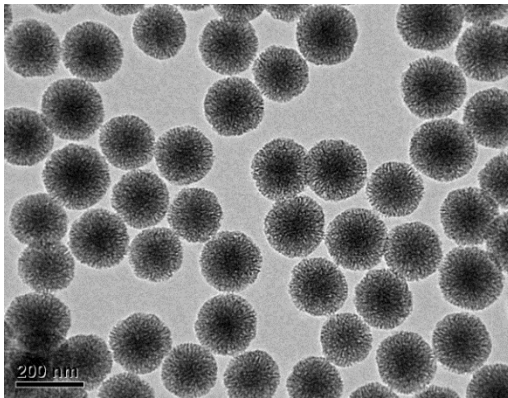


Figura 21. Micrografías de TEM para MSN. barra de referencia de 200 nm

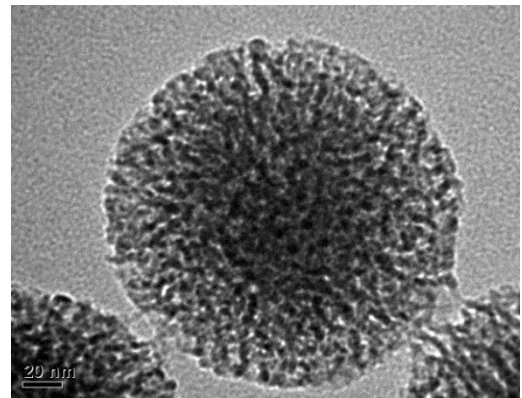


Figura 22. Micrografías de TEM para MSN. barra de referencia de 20 nm

En la figura 21 se observan las micrografías de la MSN prístina, este material presenta un aspecto esferoide cuya distribución de tamaño se observa relativamente uniforme (Stoddart, 2011). La densidad electrónica no parece ser homogénea en el *bulk* o cuerpo de las partículas, donde estas irregularidades son atribuibles a los mesoporos de este nanomaterial. La figura 22, con mayor aumento, permite ver una diferencia en las densidades electrónicas de MSN, mostrando las estructuras electrodensas con un aspecto filamentoso y uniformemente distribuida en la estructura de esta partícula. Con la micrografía

mostrada en la figura 22 se puede estimar un tamaño aproximado de 180 nm de diámetro de la MSN.

6.1.1.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

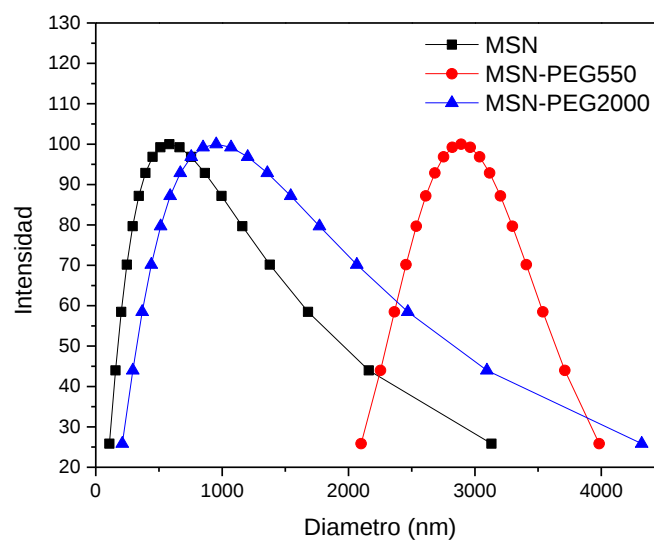


Figura 23. Distribución del diámetro hidrodinámico de MSN en PBS a pH 7,4 a 500 ppm.

Tabla 6.1.1.5-1. Valores de diámetro hidrodinámico de MSN en PBS a pH 7,4.

Muestra	Diámetro a máxima intensidad (nm)
MSN	582
MSN-PEG550	2891
MSN-PEG2000	953

La figura 23 muestra una distribución del diámetro hidrodinámico (D_H) similar entre MSN y MSN-PEG2000, donde este último posee una mayor frecuencia de D_H de mayor tamaño.

Por otra parte, la MSN-PEG550 posee una menor polidispersidad y la distribución de tamaño es mucho mayor a comparación de los otros 2 nanomateriales, superando por, aproximadamente, 2000 nm el D_H de mayor frecuencia.

6.1.2. Isotherma de adsorción de Doxorrubicina

Se estudiaron las curvas de adsorción de DOX utilizando los sistemas sintetizados con MSN.

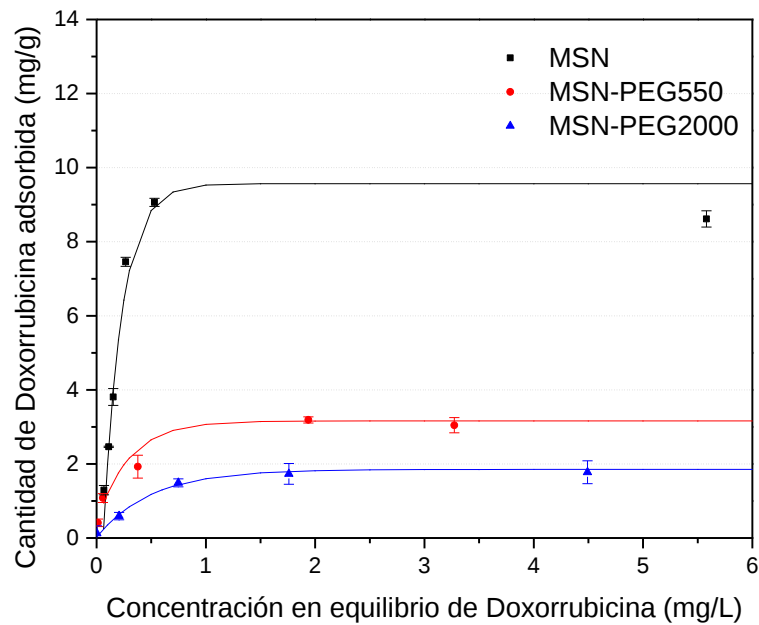


Figura 24. Isotherma de adsorción de DOX en MSN. Rango de concentraciones de DOX desde 0,5 ppm hasta 10 ppm, temperatura de 25°C.

En la figura 24, se puede observar que todas las curvas poseen un *plateau* muy marcado para cada uno. La curva de MSN prístina enseña una importante

pendiente inicial que rápidamente decrece cuando llega al plató, llegando a, aproximadamente, 9 mg/g de DOX adsorbida por este nanomaterial.

Por otra parte, las MSN modificadas poseen un plató de saturación mucho más bajo, donde la MSN-PEG550 se satura cuando encapsulan 3 mg/g y la MSN-PEG2000 no alcanza los 2 mg/g de DOX adsorbida.

Para evaluar el modelo de adsorción se utilizó el ajuste de Langmuir el cual considera la adsorción del sustrato como una monocapa en superficies homogéneas (Campos et al., 2016) de acuerdo con la ecuación linealizada (6):

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_m} * C_e + \frac{1}{Q_m * K_L} \quad (6)$$

Donde:

C_e: Concentración de DOX en equilibrio (mg/L)

Q_e: Cantidad de DOX adsorbida por cantidad de sólido (mg/g)

Q_m: Cantidad máxima de adsorción de DOX por cantidad de sólido (mg/g)

K_L: Constante de afinidad entre el adsorbato y el adsorbente (L/mg)

Tabla 6.1.2-1. Parámetros del modelo de Langmuir para Isoterma de adsorción en los nanomateriales en base a MSN.

Muestra	Q _m (mg/g)	K _L (L/mg)	R ²
MSN	8,9	5,2	0,9954
MSN-PEG550	3,7	10,5	0,9952
MSN-PEG2000	1,9	4,9	0,9932

En la tabla 6.1.2-1, se muestran los parámetros obtenidos luego de ajustar estos valores de Isoterma de adsorción de DOX al modelo de Langmuir. Este modelo permite obtener la capacidad máxima de adsorción de fármaco en una cantidad de material (Q_m) y la constante de afinidad entre el adsorbato con el adsorbente (K_L). Los valores de Q_m poseen valores muy similares a lo observado en los experimentos de isothermas de adsorción, reiterando la mayor capacidad de adsorción de DOX por las MSN prístinas, luego MSN-PEG550 y la menor capacidad la posee las MSN-PEG2000. En cuanto a la constante de afinidad del adsorbato con el adsorbente se observa una mayor afinidad entre DOX y MSN-PEG550 y una afinidad similar entre la MSN prístina y MSN-PEG2000 con DOX.

6.1.3. Cinética de liberación de doxorrubicina en PBS

6.1.3.1. PBS a pH 7,4

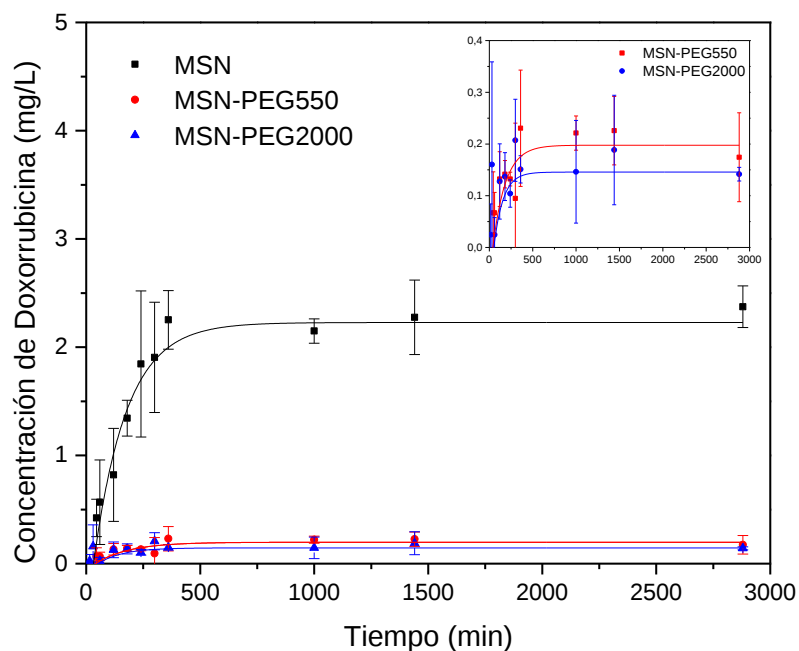


Figura 25. Cinética de liberación de DOX en PBS a pH 7,4 y 37°C para los materiales en base a MSN. Ampliación para los sistemas MSN-PEG550 y MSN-PEG2000.

Tabla 6.1.3.1-1. Parámetros obtenidos de la cinética de liberación ajustando modelo de liberación de primer orden a pH 7,4.

Muestra	Concentración de DOX a las 48 horas (ppm)	Liberación relativa a las 48 horas (%)	k (min ⁻¹)	R ²
MSN	2,4	9,9	0,0069	0,992
MSN-PEG550	0,2	2,3	0,0069	0,990
MSN-PEG2000	0,1	3,7	0,0094	0,978

La figura 25 muestra una importante diferencia en la liberación de DOX desde las MSN prístina a diferencia de las MSN PEGiladas, en estos últimos, la cantidad máxima liberada es muy similar, siendo de, aproximadamente, 0,18 ppm de DOX en equilibrio, mientras que de la MSN prístina se alcanzan los 2 ppm. Además, se observa que en las 3 liberaciones se alcanza el plató, aproximadamente, al tiempo 500 min, es decir, a las 4 horas con 20 minutos de comenzado el experimento. Las cinéticas mostradas en la figura 25 fueron ajustadas al modelo de liberación de primer orden descrita por la siguiente ecuación:

$$Q_t/Q_0 = e^{-kt} \quad (7)$$

Donde:

Q_t: Concentración de DOX medida en el tiempo t (mg/L)

Q₀: Concentración de DOX medida a 48 horas. (mg/L)

k: Constante cinética (min⁻¹)

t: tiempo (min)

Siguiendo este modelo, se confeccionó la tabla 6.1.3.1-1 donde se aprecia la concentración máxima aproximada de DOX medida en partes por millón, teniendo una clara diferencia entre las MSN prístinas y MSN modificadas, estas últimos poseen valores muy próximos como se observan en la figura 25.

También, se determinó la cantidad de DOX liberada relativamente por cada nanomaterial, siendo la MSN prístino la de mayor cantidad con un 10%

aproximadamente. De acuerdo con el valor de la constante cinética, no se observa una diferencia significativa al comparar los sistemas en estudio.

6.1.3.2. PBS a pH 5,0

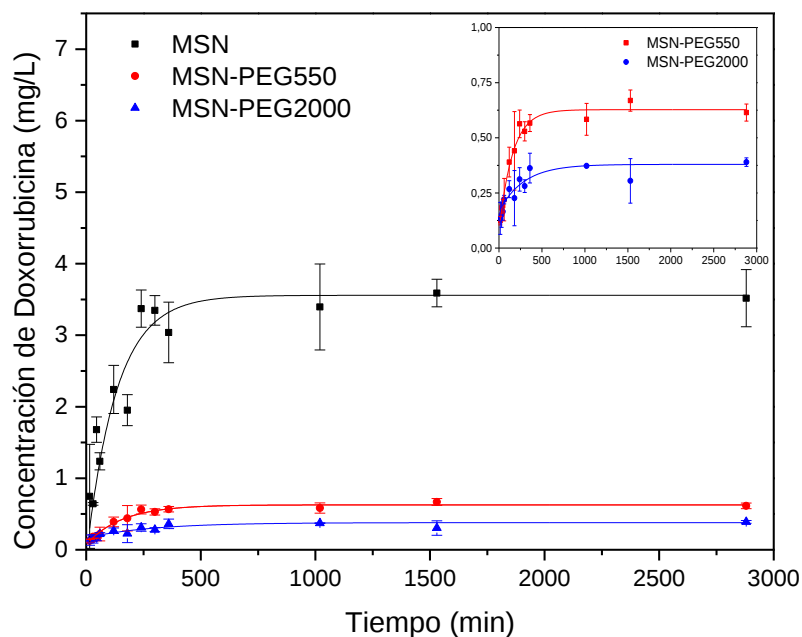


Figura 26. Cinética de liberación de DOX en PBS a pH 5.0 y 37°C para los materiales en base a MSN. Ampliación para los sistemas MSN-PEG550 y MSN-PEG2000

Tabla 6.1.3.2-1. Parámetros obtenidos de la cinética de liberación ajustada a cinética de primer orden a pH 5,0.

Muestra	Concentración de DOX a las 48 horas (ppm)	Liberación relativa a las 48 horas (%)	k (min ⁻¹)	R ²
MSN	3,5	14,7	0,0076	0,947
MSN-PEG550	0,6	8,2	0,0064	0,990
MSN-PEG2000	0,4	10,1	0,0035	0,954

La figura 26 muestra una liberación mayor de DOX desde MSN prístinos, que los PEGilados, donde el prístino tiene una concentración máxima de equilibrio de DOX liberada de 3,5 ppm. Se ve también un leve aumento en la liberación por las MSN-PEG550 que las MSN-PEG2000, difiriendo en, aproximadamente, 0,5 ppm. Esta cinética se ajustó de igual forma al modelo de liberación de primer orden usando la ecuación (7). Los valores asociados a ajuste de modelo se pueden apreciar en la tabla 6.1.3.2-1 luego de 48 horas del experimento, donde relativamente, las MSN prístinas liberaron aproximadamente un 15% de la DOX cargada, y, una menor cantidad se liberó por las MSN modificadas. La constante cinética del modelo de primer orden es similar entre las MSN y MSN-PEG550.

6.1.4. Ensayos de Biocompatibilidad

6.1.4.1. Ensayo de Hemólisis

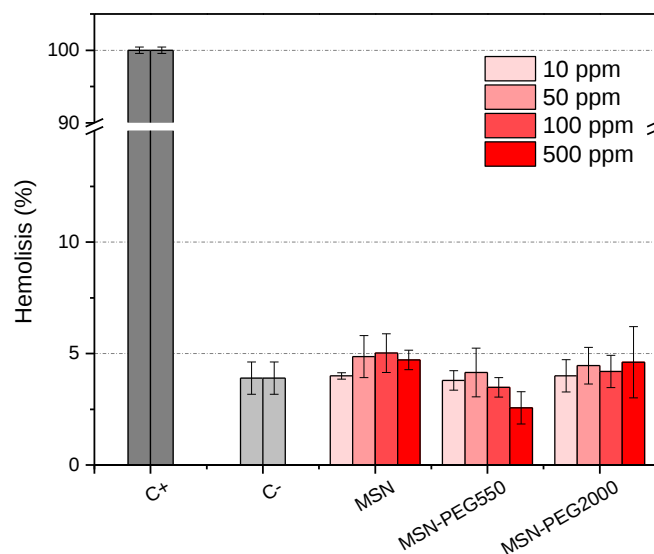


Figura 27. Gráfico del ensayo de hemólisis para los materiales en base a MSN. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C.

Tabla 6.1.4.1-1. Porcentaje de Hemólisis provocada por los sistemas de MSN a la concentración de 500 ppm.

Tipo	Hemólisis absoluta con 500 ppm (%)	Hemólisis con 500 ppm restando control (%)
Control +	100	-
Control -	3,4	0
MSN	4,7	0,82
MSN-PEG550	2,6	-1,33
MSN-PEG2000	4,6	0,72

La figura 27 muestra al control positivo con una gran cantidad de hemólisis a diferencia del control negativo. No se observa diferencia significativa en los valores de hemólisis producidos por las MSN y el control negativo de hemólisis,

tampoco se observa una correlación en la hemólisis y la concentración de MSN, ninguno de los nanomateriales incubados produce una hemólisis mayor al 5%.

6.1.4.2. Adsorción inespecífica de proteínas

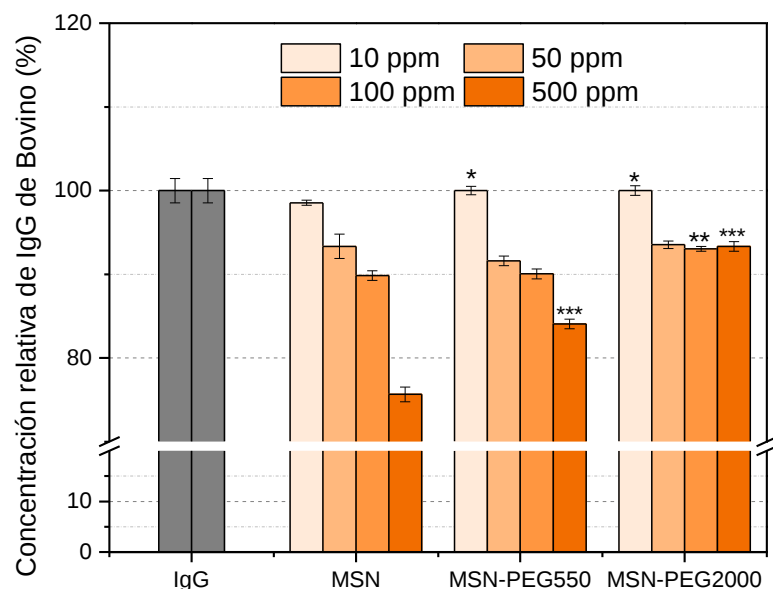


Figura 28. Concentración relativa de IgG de Bovino al contactar con los sistemas en base a MSN. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C. Prueba t-Student con MSN a la misma concentración: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Tabla 6.1.4.2-1. Concentración relativa de IgG de Bovino cuando se contacta con los sistemas de MSN.

Tipo	[IgG] con dispersión a 10 ppm (%)	[IgG] con dispersión a 50 ppm (%)	[IgG] con dispersión a 100 ppm (%)	[IgG] con dispersión a 500 ppm (%)
IgG Control	100	100	100	100
MSN	98,5	93,3	89,9	75,7
MSN-PEG550	100	91,6	90,0	84,0
MSN-PEG2000	100	93,5	93,0	93,3

Con relación a los estudios de interacción con proteínas se puede observar en la figura 28 una disminución de la concentración de IgG de bovino cuando hay algún tipo de MSN en la solución. Las diferencias significativas se observaron entre las

MSN modificadas con la MSN prístina a la misma concentración, donde se puede ver un aumento en la concentración de IgG en las MSN pegiladas, indicando que existe una menor interacción entre la IgG y las MSN modificadas, cuya interacción disminuye en mayor medida con las MSN-PEG2000.

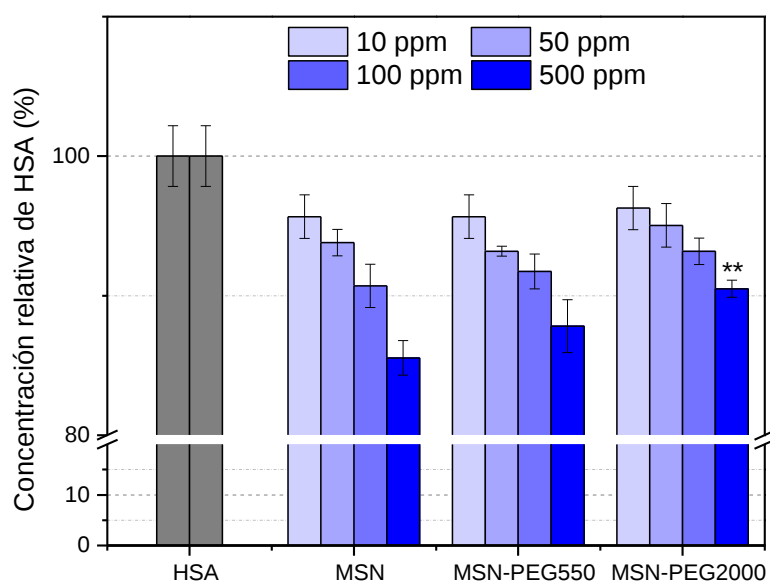


Figura 29. Concentración relativa de HSA cuando se contactar con los sistemas en base a MSN. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C.
Prueba t-Student con MSN prístina a la misma concentración: ** = $p < 0,01$

Tabla 6.1.4.2-2. Concentración relativa de HSA al entrar en contacto con los sistemas de MSN.

Tipo	[HSA] con dispersión a 10 ppm (%)	[HSA] con dispersión a 50 ppm (%)	[HSA] con dispersión a 100 ppm (%)	[HSA] con dispersión a 500 ppm (%)
HSA Control	100	100	100	100
MSN	95,7	93,8	90,7	85,5
MSN-PEG550	95,7	93,2	91,7	87,8
MSN-PEG2000	96,3	95,0	93,2	90,5

La figura 29 muestra una disminución de la concentración de HSA en solución cuando se añaden los sistemas de MSN. Se relaciona el aumento en la concentración de los sistemas con la disminución en la concentración.

La única diferencia significativa se observó entre la MSN-PEG2000 la cual adsorbe una menor cantidad de HSA que la MSN prístina ambos a 500 ppm como se aprecia mejor en la tabla 6.1.4.2-2.

6.1.4.3. Viabilidad Celular

6.1.4.3.1. Línea celular HEK293

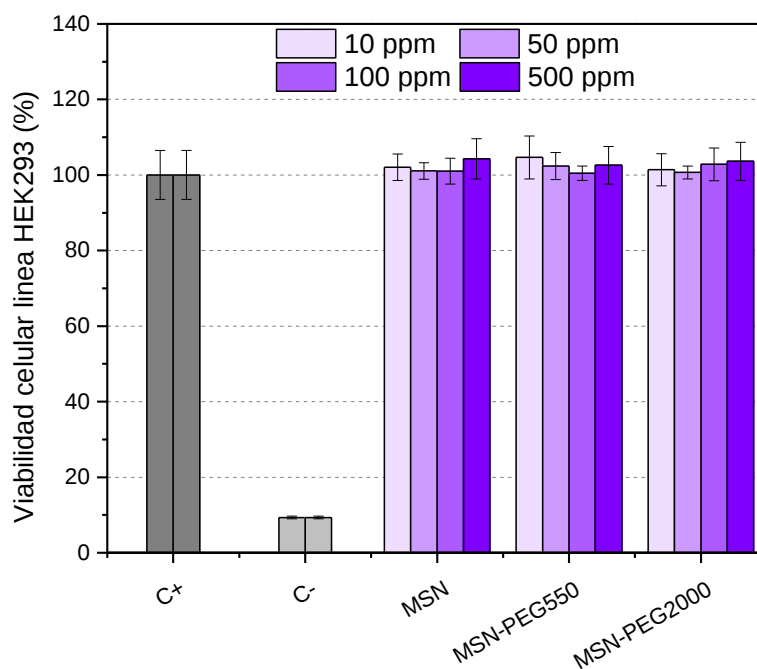


Figura 30. Viabilidad de células HEK293 incubadas con los nanomateriales en base a MSN. Condiciones: Medio para HEK293, 37°C por 48 horas de incubación.

La figura 30 muestra la viabilidad de las células HEK293 con las distintas concentraciones de MSN, MSN-PEG550 y MSN-PEG2000. El efecto de la viabilidad celular de los distintos sistemas fue comparado con los respectivos controles. Sin importar la concentración o el material incubado, no se observa una diferencia significativa de la viabilidad celular con respecto al control positivo de viabilidad.

6.1.4.3.2. Línea celular PC12

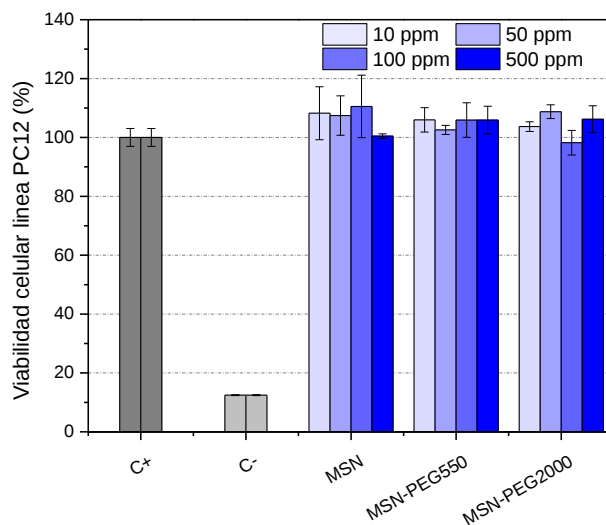


Figura 31. Viabilidad celular de PC12 incubadas con los nanomateriales en base a MSN. Condiciones: medio de cultivo PC12, 37°C por 48 horas de incubación.

La figura 31 muestra una viabilidad similar entre las células que corresponden al control positivo y las que fueron incubadas con MSN prístina y modificadas a las 4 distintas concentraciones.

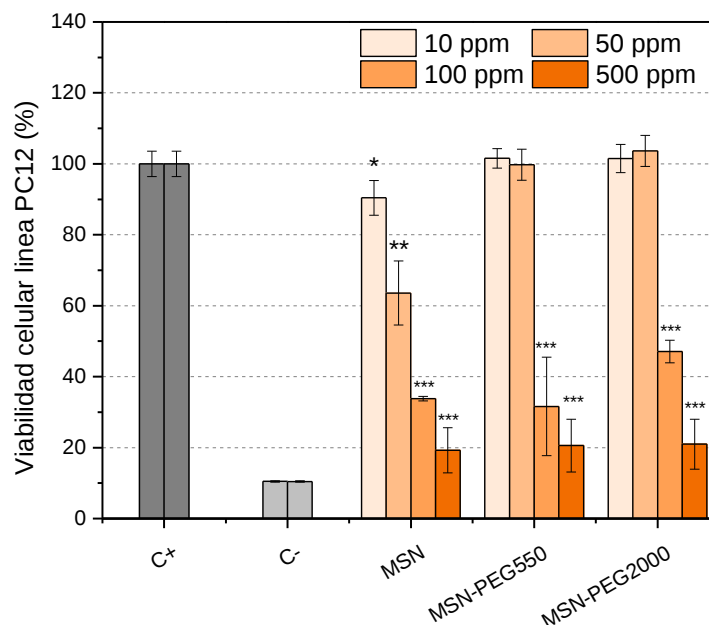


Figura 32. Viabilidad celular de PC12 incubados con los nanomateriales en base a MSN cargadas con DOX. los nanomateriales en base a MSN.
Condiciones: medio de cultivo PC12, 37°C por 48 horas de incubación.
Prueba de t-student con respecto al C⁺: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Tabla 6.1.4.3.2-1. Valores de viabilidad de MSN cargadas con DOX usando distintas concentraciones de dispersión.

Tipo	Viabilidad celular a 10 ppm (%)	Viabilidad celular a 50 ppm (%)	Viabilidad celular a 100 ppm (%)	Viabilidad celular a 500 ppm (%)
Control +	100	100	100	100
Control -	10,5	10,5	10,5	10,5
MSN	90,4	63,6	33,8	19,3
MSN-PEG550	101,5	99,8	31,6	20,6
MSN-PEG2000	101,4	103,6	47,1	30,0

En la figura 32 y tabla 6.1.4.3.2-1 se observa una clara relación entre la disminución de la viabilidad celular a medida que se aumenta la concentración del material cargado con DOX donde a la mayor concentración se observa una viabilidad similar entre sí, pero difieren estadísticamente del control negativo.

Es importante mencionar que la viabilidad obtenida a 50 ppm de MSN-PEG550 y MSN-PEG2000 no difieren estadísticamente del control positivo a diferencia de MSN prístina a la misma concentración.

6.2. Nanovarillas de alúmina (ANW)

6.2.1. Caracterización

6.2.1.1. Fisisorción de Nitrógeno

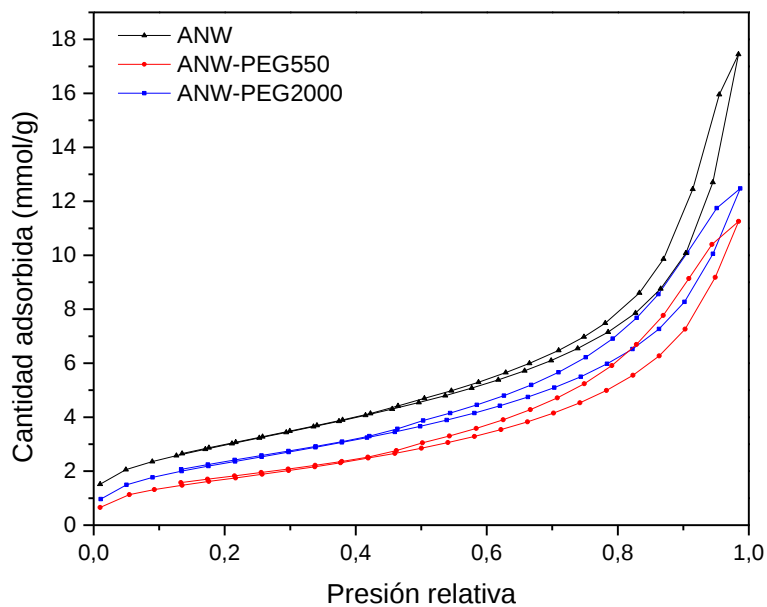


Figura 33. Adsorción-desorción de N₂ a -196°C por los sistemas preparados en base a ANW.

Tabla 6.2.1.1-1. Promedios de área específica y diámetro de poro obtenidos de la isoterma de adsorción-desorción de N₂ a -196°C de los nanomateriales en base a ANW.

Muestra	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	d _{Poros} (nm)
ANW	246	8,5
ANW-PEG550	145	9,3
ANW-PEG2000	195	8,3

En la figura 33 se observan las isotermas para los sistemas en nanovarillas de alúmina y nanovarillas modificadas. Las 3 isotermas son similares entre ellas, no obstante, difieren principalmente en la cantidad de N₂ adsorbida.

Se observa que el ANW prístino posee una mayor capacidad de adsorción de N₂ y, por consiguiente, se le atribuye una mayor área específica.

Además, el sistema ANW-PEG2000 posee una mayor capacidad de adsorción y mayor área específica con respecto al ANW-PEG550, esto principalmente se atribuye a la cantidad de sitios usados por el PEG, que de acuerdo a los análisis habría una mayor cantidad de PEG anclado en el sistema ANW-PEG550.

La isoterma posee una forma similar a la de Tipo IV, indicando sistemas mesoporosos, mientras que el ciclo de histéresis se asemeja a un tipo H1 lo que nos indica un sistema de poros cilíndricos en la estructura de estos nanomateriales (Zhang et al., 2016) ya que no se observa un plató a presiones altas. La tabla 6.2.1.1-1 muestra los valores de la superficie específica de cada material, habiendo disminuido de forma importante cuando se modifica con PEG550, también se pueden observar los valores de diámetro promedio obtenidos con esta técnica, reforzando la idea de que se sintetizaron ANW mesoporosos.

6.2.1.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

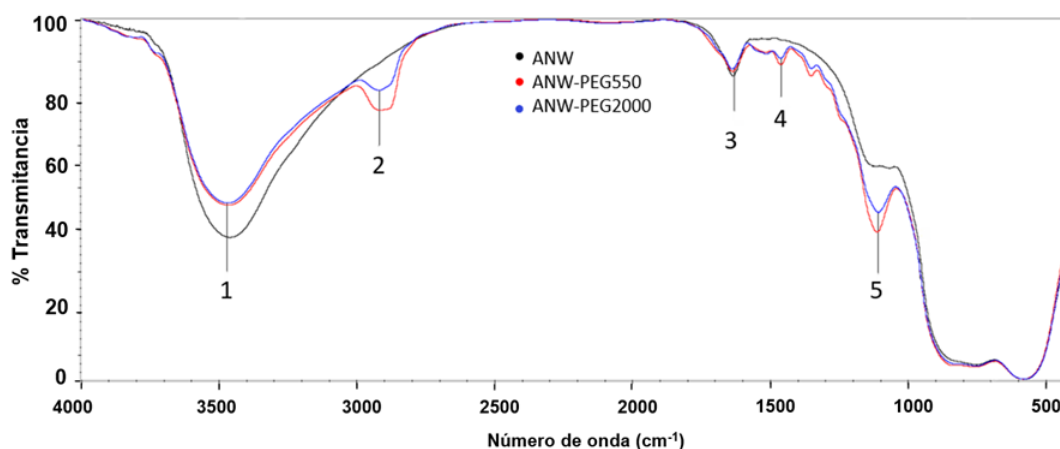


Figura 34. Espectro de FTIR para los materiales preparados en base a ANW.

Tabla 6.2.1.2-1. Grupos químicos de ANW asociados a bandas IR.

Número	Número de onda (cm ⁻¹)	Vibración asociada
1	3465	Estiramiento aluminos superficiales (O-H)
2	2910	Estiramiento C-H en PEG
3	1640	Tijera de moléculas de agua
4	1465	Flexión de N-H en carbamato de PEG-ISO
5	1115	Estiramiento C-O en PEG

Utilizando la técnica de IR se determinó los grupos superficiales de los materiales. En la figura 34 muestra los 3 de los distintos grupos de ANW, en estos resultados se puede observar en la tabla 6.2.1.2-1 que el ANW prístino posee una mayor cantidad de grupos aluminos, señalados en la banda 1, que cuando este ANW es modificado superficialmente. Además, a los 2900 cm⁻¹, señalando la banda 2, aparece una banda solo para los ANW modificados, esto corresponde a un

estiramiento C-H únicamente presente en el PEG indicando que este grupo químico está presente en la superficie. La banda 4 a los 1118 cm^{-1} aparece otro estiramiento en los ANW modificados correspondiente a C-O presente en PEG, reforzando la misma idea. También se observa una leve disminución en la transmitancia entre los $1500 - 1350\text{ cm}^{-1}$, en la banda 3, lo que se atribuye a la presencia de N-H, este grupo no estaba presente en PEG, ni en ISO, pero cuando se realiza el ataque nucleofílico por parte del PEG al ISO se forma el grupo Carbamato, esta banda es poco representativa ya que existe un grupo carbamato por cada cadena acoplada, a diferencia de los enlaces C-H o C-O que se repiten a lo largo del PEG. Por último, bajo los 900 cm^{-1} se observa una gran banda hasta los 500 cm^{-1} , aproximadamente, presente en los 3 sistemas ANW, esto se atribuye a las distintas vibraciones internas que pueden ocurrir en este nanomaterial.

6.2.1.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

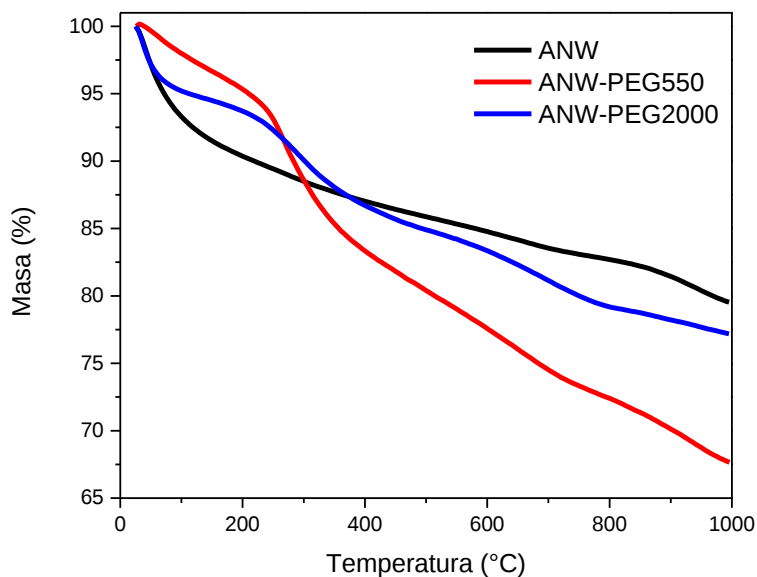


Figura 35. Termograma de ANW.

Condiciones: atmósfera de N₂ a velocidad de calentamiento de 10°C/min desde temperatura ambiente hasta los 1000°C.

Tabla 6.2.1.3-1. Masa residual, grafting y densidad de sitios inmovilizados en los nanomateriales en base a ANW.

Muestra	Masa Residual (%)	Grafting (%)	Densidad de sitios (μmol/m ²)
ANW	79,5	---	---
ANW-PEG550	67,7	11,8	1,02
ANW-PEG2000	77,2	2,3	0,06

La figura 35 muestra los termogramas para los sólidos donde el ANW prístino y en menor medida el ANW-PEG2000 poseen una pérdida de masa a menos de los 150°C asociada a agua adsorbida superficialmente en estos nanomateriales. Se observa que desde los 230°C comienza una pérdida de masa importante por parte de los ANW modificados, asociados a la pérdida de materia orgánica en la superficie, cerca de los 400°C se mantiene la pendiente hasta los 1000°C donde

fueron calculados los porcentajes de materia orgánica acoplada a la superficie de estos ANW, siendo 11,8% para el ANW-PEG550 y apenas 2,3% para el ANW-PEG2000 como se muestra en la tabla 6.2.1.3-1. Con estos resultados se puede apreciar una diferencia sustancial en la densidad de sitios usados por el PEG550 y el PEG2000, aproximadamente 17 veces más el primero que el segundo mencionado.

6.2.1.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

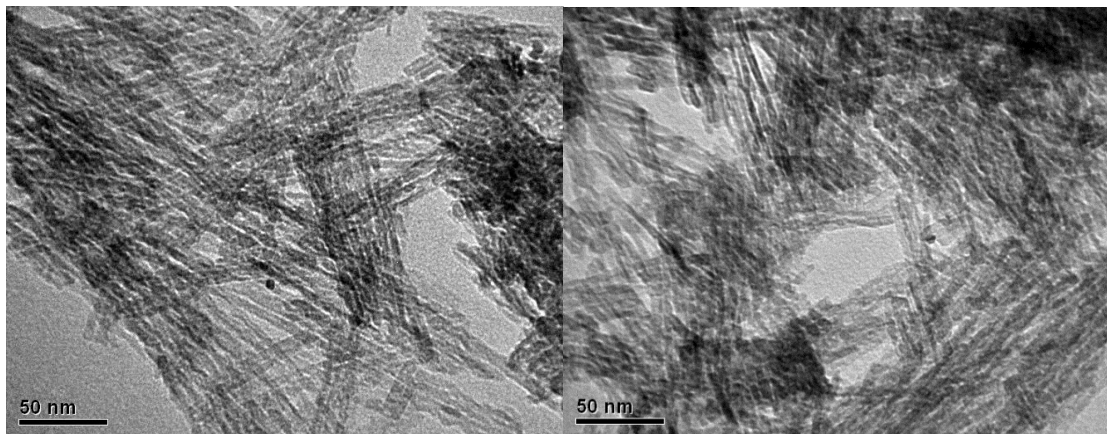


Figura 36. Micrografías de ANW con una barra de referencia de 50 nm.

En la figura 36, se observan 2 distintas micrografías de ANW, se puede apreciar un material con características filiformes, donde cada filamento posee una morfología uniforme. Con estas micrografías se puede inferir que se obtuvo un nanomaterial con características 1D en su crecimiento.

6.2.1.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

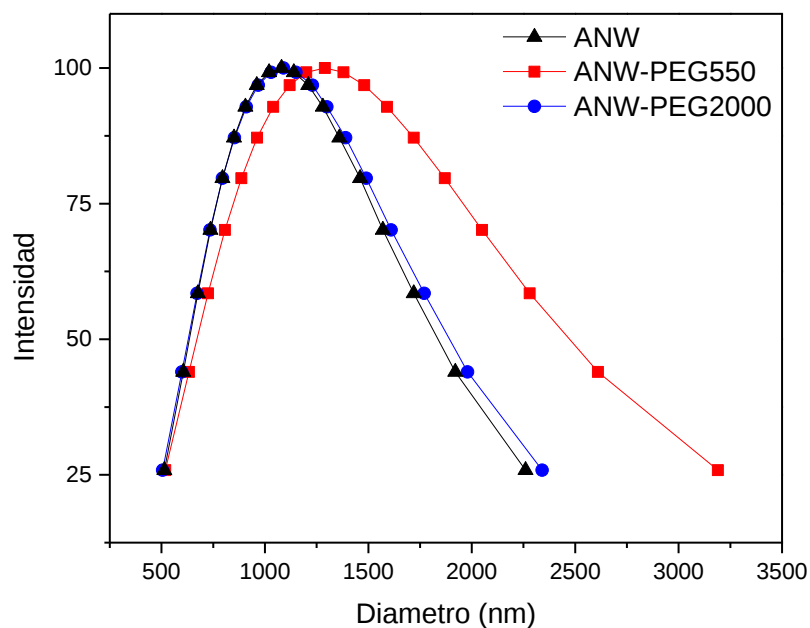


Figura 37. Distribución diámetro hidrodinámico de ANW en PBS a pH 7,4 a 250 ppm

Tabla 6.2.1.5-1. Valores de diámetro hidrodinámico de ANW en PBS 7,4.

Muestra	Diámetro a máxima intensidad (nm)
ANW	1080
ANW-PEG550	1290
ANW-PEG2000	1090

En la figura 37 se observa una distribución de diámetro hidrodinámico (D_H) mínimo similar, pero la distribución del D_H de ANW-PEG550 se destaca a medida que aumenta el diámetro. La tabla 6.2.1.5-1 muestra una similitud en el D_H más representativo observado, aumentando 200 nm en el ANW-PEG550. Las medidas de DLS solo se realizaron con fines cualitativos.

6.2.2. Isoterma de adsorción de doxorubicina

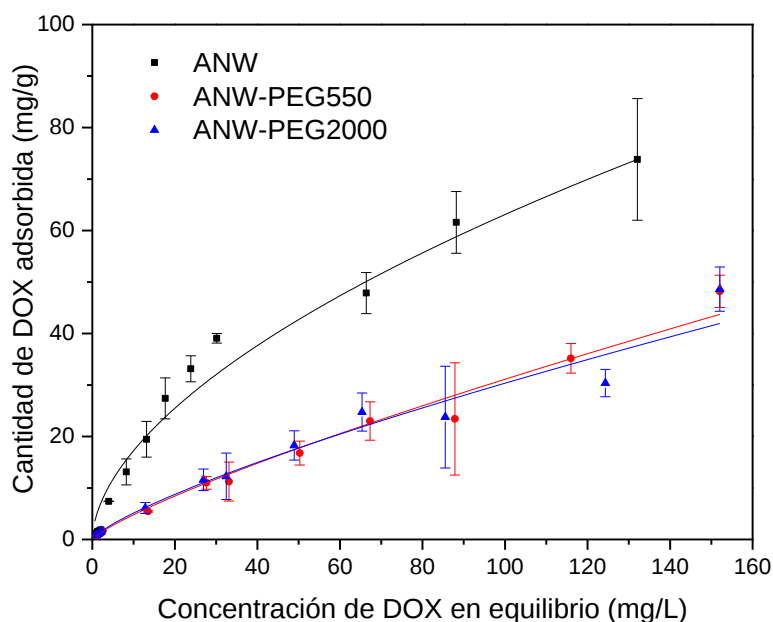


Figura 38. Isoterma de adsorción de DOX en ANW. Rango de concentraciones de DOX desde 5 ppm hasta 200 ppm, temperatura de 25°C.

En la figura 38 se observa una importante diferencia en la capacidad de adsorción de DOX entre el ANW prístino y modificados, estos últimos poseen una curva casi idéntica indicando que poseen, aproximadamente, la misma interacción en la adsorción de DOX. No se logró saturar los nanomateriales con el fármaco. La data observada se ajustó a curvas al modelo de Freundlich que sería la más apropiada para describir este tipo de comportamiento pues indica una capacidad teórica infinita de adsorción, cuya ecuación es la siguiente:

$$Q_e = K_F * C_e^{\frac{1}{n}} \quad (8)$$

Donde:

Q_e: Cantidad de DOX adsorbida por unidad de ANW (mg/g)

C_e: Concentración de DOX en equilibrio (mg/L)

K_F: Capacidad máxima de adsorción de DOX por concentración de DOX [(mg/g)(mg/L)^{1/n}].

n: Constante dependiente de la temperatura, adsorbato y solvente.

Tabla 6.2.2-1. Datos obtenidos ajustando las isotermas de adsorción al modelo de Freundlich

Muestra	n	K_F	R²
ANW	1,57	3,60	0,963
ANW-PEG550	1,16	0,575	0,987
ANW-PEG2000	1,30	0,877	0,971

Los valores de la tabla muestran un coeficiente de correlación cercano a 1, en donde se ve que el ANW prístino tiene una constante de afinidad mucho mayor a la DOX en etanol a diferencia de los ANW modificados, mostrado por el valor de K_F.

6.2.3. Liberación de doxorubicina

6.2.3.1. PBS a pH 7,4

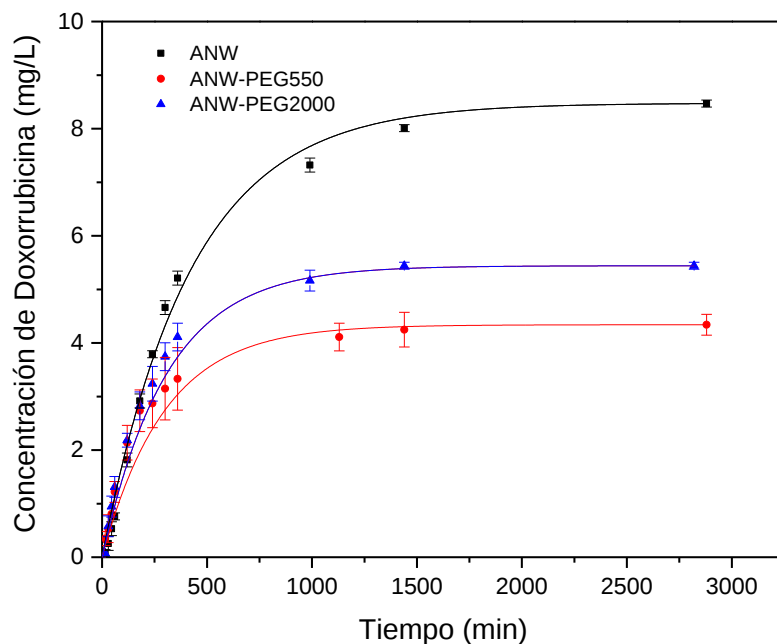


Figura 39. Cinética de liberación de DOX en PBS a pH 7,4 y 37°C para los materiales en base a ANW.

En la figura 39 se observa la liberación de DOX desde los ANW, donde el nanomaterial prístino libera una cantidad cercana al doble de ANW-PEG550 que libera aproximadamente 4 mg/L en equilibrio. Se observa que, aproximadamente, a los 1000 minutos se comienza a alcanzar el equilibrio en la liberación. Se ajustó esta cinética al modelo de liberación de primer orden (ec. 6) y se muestra el resumen de los valores obtenidos en la tabla 6.2.3.1-1 donde se observa que la liberación relativa muestra la tendencia $ANW \sim ANWP2 > ANWP1$.

Tabla 6.2.3.1-1. Concentración de DOX liberada y linealidad del ajuste al modelo de liberación de primer orden.

Muestra	Concentración de DOX 48 horas (ppm)	Liberación relativa a 48 horas (%)	k (min ⁻¹)	R ²
ANW	8,46	37,9	0,002	0,992
ANW-PEG550	4,34	28,5	0,005	0,992
ANW-PEG2000	5,44	36,6	0,004	0,997

También, en esta tabla se ve el coeficiente de correlación de los valores obtenidos con el ajuste al modelo de liberación de primer orden, obteniendo un R² muy cercano a 1. Se debe tener en cuenta que la constante cinética k se ve alterada cuando este ANW se modifica, aumentando, lo que indica que se libera más rápido que como lo hace del ANW prístino.

6.2.3.2. PBS a pH 5,0

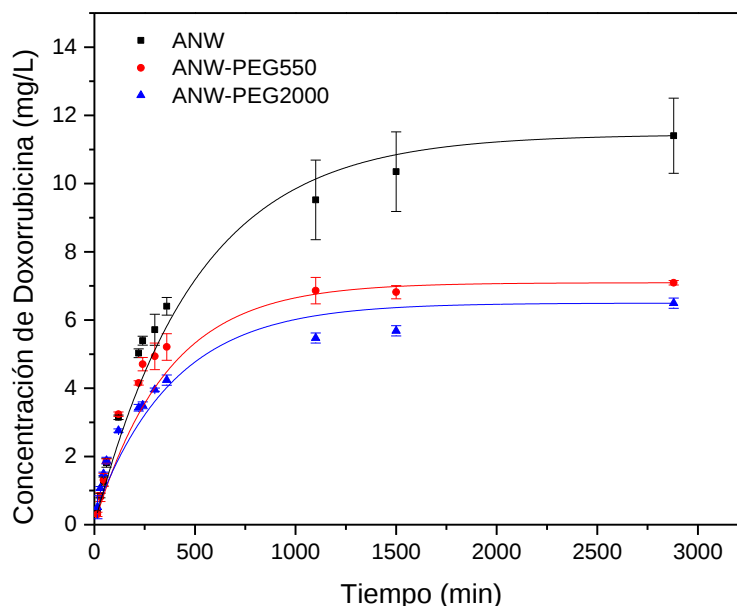


Figura 40. Cinética de liberación de DOX en PBS a pH 5.0 y 37°C para los materiales en base a ANW.

De acuerdo con el análisis de liberación en la figura 39 se observa que los ANW prístino son los materiales que liberan mayor cantidad de DOX. Sin embargo, a diferencia de la liberación a pH 7,4; el sistema ANW-PEG550 libera mayor cantidad de DOX en comparación con ANW-PEG2000. En general se observa un aumento en la liberación de DOX a pH 5,0 que a pH 7,4. Estas cinéticas se volvieron a ajustar al modelo de primer orden de liberación mencionado anteriormente (ec. 6).

Tabla 6.2.3.2-1. Concentración de DOX liberada y ajuste al modelo de liberación de primer orden.

Muestra	Concentración de DOX 48 horas (ppm)	Liberación relativa a 48 horas (%)	k (min⁻¹)	R²
ANW	11,40	52,1	0,003	0,989
ANW-PEG550	7,09	46,6	0,005	0,993
ANW-PEG2000	6,49	43,9	0,004	0,964

La tabla 6.2.3.2-1 muestra que el ajuste al modelo de primer orden decrece levemente a este pH, pero mantiene la tendencia de las constantes cinéticas. Indicando que es menor en el ANW prístino que cuando es modificado, siendo similar en ambos sistemas modificados con PEG en su superficie. Es importante remarcar que el ANW prístino supera el 50% de la liberación total de su carga de DOX, de una forma similar, cuando el ANW es modificado se supera el 40% de la liberación de DOX cargado en cada ANW.

6.2.4. Ensayos de Biocompatibilidad

6.2.4.1. Ensayo de Hemólisis

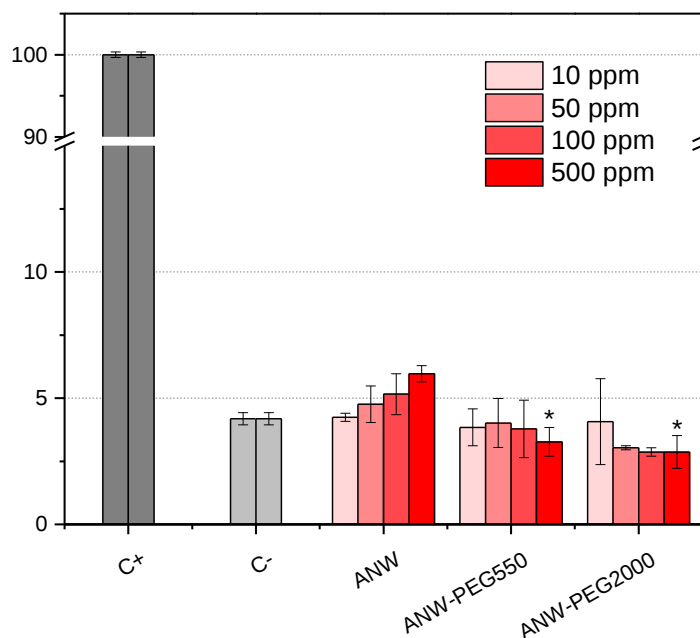


Figura 41. Gráfico del ensayo de hemólisis para los materiales en base a ANW. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C. Prueba t-Student con respecto al ANW prístino a la misma concentración: * = $p < 0,05$

Tabla 6.2.4.1-1. Valores de hemólisis % generada por ANW a 500 ppm

Muestra	Hemólisis con 500 ppm (%)	Hemólisis con 500 ppm restando control - (%)
Control +	100	-
Control -	4,19	0
ANW	5,96	1,77
ANW-PEG550	3,27	-0,92
ANW-PEG2000	2,87	-1,32

Los resultados de los estudios de hemólisis muestran una tendencia leve de este proceso para ANW prístinas al aumentar su concentración. Esta hemólisis a 500 ppm concentraciones disminuye cuando los materiales se modifican superficialmente con PEG. En ninguno de los casos se observa un grado de hemólisis significativo.

No se observan diferencias significativas de las hemólisis producidas entre las ANW modificadas.

6.2.4.2. Adsorción inespecífica de proteínas

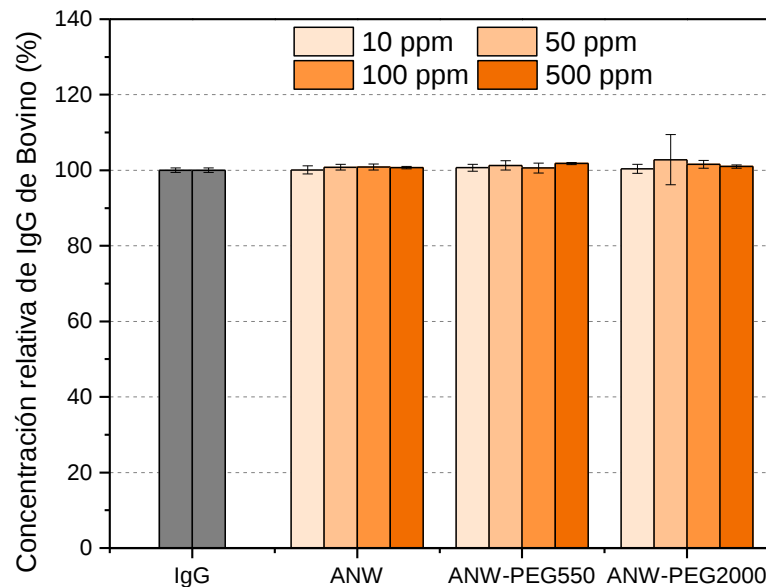


Figura 42. Concentración relativa de IgG de Bovino al contactar con los sistemas en base a ANW. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C

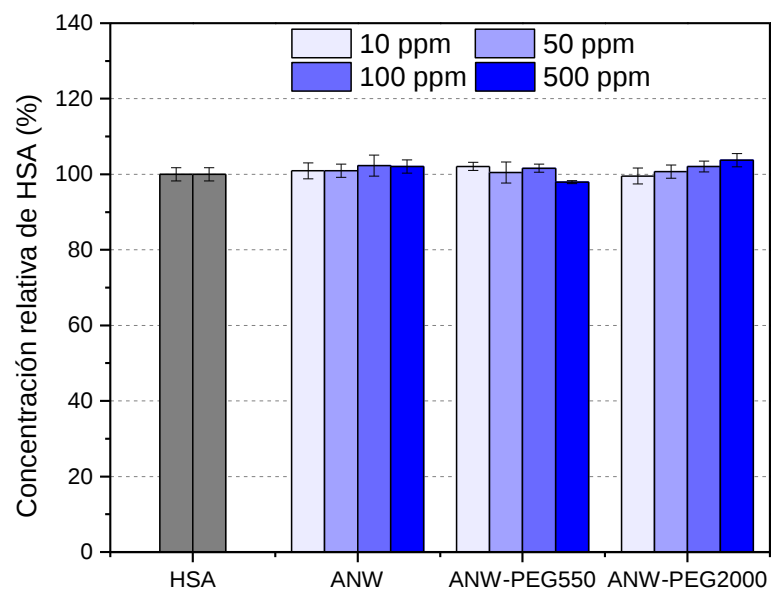


Figura 43. Concentración relativa de HSA cuando se contactaron con los sistemas en base a ANW. Rango de dispersiones de 10 – 500 ppm a 37°C

Las figuras 42 y 43 muestra la nula diferencia en la concentración relativa de los modelos de proteína del suero luego medirlos con y sin ANW indicando una interacción despreciable entre estas proteínas y estos nanomateriales.

6.2.4.3. Viabilidad Celular

6.2.4.3.1. Línea celular HEK293

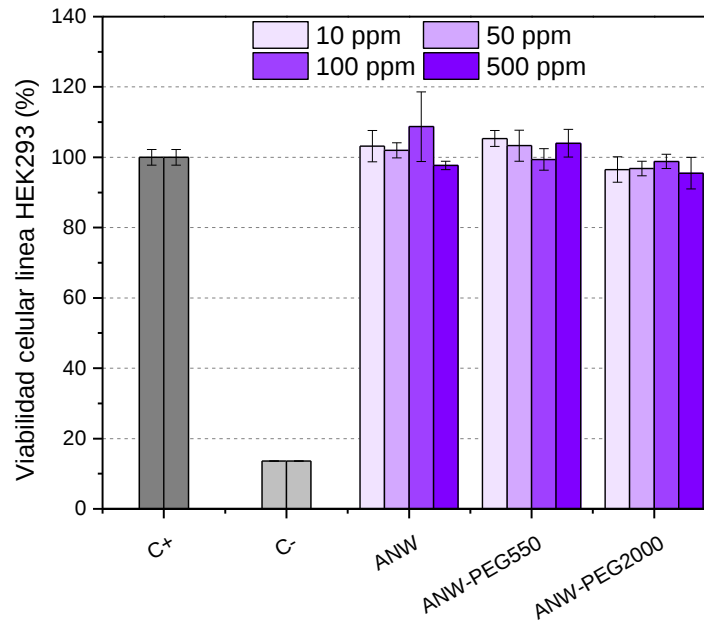


Figura 44. Viabilidad de células HEK293 incubadas con los nanomateriales en base a ANW. Condiciones: Medio para HEK293, 37°C por 48 horas

La figura 44 muestra valores de citotoxicidad de los ANW no poseen diferencias significativas con el control de viabilidad celular en HEK293.

6.2.4.3.2. Línea celular PC12

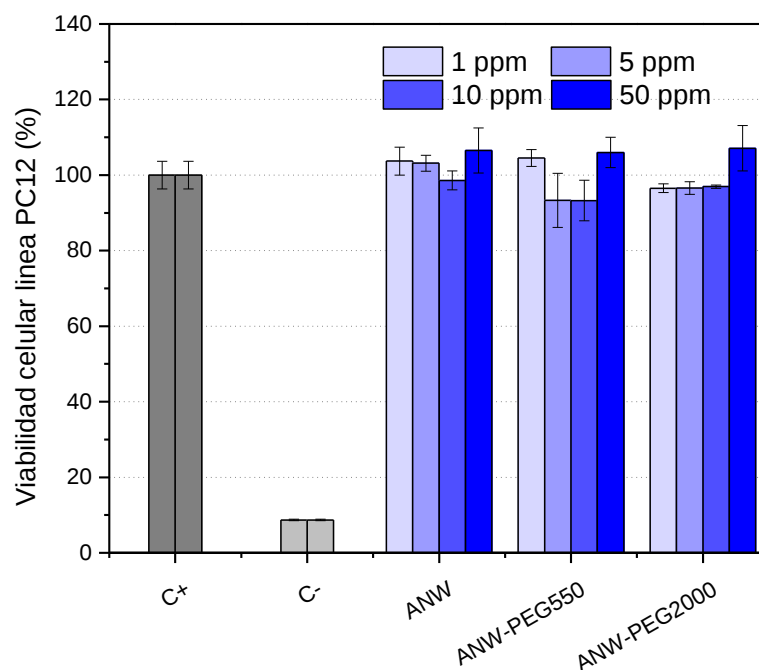


Figura 45. Viabilidad celular de PC12 incubadas con los nanomateriales en base a ANW. Condiciones: medio de cultivo PC12, 37°C y 48 horas de incubación.

La figura 45 muestra la viabilidad de las células PC12 incubadas con los distintos ANW a distintas concentraciones, las cuales no poseen una diferencia significativa de esta viabilidad con respecto al control positivo.

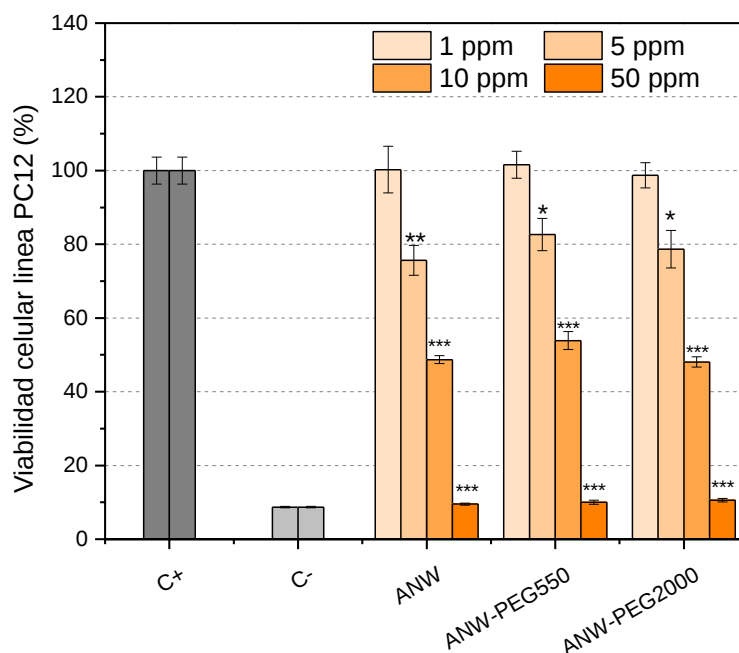


Figura 46 Viabilidad celular de PC12 incubados con los nanomateriales en base a ANW cargadas con DOX.

Condiciones: medio de cultivo PC12, 37°C por 48 horas de incubación.

Prueba t-Student: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

La viabilidad celular de las PC12 cuando son incubadas con ANW cargadas con DOX disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración de estos nanomateriales cargados como se muestra en la figura 46, llegando a una viabilidad estadísticamente similar a la del control negativo cuando se administran 50 ppm de estos ANW cargados con DOX. Además, se ve una similitud en la viabilidad celular usando estos los 3 nanomateriales a la misma concentración. La prueba t-student permite detectar los resultados con una significancia estadística respecto del control positivo de viabilidad desde la concentración equivalente a 5 ppm de ANW.

7. DISCUSIÓN

A continuación, en base a los resultados presentados, se discutirán por partes, siguiendo el orden de presentación de los resultados y luego de cada tema se hará una discusión comparando los nanomateriales. En el caso de la caracterización de los nanomateriales, se respalda la correcta preparación de los nanomateriales MSN y ANW prístinos y los modificados superficialmente con PEG de 2 distintos pesos moleculares.

Para los sistemas en base a MSN se observa una tendencia general en relación con los resultados de adsorción-desorción de N_2 a $-196^\circ C$, TGA y espectroscopía FT-IR. De ellos, se puede afirmar que MSN prístina fue modificada exitosamente con PEG de peso molecular de 550 Da y 2000 Da de forma homogénea tal como se observó por la densidad de sitios inmovilizados (ver tabla 6.1.1.3-1). Sin embargo, la caracterización por DLS mostró una diferencia importante en el DH para estos nanomateriales, la cual sigue la tendencia $MSN-PEG550 > MSN-PEG2000 \sim MSN$ prístina.

Lo anterior se atribuye a la naturaleza de las cadenas de polímero PEG550-ISO en la superficie en comparación con las cadenas de PEG2000-ISO. Al ser un polímero lineal, el largo de las cadenas influencia de forma significativa la conformación de estas. En el caso de PEG2000-ISO, las ramas del polímero pueden adquirir una conformación más compacta al ordenarse tipo *mushroom* tal

como se muestra en el esquema de la Figura 47. Sin embargo, en el caso de PEG550-ISO, al ser un polímero que posee cadenas más cortas, la conformación de estas podrían tender a adquirir una forma del tipo *brush*. Estas conformaciones podrían ser las responsables de generar un efecto que distorsione los resultados que se observan mediante DLS estimado un valor de D_H significativamente superior para el sistema MSN-PEG550 en comparación con el MSN-PEG2000.

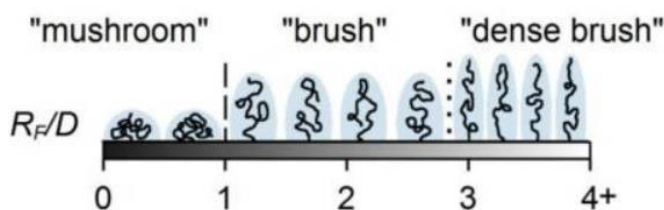


Figura 47. Densidad de PEG en la superficie de un nanomaterial, se observan 3 estados conformacionales.
modificado de (Suk et al., 2016)

Una tendencia diferente se observó en el caso la familia de nanomateriales en base a ANW. Si bien se logró la inmovilización de los nanomateriales, tal como se comprobó por Isotermas de adsorción de N_2 a -196°C , FTIR y TGA, la inmovilización del PEG550-ISO fue diferente a la que se observó para el caso de PEG2000-ISO.

De acuerdo con los resultados de la densidad de sitios inmovilizados, obtenida a partir de los resultados de caracterización, se observó que ANW-PEG550 posee mayor cantidad de sitios modificado que el sistema ANW-PEG2000. Lo anterior se puede atribuir a los siguientes fenómenos:

(1) difusión de las cadenas de PEG-ISO es función del peso molecular, siendo más lenta para PEG2000-ISO en comparación con PEG550-ISO

(2) Impedimento estérico que generan las cadenas que se inmovilizan primero en la superficie de los nanomateriales mismas al anclarse los sitios M-OH (M: Si o Al) que se incrementa a medida que aumenta el peso molecular del polímero.

Lo anterior se podría correlacionar también con la caracterización por DLS que muestra la tendencia para D_H de ANW-PEG550 > ANW-PEG2000 ~ ANW prístino. Lo anterior es una consecuencia del largo de las cadenas de polímero en la superficie del material y de la arquitectura 1D de la nanovarillas de ANW que podrían promover, en el caso del sistema ANW-PEG2000, que las ramas de PEG2000-ISO se ovillen alrededor de la superficie adquiriendo una conformación tipo *mushroom* (ver Fig. 47).

Una vez discutidas las caracterizaciones fisicoquímicas de los nanomateriales de las familias en base a MSN y ANW, el próximo tópico es comparar la interacción con el fármaco modelo DOX y la biocompatibilidad de los nanomateriales estudiados.

La encapsulación de DOX en los materiales en base a MSN es baja alcanzando valores del orden de 2 – 10 mg/g. De acuerdo con la estructura de la DOX (ver figura 9) las interacciones que podría presentar con MSN prístina serán fundamentalmente del tipo enlace hidrógeno y del tipo electroestático pues este

tipo de materiales tienen puntos isoeléctricos a $\text{pH} \sim 2$ (Metin et al., 2011) – 3 cargado negativamente a $\text{pH} = 7.4$ donde se realizó la adsorción.

Para MSN prístina se logró una adsorción aproximada de 9 mg/g con la MSN prístina, mientras que los sistemas MSN-PEG550 y MSN-PEG2000 la adsorción es tan sólo de 4 mg/g con PEG550 y cercana a 2 mg/g con PEG2000. Es de esperarse que estos materiales al poseer una elevada área superficial (ver tabla 6.1.1.1-1) fuesen capaces de encapsular una mayor cantidad de fármaco. Sin embargo, al poseer una componente orgánica altamente hidrofóbica (BTEE como agente entrecruzador) en la cavidad del poro de la MSN, la afinidad del fármaco es mínima por los poros del *carrier*.

Es por esta razón que la adsorción de DOX en MSN prístina sea preferentemente en la superficie externa de la nanoesfera. En línea con lo anterior, en el caso de los materiales de MSN pegilados, al modificar los grupos superficial Si-OH por anclaje de PEG550-ISO y PEG2000-ISO se observa una disminución de la capacidad de encapsulación. Para ambos, se observa la tendencia en la encapsulación tal que la capacidad de carga de MSN-PEG550 es el doble de que se observa en el caso de MSN-PEG2000 (ver tabla 6.2.1-1). Lo anterior va en línea con los resultados de caracterización que se determinaron para estos materiales. De acuerdo con la caracterización por TGA e isothermas de adsorción – desorción de N_2 a -196°C , donde se logró evidenciar que ambos nanomateriales pegilados poseen valores similares de densidad de sitios

inmovilizados, pero la conformación de las cadenas cambia significativamente para MSN-PEG550 comparado con MSN-PEG2000. Las cadenas de PEG (-CH₂-CH₂-O-) son capaces de interaccionar mediante la formación de enlaces hidrógeno con los grupos -OH y C=O de la DOX. En el caso del sistema MSN-PEG550 se observa una conformación tipo *brushes* de las cadenas de PEG permite que una mayor cantidad de las ramas del polímero estén disponibles para interaccionar con el fármaco. Sin embargo, en el caso de MSN-PEG2000 la conformación *mushroom* disminuye la disponibilidad de los grupos funcionales para interaccionar con la DOX disuelta en el medio por ovillamiento de las cadenas.

Esto se correlaciona de forma directa con los valores de las K_L que se obtuvieron cuando se aplicó el modelo Langmuir para las isotermas de adsorción de DOX, donde se observa que la afinidad de la DOX por MSN-PEG550 (10,5 L/mg) es mucho mayor que la que presenta con MSN-PEG2000 (4,9 L/mg).

En relación con la liberación, todos los sistemas a pH = 7,4 y 5,0 mostraron perfiles similares de liberación permitiendo un ajuste a modelos de primer orden. El ajuste de cinética al modelo de primer orden indica un modelo de liberación Fickiano ("5 - Mathematical models of drug release," 2015). Sin embargo, se observan comportamientos diferentes dependiendo del pH al que se simula el proceso. A pH = 7,4 la cantidad liberada a las 48 h muestra un perfil similar al de la encapsulación donde en orden creciente de liberación MSN prístina > MSN-

PEG2000 > MSN-PEG550. Esto está en línea con los resultados de encapsulación los cuales se hicieron al mismo pH de la liberación. En todos se libera menos de la cantidad adsorbida, lo que va en directa relación con que el material adsorbe; si bien estos ellos adsorben baja cantidad de fármaco, lo hace con mucha afinidad a ese pH. En términos de la rapidez del proceso, todos los sistemas muestran constantes de velocidad que son prácticamente del mismo orden de magnitud ($0.006 - 0.009 \text{ min}^{-1}$). Sin embargo, a pH 5,0 (que simula el microambiente tumoral) comparado a pH = 7,4, a pesar de que muestran un perfil cinético que se ajusta a una liberación de primer orden, se observa un cambio en la cantidad liberada de DOX para los sistemas de MSN pegilados. En el caso de MSN prístino se observa un leve incremento de la liberación, pero en el caso MSN-PEG550 y MSN-PEG2000 la cantidad liberada aumenta casi al triple. Lo anterior se debe fundamentalmente al cambio en la concentración de H_3O^+ que debería ser la responsable de modificar las interacciones del fármaco con el nanotransportador y las interacciones intercatenares de las ramas de PEG para el caso de los sistemas MSN pegilados. Lo anterior se puede comprobar en las constantes de rapidez, donde se observa que el sistema MSN-PEG550 muestra valores de k equivalentes a ambos pH (~ 0.006) mientras que el sistema MSN-PEG2000 muestra una disminución de la k desde $0,009 \text{ min}^{-1}$ a pH =7,4 hasta $0,003 \text{ min}^{-1}$ a pH = 5,0. Se especula que el sistema MSN-PEG550 libera una mayor cantidad de fármaco por efecto de la protonación de las cadenas de PEG550-ISO, pero que esto no perturba la velocidad del proceso. No obstante,

para el sistema MSN-PEG2000 el cambio del microambiente podría generar que se libere más DOX y que además las cadenas de polímero cambien su conformación brindando un camino más tortuoso al recorrido del fármaco, en su migración hacia el seno del líquido, ralentizando el proceso.

En cuanto a la biocompatibilidad de los nanomateriales basados en MSN, los ensayos de hemólisis realizados no mostraron una hemólisis significativa lo que es distinto con los resultados reportados por (Gaoxin et al., 2017; Nepal et al., 2023; Yildirim et al., 2013; Zhao et al., 2011). Esto no va directamente en contra de lo anteriormente reportado ya que la síntesis de estas MSN se realiza con un agente de entrecruzamiento, lo cual además de modificar la estructura interna de las MSN, también influirá en como interacciona con los eritrocitos, en este caso, sin mostrar un grado de hemólisis significativo.

Los ensayos de adsorción inespecífica de proteínas muestran para los sistemas en base a MSN una interacción con las proteínas modelo que aumenta con la cantidad de nanomaterial dispersado.

Esta tendencia es notoriamente visible cuando se ensayó IgG de bovino. Sin embargo, la PEGilación superficial de las MSN mostró una disminución de esta adsorción en los diferentes rangos de dispersiones estudiados. Estas interacciones no son deseable con albúmina y mucho menos con IgG debido a la cadena de reacciones y procesos que podrían realizarse generados por este anticuerpo ya que se podría encontrar el material opsonizado por estos IgG u

otros anticuerpos, también podrían neutralizarse y aglomerarse debido a este reconocimiento, lo que generaría una incapacidad de transportar el fármaco y aparte pudiendo generar reacciones adversas con consecuencias importantes (Diebolder et al., 2014). Otro resultado indeseable de las interacciones de los nanotransportadores con IgG sería favorecer el reconocimiento de estos por parte de las células fagocíticas que poseen receptores para la fracción constante del anticuerpo, facilitando la fagocitosis del material (Magenau et al., 2011; Rosales & Uribe-Querol, 2017) y de ser así, quedaría imposibilitado de distribuir el fármaco de forma efectiva. Junto con esto, la interacción generada también podría desencadenar una serie de reacciones del sistema del complemento, específicamente la vía clásica o activada por anticuerpo, esto se resume en una serie de mecanismos proteicos que aumentan un proceso inflamatorio provocado por el agente externo, permite una opsonización más eficaz y para el caso de células invasoras se genera la lisis en condiciones fisiológicas (Dunkelberger & Song, 2010).

Esta lisis no es posible en los nanomateriales por lo que la activación del sistema del complemento únicamente activaría un proceso inflamatorio lo cual tampoco es deseado.

Los resultados obtenidos en la adsorción de albúmina (tabla 6.1.4.2-2) permiten inferir que, como solo el cambio es significativo en sistema MSN-PEG2000, debido al mayor tamaño del polímero y la configuración *mushroom* de sus

cadenas en la superficie de la nanoesfera, se impide de forma más efectiva la interacción existente entre la albumina con la superficie de MSN. Diferente es el caso del sistema MSN-PEG550 que muestra resultados similares al de la MSN prístina lo que se permite sugerir que el largo de la cadena de los PEG550-ISO no brinda un impedimento estérico adecuado para la adsorción de la proteína en la superficie el nanotransportador.

El último ensayo es la viabilidad celular de cultivos de HEK293 y PC12 no produce una disminución en la viabilidad celular para las MSN prístinos y modificados, esto se contrasta fuertemente cuando los materiales se cargan con DOX. La tendencia a la disminución de la viabilidad celular se relaciona con el aumento de la concentración de los nanomateriales llegando a valores de viabilidad cercanos al control negativo, a pesar de la baja cantidad de DOX liberada, sobre todo con las MSN modificadas, esto explicaría la viabilidad obtenida al incubar las MSN modificadas en 50 ppm de concentración en cada pocillo, donde por la cinética de liberación de DOX se espera:

$$[DOX] = Q_m * L_R * [Sólido_{DOX}] * M_{DOX \cdot HCl} = 4,0 \frac{mg \text{ DOX}}{g \text{ sólido}} * 10\% * 50 \frac{g \text{ sólido}}{1000 L} * \frac{1 mmol}{580 mg} = 3,4 \times 10^{-3} \mu M \text{ DOX} \cdot HCl$$

En donde:

- Q_m : Carga de DOX por cantidad de solido (mg DOX / g nanotransportador)
- L_R : Liberación relativa de DOX desde cada sólido (%)
- $M_{DOX \cdot HCl}$: Masa molar de la formulación de DOX usada (g/mol)

- [Sólido_{DOX}]: Concentración de la dispersión de nanomaterial cargado con DOX (mg/L)

Suponiendo que se libera de forma óptima en el medio de cultivo, se obtiene una cota máxima de $3,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol L}^{-1}$ de DOX·HCl en solución la cual es incapaz de generar una disminución significativa de viabilidad con respecto al control positivo. Esta concentración está muy por debajo a lo necesario para llegar a un IC₅₀ para la línea celular PC12 según lo reportado por el grupo de Y. Shokoohinia (Shokoohinia et al., 2014).

Los mecanismos que podrían explicar pueden ser al menos 2, pero se necesitan más experimentos para corroborarlo. La primera es que la DOX adsorbida en la superficie de los materiales puede desprenderse por difusión al encontrarse con las células y así pudiendo ingresar libremente. La segunda vía de acción sería la internalización directa de una cantidad de nanomateriales por endocitosis (Manzanares & Ceña, 2020) donde liberaría el fármaco directamente dentro de la célula, esto se podría observar por microscopia confocal (Jonkman et al., 2020).

Por otra parte, los ANW poseen una capacidad de encapsulación mayor, en comparación con los sistemas estudiados para la familia en base a MSN, y que sólo se ve limitada por la capacidad de disolver DOX en etanol. En ellos se determinó que el comportamiento en la isoterma de adsorción se ajustó a un modelo del tipo Freundlich. Es importante notar que la capacidad de adsorción

de DOX es muy similar entre los ANW-PEG550 y ANW-PEG2000 lo que permite sugerir que la adsorción del fármaco se da preferentemente en los sitios disponibles en el ANW (poros internos del material) más que en la superficie modificada con PEG. Lo anterior se contrasta de manera directa con los valores obtenidos para las K_F que muestran valores que siguen la misma tendencia que los máximos que se observan en la Figura 38.

En cuanto a la liberación de DOX desde ANW, todos los sistemas se ajustaron al modelo de primer orden (Ecuación 7). Se puede observar que, tras 48 horas de experimento, se libera a pH 7,4, aproximadamente un 28% de DOX desde los ANW-PEG550 y un valor aproximado de 38% desde el ANW prístino en relación con la carga total de los materiales. Respecto de la liberación a pH 5,0 se observa que la liberación del fármaco se ajusta a una cinética de primero orden con valores de k de velocidad del mismo orden a las observadas a pH 7,4. No obstante, la cantidad liberada aumenta, llegando a liberar el 52% de DOX previamente cargado desde el ANW prístino y alrededor de un 44% desde los materiales ANW-PEG550 y ANW-PEG2000, respectivamente. Estos resultados deben ser considerados como óptimos ya que se debe tener en cuenta que el microambiente tumoral se reporta un pH 5,6 como el valor más ácido, y comúnmente, fluctúa en un rango entre 6,4 y 7,0 (Boedtkjer & Pedersen, 2020).

El cambio en la liberación en un ambiente ácido se debe a que el ANW posee un punto isoeléctrico en medio acuoso (PIE) a pH = 8.0 (Reyes Bahena et al., 2007),

indicando la presencia de cargas positivas en las proximidades de la superficie de Al_2O_3 a $\text{pH} = 5.0$ mientras que DOX al mismo valor de pH predomina en equilibrio acuoso en su forma catiónica (Fülöp et al., 2013) generando así una repulsión electroestática con la superficie del óxido y siendo capaz de liberarse en mayor cantidad. Por otra parte, a $\text{pH} 7,4$, es posible la carga superficial del sólido se aproxima a la carga neutra material disminuyendo la cantidad liberada.

En cuanto a la biocompatibilidad de estos ANW, los ensayos de hemólisis muestran valores de alrededor del 2% cuando se incubaba a 500 ppm de ANW prístino y ANW modificado indicando que ninguno de los materiales es hematotóxico.

Esta tendencia se puede deber a que el sistema ANW prístino, al pH fisiológico de 7,4 se carga de forma positiva lo que impide el daño en la membrana por interacciones electroestáticas lo cual se potencia cuando se modifica superficialmente con PEG (Slowing et al., 2009). En este caso, se obtuvieron valores promedio de hemólisis más bajos en los ANW-PEG2000 que en los ANW-PEG550 aun cuando este último posee una mayor presencia en la superficie de este nanomaterial, no se puede hablar de una diferencia significativa a pesar de esto por los bajos valores de hemólisis obtenidos con los ANW prístino.

En el caso de los resultados de adsorción inespecífica de proteínas en los sistemas basado en ANW, se observa que IgG y HSA no son adsorbidas en ninguno de los sistemas estudiados ANW.

Por último, los ensayos de viabilidad en HEK293 y PC12 incubados con los ANW no mostraron una disminución en la viabilidad demostrando así que ellos no son citotóxicos. Sin embargo, en el ensayo con los materiales en base a ANW cargados con DOX en células PC12 se logró ver una disminución gradual y similar, a la misma concentración entre sí, en la viabilidad de las células mencionadas llegando a valores de viabilidad que coinciden con los del control negativo, indicando que a una concentración de 50 ppm estos nanomateriales cargados con DOX son capaces de ejercer el máximo efecto en un cultivo bidimensional de células de la línea PC12. En este caso también se puede esperar una incorporación de una cantidad de nanomateriales a las células por endocitosis y otros mecanismos anteriormente mencionados por como la DOX podría ejercer su efecto en tan baja concentración.

8. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

En este trabajo de tesis se logró sintetizar nanoesferas de sílica y nanovarillas de alúmina con características de materiales mesoporosos los cuales se lograron modificar superficialmente con polietilenglicol, de 550 Da y 2000 Da, mediante inmovilización covalentemente a la superficie de los respectivos óxidos inorgánicos.

Los sistemas ANW y MSN - prístinas y PEGilados - son capaces de encapsular DOX cuya capacidad de adsorción disminuye cuando se modifican superficialmente con el polímero PEG. Los materiales en base MSN pueden encapsular encapsulan bajas carga de fármaco alcanzando un valor de 9mg/g para el material prístino y tan solo de alrededor 2 y 4 mg/g para los materiales MSN-PEG550 y MSN-PEG2000, respectivamente. En relación con la capacidad de adsorción, los sistemas en base MSN muestran perfiles de isoterma de adsorción de DOX del tipo Langmuir. Los sistemas en base ANW poseen una capacidad de adsorción de DOX mucho mayor a la observada en las MSN y su isoterma de adsorción se ajustan a modelos tipo Freundlich. Lo anterior es una respuesta a la naturaleza de cada material, lo que se confirmo mediante las diferentes caracterizaciones medidas. En el caso de las MSN sólo encapsularon fármaco por efecto de adsorción de la superficie externa del material, ya que los poros de este material esferoidal poseen características hidrofóbicas, limitando

la adsorción a una monocapa que se correlaciona con el modelo de Langmuir. Sin embargo, los sistemas en base a ANW poseen mayor superficie disponible – atribuido a su forma 1D – que permitieron que el fármaco se encapsulara mostrando una adsorción sistemática que se ajusta con el modelo Freundlich.

Las liberaciones de DOX en todos los nanomateriales estudiados se ajustan a una cinética de primer orden del tipo Fickiana. Ambos nanomateriales liberan una mayor cantidad de DOX en PBS a pH 5,0 que a pH 7,4. Lo anterior se atribuye a que el cambio de pH puede modificar las interacciones del fármaco con la superficie de los nanomateriales promoviendo una mayor liberación hacia el seno de la disolución. Esto permite estimar que la liberación del fármaco será mayor, por parte de los nanomateriales, en microambientes tumorales.

La biocompatibilidad de los nanomateriales en base MSN muestra que estos sistemas no son hematotóxicos y no muestran una disminución de la viabilidad celular de HEK293 y PC12. Sin embargo, MSN prístina interacciona con modelos de proteínas del plasma, pero que cuando se modifican superficialmente con PEG de 550 Da y PEG de 2000 Da disminuye esta interacción demostrando así un incremento de la biocompatibilidad de estos materiales cuando se PEGilan superficialmente.

Los nanomateriales en base a ANW muestran una elevada biocompatibilidad pues no interaccionan con modelos de proteínas de plasma, no generan un grado de hemólisis significativo y no disminuyen la viabilidad de cultivos celulares

HEK293 como modelo de células funcionales ni PC12 como modelo de células cancerosas.

En todos los nanomateriales estudiados, cuando se cargaron con DOX disminuyeron la viabilidad en cultivos de PC12 luego de ser incubados 48 horas. Los sistemas en base a ANW cargadas con DOX disminuyen de forma más importante la viabilidad en dispersiones > 10mg/mL a diferencia de los sistemas en base a MSN que muestran citotoxicidad a valores > 50mg/mL. Lo anterior se correlaciona de forma directa con los resultados de caracterización fisicoquímica pues la cantidad encapsulada y liberada de cada nanomaterial es significativamente mayor en los nanomateriales en base a ANW lo que permite alcanzar concentraciones de fármaco que inducen citotoxicidad a valores de dispersiones menores en comparación con los sistemas en base a MSN.

Como proyecciones se podrían realizar más ensayos de estabilidad de las dispersiones de los nanomateriales en medio acuoso, ensayo de biocompatibilidad más sensibles para determinar de forma concluyente la diferencia entre usar PEG550 y PEG2000, ensayos de trombogenicidad inducida por los nanomateriales y otros. Además, se pueden realizar ensayos *in vivo* para determinar su biodistribución, efecto anticancerígeno, principalmente con ANW, y otros experimentos en modelos animales.

9. GLOSARIO

ANW: Nanovarillas de alúmina o nanovarillas de óxido de aluminio.

ANWP1: ANW-PEG550: ANW modificadas con PEG de 550 dalton.

ANWP2: ANW-PEG2000: ANW modificadas con PEG de 2000 dalton.

BTEE: bis(trietoxietil)etano, agente de entrecruzamiento de MSN

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio, surfactante

D_H: Diámetro hidrodinámico, diámetro efectivo de una partícula que se mueve en una disolución, incluyendo moléculas del solvente atraídas por la partícula.

DLS: Dispersión dinámica de la luz.

DOX: Doxorrubicina, molécula anticancerígena y antibacteriana.

Fisisorción: Adsorción física, proceso de adsorción donde se perturba de forma mínima la estructura electrónica de los átomos o moléculas.

FT-IR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.

HEK293: Línea celular de células embrionarias de riñón humano.

HSA: Albúmina de suero humano

IC₅₀: 50% de la concentración máxima inhibitoria

IgG: Inmunoglobulina gamma o globulina de fracción gamma

ISO: 3-(triethoxysilyl)propylisocyanate, agente de acople para PEG

MSN: Nanopartículas o nanoesferas de sílica mesoporosas.

MSN1: MSN-PEG550: MSN modificadas con PEG de 550 dalton.

MSN2: MSN-PEG2000: MSN modificadas con PEG de 2000 dalton.

Nanomaterial: Material con al menos una dimensión en el rango del nanómetro

PBS: Buffer fosfato salino

PC12: Línea celular de feocromocitoma, tumor de la médula de la glándula suprarrenal.

PEG: Poli(etilenglicol)metil éter

PEG-ISO: PEG activado con ISO para ser acoplado a la superficie del material.

Prístino: Material sin modificar.

TEOS: Tetraetilortosilicato, precursor principal de MSN

TGA: Análisis termogravimétrico

UV: Radiación del espectro ultravioleta.

UV-Vis: Espectroscopía UV – Visible.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 5 - Mathematical models of drug release. (2015). In M. L. Bruschi (Ed.), *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 63-86). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>
- Agrahari, V., Meng, J., Purohit, S. S., Oyler, N. A., & Youan, B.-B. C. (2017). Real-Time Analysis of Tenofovir Release Kinetics Using Quantitative Phosphorus (31P) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(10), 3005-3015.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.043>
- Al-malky, H. S., Al Harthi, S. E., & Osman, A. M. M. (2020). Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 26(2), 434-444, Article 1078155219877931. <https://doi.org/10.1177/1078155219877931>
- Amjad, M. T. (2022). Cancer Chemotherapy.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>
- Bakhshian Nik, A., Zare, H., Razavi, S., Mohammadi, H., Torab Ahmadi, P., Yazdani, N., Bayandori, M., Rabiee, N., & Izadi Mobarakeh, J. (2020). Smart drug delivery: Capping strategies for mesoporous silica nanoparticles. *Microporous and Mesoporous Materials*, 299, 110115.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110115>
- Ball, K., Bruin, G., Escandón, E., Funk, C., Pereira, J. N. S., Yang, T. Y., & Yu, H. (2022). Characterizing the Pharmacokinetics and Biodistribution of Therapeutic Proteins: An Industry White Paper. *Drug Metab Dispos*, 50(6), 858-866. <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000463>
- Banerjee, D., & Sengupta, S. (2011). Nanoparticles in Cancer Chemotherapy. In A. Villaverde (Ed.), *Nanoparticles in Translational Science and Medicine* (Vol. 104, pp. 489-507). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416020-0.00012-7>
- Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 101(2-3), 157-170.
<https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>

- Boedtkjer, E., & Pedersen, S. F. (2020). The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual Review of Physiology*, 82(1), 103-126. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034627>
- Bomford, C., Kunkler, I. H., Walter, J., Miller, H., & Hancock, B. W. (2003). Walter and Miller's Textbook of radiotherapy : radiation physics, therapy, and oncology.
- Bonanno, L. M., & Segal, E. (2011). Nanostructured porous silicon-polymer-based hybrids: from biosensing to drug delivery. *Nanomedicine*, 6(10), 1755-1770. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.153>
- Campanella, B., Palleschi, V., & Legnaioli, S. (2021). Introduction to vibrational spectroscopies. *ChemTexts*, 7. <https://doi.org/10.1007/s40828-020-00129-4>
- Campos, C. H., Diaz, C. F., Guzman, J. L., Alderete, J. B., Torres, C. C., & Jimenez, V. A. (2016). PAMAM-Conjugated Alumina Nanotubes as Novel Noncytotoxic Nanocarriers with Enhanced Drug Loading and Releasing Performances. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 217(15), 1712-1722. <https://doi.org/10.1002/macp.201600136>
- Carucci, C., Scalas, N., Porcheddu, A., Piludu, M., Monduzzi, M., & Salis, A. (2021). Adsorption and Release of Sulfamethizole from Mesoporous Silica Nanoparticles Functionalised with Triethylenetetramine. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), Article 7665. <https://doi.org/10.3390/ijms22147665>
- Chandraprasad, M. S., Dey, A., & Swamy, M. K. (2022). 1 - Introduction to cancer and treatment approaches. In M. K. Swamy, T. Pullaiah, & Z.-S. Chen (Eds.), *Paclitaxel* (pp. 1-27). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90951-8.00010-2>
- Chen, Z., Bai, T., & Pan, Z. (2015). Coal Reservoir Characterization. In (pp. 22). <https://doi.org/10.1201/b19352-6>
- Cheng, Z., Li, M. Y., Dey, R., & Chen, Y. H. (2021). Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), Article 85. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01096-0>
- Corrie, P. G. (2008). Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 36(1), 24-28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2007.10.012>

- Cutts, S. M., Nudelman, A., Rephaeli, A., & Phillips, D. R. (2005). The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *Iubmb Life*, 57(2), 73-81.
<https://doi.org/10.1080/15216540500079093>
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67(3), 217-223. <Go to ISI>://WOS:000281750900001
- Dening, T. J., Zemlyanov, D., & Taylor, L. S. (2019). Application of an adsorption isotherm to explain incomplete drug release from ordered mesoporous silica materials under supersaturating conditions. *Journal of Controlled Release*, 307, 186-199.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.028>
- Diebolder, C. A., Beurskens, F. J., de Jong, R. N., Koning, R. I., Strumane, K., Lindorfer, M. A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A. J. R., van de Winkel, J. G. J., Wilson, I. A., Koster, A. J., Taylor, R. P., Ollmann Saphire, E., Burton, D. R., Schuurman, J., Gros, P., & Parren, P. W. H. I. (2014). Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface. *Science*, 343(6176), 1260-1263.
<https://doi.org/doi:10.1126/science.1248943>
- Dunkelberger, J. R., & Song, W.-C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), 34-50.
<https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Ensafi, A. A., Mirzaii, F., Nasr-Esfahani, P., & Rezaei, B. (2020). Ni 3 S 2 Supported on Porous Ball-milled Silicon, a Highly Selective Electrochemical Sensor for Glucose Determination. *Electroanalysis*, 32(8), 1707-1716. <https://doi.org/10.1002/elan.202000069>
- Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2019). CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol*, 234(6), 8509-8521.
<https://doi.org/10.1002/jcp.27782>
- Ferreira, M. M., & Bizeto, M. A. (2020). Kinetic analysis of pH influence on the fluorescein release from chitosan-coated mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Porous Materials*, 27(4), 1077-1086.
<https://doi.org/10.1007/s10934-020-00885-1>
- Fidler, I. J. (2000). Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer Journal*, 6, S134-S141. <Go to ISI>://WOS:000088694200006

- Fornaguera, C., & Solans, C. (2017). Methods for the In Vitro Characterization of Nanomedicines—Biological Component Interaction. *Journal of Personalized Medicine*, 7, 2. <https://doi.org/10.3390/jpm7010002>
- Fülöp, Z., Gref, R., & Loftsson, T. (2013). *IJP.Doxorubicin.2013*.
- Galluzzi, L., Linkermann, A., Kepp, O., & Kroemer, G. (2020). 5 - Pathophysiology of Cancer Cell Death. In J. E. Niederhuber, J. O. Armitage, M. B. Kastan, J. H. Doroshow, & J. E. Tepper (Eds.), *Abeloff's Clinical Oncology (Sixth Edition)* (pp. 74-83.e74). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47674-4.00005-0>
- Gaoxin, Z., Li, L., Xing, J., Cai, J., Chen, J., Liu, P., Ning, G., & Ji, M. (2017). Layer-by-layer construction of lipid bilayer on mesoporous silica nanoparticle to improve its water suspensibility and hemocompatibility. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 82. <https://doi.org/10.1007/s10971-017-4330-2>
- Ghiran, I. C. (2011). Introduction to Fluorescence Microscopy. In H. Chiarini-Garcia & R. C. N. Melo (Eds.), *Light Microscopy: Methods and Protocols* (pp. 93-136). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5_7
- Guerrini, L., Alvarez-Puebla, R. A., & Pazos-Perez, N. (2018). Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids. *Materials (Basel)*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/ma11071154>
- Hashida, M. (2020). Role of pharmacokinetic consideration for the development of drug delivery systems: A historical overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 157, 71-82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.015>
- Hassan, S., Prakash, G., Ozturk, A. B., Saghadzadeh, S., Sohail, M. F., Seo, J., Dokmeci, M. R., Zhang, Y. S., & Khademhosseini, A. (2017). Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials. *Nano Today*, 15, 91-106. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.06.008>
- Hosseini, H., Ortiz Ortega, E., Aguilar Meza, I. B., Rodríguez Vera, A., Rosales López, M. J., & Hosseini, S. (2022). Characterization Techniques for Thermal Analysis. In (pp. 153-180). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9569-8_5
- Jaros, J., Guest, P., Bahn, S., & Martins-de-Souza, D. (2013). Affinity Depletion of Plasma and Serum for Mass Spectrometry-Based Proteome Analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1002. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-360-2_1

- Jonkman, J., Brown, C. M., Wright, G. D., Anderson, K. I., & North, A. J. (2020). Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nature Protocols*, 15(5), 1585-1611. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0313-9>
- Leeman, M., Choi, J., Hansson, S., Storm, M. U., & Nilsson, L. (2018). Proteins and antibodies in serum, plasma, and whole blood—size characterization using asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(20), 4867-4873. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1127-2>
- LEES, P., CUNNINGHAM, F. M., & ELLIOTT, J. (2004). Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), 397-414. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00620.x>
- Li, Z., Tan, S. R., Li, S., Shen, Q., & Wang, K. H. (2017). Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). *Oncology Reports*, 38(2), 611-624. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5718>
- Liang, J., Zhang, Z., Zhao, H., Wan, S., Zhai, X., Zhou, J., Liang, R., Deng, Q., Wu, Y., & Lin, G. (2018). Simple and rapid monitoring of doxorubicin using streptavidin-modified microparticle-based time-resolved fluorescence immunoassay. *Rsc Advances*, 8(28), 15621-15631. <https://doi.org/10.1039/c8ra01807c>
- Ligasová, A., & Koberna, K. (2021). DNA Dyes—Highly Sensitive Reporters of Cell Quantification: Comparison with Other Cell Quantification Methods. *Molecules*, 26(18), 5515. <https://doi.org/10.3390/molecules26185515>
- Lin, B., & Zhou, S. (2017). Poly(ethylene glycol)-grafted silica nanoparticles for highly hydrophilic acrylic-based polyurethane coatings. *Progress in Organic Coatings*, 106, 145-154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.02.008>
- Loganathan, S., Valapa, R. B., Mishra, R. K., Pugazhenth, G., & Thomas, S. (2017). Chapter 4 - Thermogravimetric Analysis for Characterization of Nanomaterials. In S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, & R. K. Mishra (Eds.), *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* (pp. 67-108). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00004-9>

- Luu, A. Z., Chowdhury, B., Al-Omran, M., Teoh, H., Hess, D. A., & Verma, S. (2018). Role of Endothelium in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Jacc-Basic to Translational Science*, 3(6), 861-870. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.06.005>
- Ma, M.-G., Zhu, Y.-J., & Xu, Z.-L. (2007). A new route to synthesis of γ -alumina nanorods. *Materials Letters*, 61(8), 1812-1815. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.07.138>
- Ma, Y., Xu, Y., Chen, H., Guo, J., Wei, X., & Huang, L. (2021). Supported on mesoporous silica nanospheres, molecularly imprinted polymer for selective adsorption of dichlorophen. *Green Processing and Synthesis*, 10(1), 336-348. <https://doi.org/10.1515/gps-2021-0030>
- Magenau, A., Benzing, C., Proschogo, N., Don, A. S., Hejazi, L., Karunakaran, D., Jessup, W., & Gaus, K. (2011). Phagocytosis of IgG-coated polystyrene beads by macrophages induces and requires high membrane order. *Traffic*, 12(12), 1730-1743. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01272.x>
- Mageswari, A., Srinivasan, R., Subramanian, P., Ramesh, N., & Gothandam, K. M. (2016). Nanomaterials: Classification, Biological Synthesis and Characterization. In S. Ranjan, N. Dasgupta, & E. Lichtfouse (Eds.), *Nanoscience in Food and Agriculture 3* (Vol. 23, pp. 31-71). https://doi.org/10.1007/978-3-319-48009-1_2
- Manzanares, D., & Ceña, V. (2020). Endocytosis: The Nanoparticle and Submicron Nanocompounds Gateway into the Cell. *Pharmaceutics*, 12(4), 371. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371>
- Manzano, M., & Vallet-Regí, M. (2020). Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Advanced Functional Materials*, 30(2), 1902634. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.201902634>
- Matyszewska, D. (2014). Drug delivery systems in the transport of doxorubicin. *Surface Innovations*, 2(4), 201-210. <https://doi.org/10.1680/si.13.00040>
- Metin, C. O., Lake, L. W., Miranda, C. R., & Nguyen, Q. P. (2011). Stability of aqueous silica nanoparticle dispersions. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(2), 839-850. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0085-1>
- Miao, Y. L., Feng, Y. C., Bai, J., Liu, Z. Y., & Zhao, X. B. (2021). Optimized mesoporous silica nanoparticle-based drug delivery system with removable manganese oxide gatekeeper for controlled delivery of

- doxorubicin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 592, 227-236.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.02.054>
- Minton, A. (2016). Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences. *Analytical Biochemistry*, 501.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.02.007>
- Mirzaei, M., Zarch, M. B., Darroudi, M., Sayyadi, K., Keshavarz, S. T., Sayyadi, J., Fallah, A., & Maleki, H. (2020). Silica Mesoporous Structures: Effective Nanocarriers in Drug Delivery and Nanocatalysts. *Applied Sciences-Basel*, 10(21), Article 7533. <https://doi.org/10.3390/app10217533>
- Morelli, C., Maris, P., Sisci, D., Perrotta, E., Brunelli, E., Perrotta, I., Panno, M. L., Tagarelli, A., Versace, C., Casula, M. F., Testa, F., Ando, S., Nagy, J. B., & Pasqua, L. (2011). PEG-templated mesoporous silica nanoparticles exclusively target cancer cells. *Nanoscale*, 3(8), 3198-3207.
<https://doi.org/10.1039/c1nr10253b>
- Nepal, B., Bhattarai, J. K., Dhami, K. B., Nichols, M. R., & Stine, K. J. (2023). Effect of mesoporous silica nanoparticles loaded with α -tomatine on HepG2 cancer cells studied in vitro. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 79, 104033.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104033>
- Neumeier, J. (2015). *Photophysics of Graphene Quantum Dots*
- Nguyen, T. N. T., Nguyen-Tran, D. H., Bach, L. G., Truong, T. H. D., Le, N. T. T., & Nguyen, D. H. (2019). Surface PEGylation of hollow mesoporous silica nanoparticles via aminated intermediate. *Progress in Natural Science-Materials International*, 29(6), 612-616.
<https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2019.10.002>
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*, 2(3), 213-219.
<https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>
- Omokpariola, D. (2021). Experimental Modelling Studies on the removal of crystal violet, methylene blue and malachite green dyes using Theobroma cacao (Cocoa Pod Powder). *Chemistry Letters*, 2, 9-24.
<https://doi.org/10.22034/jchemlett.2021.272842.102>
- Ortiz Ortega, E., Hosseini, H., Rosales López, M. J., Rodríguez Vera, A., & Hosseini, S. (2022a). Characterization Techniques for Chemical and Structural Analyses. In (pp. 93-152). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-9569-8_4

- Ortiz Ortega, E., Hosseini, H., Rosales López, M. J., Rodríguez Vera, A., & Hosseini, S. (2022b). Characterization Techniques for Morphology Analysis. In (pp. 1-45). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9569-8_1
- Park, E.-J., Lee, G.-H., Shim, J.-h., Cho, M.-H., Lee, B.-S., Kim, Y.-B., Kim, J.-H., Kim, Y., & Kim, D.-W. (2015). Comparison of the toxicity of aluminum oxide nanorods with different aspect ratio. *Archives of Toxicology*, 89(10), 1771-1782. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1332-5>
- Paul, S., & Lal, G. (2017). The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 8, 1124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>
- Pokropivny, V. V., & Skorokhod, V. V. (2007). Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 27(5-8), 990-993. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.09.023>
- Pourhakkak, P., Taghizadeh, A., Taghizadeh, M., Ghaedi, M., & Haghdoust, S. (2021). Chapter 1 - Fundamentals of adsorption technology. In M. Ghaedi (Ed.), *Interface Science and Technology* (Vol. 33, pp. 1-70). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818805-7.00001-1>
- Prasad, N. V. K., Babu, T. A., Sarma, M., Ramesh, S., Nirisha, K., Mathew, T., & Madhavi, N. (2021). ROLE OF POROUS NANOMATERIAL'S IN WATER PURIFICATION, ELECTRONICS, DRUG DELIVERY AND STORAGE: A COMPREHENSIVE REVIEW. *Journal of Optoelectronic and Biomedical Materials*, 13(1), 11-22. <Go to ISI>://WOS:000637023900001
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347-12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J. P., & Gögenur, I. (2021). Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*, 124(2), 359-367. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>
- Reyes Bahena, J. L., Cabrera, A., Lopez-Valdivieso, A., & Urbina, R. (2007). Fluoride adsorption onto α -Al₂O₃ and its effect on the zeta potential at the alumina–aqueous electrolyte interface. *Separation Science and Technology*, 37(8), 1973-1987. <https://doi.org/10.1081/SS-120003055>

- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, Jr., Y. Wang, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia, & X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Riviere, J. E., Jaber-Douraki, M., Lillich, J., Azizi, T., Joo, H., Choi, K., Thakkar, R., & Monteiro-Riviere, N. A. (2018). Modeling gold nanoparticle biodistribution after arterial infusion into perfused tissue: effects of surface coating, size and protein corona. *Nanotoxicology*, 12(10), 1093-1112. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1476986>
- Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int*, 2017, 9042851. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
- Saha, S., Bansal, S., & Khanuja, M. (2022). Chapter 2 - Classification of nanomaterials and their physical and chemical nature. In M. Ghorbanpour & M. A. Shahid (Eds.), *Nano-enabled Agrochemicals in Agriculture* (pp. 7-34). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91009-5.00001-X>
- Sakho, E. H. M., Allahyari, E., Oluwafemi, O. S., Thomas, S., & Kalarikkal, N. (2017). Chapter 2 - Dynamic Light Scattering (DLS). In S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, & R. K. Mishra (Eds.), *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* (pp. 37-49). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00002-5>
- Shah, P. V., & Rajput, S. (2019). Surface Decorated Mesoporous Silica Nanoparticles: A Promising and Emerging Tool for Cancer Targeting. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53(3), 382-399. <https://doi.org/10.5530/ijper.53.3.72>
- Shimizu, K., Kawashima, H., Kawai, A., Yoshida, M., & Nishida, Y. (2020). Effectiveness of doxorubicin-based and liposomal doxorubicin chemotherapies for patients with extra-abdominal desmoid-type fibromatosis: a systematic review. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 50(11), 1274-1281. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyaa125>

- Shokoohinia, Y., Hosseinzadeh, L., Moieni-Arya, M., Mostafaie, A., & Mohammadi-Motlagh, H.-R. (2014). Osthole Attenuates Doxorubicin-Induced Apoptosis in PC12 Cells through Inhibition of Mitochondrial Dysfunction and ROS Production. *BioMed Research International*, 2014, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/156848>
- Skorokhod, O. A., Kulikova, E. V., Galkina, N. M., Medvedev, P. V., Zybunova, E. E., Vitvitsky, V. M., Pivnik, A. V., & Ataullakhanov, F. I. (2007). Doxorubicin pharmacokinetics in lymphoma patients treated with doxorubicin-loaded erythrocytes. *Haematologica*, 92(4), 570-571. <https://doi.org/10.3324/haematol.10770>
- Slowing, I. I., Wu, C.-W., Vivero-Escoto, J. L., & Lin, V. S.-Y. (2009). Mesoporous Silica Nanoparticles for Reducing Hemolytic Activity Towards Mammalian Red Blood Cells. *Small*, 5(1), 57-62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.200800926>
- Solcova, O., Matejova, L., & Schneider, P. (2006). Pore-size distributions from nitrogen adsorption revisited: Models comparison with controlled-pore glasses. *Applied Catalysis a-General*, 313(2), 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2006.07.021>
- Sritharan, S., & Sivalingam, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sciences*, 278, Article 119527. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>
- Stoddart, M. J. (2011). Cell Viability Assays: Introduction. In M. J. Stoddart (Ed.), *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* (pp. 1-6). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
- Strieter, R. M., Burdick, M. D., Mestas, J., Gomperts, B., Keane, M. P., & Belperio, J. A. (2006). Cancer CXCL chemokine networks and tumour angiogenesis. *European Journal of Cancer*, 42(6), 768-778. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.006>
- Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 99(Pt A), 28-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
- Tang, F., Li, L., & Chen, D. (2012). Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Advanced Materials*, 24(12), 1504-1534. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201104763>

- Tietze, R., Lyer, S., Durr, S., Struffert, T., Engelhorn, T., Schwarz, M., Eckert, E., Goen, T., Vasylyev, S., Peukert, W., Wiekhorst, F., Trahms, L., Dorfler, A., & Alexiou, C. (2013). Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles - biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 9(7), 961-971. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.05.001>
- Vélez-Peña, E., Morales, R., Reyes-Escobar, C., Torres, C. C., Avello, M., Marrugo, K. P., Manzo-Merino, J., Alderete, J. B., & Campos, C. H. (2022). Mesoporous mixed oxides prepared by hard template methodology as novel drug delivery carriers for methotrexate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 73, 103483. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103483>
- Vinardell, M. P., Sorde, A., Diaz, J., Baccarin, T., & Mitjans, M. (2015). Comparative effects of macro-sized aluminum oxide and aluminum oxide nanoparticles on erythrocyte hemolysis: influence of cell source, temperature, and size. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2), Article 80. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2893-9>
- Waldman, A. D., Fritz, J. M., & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, 20(11), 651-668. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Walkey, C. D., & Chan, W. C. W. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment [10.1039/C1CS15233E]. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2780-2799. <https://doi.org/10.1039/C1CS15233E>
- Wallace, K. B., Sardao, V. A., & Oliveira, P. J. (2020). Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circulation Research*, 126(7), 926-941. <https://doi.org/10.1161/circresaha.119.314681>
- Welch, D. A., Woehl, T. J., Park, C., Faller, R., Evans, J. E., & Browning, N. D. (2016). Understanding the Role of Solvation Forces on the Preferential Attachment of Nanoparticles in Liquid. *ACS Nano*, 10(1), 181-187. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b06632>
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1845(1), 84-89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>

- Yildirim, A., Ozgur, E., & Bayindir, M. (2013). Impact of mesoporous silica nanoparticle surface functionality on hemolytic activity, thrombogenicity and non-specific protein adsorption [10.1039/C3TB20139B]. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(14), 1909-1920.
<https://doi.org/10.1039/C3TB20139B>
- Yurdakal, S., Garlisi, C., Özcan, L., Bellardita, M., & Palmisano, G. (2019). Chapter 4 - (Photo)catalyst Characterization Techniques: Adsorption Isotherms and BET, SEM, FTIR, UV–Vis, Photoluminescence, and Electrochemical Characterizations. In G. Marcì & L. Palmisano (Eds.), *Heterogeneous Photocatalysis* (pp. 87-152). Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64015-4.00004-3>
- Zhang, Y., Shao, D., Yan, J., Jia, X., Li, Y., Yu, P., & Zhang, T. (2016). The pore size distribution and its relationship with shale gas capacity in organic-rich mudstone of Wufeng-Longmaxi Formations, Sichuan Basin, China. *Journal of Natural Gas Geoscience*, 1.
<https://doi.org/10.1016/j.jnggs.2016.08.002>
- Zhao, Y., Sun, X., Zhang, G., Trewyn, B. G., Slowing, I. I., & Lin, V. S. Y. (2011). Interaction of Mesoporous Silica Nanoparticles with Human Red Blood Cell Membranes: Size and Surface Effects. *ACS Nano*, 5(2), 1366-1375.
<https://doi.org/10.1021/nn103077k>

11. ANEXOS

Los residuos son propiamente almacenados y posteriormente tratados por MATPEL. Se usarán compuestos ácidos, básicos, inflamables, no inflamables, orgánicos y en menor cantidad organoclorados. Todos los experimentos son realizados siguiendo el instructivo adjunto:

- <http://www2.udec.cl/matpel/wmat/wp-content/uploads/I-01-v02-Clasificaci%C3%B3n-y-manejo-de-residuos-peligrosos-v2-13-ene-16.pdf>
“Instructivo I-01 Clasificación y manejo de residuos peligrosos versión N° 02”.