



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis y caracterización de sistemas teragnósticos basados en microburbujas magnéticas
con metotrexato

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. José Guillermo Macías Cárdenas

Tutor: Dr. Jesús Gracia Mora
Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, UNAM

Ciudad de México, Octubre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Síntesis y caracterización de sistemas teragnósticos basados en
microburbujas magnéticas con metotrexato**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. José Guillermo Macías Cárdenas



Ciudad de México, Ciudad Universitaria

2018

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, que me ha brindado un segundo hogar durante una década, donde no sólo me forme en lo profesional sino como ser humano.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química de la UNAM que me formaron como profesional de la química y como ser humano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría con el número de becario 620700.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por la beca otorgada para la asistencia al congreso 52° Congreso Mexicano de Química, y 36° Congreso Nacional de Educación Química

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) por el apoyo PAPIIT IT201518 “Síntesis y caracterización de sistemas nanohíbridos superparamagnéticos con posible aplicación en el tratamiento del cáncer”

A mi tutor el Dr. Jesús Gracia Mora, por su invaluable apoyo, por su confianza, por las enseñanzas que me formaron como profesionista, pero por encima de cualquier otra cosa por las lecciones que me dieron como persona.

A los doctores Perla García Guzman, Viridiana Gisela Llera Rojas, Iván Dario Rojas Montoya y Laura Verónica Olguín Henao quienes, a pesar de trabajar incansablemente, cedieron su valioso tiempo para guiarme durante la realización de este trabajo.

A clínica de reproducción canina, parte del Departamento de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su contribución a la realización y sus valiosas aportaciones durante el análisis de los estudios de ultrasonido.

Esta tesis se realizó en el laboratorio 100 del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear en el edificio B, y el laboratorio de sistemas de liberación de fármacos del Departamento de Farmacia en el edificio F-1 de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedicatorias

A mis padres quienes me motivaron, dirigieron, y corrigieron, con cariño y comprensión en ocasiones sin certidumbre sobre mis decisiones, pero sin cabida a duda en su amor y apoyo. Me mostraron que todos hacemos elecciones, pero al final, las elecciones son las que nos hacen a nosotros.

A mis hermanos, Julian y Valeria, de ustedes aprendí el sentido de la pasión y la virtud, de defender mis ideas, de añorar y luchar. Aunque nuestros objetivos nos hagan tomar caminos separados, siempre llevaré conmigo nuestro recorrido.

A Mariana Gallegos y a Santiago Macías, quienes me han permitido formar parte de sus vidas sin saber que ellos dan sentido a la mía. Mi vida no bastará para retribuir lo que me han dado, pero no por ello daré menos que el todo en el día a día para intentarlo.

A mis amigas Leticia Antonio, Brenda Bravo, Fernando Bravo, Citlali de la Cruz, Perla García, Yokari Godínez, Cynthia Sánchez, Guadalupe Tapia, Mayra Martínez, y Dario Rojas cuyo consejo y auxilio en la realización de este trabajo fue invaluable, pero por encima de todo agradezco el apoyo brindado, el tiempo invertido, haber tenido con quien compartir buenos y malos momentos a lo largo de estos años.

Al Dr. Jesús Gracia y la Dra. Josefa Bernad por ayudarme a mejorar, por corregirme sin recriminar, por ampliar mi horizonte sobre mi futuro y mis metas, por esto y mucho más les agradezco.

A mis amigos Alejandra Puerto, Biaani Beltrán, Juan Campos, Daniel Gómez, Joan Lucas, Gabriel Moreno, Carlos Pérez, y Jessica Romero, ustedes fueron pilares fundamentales para la persona que soy hoy en día, me mostraron que el tiempo cambia las circunstancias, pero no el deseo de los amigos de volverse a reunir.

“No puede existir certidumbre respecto a la última conclusión sin una certidumbre acerca de todas aquellas afirmaciones y negaciones sobre las cuales se fundó e infirió la última.”

Thomas Hobbes. [“El Leviatán o la materia, forma y poder de un estado eclesiástico y civil”](#), Cap. 5, De la Razón y de la Ciencia

Índice General

Capítulo 1. Resumen	10
Capítulo 2. Antecedentes.....	14
2.1. Aspectos generales del cáncer.....	14
2.1.1. Etiología	14
2.1.2. Epidemiología	14
2.1.3. Métodos de diagnóstico	15
2.1.4. Tratamiento	16
2.2. Metotrexato.....	17
2.2.1. Indicación terapéutica	17
2.2.2. Características biofarmacéuticas	18
2.2.3. Efectos adversos.....	18
2.2.4. Características fisicoquímicas.....	18
2.3. Sistemas de liberación farmacéuticos	18
2.3.1. Sistemas convencionales de liberación de fármacos.....	18
2.3.2. Sistemas liberación modificada de fármacos	19
2.3.3. Sistemas teragnósticos	20
2.4. Agentes de contraste para diagnóstico clínico	21
2.4.1. Agentes de contraste para ultrasonido (US)	21
2.4.2. Resolución en imagenología por ultrasonido	22
2.4.3. Agentes de contraste para resonancia magnética de imagen (MRI).....	23
2.4.4. Nanopartículas magnéticas.....	24
2.5. Magnetismo	24
2.5.1. Teoría de dominios	25
2.5.2. Métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas de óxidos de metales de transición.....	26
2.5.3. Magnetita y ferrita de cobalto	27
2.6. Agentes de contraste para ultrasonido	29
2.6.1. Microburbujas.....	29
2.6.2. Estabilidad de microburbujas	32
2.6.3. Propiedades de un agente de contraste ideal basado en microburbujas.....	33
2.6.4. Cinética de detección de microburbujas magnéticas como medio de contraste en ultrasonido.....	35

2.6.5.	Microburbujas magnéticas	36
2.7.	Sistemas teragnósticos en cáncer	36
2.7.1.	Avances en los sistemas teragnósticos de cáncer	36
2.7.2.	Retos y nuevas perspectivas en el desarrollo de sistemas teragnósticos de cáncer	37
2.7.3.	Microburbujas magnéticas en cáncer.....	37
2.7.4.	Agentes teragnósticos en cáncer basados en microburbujas magnéticas.....	38
2.8.	Modelos cinéticos de liberación de fármacos	39
Capítulo 3.	Planteamiento del problema	42
Capítulo 4.	Objetivo general.....	43
4.1.	Objetivos particulares	43
Capítulo 5.	Hipótesis de trabajo	44
Capítulo 6.	Metodología experimental.....	45
6.1.	Materiales	45
6.2.	Síntesis de NPMs hidrofóbicas de magnetita	45
6.3.	Síntesis de acetilacetonato de Co (II) y acetilacetonato de Fe (III).....	45
6.4.	Síntesis solvotermal de NPMs hidrofóbicas de ferrita de cobalto	46
6.5.	Síntesis de NPMs hidrofóbicas de ferrita de cobalto por coprecipitación	47
6.6.	Caracterización de nanopartículas magnéticas (NPMs)	47
6.6.1.	Espectroscopia de infrarrojo de nanopartículas magnéticas	47
6.6.2.	Espectroscopia de absorción atómica de nanopartículas magnéticas	47
6.6.3.	Potencial Z	47
6.6.4.	Difracción de Rayos X de Polvo.....	48
6.6.5.	Curvas de histéresis magnética de NPMs.....	48
6.7.	Síntesis de microburbujas	48
6.8.	Síntesis de microburbujas magnéticas	48
6.9.	Aislamiento de partículas del medio de síntesis	49
6.10.	Cuantificación de metotrexato en microburbujas	49
6.11.	Liofilización de los sistemas sintetizados.....	49
6.12.	Determinación de morfología y tamaño de partícula por microscopia SEM	49
6.13.	Evaluación del uso de membranas de diálisis en la liberación del fármaco antineoplásico modelo (metotrexato).....	50
6.14.	Liberación del fármaco antineoplásico modelo (metotrexato).....	50

6.15. Evaluación de los sistemas como sistemas diagnósticos <i>in vitro</i>	50
6.16. Evaluación de las propiedades mecánicas de los sistemas generados	51
Capítulo 7. Resultados y discusión	52
7.1. Síntesis de precursores para la síntesis solvotermal de ferrita de cobalto	52
7.2. Caracterización de precursores de la síntesis solvotermal de ferrita de cobalto	52
7.2.1. Análisis de infrarrojo con reflectancia ATR (ATR-FTIR) de precursores	52
7.2.2. Análisis térmico de precursores de la síntesis solvotermal	56
7.2.3. Análisis elemental de precursores de la síntesis solvotermal	58
7.3. Síntesis de nanopartículas magnéticas	59
7.4. Caracterización de nanopartículas magnéticas (NPM's)	60
7.4.1. Dispersión de nanopartículas magnéticas.....	60
7.4.2. Difracción de rayos X de polvos de NPMs	61
7.4.3. Caracterización por microscopía electrónica de NPMs.....	67
7.4.4. Curvas de histéresis de NPMs	70
7.4.5. Espectroscopia atómica de NPMs de ferrita de cobalto	72
7.4.6. Análisis de infrarrojo con reflectancia ATR. (ATR-FTIR) de NPMs	72
7.5. Síntesis y caracterización de sistemas poliméricos e híbridos	80
7.5.1. Porcentaje de carga de metotrexato en sistemas poliméricos e híbridos	80
7.5.2. Microscopía electrónica de sistemas poliméricos e híbridos.....	82
7.5.3. Potencial zeta de sistemas poliméricos e híbridos.....	88
7.6. Evaluación de los sistemas poliméricos e híbridos como sistemas terapéuticos	89
<i>in vitro</i>	89
7.7. Evaluación ecogénica de los sistemas poliméricos e híbridos	100
7.8. Evaluación mecánica de modelos de membranas basadas en los sistemas poliméricos e híbridos.....	104
Capítulo 8. Conclusiones	110
Capítulo 9. Perspectivas	112
Capítulo 10. Referencias y bibliografía	112
Capítulo 11. Anexos.....	127

Glosario de abreviaturas

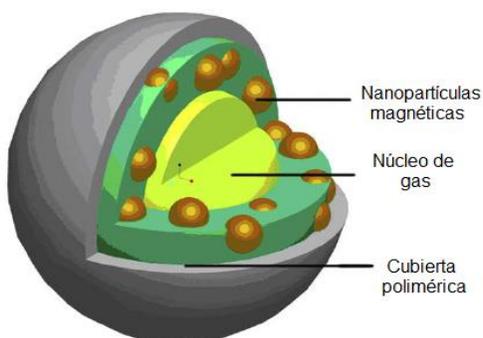
AIC	Criterio de Akaike
CME	Concentración mínima efectiva
CMT	Concentración mínima tóxica
CPP	Carbonato de polipropileno
DLS	Dispersión dinámica de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ICDD	International Center for Diffraction Data
EDS	Espectroscopia de energía dispersiva
MagHBSC	Magnetita hidrofóbica obtenida mediante síntesis por coprecipitación
MagHFSC	Magnetita hidrofílica obtenida mediante síntesis por coprecipitación
MBCPPØ	Microburbujas con capa interna de carbonato de polipropileno sin nanopartículas magnéticas
MBCPPFe	Microburbujas con capa interna de carbonato de polipropileno con nanopartículas magnéticas de magnetita
MBCPPCo	Microburbujas con capa interna de carbonato de polipropileno con NPMs de ferrita de cobalto
MBPLAØ	Microburbujas con capa interna de ácido (L) láctico sin nanopartículas magnéticas
MBPLAFe	Microburbujas con capa interna de ácido (L) láctico con nanopartículas magnéticas de magnetita
MBPLACo	Microburbujas con capa interna de ácido (L) láctico con nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto
MGS	Escala media de grises
MRI	Resonancia magnética de imagen
MSC	Criterio de selección del modelo
NPMs	Nanopartículas magnéticas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCL	Poli-(ϵ)-caprolactona
PDF	Powder diffraction file
PLA	Ácido poli (D-láctico)

PVA	Alcohol polivinílico
RCF	Fuerza centrífuga relativa
Rsqr	Coeficiente de correlación
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SS	Suma de cuadrados
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
XRD	Difracción de rayos X de polvos

Capítulo 1. Resumen

La necesidad de modificar la duración o efectividad de los tratamientos ha llevado al desarrollo de sistemas acarreadores de fármacos que permitan la detección de neoplasias. Entre los acarreadores utilizados en diversas terapias contra el cáncer encontramos a las nanopartículas de óxido de hierro, las cuales poseen una superficie fácilmente funcionalizable, así como propiedades superparamagnéticas que permiten su uso como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (MRI), en el tratamiento por hipertermia, como agentes acarreadores y como agentes teragnósticos. Sin embargo, existen pocos productos en el mercado que aprovechen estas características.

Las microburbujas también han sido ocupadas en la práctica clínica, debido a su capacidad de aumento en la resolución en la técnica de imagen por ultrasonido (US) de distintos tejidos, esta característica ha permitido llevar a cabo mejores estudios de detección y caracterización de tejidos cancerígenos, procesos inflamatorios, y patologías cardiovasculares. Las cubiertas de los agentes de contraste ultrasónicos pueden ser utilizadas para transportar fármacos en el cuerpo. Así mismo, es posible embeber nanopartículas magnéticas en la cubierta de las microburbujas aumentando la susceptibilidad magnética permitiendo su detección por medio de la MRI, la posibilidad de llevar a cabo la confirmación de resultados obtenidos mediante ultrasonido y/o la liberación de fármacos con el uso de hipertermia magnética.¹ El esquema 1 muestra los componentes que conforman una microburbuja magnética:



Esquema 1. Modelo de una microburbuja magnética.¹

Esta investigación buscó el desarrollo del sistema teragnóstico basado en microburbujas magnéticas, para ello se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas magnéticas por el método de coprecipitación y síntesis solvotermal, se llevó a cabo la evaluación de su dispersabilidad en disolventes orgánicos y en agua, se estimó la distribución de tamaño de partícula e identificación de fases cristalinas mediante difracción de rayos X de polvos, el tamaño de partícula, morfología y difracción electrónica mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), su composición mediante espectroscopía EDS, espectroscopía de absorción atómica

y espectroscopia FTIR, la estabilidad en dispersión acuosa mediante la medición potencial Z y la caracterización de sus propiedades magnéticas mediante el análisis de su histéresis magnética. Una vez se llevó a cabo la síntesis y caracterización de NPMs se prosiguió a la síntesis de sistemas teragnósticos basados en microburbujas magnéticas mediante el método de doble emulsión modificando el polímero hidrofóbico de la fase interna de las burbujas, así como el tipo y la cantidad de NPMs incluidas en la fase interna. Se llevó a cabo la caracterización de morfología y tamaño de partícula mediante dispersión dinámica de luz (DLS), se estimó la distribución de tamaño de partícula y morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se determinó su capacidad de diagnóstico mediante el análisis de eficiencia ecográfica usando la comparación de contraste en escalas de grises (MGS), determinando la proporción de esta respuesta en función de la composición y la cantidad de NPMs dispersas en dos polímeros hidrofóbicos distintos, así como la determinación de la eficiencia como sistema de liberación farmacéutico mediante su capacidad de encapsulación de un fármaco quimioterapéutico en la pared de los sistemas y su liberación *in vitro* simulando condiciones fisiológicas.

Las distintas pruebas de caracterización se realizaron con la finalidad de obtener evidencia de la obtención de un sistema teragnóstico basado en microburbujas magnéticas capaz de aumentar la respuesta acústica y la liberación modificada de metotrexato como agente antineoplásico, demostrando la obtención de un sistema capaz de mejorar la detección de neoplasias mediante ultrasonido, así como la liberación de metotrexato.

Para llevar a cabo la síntesis se requirió la fabricación previa de nanopartículas de magnetita y ferrita de cobalto con ácido oleico coordinado en la superficie como recubrimiento; su fabricación fue mediante el método de coprecipitación. Las nanopartículas de magnetita recubierta con ácido oleico (MagHBSC) fueron de 8.8 ± 1.1 nm y de -5.94 ± 2.2 mV, mientras que para las nanopartículas de ferrita de cobalto con ácido oleico (COHBSC) fueron de 7.9 ± 1.2 nm y de -3.99 ± 0.5 mV respectivamente, se demostró además la coordinación del ácido oleico como carboxilato en la superficie por medio de su dispersión en diclorometano y la evaluación de su espectro de infrarrojo por reflectancia ATR. Además, se obtuvieron los difractogramas de rayos X para determinar si las nanopartículas generadas correspondían a las fases de la magnetita [00-019-0629], ferrita de cobalto [00-022-1086] y maghemita [00-039-1348] según la base de datos PDF-2 (2013) del ICDD.

Se generaron seis sistemas para ser comparados por medio del método de doble emulsión utilizando uno de dos polímeros hidrófobos distintos en la capa interna: ácido poli-(L)-láctico (PLA) y carbonato de polipropileno (CPP), así como la presencia o ausencia de dos clases de nanopartículas magnéticas dispersas en la fase interna de la microburbuja: magnetita o ferrita de cobalto.

Se obtuvieron microburbujas con una capa interna de ácido poliláctico y una capa externa de alcohol polivinílico con tamaño de 4.06 – 5.1 μm y un potencial zeta de -34.6 ± 0.1 mV en ausencia de NPM's, microburbujas con inclusiones de magnetita hidrofóbica con tamaño de 4.13 – 5.2 μm y un potencial zeta de -38.1 ± 1.2 , y microburbujas con inclusiones de ferrita de cobalto hidrofóbica con tamaño de 4.40 – 5.6 μm y un potencial zeta de -35.1 ± 3.7 . Así mismo, se obtuvieron microburbujas con una capa interna de carbonato de polipropileno y una capa externa de alcohol polivinílico con tamaño de 5.30 – 5.6 μm y un potencial zeta de -39.9 ± 4.4 mV en ausencia de NPM's, microburbujas con inclusiones de magnetita hidrofóbica con tamaño de 2.00 – 2.6 μm y un potencial zeta de -39.8 ± 0.3 , y microburbujas con inclusiones de ferrita de cobalto hidrofóbica con tamaño de 5.17 – 6.6 μm y un potencial zeta de -40.8 ± 3.5 mV.

Finalmente, se llevó a cabo la correspondiente evaluación de la liberación de metotrexato a partir de los sistemas imitando condiciones fisiológicas. La cinética de liberación demostró que no existe diferencia significativa en la cantidad y rapidez de la liberación de metotrexato a partir de los sistemas poliméricos e híbridos por efecto de la composición de la fase interna de la microburbuja. La liberación es un proceso de difusión de metotrexato a partir de la capa de PVA de los sistemas y corresponde con lo esperado para matrices erosionables esféricas.

Para llevar a cabo la evaluación de la mejora en la capacidad de diagnóstico mediante ultrasonido, los sistemas fueron inyectados en un medio de referencia que contenía un espécimen de fruto de *Vitis vinifera* y se comparó el aumento en la escala media de grises producida en respuesta a una señal de ultrasonido en modo B a 8.5 MHz. Los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados demostraron un aumento en la respuesta ecogénica, así como una mayor resolución de las estructuras internas del fruto de *Vitis vinifera*; observando que los sistemas MBPLAFe y MBCPP0 aumentaron la respuesta y resolución de manera más efectiva.

Considerando las propiedades magnéticas de NPM obtenidas, las propiedades farmacéuticas como sistemas de liberación de metotrexato, y las propiedades mecánicas de los sistemas obtenidos se propone a las microburbujas magnéticas de MBCPPFe, MBCPP0 y MBCPPCo como aquellas más adecuadas como sistema teragnóstico basado en microburbujas magnéticas.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1. Aspectos generales del cáncer

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. La característica principal del cáncer es la proliferación acelerada de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir a diversos tejidos, en un proceso conocido como metástasis, siendo esta la principal causa de muerte por esta enfermedad.²⁻⁴

2.1.1. Etiología

En las células cancerígenas existe la desregulación de genes que produce una transformación maligna acompañada de la disrupción de información genética y la expresión de múltiples genes. Estos cambios aumentan la capacidad de supervivencia de las células malignas y alteran su capacidad de proliferación, llevando a la formación de tumores.²⁻⁴

El entorno en que se desarrolla un tumor carece de las condiciones normales reconocidas por la anatomía y fisiología. La proliferación celular y la secreción de factores angiogénicos contribuyen a la generación de tejido con poca o nula organización, altamente vascularizados y con una tasa de productos de eliminación extravascular exacerbada, pues la cantidad de factores angiogénicos en el entorno tumoral produce capilares desordenados, discontinuos y altamente fenestrados. El grado de penetración al endotelio del tejido y la permeabilidad vascular dependen del tipo de cáncer y de la etapa en que éste se encuentre.⁵

El ambiente extratumoral se encuentra congestionado con fibras de colágeno y glucosaminoglicanos en una distribución no homogénea de solutos, debido a esto el flujo intersticial se ve disminuido para la población celular, aumentando la presión osmótica del intersticio y la tasa de fármacos excretada al parénquima, dificultando la dosificación de fármacos antineoplásicos.^{5,6} La mayor parte de las muertes provocadas por cáncer son debidas al crecimiento de tumores que conducen a metástasis.²⁻⁴

2.1.2. Epidemiología

2.1.2.1. Cáncer en México

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial con cerca de 14 millones de casos nuevos anualmente, y un promedio de 8 millones de muertes anuales

durante la última década, siendo una enfermedad que afecta a todos los países del mundo como se muestra en la figura 1.

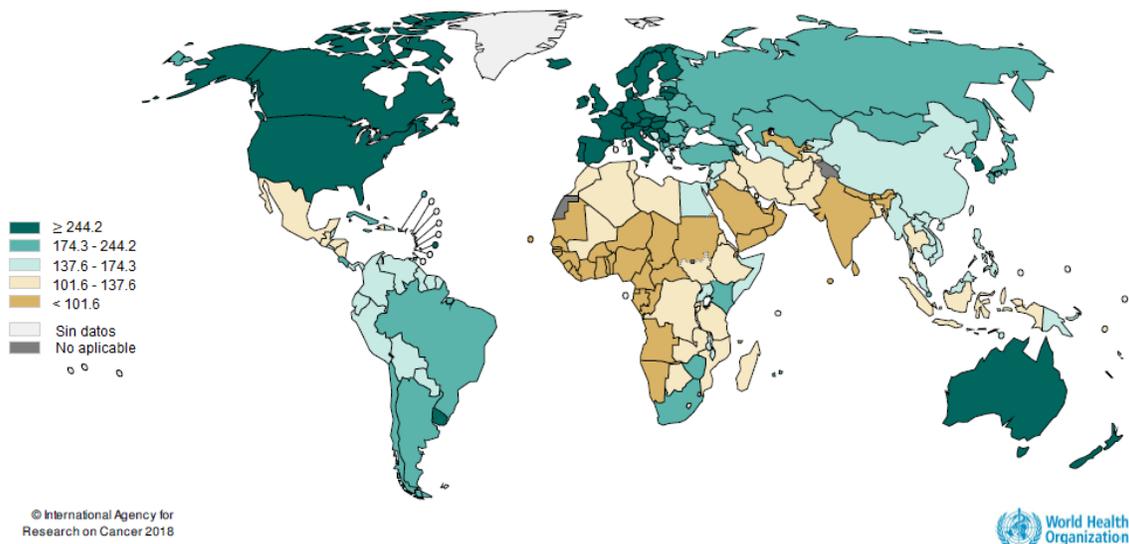


Figura 1. Tasa de morbilidad por 100 000 habitantes de todo tipo de cáncer excluyendo el cáncer de piel no melanoma para el año 2012.

En México se registran cerca de 160 mil casos de cáncer anualmente, con un total de fallecimientos por tumores malignos de 82 502 habitantes en el año 2016 según cifras del INEGI (“Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido, INEGI” el 07 de marzo de 2018) y su distribución se muestra en la figura 2;

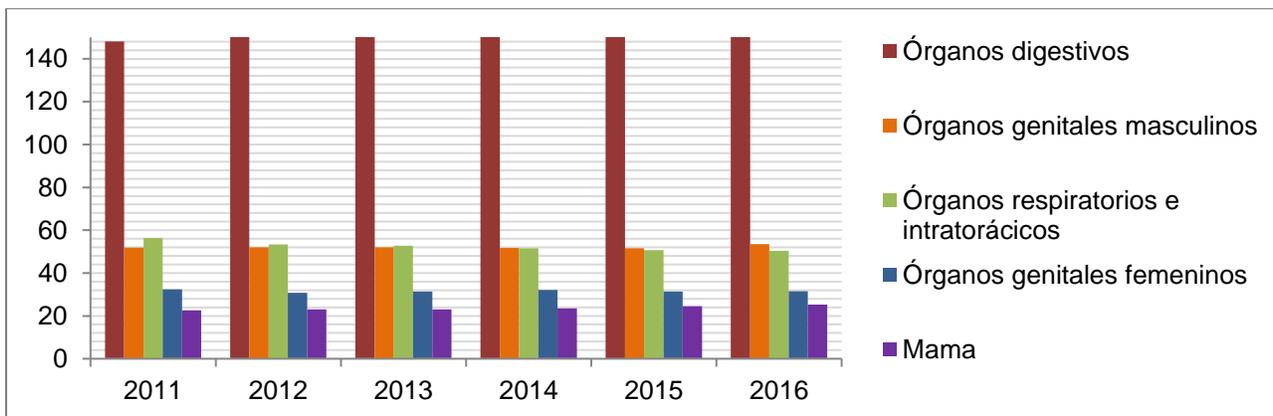


Figura 2. Tasa de mortalidad por tumores en México según su localización anatómica (Hombres y mujeres).

2.1.3. Métodos de diagnóstico

Las personas que padecen alguna neoplasia ven disminuida la esperanza y calidad de vida de manera proporcional al retraso del inicio del tratamiento, por ello las políticas públicas de la

OMS han sido dirigidas a la detección temprana del cáncer y al tratamiento en el menor tiempo una vez se ha realizado un diagnóstico positivo de algún tipo de cáncer.^{7,8}

2.1.3.1. Pruebas clínicas

Las concentraciones altas o bajas de ciertas sustancias en el organismo pueden ser un signo de cáncer, por lo que los análisis de sangre, orina, u otros fluidos del cuerpo pueden ayudar a los médicos a dar un diagnóstico. Sin embargo, aun cuando los análisis de laboratorio son una herramienta útil, estos métodos no son concluyentes en la determinación de neoplasias y sólo estudios de imagenología e histología se consideran concluyentes.^{7,8}

2.1.3.2. Biopsia

Una biopsia es un procedimiento en el que se extrae una muestra de tejido para luego ser examinada al microscopio para determinar si hay células cancerosas. La muestra puede obtenerse mediante agujas, endoscopio o cirugía, y se considera un método concluyente en el diagnóstico de neoplasias.^{7,8}

2.1.3.3. Imagenología

Las imágenes de los órganos internos son muy importantes para llevar a cabo una detección temprana de neoplasias, así como para poder llevar a cabo el seguimiento del progreso de la enfermedad durante el tratamiento. La imagenología ha experimentado un gran progreso tecnológico en años recientes, posibilitando exámenes más avanzados y detallados de la anatomía y fisiología de diversos tejidos. En ocasiones la fisiología y anatomía de los tejidos no permiten obtener la resolución adecuada de las estructuras estudiadas, por lo que se han desarrollado diversos medios de contraste que permiten mejorar la calidad del análisis para tener una mejor elucidación.⁹⁻¹¹

2.1.4. Tratamiento

El tratamiento de neoplasias tiene como finalidad la eliminación selectiva de células o tejidos cancerígenos antes de que ocurra la invasión de otros tejidos (metástasis). La mayor parte de los casos son tratados con una combinación de tratamientos entre los que destacan la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, también se han logrado avances importantes en la inmunoterapia, y la terapia hormonal. A pesar del aumento en la tasa de supervivencia de los pacientes se ha observado la necesidad de desarrollar no sólo tratamientos con mayor efectividad sino con menores efectos adversos, ya que gran parte de estos atacan tanto a las

células cancerígenas como a las células sanas. Es por ello que muchas terapias se realizan en forma conjunta, disminuyendo las dosis o facilitando procedimientos quirúrgicos.⁹⁻¹¹

2.1.4.1. Quimioterapia

La quimioterapia es un tipo de tratamiento que utiliza fármacos para detener o desacelerar el crecimiento de las células cancerígenas. Sin embargo, la mayor parte de tratamientos quimioterapéuticos tienen por mecanismo la interrupción de la síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas para disminuir la proliferación celular, por lo que no solo elimina las células cancerígenas, sino cualquier célula sana que se encuentre a su alcance. Esta situación ocasiona mayores daños en células sanas que poseen de manera natural una mayor velocidad de crecimiento y de división, tales como las células del tracto gastrointestinal, células epiteliales y foliculares, ocasionando los efectos adversos típicos entre lo que podemos encontrar la anemia, sangrado, alopecia, infección, náusea y vómito, neuropatía nerviosa y dolor.¹²

2.2. Metotrexato

El metotrexato es un fármaco antineoplásico análogo del ácido fólico que inhibe la enzima tetrahidrofolato deshidrogenasa, la cual es necesaria para la síntesis de timidilato en la duplicación de DNA.¹³ Ambas estructuras se muestran en las figuras 3 y 4:

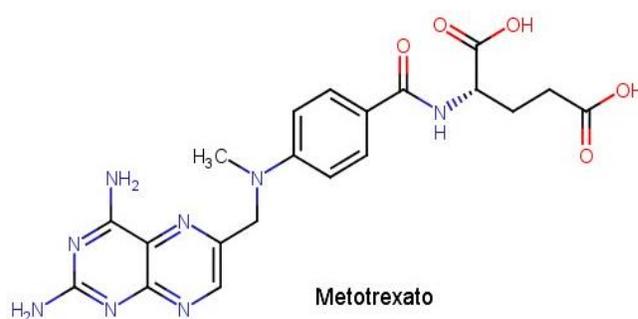
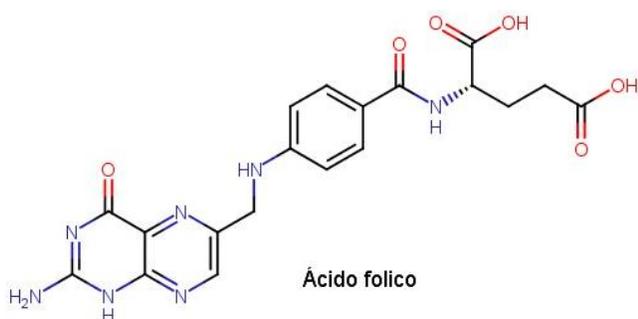


Figura 3. Estructura química del ácido fólico. Figura 4. Estructura química del metotrexato.

2.2.1. Indicación terapéutica

El metotrexato está indicado en el tratamiento de leucemia aguda linfocítica, coriocarcinoma gestacional, corioadenoma destruens y la mola hidatidiforme; así como en el tratamiento y profilaxis de leucemia meníngea. Es utilizado por sí mismo o en combinación en cáncer de mama, cáncer epidermoide de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, linfoma no Hodgkin. La dosis en adulto para el tratamiento de diversos tipos de cáncer es de 20 a 60 mg/m².¹³

2.2.2. Características biofarmacéuticas

En adultos la concentración plasmática máxima se alcanza entre una hora y dos después de la administración. Por vía oral a dosis de 30 mg/m² o menos, el metotrexato posee una biodisponibilidad del 60% mientras en dosis mayores de 80 mg/m², la absorción es menor debido a la saturación de receptores. El metotrexato es metabolizado en hígado y de manera intracelular a formas poliglutamadas que son convertidas de vuelta a metotrexato por las enzimas hidrolasas y actúan como inhibidores de la hidrofolato reductasa y la timidilato sintasa. La excreción renal es la principal ruta de eliminación. En la administración intravenosa 80-90% se elimina por orina en menos de 24 horas, y 10% por excreción biliar.¹³

2.2.3. Efectos adversos

La terapia con metotrexato está asociada a náusea, vómito, alopecia, mucositis, neumonitis, daño hepático, inmunosupresión, supresión de la médula ósea y toxicidad gástrica. DL50 = 43 mg/kg (Por vía oral en ratas).¹³

2.2.4. Características fisicoquímicas

En la tabla 1 se resumen algunas de las propiedades fisicoquímicas del metotrexato sódico:

Tabla 1 Características fisicoquímicas del metotrexato.¹³

Fórmula química	C₂₀H₂₂N₈O₅
Peso molecular	454.447 g/mol
Nombre IUPAC	Ácido (2S)-2-((4-(2,4-diaminoteridin-6-il) metil-metilamino) benzoil]amino)pentanodioico
Punto de fusión	195 °C
Solubilidad en agua	2600 mg/L
log P	-1.85
Permeabilidad en Caco-2	-5.92
pK_a (Ácido carboxílico)	3.41

2.3. Sistemas de liberación farmacéuticos

2.3.1. Sistemas convencionales de liberación de fármacos

La mayor parte de los sistemas farmacéuticos son formulados para liberar el principio activo inmediatamente después de la administración para obtener una absorción sistémica rápida y completa. Estos sistemas de liberación inmediata resultan en una rapidez de absorción

relativamente alta, dando inicio a los efectos farmacodinámicos acompañantes, sin embargo, después de darse la completa absorción del principio activo, las concentraciones plasmáticas comienzan a disminuir conforme al perfil farmacocinético del principio activo. Eventualmente las concentraciones plasmáticas llegan a ser menores a la concentración mínima efectiva (CME), lo que resulta en la pérdida de la actividad terapéutica. Durante un tratamiento farmacológico con formulaciones convencionales es necesaria la administración de una nueva dosis antes de alcanzar a la CME consiguiendo el efecto terapéutico durante la duración del tratamiento considerando que una dosis alta puede ocasionar efectos adversos si sobrepasa la concentración mínima tóxica (CMT).¹⁴

Una alternativa a este planteamiento es la administración de un sistema que provea de una liberación sostenida de principio activo, manteniendo las concentraciones plasmáticas en un tiempo mayor al provisto por los sistemas de liberación inmediata.¹⁵

2.3.2. Sistemas liberación modificada de fármacos

El término sistema de liberación modificada describe sistemas farmacéuticos que alteran el periodo de tiempo y/o espacio, y la rapidez con que es liberado un principio activo.¹⁵ Los sistemas de liberación modificada pueden clasificarse en:

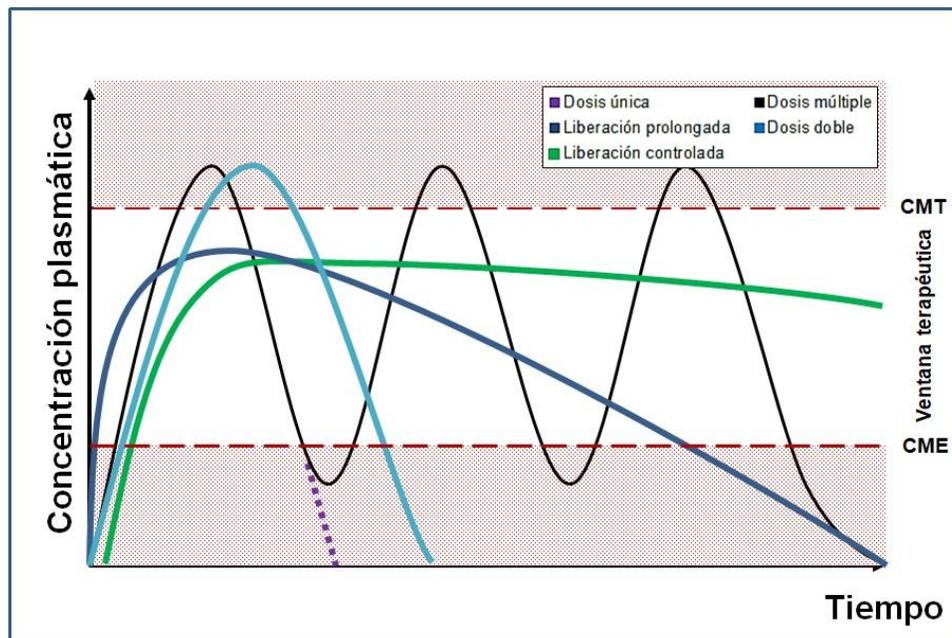
- Sistema de liberación controlada con respecto al tiempo: Permiten modificar la frecuencia de dosificación; estos sistemas incluyen a los sistemas de liberación prolongada, los sistemas de liberación retardada, y los sistemas de liberación acelerada.
- Sistemas de liberación dirigida a un sitio específico: Permiten la liberación de una cantidad de fármaco en un sitio o tejido específico, evitando la toxicidad ocasionada por la distribución no selectiva de fármaco a través del cuerpo. El direccionamiento del sistema farmacéutico puede darse mediante el acoplamiento a moléculas reconocidas por moléculas endógenas, debido a las modificaciones fisiológicas y anatómicas en el tejido enfermo, o mediante la selección de la vía de administración.¹⁶
- Sistemas de liberación sensible a estímulos: Permiten la liberación de fármaco en respuesta a su entorno, por ejemplo, las modificaciones en pH, temperatura, fuerza iónica, presión, o campo magnético.

En los últimos años se han realizado diversos avances en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos siendo capaces de regular la cantidad de fármaco liberada,

manteniendo la duración de acción terapéutica, y/o haciendo específico el tejido o sitio de liberación.¹⁵ Estos avances han llevado al desarrollo de muchos medicamentos con uno o varios de los siguientes beneficios:

- Liberación controlada de la cantidad de fármaco a un tiempo deseable.
- Control de la concentración de fármaco dentro de la ventana terapéutica.
- Maximización de la eficacia en la relación dosis-respuesta.
- Reducción de los efectos adversos.
- Minimización de la frecuencia de dosificación
- Aumento en la comodidad del paciente, asegurando una mayor adhesión al tratamiento.

El esquema 2 representa el curso temporal de la concentración plasmática de un mismo fármaco administrado por distintos sistemas farmacéuticos:



Esquema 2. Representación hipotética de la concentración plasmática de fármaco para distintos sistemas de liberación. Las regiones en rojo consideran la ineficacia terapéutica (región inferior) y la dosis tóxica de fármaco (región superior).^{14,15}

2.3.3. Sistemas teragnósticos

Los sistemas teragnósticos se caracterizan por su actividad dual en el tratamiento y diagnóstico; con el desarrollo de estos sistemas se busca ser capaz de monitorear el avance de un padecimiento y proveer de una terapia en el mismo momento. De este modo, se reduce el tiempo de retraso en la administración de un tratamiento, facilitando el cuidado del paciente,

llevando un control de manera individual del régimen de dosificación.¹⁰ Los sistemas teragnósticos incluyen (pero no se limitan) sistemas de liberación farmacéuticos acoplados a biomarcadores de diagnóstico molecular, sondas de imagenología y de técnicas de detección temprana, así como plataformas que incorporan sistemas de contraste y componentes terapéuticos.¹⁰

2.4. Agentes de contraste para diagnóstico clínico

Los agentes de contraste permiten la diferenciación de tejidos adyacentes a estructuras con una alta similitud de respuesta en los análisis por imagenología y son utilizados para obtener una mayor certeza por los profesionales de la salud en la determinación de alteraciones anatómicas, morfológicas y/o fisiológicas.¹⁷⁻¹⁹

2.4.1. Agentes de contraste para ultrasonido (US)

El principio básico de los agentes de contraste ultrasónicos es la creación de muchas interfases pequeñas con alta ecogenicidad, lo que puede ser alcanzado usando microburbujas gaseosas. Para incrementar la estabilidad de las mismas en la sangre y alcanzar un tamaño estandarizado, éstas son recubiertas por una capa biocompatible.

En una microburbuja con tamaño de 1-15 μm cuando las ondas sonoras generadas por el ultrasonido chocan, éstas son reflejadas desde la superficie, en un fenómeno conocido como dispersión retrógrada. Las ondas sonoras dispersas tienen la misma longitud de onda de las ondas sonoras emitidas, por lo que se reconoce una conducta lineal de dispersión retrógrada. Sin embargo, cuando la presión debido a las ondas sonoras incrementa, las conductas no lineales de las microburbujas se vuelven muy prominentes. Inicialmente comienzan a oscilar, enviando hacia afuera oscilaciones armónicas, y después que la presión aumenta las microburbujas se vuelven inestables y comienzan a fracturarse hasta finalmente romperse, donde envían una señal de alta energía (emisión acústica estimulada, EAS). Durante la oscilación, las microburbujas producen una señal de eco no lineal debido a que la compresión de las microburbujas contra la presión del contenido de gas interior es menor que su expansión y permitiendo su detección por la sonda ultrasónica.^{18,20}

Las desventajas generales del ultrasonido han sido reconocidas por diversos investigadores.

- Los tejidos estudiados pueden presentar una propagación del ultrasonido atenuada por tejidos circundantes tales como el tejido adiposo o el tejido óseo, y no es posible que el

ultrasonido sea aplicado sin agente de contraste a la obtención de imágenes en pulmón debido a que el aire dentro de este órgano impide la propagación de ondas sonoras.

- La obtención de imágenes es dependiente del operador y su experiencia; un sonógrafo puede obtener imágenes con alta calidad mientras que un operador con entrenamiento insuficiente podría obtener resultados no concluyentes.
- El campo de visión obtenido en un equipo de ultrasonido es relativamente pequeño, típicamente, no más de 20 – 30 cm y solo unos pocos centímetros a una resolución espacial mayor. Normalmente, se obtienen imágenes de la sección transversal.

Al llevar a cabo una comparación del diagnóstico a través de ultrasonido mejorado por medios de contraste con técnicas que son consideradas más confiables, como la MRI y la tomografía computacional, se ha demostrado una eficacia de diagnóstico con el mismo nivel de confianza a través de un procedimiento de menor costo. Mediante un análisis costo-beneficio se considera que el ultrasonido mejorado por medios de contraste supone una opción más adecuada que el uso de técnicas como la resonancia magnética o la tomografía computarizada, por lo que se ha optado por el desarrollo de medios de contraste para ultrasonido que sean asequibles en la producción a gran escala y que posean altas propiedades ecogénicas.¹⁷

2.4.2. Resolución en imagenología por ultrasonido

Para obtener imágenes óptimas por medio de ultrasonido debemos considerar dos aspectos básicos en la obtención de datos: la resolución espacial lateral y la resolución espacial axial.^{18,21}

La resolución espacial axial es la distancia mínima en que se pueden diferenciar dos puntos entre dos reflectores localizados de manera paralela a la dirección de la onda ultrasónica y es igual a la mitad de la frecuencia en que se genera el pulso ultrasónico. Los transductores de mayor frecuencia cuentan con materiales piezoeléctricos más pequeños que generan una menor longitud de pulso.

La resolución espacial lateral es la distancia mínima que puede ser distinguida entre dos reflectores localizados de manera perpendicular a la dirección de la onda ultrasónica. La resolución espacial es alta cuando el ancho del haz de onda es estrecho, y los factores que modifican el ancho del haz de onda son:

- En el transductor el ancho del haz de onda es igual al ancho del transductor.
- El haz converge a su mínimo ancho (la mitad del ancho del transductor) a una distancia denominada longitud de zona cercana.
- Al aumentar la distancia más allá de la longitud de zona cercana el haz diverge de manera al doble de la longitud de onda cercana es el ancho del transductor.

La resolución espacial lateral es mayor cuando la longitud de zona cercana incrementa pues hay una mayor incidencia del haz sobre la muestra y está dado por la ecuación 1:

$$\text{Longitud de zona cercana} = \frac{\text{Diámetro de la sonda}^2}{4 * \text{Longitud de onda}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Considerando lo anterior la mejor resolución espacial lateral se obtiene cuando²¹:

- Se trabaja con sondas de mayor frecuencia (menor longitud de onda)
- Las sondas están compuestas por materiales piezoeléctricos pequeños con mayor amortiguación (sondas de alta frecuencia)
- Las sondas tienen una mayor apertura (más anchas)

2.4.3. Agentes de contraste para resonancia magnética de imagen (MRI)

Mientras algunos análisis como los rayos X y las tomografías computarizadas permiten la detección de diferencias anatómicas mediante la diferencia en densidad electrónica de los elementos que conforman los tejidos estudiados la MRI evalúa la disposición de protones. En la MRI se hace incidir un campo magnético que alinea los spines de los protones de manera paralela o antiparalela al campo, con este alineamiento ocurre una precesión a una frecuencia específica, denominada frecuencia de Larmor. Cuando se introduce una frecuencia de resonancia en el núcleo, dentro del intervalo de la radiofrecuencia (RF), los protones absorben energía y son excitados al estado antiparalelo; una vez desaparece el pulso de RF el núcleo vuelve a su estado basal. Existen dos vías para que un núcleo vuelva a su estado basal:

- Relajación longitudinal (T1): Disminuye la magnetización neta volviendo al estado basal.
- Relajación transversal (T2): Se magnetiza el plano perpendicular y la magnetización disminuye por desfase con el spin nuclear.

Sin embargo, debido a los costos de los equipos, instalaciones y personal médico calificado, esta técnica de diagnóstico solo es asequible para personas con altos ingresos económicos o

sistemas de salud de países considerados como de primer mundo por una baja disponibilidad de equipos, la necesidad de infraestructura costosa para su mantenimiento y la necesidad de personal altamente especializado para su uso.¹⁷

La relajación de un núcleo alrededor de un centro paramagnético ($1/T_{obs}$) depende de dos términos, de la tasa de relajación diamagnética correspondiente al disolvente en ausencia del soluto paramagnético ($1/T_{i,d}$) y la tasa de relajación de la sustancia paramagnética ($1/T_{i,p}$) y se describe en la ecuación 2:

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}} \quad i = 1,2 \quad \text{Ecuación 2}$$

La contribución paramagnética es linealmente proporcional a la concentración de especies paramagnéticas $[M_p]$ como se muestra en la ecuación 3:

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i [M_p] \quad i = 1,2 \quad \text{Ecuación 3}$$

La relajación paramagnética de los protones de agua se origina debido a las interacciones dipolo-dipolo entre los espines protónicos y la fluctuación del campo magnético ocasionada por los espines de los electrones desapareados de la sustancia paramagnética.²²

2.4.4. Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas han demostrado un gran potencial en la liberación de fármacos debido a su capacidad de funcionalización de la superficie que permite llevar a cabo la adsorción de cantidades relativamente alta de fármacos. Estas partículas de menos de 100 nm son empleadas bajo el estímulo de un campo magnético, pero no es sino hasta un tamaño crítico (aproximadamente tamaños menores a 20 nm)²³ que muestran comportamientos superparamagnéticos. Es debido a esta propiedad que se han desarrollado sistemas magnéticos nanométricos para uso en la terapia por hipertermia magnética, como sistema de vectorización, como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen, como agente de contraste vascular, en la ingeniería de tejidos, separación de células, o como sistemas teragnósticos.

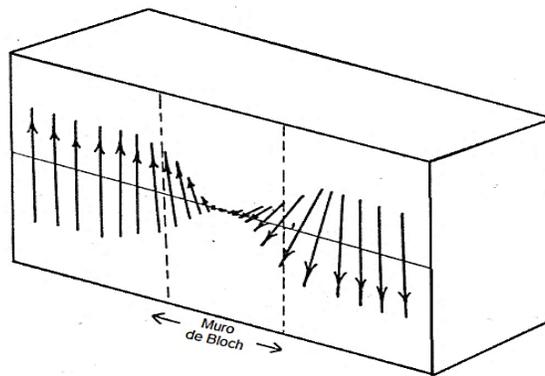
2.5. Magnetismo

El magnetismo es un fenómeno físico de los imanes y las corrientes eléctricas de ejercer acciones a distancia, tales como atracciones y repulsiones mutuas, mediado por campos magnéticos, la intensidad de corriente, y momentos magnéticos. El magnetismo es debido a la

composición de la materia por partículas subatómicas cargadas en movimiento y su vector es descrito mediante el momento magnético \mathbf{m} .²⁴

2.5.1. Teoría de dominios

Una propiedad de los materiales ferromagnéticos es poseer una baja magnetización espontánea, la cual puede ser aumentada por la aplicación de campos magnéticos bajos. Lo que permite que este fenómeno ocurra es la composición de los materiales por regiones pequeñas denominadas dominios, donde la magnetización local se encuentra saturada pero no necesariamente paralela, los dominios se encuentran separados por los llamados muros de Bloch, las cuales son un volumen estrecho de transición entre dos dominios magnéticos como se representa en el esquema 3, y su momento magnético total es igual a cero en ausencia de un campo magnético externo; cuando esto ocurre se considera que se tiene un material con multidominios magnéticos.²⁵



Esquema 3. Representación de la transición del momento magnético en el muro de Bloch en un material con multidominios magnéticos.²⁵

Cuando un material alcanza un tamaño crítico, en orden nanométrico, no existe la posibilidad de formar transiciones entre dominios, es decir, se obtienen partículas con momentos magnéticos independientes, y se denominan monodominios magnéticos. Diversos investigadores han demostrado y hecho uso de la modificación de las propiedades magnéticas de acuerdo al tamaño de partícula, mediante la síntesis de nanopartículas que actúan como monodominios magnéticos como se muestra en la figura 5.²⁶⁻³³

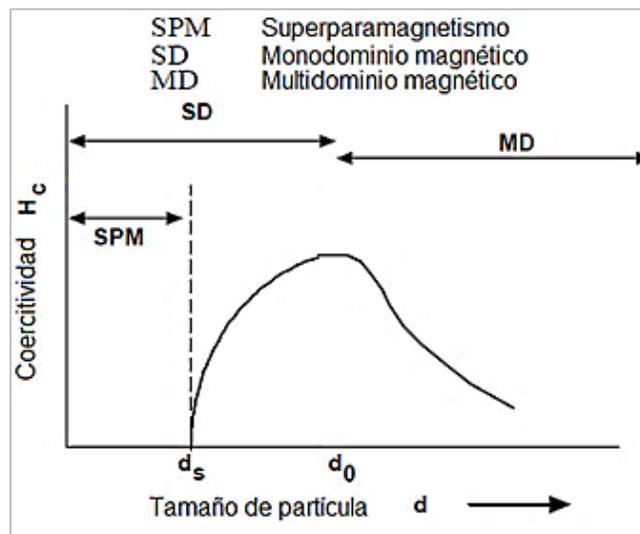
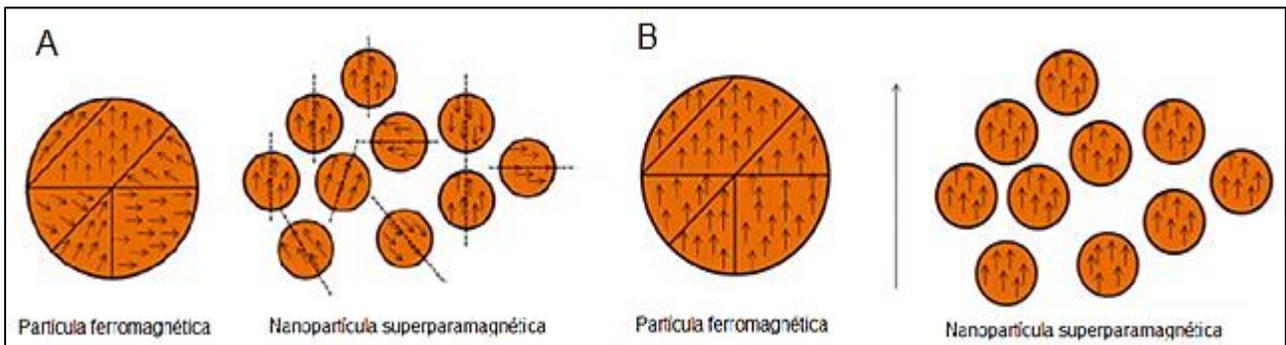


Figura 5. Dependencia la coercitividad magnética conforme a la teoría de dominios.^{23,30}

Debido a este fenómeno es que los materiales ferrimagnéticos, como la magnetita, en partículas de tamaño nanométricos muestran un comportamiento superparamagnético en presencia de campos magnéticos de baja intensidad como se muestra en la figura 11:



Esquema 4. Momento magnético de un multidominio magnético y monodominios magnéticos en ausencia (A) y presencia (B) de un campo magnético impuesto.³⁰

2.5.2. Métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas de óxidos de metales de transición

a) Coprecipitación

La coprecipitación es un método de síntesis donde la adición de hidróxidos en la presencia de iones de metales de transición en solución acuosa produce la formación de óxidos de los metales en las proporciones estequiometrias adecuadas. La coprecipitación es el método de mayor preferencia debido a la facilidad en que se llevan a cabo estas reacciones, siendo convenientes para la síntesis de partículas de magnetita esférica a tamaño nanométrico. Este método se prefiere, debido a que requiere una baja temperatura, se lleva a cabo en cortos

tiempos y no es necesario utilizar solventes orgánicos. Además, es posible controlar la morfología y composición de nanopartículas mediante la concentración de iones, la estequiometría de los iones, la temperatura de reacción, el pH y la fuerza iónica.³⁴

b) Microemulsiones

Las microemulsiones son ampliamente utilizadas para la síntesis de partículas con tamaño uniforme en una emulsión agua en aceite (w/o). En este método de síntesis se utilizan agentes tensoactivos para generar estructuras de tamaños nano o micrométricos, dentro de las cuales se dará la reacción de síntesis, de esta manera se logra mantener el tamaño de partícula con una baja dispersión. La formación de precipitados es controlada por la proporción y composición de la fase acuosa, la fase oleosa y tensoactivos en el medio, así como por la temperatura en que se lleva a cabo la asociación de los componentes.^{34,35}

c) Descomposición térmica (Síntesis solvotermal)

El término “proceso hidrottermal/solvotermal” se define como la ejecución de reacciones químicas en solventes contenidos dentro de recipientes sellados en los cuales se aumenta la temperatura con un incremento en la presión autógena. Se considera hidrottermal si el disolvente en que se lleva a cabo es agua. La síntesis por el método solvotermal es un proceso de cristalización en solución que involucra dos pasos: la nucleación de cristales y su crecimiento subsecuente; mediante la modificación de la temperatura, pH, concentración de reactivos y aditivos se obtienen distintos tamaños, formas, grados de cristalinidad y funcionalizaciones de superficie.^{34,36} La nucleación ocurre cuando la solubilidad del soluto excede su límite en la solución, siendo una reacción irreversible el soluto precipita en cristales. Una vez se da la nucleación hay un transporte de núcleos, el acoplamiento de los mismos a la superficie para darse el crecimiento.³⁷

2.5.3. Magnetita y ferrita de cobalto

La magnetita es un óxido mixto de fórmula Fe_3O_4 , donde el oxígeno forma la red cúbica tipo espinela $\text{Y}[\text{XY}]\text{O}_4$, $\text{X}=\text{Fe}^{+2}$ y $\text{Y}=\text{Fe}^{3+}$, donde los corchetes denotan los sitios octaédricos (32 espacios) y los restantes los sitios tetraédricos (64 espacios). Su estructura es cúbica con dimensiones de celda de 8.3958 Å, con una densidad de 5.18 g*cm⁻¹ y una dureza de 5 ½ en escala de Mohs.³⁸ En la estructura de espinela el momento magnético del catión divalente y los 10 μB de los cationes trivalentes en los sitios octaédricos originan el momento resultante.

La figura 6 representa la estructura cristalina de magnetita y ferrita de cobalto en sus disposiciones posibles:

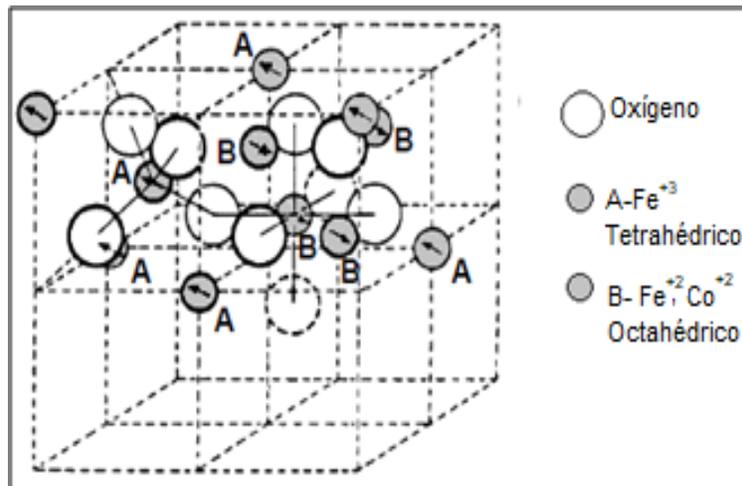


Figura 6. Estructura cristalina de la magnetita y ferrita de cobalto en disposición tetrahédrica (A) y disposición octahédrica (B).^{38,39}

La ferrita de cobalto es un compuesto conformado por óxidos de hierro de fórmula CoFe_2O_4 , donde el oxígeno forma la red cúbica tipo espinela inversa $\text{Y}[\text{XY}]\text{O}_4$, $\text{X}=\text{Co}^{+2}$ y $\text{Y}=\text{Fe}^{3+}$. Su estructura es cúbica con dimensiones de celda de 8.3783 \AA y con una densidad de $6.22 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ y una dureza de $6 \frac{1}{2}$ en escala de Mohs.³⁹

La magnetita es un material altamente magnético, además de ser biocompatible y biodegradable, por ello es que muchas investigaciones han utilizado este material en el desarrollo de sistemas farmacéuticos sensibles a estímulos magnéticos.^{38,39} A pesar de ello una limitante del uso de la magnetita ha sido la poca estabilidad que posee el material ante la oxidación en condiciones normales de almacenamiento llevando a la formación de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{3+}_{2/3}\text{A}_{1/3}]\text{O}_4$), por lo que algunos investigadores han preferido llevar a cabo la modificación de este material a fin de obtener sistemas más estables como es el caso de ferrita de cobalto. La ventaja especial del uso de ferrita de cobalto es su mayor estabilidad, los estados de oxidación $+2$ en el cobalto y $+3$ en el hierro forman una estructura especialmente estable, impidiendo la oxidación en estos materiales, conservando sus propiedades magnéticas durante mayores periodos de tiempo.⁴⁰⁻⁴³

Las propiedades magnéticas calculadas y experimentales de diversos óxidos de hierro se muestran a continuación en la tabla 2:

Tabla 2. Propiedades magnéticas de algunas ferritas.^{40,41,43}

Ferrita	T _c (K)	Momento magnético (μ _B) Calculado	Momento magnético (μ _B) Experimental	Saturación magnética (M _s)
Fe ³⁺ [Fe ²⁺ Fe ³⁺]O ₄	858	4	4.1	480
Fe[NiFe]O ₄	858	2	2.3	270
Fe ³⁺ [Fe ³⁺ Fe ³⁺ _{2/3} A _{1/3}]O ₄	-	2.5	2.3	78
Fe[CoFe]O ₄	793	3	3.7	425
Fe[CuFe]O ₄	726	1	1.3	135
Mn[Fe ₂]O ₄	573	5	4.6	400
Zn[Fe ₂]O ₄	9	0	0	0

La letra A representa cambios para la maghemita a Fe³⁺ en la estructura cúbica donde residían Fe²⁺.

2.6. Agentes de contraste para ultrasonido

2.6.1. Microburbujas

Las microburbujas (esferas gaseosas con diámetro menor o igual a 10 μm) han demostrado ser sistemas dispersos capaces de mejorar la señal ecogénica en el ultrasonido mediante la generación de múltiples interfases de diámetros micrométricos dispersados en el seno de un líquido.^{17,20,44,45}

Cuando las ondas sonoras chocan con la superficie de las microburbujas son reflejadas en un proceso conocido como dispersión retrógrada; las ondas sonoras reflejadas tienen la misma longitud de onda que las ondas que son incididas y se considera como la conducta lineal de las microburbujas.¹⁸ Las microburbujas son agentes que reflejan de manera altamente efectiva la dispersión retrógrada aumentando la intensidad de la señal en más de 30 dB, lo que corresponde a un factor de x1000 en la intensidad de sonido recibida.^{18,46} Sin embargo, cuando la presión acústica se incrementa la reflexión de las ondas deja de ser lineal debido a la oscilación de las microburbujas, inicialmente en oscilaciones armónicas

La compresión del gas dentro de las microburbujas es menor a la expansión durante la fase de baja presión acústica, lo que provoca que la fluctuación en el diámetro de las burbujas sea asimétrica dando respuestas no lineales a la reflexión acústica como se muestra en la figura 7:

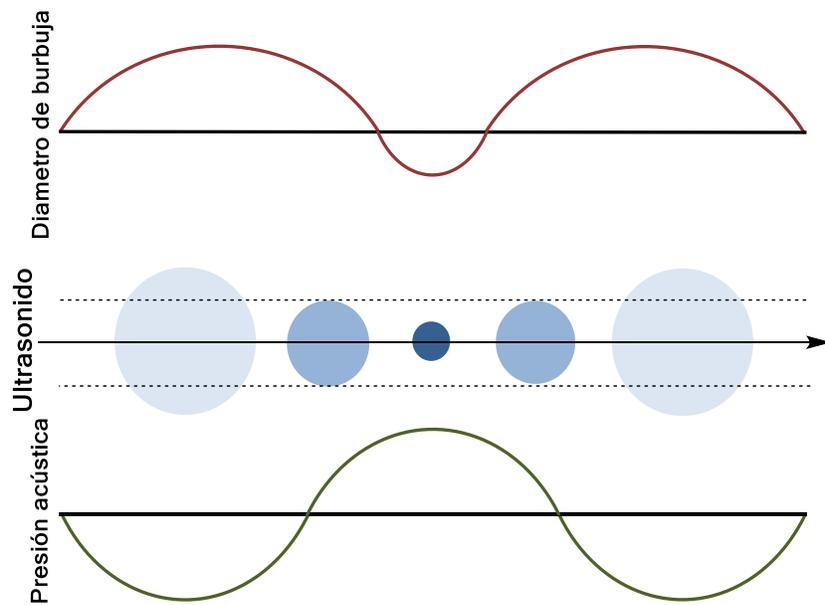


Figura 7. Oscilación de una microburbuja en presencia de un campo ultrasónico.

La compresión del gas ejerce una fuerza de resistencia en la microburbuja de manera proporcional a la disminución en su tamaño de tal forma que la incidencia de ondas acústicas provoca la oscilación del diámetro de las microburbujas de forma espontánea en función de la ecuación de Rayleigh-Plesset (Ecuación 4):

$$\frac{p_B(t) - p_\infty(t)}{\rho_L} = R \frac{d^2R}{dt^2} + \frac{3}{2} \left(\frac{dR}{dt} \right)^2 + \frac{4\nu_L}{R} \frac{dR}{dt} + \frac{2\sigma}{\rho_L R} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde $p_B(t)$ es la presión en el interior de la burbuja, $p_\infty(t)$ es la presión externa en el fluido a una distancia infinita, ρ_L es la densidad del líquido que rodea a la burbuja, $R(t)$ es el radio de la burbuja, ν_L es la viscosidad cinemática del fluido que rodea a la burbuja y σ es la tensión superficial de la burbuja.⁴⁷ Considerando que no existe cambio en $p_\infty(t)$ y ρ_L para un sistema adiabático la oscilación en el diámetro genera presión sobre la superficie de la microburbuja, provocando un proceso de cavitación.

La evolución de un radio inicial equivalente al radio en ausencia de ultrasonido R_0 , hasta un radio R , cuando la presión del líquido, inicialmente p_∞ , decrece a un valor $p_\infty - p_a$. Se asume que la evolución es lo suficientemente lenta para que el gas siga una modificación isotérmica como se muestra en la ecuación 5:

$$p_L = p_\infty - p_a = \left(p_\infty - p_v(T_0) + \frac{2\sigma}{R_0} \right) \left[\frac{R_0}{R} \right]^3 + p_v(T_0) - \frac{2\sigma}{R} \quad \text{Ecuación 5}$$

Entonces existe un extremo local cuando $p_L = p_\infty - p_a^c$. Al valor p_a^c se le denomina umbral de Blake, pues si la presión en el líquido es inferior al valor crítico $p_L < p_\infty - p_a^c$ no existe un radio de equilibrio para la burbuja y físicamente se observa el fenómeno de cavitación, la figura 8 muestra la relación entre el radio de una burbuja y la presión al interior generada por el gas contenido.^{48,49}

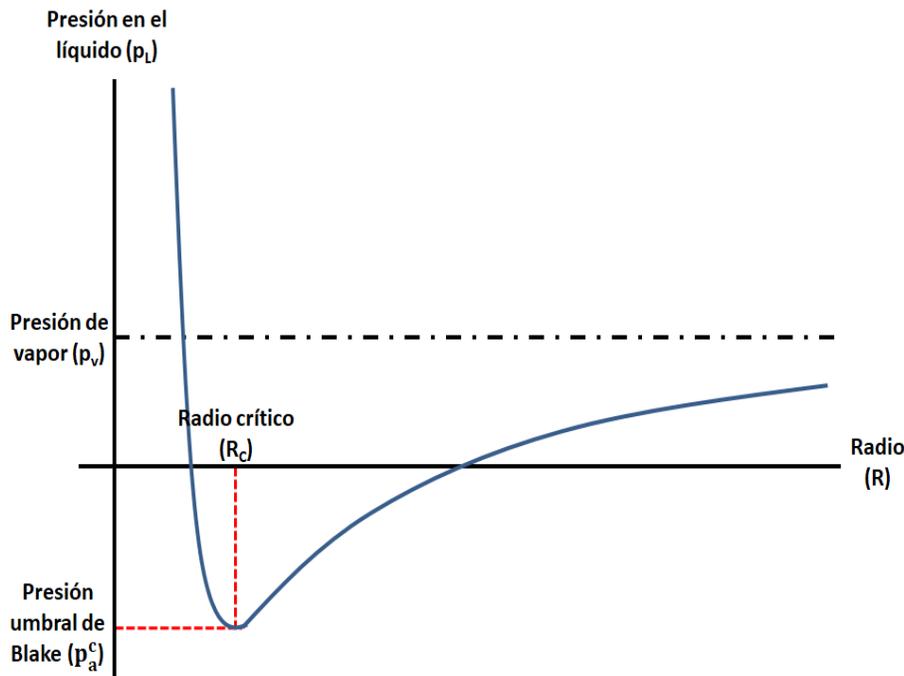


Figura 8. Relación radio (R) contra presión (p) para una burbuja en un líquido por efecto de ondas acústicas.

Cuando las burbujas existen con un radio menor al radio crítico estas son estables, sin embargo, cuando $R > R_c$ se presenta la cavitación de la burbuja, lo que, en un medio de contraste para ultrasonido resulta en la disminución de la respuesta ecogénica hasta alcanzar concentraciones por debajo del umbral de detección. La ecuación 6 muestra el valor de radio crítico como se muestra en la ecuación 6:

$$R_0 = \frac{\sigma}{3(p_L - p_a^c)} \quad \text{Ecuación 6}$$

Considerando el cambio en el radio de la burbuja por la incidencia de las ondas acústicas la presión ejercida es capaz de ocasionar la cavitación de los sistemas una vez que la presión que ejerce el gas en su interior sobre la microburbuja ha superado la tensión interfacial (o la resistencia mecánica para microburbujas sólidas) o el aumento del radio de la microburbuja sobrepasa el radio crítico.

2.6.2. Estabilidad de microburbujas

La desventaja de estos agentes de contraste es su falta de resistencia a los gradientes de presión arterial y a la inducción de ondas acústicas que ejercen una presión en las microburbujas que ocasionan su cavitación y ruptura.⁵⁰ La figura 9 muestra la presión de perfusión a que soportan las microburbujas durante su recorrido en el sistema circulatorio.

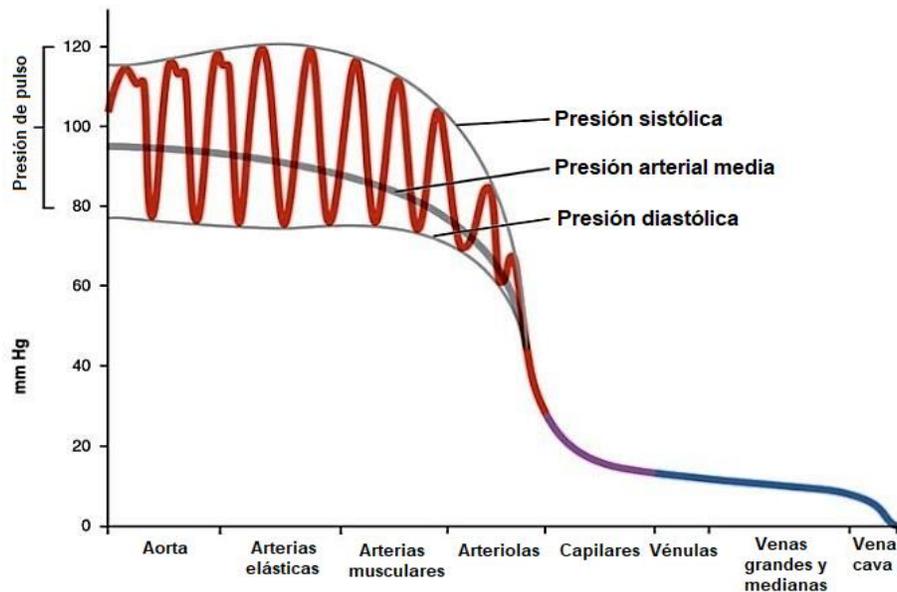


Figura 9. Presión de perfusión sanguínea en distintos segmentos del sistema circulatorio.

La distribución de tamaño debe considerarse como un factor crítico en la estabilidad de las microburbujas, su comportamiento *in vivo*, y su respuesta acústica.⁵¹ Debe considerarse que en el sistema circulatorio no es posible llevar a cabo la inyección de burbujas con tamaño de 0.1-1 mm, ya que estos impedirían la adecuada vascularización de los tejidos, siendo capaces de generar una embolia. Considerando que las microburbujas con tamaños micrométricos presentan una alta ecogenicidad en el ultrasonido (suficiente para modificar de manera significativa la detección visual de estructuras), se consideran sistemas de contraste óptimos.¹⁸

Las microburbujas con tamaños menores a 10 μm pueden viajar a través de la microvasculatura de los pulmones con el flujo de sangre mediante la administración intravenosa y pasar al ventrículo izquierdo para luego permitir su paso por el músculo cardíaco realizando una perfusión miocárdica. Las microburbujas con tamaños cercanos o menores a 1 μm no presentan una gran respuesta ecogénica.^{52,53} La proporción superficie-volumen es mucho mayor en burbujas de menor tamaño, por lo que tienden a perder el gas encapsulado con mayor rapidez durante su paso por el torrente sanguíneo y durante los eventos

destruyentes en el análisis por ultrasonido (a menor tamaño de microburbuja una misma intensidad de ultrasonido destruye un mayor número de las mismas).⁵⁴

Al evaluar un método de síntesis para estos sistemas de contraste debe buscarse la disminución de distribución de tamaño de partícula, donde sus límites inferior y superior deben de permitir el paso libre a través de capilares en todos los tejidos, pero de tamaño suficiente para producir una alta respuesta ecogénica.⁵¹⁻⁵³

La formación de imágenes de alta resolución requiere utilizar sondas que generen ultrasonido de mayor frecuencia, sin embargo, cuando la potencia de las ondas es muy alta existen efectos mecánicos sobre el tejido analizado, llegando a dañar estructuras celulares. La FDA determinó necesario la consideración de un parámetro que indicara los potenciales efectos causados por la cavitación en estructuras biológicas, por lo que todos los equipos de ultrasonido a partir de 1992 cuentan con un parámetro denominado índice mecánico y se determina según la ecuación 7.⁵⁵

$$\text{Índice mecánico (MI): } P^{-}(\text{MPa}) / f(\text{MHz}) \quad \text{Ecuación 7}$$

Así mismo los efectos mecánicos del ultrasonido sobre los tejidos modifican la permeabilidad de fármaco sobre el tejido incidido, y Sorace *et al.* determinó que un índice mecánico igual a 1 es óptimo para aumentar la permeabilidad de un marcador hidrofílico en células cancerígenas.⁵⁶

La incidencia de ondas de mayor frecuencia (máxima resolución) pero con un índice mecánico igual a 1 (mayor permeación de fármaco) requiere de microburbujas con una alta resistencia mecánica y con alta capacidad de deformación por efecto de la rarefacción (considerando el radio crítico del umbral de Blake) para evitar la cavitación siendo estables durante el mayor tiempo de incidencia del ultrasonido.

2.6.3. Propiedades de un agente de contraste ideal basado en microburbujas

Los agentes de contraste para ultrasonido utilizados en la práctica clínica requieren cumplir con una serie de características para poder ser considerados seguros, algunos ejemplos son:

- Un agente de contraste debe ser inocuo para los pacientes, es decir, no debe haber efectos adversos en el paciente a la dosis de uso normal.
- Debe estar compuesto por materiales biodegradables y biocompatibles.

- Deben presentar periodos cortos de permanencia dentro del cuerpo humano.

Sin embargo, la eficiencia de estos agentes de contraste requiere consideraciones no únicamente de su composición sino del mecanismo de respuesta ante el ultrasonido de estos. Idealmente la cubierta debe tener características de flexibilidad que permitan el paso a través de capilares, además de limitar de manera mínima la vibración de las microburbujas en presencia de ultrasonido para generar las señales de eco, al mismo tiempo debe ser impermeable a la transmisión del gas desde interior a fin de aumentar la estabilidad de las microburbujas. En contraposición, debe presentar una alta resistencia a la ruptura por efecto de la presión hidrostática y la presión generada dentro de la burbuja durante la fase de presión negativa del ultrasonido.⁵⁷

Existen diversos métodos de síntesis entre los que destacan la sonicación, la formación de emulsiones en sistemas de alto corte, la formación de membranas por emulsión, la impresión de inyección de tinta, la atomización electrohidrodinámica y la formación mediante microfluidica.^{58,59} La síntesis de microburbujas por el método de doble emulsión genera microburbujas con una doble capa polimérica lo que resulta en propiedades mecánicas dependientes de dos distintos polímeros, propiedades de permeación de gas, y que permite la incorporación de fármacos de naturaleza hidrofóbica e hidrofílica. La tabla 3 muestra algunas propiedades de los polímeros más utilizados en la fase interna en la síntesis por doble emulsión.:

Tabla 3. Propiedades de algunos de los posibles polímeros utilizados en la síntesis de microburbujas mediante el método de doble emulsión.⁶⁰⁻⁶²

Material	Módulo de Young (MPa)	Fuerza tensil de ruptura (MPa)	Elongación de ruptura (%)	Precio MXN/g
Ácido poli-(L)-láctico (PLA) Mn 50,000	3500	50.0	6	1187.80
Poli-ε-caprolactona (PLC) Mn 45,000	1200	10.0	300	15.88
Carbonato de polipropileno (CPP) Mn 50,000	830	21.2	330	51.99

*Los precios reportados son calculados considerando el catálogo en menudeo de Sigma-Aldrich con el envase de mayor tamaño.

Las propiedades del carbonato de polipropileno muestran ser una propuesta con mayor flexibilidad y menor limitación de la vibración –(menor módulo de Young), pero manteniendo la

mayor resistencia a la ruptura por efecto de la presión hidrostática (media fuerza tensil de ruptura) y la presión generada dentro de la burbuja durante la fase de presión negativa del ultrasonido (mayor porcentaje de elongación de ruptura) a un costo asequible.

2.6.4. Cinética de detección de microburbujas magnéticas como medio de contraste en ultrasonido

Los medios de contraste de ultrasonido son administrados en la región a estudiar por lo que su cinética en un organismo se asemeja a la farmacocinética de sistemas de liberación de fármacos inyectables convencionales como se muestra en la figura 9:

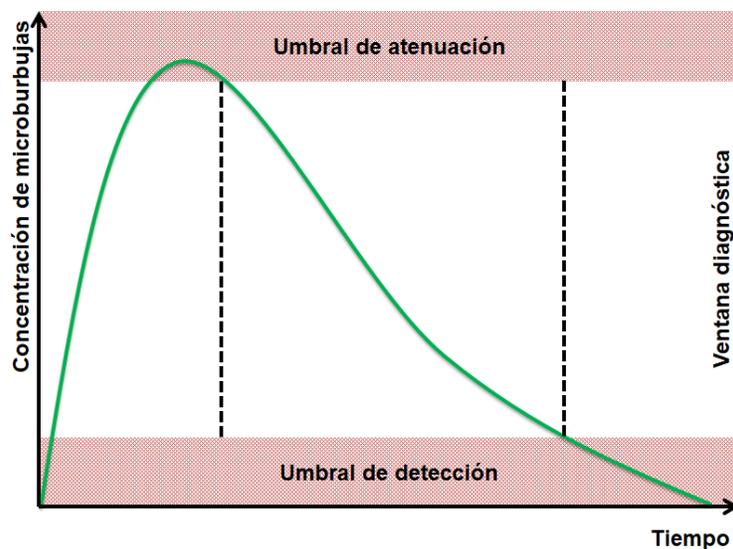


Figura 10. Representación hipotética de la concentración plasmática de microburbujas para una administración intravenosa.

La ventana diagnóstica es un intervalo donde la concentración de microburbujas puede ser detectada mediante el ultrasonido sin la necesidad de modificar la frecuencia del transductor, mientras las regiones en rojo consideran el umbral de detección (región inferior) y el umbral de atenuación (región superior).

El umbral de atenuación es una concentración de microburbujas en donde existe una fuerte señal de eco hacia el transductor que provoca la aparición de sombras por efecto de estructuras hiperecóticas, mientras el umbral de detección es la concentración mínima de microburbujas para poder ser observado un cambio en las ondas reflejadas hacia el transductor.¹⁸

La disminución de la respuesta ecogénica a lo largo del tiempo puede ocurrir debido a la ruptura de las microburbujas con ultrasonido, sin embargo, en ausencia de este estímulo se observa la pérdida de gas desde el núcleo por efecto de la difusión. La rapidez en que existe la transferencia del gas a partir del interior de la microburbuja depende de la capacidad del gas de permear a través de la coraza, su disolución en el medio y su separación del gas a partir de la superficie de la microburbuja.

2.6.5. Microburbujas magnéticas

La construcción de una microburbuja permite la introducción de fármacos, moléculas de reconocimiento molecular y de partículas sin que estas interfieran con su principal actividad como agente de contraste en ultrasonido.^{1,45} Al introducir nanopartículas magnéticas en la cubierta de las microburbujas se generan sistemas híbridos no sólo capaces de aumentar la respuesta ecogénica en la visualización mediante ultrasonido sino de ser detectables por medio de la resonancia magnética de imagen, lo que permite llevar a cabo confirmación de resultados en estructuras cuya respuesta ecogénica no permite una buena resolución¹, además de posibilitar la modificación en la rapidez de liberación de fármaco a partir de los sistemas basados en microburbujas por medio de hipertermia magnética.⁵⁸

2.7. Sistemas teragnósticos en cáncer

Los

2.7.1. Avances en los sistemas teragnósticos de cáncer

Los sistemas teragnósticos de cáncer han sido desarrollados mediante enfoques multidisciplinarios que involucran a especialistas en la salud, en el desarrollo de fármacos y el desarrollo de nuevos materiales para:

- Identificar nuevos biomarcadores que permitan el diagnóstico molecular de cáncer.
- Nuevas sondas de imagenología que permitan la detección temprana de cáncer.
- Terapias antineoplásicas dirigidas por imagenología.
- Nanoplataformas que incorporan imagenología y componentes terapéuticos.

Los sistemas teragnósticos de cáncer incluyen, pero no se limitan a biomarcadores teragnósticos, marcadores de reconocimiento molecular, terapias dirigidas a través de imagenología (en el sitio de acción), y nanoplataformas teragnósticas.⁹⁻¹¹

2.7.2. Retos y nuevas perspectivas en el desarrollo de sistemas teragnósticos de cáncer

La búsqueda de terapias individualizadas que permitan el funcionamiento costo eficaz de los sistemas de salud, con el menor tiempo entre la detección y el inicio de los procedimientos médicos proveerá de mejores resultados para los pacientes a un menor costo. A través de los sistemas teragnósticos se busca dar respuesta a estos problemas, pues el desarrollo de sistemas tecnológicos que permitan la detección temprana a la vez que el inicio del tratamiento asegura una máxima efectividad en el tratamiento. Sin embargo, estos sistemas deben superar una serie de retos como:

- Escalamiento de la síntesis: Debido a la formación de estructuras complejas, la síntesis y la reproducibilidad de estos sistemas puede ser un reto a nivel industria pues se debe asegurar su calidad y efectividad.
- Diseño racional de un régimen de dosificación: Debido a las diferencias entre los requerimientos de diagnóstico y la farmacocinética del sistema terapéutico se deberán hacer análisis paralelos para el establecimiento de dosis efectivas.
- Regulación: Al no ser sistemas convencionales su regulación es nula, lo que impedirá ser aceptados por agencias regulatorias sino hasta años después del inicio de su registro.
- Toxicidad: Diversos análisis han demostrado la inducción de citotoxicidad, genotoxicidad, e inmunotoxicidad por sistemas nanométricos. Las propiedades que permiten su posible uso como sistemas acarreadores, de diagnóstico o teragnósticos los que se han asociado con estos posibles efectos secundarios.

2.7.3. Microburbujas magnéticas en cáncer

A pesar de que las microburbujas magnéticas se diseñaron originalmente para mejorar la detección de estructuras en modo dual para ultrasonido y resonancia magnética de imagen, se ha demostrado que es posible incorporar fármacos en la estructura de estos agentes para formar sistemas teragnósticos.⁶³⁻⁶⁷

En los últimos tres años se ha llevado a cabo el diseño de sistemas de tipo teragnósticos basados en microburbujas magnéticas que, además de aprovechar sus características como agentes de diagnóstico en modo dual para ultrasonido y resonancia magnética de imagen, proponen la liberación de fármacos a partir de los mismos en el sitio de acción para aumentar su eficacia.

Las ventajas de un sistema teragnóstico basado en microburbujas magnéticas, considerando el sinergismo existente entre los sistemas y la administración de fármacos, fueron resumidas por Lee *et.al.*⁶⁸ como se muestra a continuación:

- **Permeación de la barrera hematoencefálica:** La exposición de microburbujas al ultrasonido ha demostrado ser capaz de debilitar las uniones entre células epiteliales de manera local y reversible en la barrera hematoencefálica aumentando la captación de fármaco del torrente sanguíneo.
- **Terapia antineoplásica:** La gran variedad de materiales que pueden componer microburbujas magnéticas (proteínas, lípidos o polímeros) permiten cargar una amplia gama de fármacos antineoplásicos sin que exista la inestabilidad física o química. La vectorización de fármacos antineoplásicos acoplados a dichos sistemas por medio del uso de campos magnéticos disminuye los efectos adversos de fármacos no selectivos; así mismo los efectos de cavitación y sonoporación sobre células neoplásicas han demostrado aumentar la muerte celular de células en tumor.
- **Disrupción de trombos en sistema cardiovascular:** La disrupción de coágulos por medio de la cavitación y sonoporación se ve incrementada por efecto de la inclusión de fármacos trombolíticos para disminuir la severidad de episodios de ataques cardiacos y accidentes cardiovasculares.

La tendencia más reciente busca acoplar el uso de microburbujas magnéticas con sistemas estímulo sensibles de liberación de fármaco para disminuir los efectos adversos de muchos fármacos antineoplásicos por efecto de su distribución no selectiva en el organismo mediante el reconocimiento a las modificaciones en el microambiente circundante de los tumores.^{11,45,59,66}

2.7.4. Agentes teragnósticos en cáncer basados en microburbujas magnéticas

La necesidad de generar mejores sistemas de diagnóstico así como disminuir el tiempo que existe entre la detección de neoplasias y el inicio de la terapia para aumentar las probabilidades de recuperación en un paciente, ha despertado el interés en generar técnicas y sistemas que satisfagan estas necesidades de manera simultánea.¹⁰ Por ello inicialmente se diseñaron sistemas que aprovecharon la cavitación de las microburbujas para:

- Aumentar la cantidad de fármaco liberada en el sitio de acción.⁶⁹⁻⁷²

- Causar un daño en la pared celular de las células neoplásicas.⁷³⁻⁷⁵
- Inducir un aumento en la cantidad de fármaco que es capaz de permear la barrera hematoencefálica.⁷⁶⁻⁷⁸

Algunos de los trabajos más recientes lograron condicionar la liberación de fármaco antineoplásico únicamente al sitio de acción mediante sistemas sensibles a ultrasonido que presentan cambios en su estructura dependientes de la intensidad y frecuencia de las ondas.⁷⁹⁻⁸²

Los sistemas más novedosos utilizan microburbujas magnéticas para lograr la detección mediante ultrasonido o resonancia magnética de imagen, así como la liberación de fármaco de manera simultánea; en su gran mayoría se acopla un fármaco hidrofóbico en la capa interna de polímero para mediar su liberación. Estos sistemas han mostrado ser efectivos en líneas celulares y en modelos animales, sin embargo, no se ha demostrado la estabilidad de las microburbujas una vez que se induce el ultrasonido.^{64,67,83}

2.8. Modelos cinéticos de liberación de fármacos

Para llevar a cabo la caracterización de un sistema de liberación farmacéutico es necesario conocer el mecanismo por el cual lleva a cabo la liberación. Para dicho análisis se han desarrollado diversos modelos que permiten expresar en ecuaciones matemáticas la relación entre la cantidad de fármaco liberado con respecto al tiempo. Estos modelos cinéticos han sido propuestos en torno a diversas consideraciones acerca del funcionamiento de los sistemas y es por ello que la información obtenida en algunos parámetros es capaz de brindar información acerca del mecanismo de liberación.⁸⁴

- **Modelo de orden cero:** El modelo asume que la superficie del sistema permanece constante y que el fármaco se libera continuamente de manera gradual e independiente a la cantidad de principio activo remanente debido a que no se alcanzan condiciones de equilibrio como se muestra en la ecuación 8:

$$W_0 - W_t = kt \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde W_0 es la cantidad de fármaco inicial en el sistema de liberación, W_t es la cantidad de fármaco en el sistema de liberación a tiempo t y k es la constante de proporcionalidad.

Dividiendo la ecuación entre W_0 y simplificando se obtiene la ecuación 9:

$$f_t = k_0 t \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde $f_t = 1 - (W_t/W_0)$ y representa la fracción de fármaco disuelto en el tiempo t y k_0 representa la constante de disolución aparente, o la constante de orden cero.

- **Modelo de primer orden:** El modelo asume una dependencia de la liberación de fármaco con respecto al área superficial del sistema de liberación a través del tiempo de acuerdo con la ecuación de Noyes-Whitney modificada por Hixson y Crowell

$$\frac{dW}{dt} = k_s(C_s - C) \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde W es la cantidad de fármaco en la solución a tiempo t , S la proporción de área de sólido accesible a la disolución dW/dt es el cambio en la tasa de disolución en el tiempo t y K es una constante de proporcionalidad.

- **Modelo de Hopfenberg:** Este modelo describe la liberación de fármaco a partir de sistemas con superficie erosionable:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0}\right]^n \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t , M_∞ es la cantidad total de fármaco disuelto a tiempo, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco disuelto, k_0 es la constante de rapidez de erosión, C_0 es la concentración inicial de fármaco en el sistema, a_0 es el radio inicial de la esfera o cilindro o la mitad del ancho de la placa. El valor de n es 1, 2 o 3 para una placa, un cilindro, y una esfera, respectivamente.

- **Modelo de Higuchi:** Este modelo se desarrolló considerando la disolución de fármacos en suspensión a partir de linimentos, pero logra describir la cinética de liberación de fármacos incorporadas en matrices sólidas y semisólidas. Higuchi describe la liberación de fármaco como un proceso de difusión basado en la ley de Fick con una dependencia proporcional a la raíz cuadrada del tiempo.

$$M_t/M_\infty = k_H t^{1/2} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t , M_∞ es la cantidad total de fármaco disuelto a un tiempo, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco disuelto y k_H es la constante de disolución de Higuchi.

- **Modelo de Korsmeyer-Peppas:** Este modelo semi-empírico relaciona la liberación de fármaco con un tiempo (t) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$f_t = M_t/M_\infty = at^n \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde a es una constante que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación, n es el exponente de liberación, es un indicador del mecanismo de liberación en función de t , siendo $ft = M_t/M_\infty$ (Fracción de fármaco liberado).

- **Modelo de Peppas-Sahlin:** Este modelo considera que el mecanismo de liberación está mediado por hinchamiento del material por interacción con el medio, donde el mecanismo se inicia una vez que al contacto del material con el medio de dispersión las cadenas se separan dando un aumento en el área de contacto entre las fases, lo que aumenta la movilidad del fármaco. Está descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^n \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t , M_∞ es la cantidad total de fármaco disuelto a tiempo, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco disuelto, k_1 es el coeficiente de difusión y k_2 es la relajación del polímero por interacciones con el medio. El valor de n determinado permite relacionar la liberación de fármaco a un mecanismo de liberación de acuerdo con los siguientes parámetros:

Tabla 4. Mecanismo de transporte de fármaco de acuerdo con el valor de n en el modelo Peppas-Sahlin para esferas.⁸⁵

Coeficiente de difusión (m)			Mecanismo
Película	Cilindro	Esfera	
0.5	0.45	0.43	Difusión (Ley de Fick)
0.50 < m < 1.00	0.45 < m < 0.89	0.43 < m < 0.85	Transporte anómalo
1	0.89	0.85	Transporte de caso II*

* El transporte de caso II hace referencia a la liberación de un fármaco por efecto de la relajación de cadenas poliméricas previa a su difusión.⁸⁶

Para llevar a cabo la selección modelo se considera el coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1, el mayor criterio de selección del modelo (MSC), la menor suma de cuadrados (SSR), y el menor criterio de Akaike (AIC).

Capítulo 3. Planteamiento del problema

Es posible reducir y controlar el desarrollo de cáncer aplicando estrategias de base científica destinadas a la prevención de la enfermedad. De detectarse de manera oportuna, muchas neoplasias tienen una mayor probabilidad de curarse si se tratan de forma adecuada. Las estrategias más efectivas incluyen disminuir el intervalo de tiempo entre la detección y el inicio del tratamiento, llevar a cabo el monitoreo de la evolución de la neoplasia, y minimizar los efectos adversos debido a la distribución no selectiva de fármacos antineoplásicos aumentando con ello la probabilidad de recuperación de un paciente con un tumor sólido. En la última década se han desarrollado alternativas a los medios de contraste convencionales para la detección de tumores obteniendo plataformas capaces de fungir además como sistemas de liberación de fármacos antineoplásicos. El uso de microburbujas con un fármaco antineoplásico como sistema teragnóstico es una propuesta que surgió para mejorar la detección de tumores sólidos, supervisar la evolución y llevar a cabo la liberación de fármacos antineoplásicos con el menor intervalo de tiempo posible entre la detección y tratamiento. Actualmente los sistemas teragnósticos basados en microburbujas son fabricados con materiales cuya resistencia mecánica no es adecuada para la presión acústica generada por las sondas de ultrasonido en imagenología durante periodos prolongados.

Este trabajo propone el uso de la modificación del polímero hidrofóbico de la capa interna de la microburbuja magnética para mejorar la estabilidad de los sistemas durante la incidencia de ultrasonido y la modificación de NPMs para mejorar las propiedades magnéticas de los sistemas.

Capítulo 4. Objetivo general

Sintetizar y caracterizar microburbujas magnéticas compuestas por nitrógeno como gas en el interior, un polímero hidrofóbico como fase interna, y una dispersión de metotrexato en PVA como fase externa, así como obtenidas mediante el método de doble emulsión, evaluar su eficiencia como sistemas de diagnóstico y como sistemas de liberación farmacéuticos modificando el polímero hidrofóbico de la fase interna, la composición y cantidad de NPMs.

4.1. Objetivos particulares

- Sintetizar nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) recubiertas por ácido oleico por el método de coprecipitación.
- Sintetizar nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) recubiertas por ácido oleico por el método de síntesis solvotermal y coprecipitación.
- Caracterizar las nanopartículas magnéticas determinando los parámetros de estructura cristalina mediante la técnica de difracción de rayos X de polvos, el tamaño de partícula mediante la ecuación Debye-Scherrer, el tamaño y la morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), la estabilidad en dispersión acuosa mediante potencial Z y sus propiedades magnéticas mediante la obtención de curvas de histeresis.
- Sintetizar sistemas de diagnóstico basados en microburbujas poliméricas con capa interna de ácido poli-(L)-láctico o carbonato de polipropileno, en ausencia o presencia de inclusiones magnéticas de magnetita o ferrita de cobalto y una capa externa de alcohol polivinílico con metotrexato por el método de doble emulsión.
- Caracterizar los sistemas generados determinando su tamaño mediante dispersión dinámica de luz (DLS), cuantificando la cantidad de nanopartículas magnéticas incluidas en su interior mediante espectroscopia de absorción atómica, su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), así como su evaluación como sistemas de diagnóstico en ultrasonido en modo B y como sistemas de liberación farmacéuticos.
- Evaluar la liberación *In vitro* de metotrexato a partir de los sistemas poliméricos e híbridos y comparar los perfiles dependiendo de su composición.
- Caracterizar las propiedades mecánicas de películas modelo basadas en los sistemas sintetizados con el uso de un texturómetro.
- Evaluar la modificación en la respuesta ecogénica de un tejido modelo en función de la composición del sistema.

Capítulo 5. Hipótesis de trabajo

La optimización de un sistema teragnóstico basado en microburbujas magnéticas con un fármaco antineoplásico es dependiente del polímero utilizado como capa interna en el método de doble emulsión, el tipo de nanopartículas dispersadas en el sistema, la dispersión de fármaco en la capa externa de la burbuja y la respectiva liberación de fármaco desde el sistema en presencia o ausencia de estímulos de ultrasonido. Si se utiliza un polímero en la capa interna con alta resistencia mecánica, baja permeabilidad al gas encapsulado, nanopartículas con la mayor respuesta a estímulos magnéticos y un polímero capaz de formar un sistema de matriz erosionable en la superficie, entonces se podrá obtener un sistema teragnóstico basado en microburbujas magnéticas que aumente la respuesta ecogénica, con alta respuesta a la inducción magnética y con liberación controlada de un fármaco antineoplásico.

Capítulo 6. Metodología experimental

6.1. Materiales

Cloruro ferroso tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pureza >99%), cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pureza $\geq 99\%$), ácido oleico (pureza 90%), Ácido poli-(L)-láctico (PLA), alcohol polivinílico (PVA) (pureza $\geq 99\%$, Mn 50,000), carbonato de polipropileno (PPC) (pureza $\geq 99\%$, Mn 50,000) adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); hidróxido de sodio (NaOH pureza $\geq 95\%$), acetona (pureza $\geq 95\%$) adquirida de Distribuidora Química ALVI (Edo. de México, Méx.); cloruro de metileno (CH_2Cl_2 , pureza 99%) adquirido de J.T. Baker, agua desionizada obtenida de un equipo Nanopure Diamond (Barnstead®), metotrexato sódico USP donado por Laboratorios Pisa (Ciudad de México, Méx.)

6.2. Síntesis de NPMs hidrofóbicas de magnetita

Para la síntesis de NPMs de óxidos de hierro se llevó a cabo una coprecipitación con temperatura controlada. Se agregaron 0.184 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.925 mmol) y 0.50 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.85 mmol) en 9.3 mL agua con una atmósfera de N_2 , la mezcla de reacción fue llevada a una temperatura de 90 °C; al llegar a la temperatura de reacción se adicionaron 3.7 mL de NaOH 2M y 0.4 mL de ácido oleico; durante la adición se formó un precipitado negro, que fue aislado mediante decantación magnética. El precipitado se lavó dos veces mediante sonicación en acetona para remover el exceso de ácido oleico, y fue secado a temperatura ambiente durante una noche. La reacción que se lleva a cabo es:



Así mismo, como referencia se sintetizó magnetita hidrofílica mediante la misma técnica sin adición de ácido oleico, y realizando lavados en agua desionizada previa al secado durante una noche.

6.3. Síntesis de acetilacetonato de Co (II) y acetilacetonato de Fe (III)

Para llevar a cabo la síntesis de NPMs hidrofóbicas de ferrita de cobalto por el método de síntesis solvotermal primero se obtuvieron los acetilacetonatos de Fe (III) y de Co (II) como precursores.

Para la síntesis de acetilacetonato de Co (II) se colocaron 4.5 mL de acetilacetona (44 mmol) a 15 mL de una solución con 1.6 g de hidróxido de sodio (400 mmol) manteniendo la

temperatura por debajo de los 40°C para evitar la descomposición y, sólo cuando se formaba un precipitado blanco, era agregada agua desionizada gota a gota. La solución amarilla es adicionada gota a gota con agitación magnética vigorosa durante 10 minutos a 25 mL de una solución con 4.8 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mmol) en agua desionizada.

El precipitado fue recolectado por filtración lavando con 50 mL de agua destilada. El sólido húmedo fue disuelto en una mezcla de 39 mL de etanol absoluto y 26 mL de cloroformo a 40°C, evitando la ebullición. La solución final se dejaba enfriar a temperatura ambiente antes de ser colocada en un baño de hielo, para finalmente recolectar el precipitado por filtración.⁸⁷

Para la síntesis de acetilacetonato de Fe (III) se colocaron 250 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 2.5 mL de agua, con agitación magnética constante. Se adicionaron 2.5 mL de una solución acuosa que contiene 500 mg de acetato de sodio trihidratado, así como 500 μL de acetilacetona. La mezcla de reacción permaneció con agitación magnética durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de proceder a llevar a cabo su filtración a vacío. Finalmente, el precipitado húmedo fue secado en un horno a 60°C durante 1 hora.⁸⁸

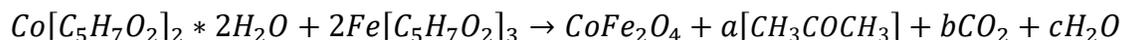
6.4. Síntesis solvotermal de NPMs hidrofóbicas de ferrita de cobalto

Para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de ferrita de cobalto se llevó a cabo la descomposición solvotermal del acetilacetonato de Fe (III) y acetilacetonato de Co (II). En un matraz de tres bocas de 100 mL se colocaron 0.192 g de acetilacetonato de Co (II) (0.65 mmol), 0.459 g de acetilacetonato de Fe (III) (1.29 mmol), 3.6 mL de ácido oleico, 3.6 mL de oleilamina y 30 mL de 1-octadeceno.

La mezcla de reacción se agitó magnéticamente y se desgasificó a temperatura ambiente por al menos 30 minutos para eliminar el agua. La temperatura fue incrementada a 200°C, y se mantuvo durante 30 minutos. Finalmente, la temperatura de la mezcla se elevó a 295°C con una rapidez de 6 °C/min.

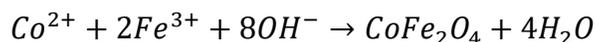
Para llevar a cabo las pruebas de caracterización, así como su uso en la síntesis de membranas y microburbujas, se llevó a cabo la separación de nanopartículas del medio de reacción. Por cada mililitro de mezcla de reacción se colocó 1 mL de etanol prosiguiendo a la centrifugación a 2600 RCF descartando el sobrenadante. Las nanopartículas se redispersaron en 5 mL de diclorometano y se precipitaron agregando 1 mL de etanol. Este procedimiento de

precipitación-redisposición se repitió 2 veces más antes de finalmente redispersar las nanopartículas en hexano.⁸⁹ La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



6.5. Síntesis de NPMs hidrofóbicas de ferrita de cobalto por coprecipitación

Para este proceso se mezclaron 14.35 mL de una solución 0.697 M de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y 7.90 mL de una solución 0.632 M de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, ambas en 0.4 M de HCl. La mezcla fue adicionada gota a gota a 200 mL de NaOH 1.5 M previamente ajustados a pH 12. Durante la precipitación se mantuvo agitación magnética constante y se ajustaba continuamente a pH 11-12 utilizando NaOH 1.5 M manteniendo una temperatura de 20 ± 0.5 °C durante la reacción.⁹⁰ La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



El producto obtenido fue separado mediante decantación magnética y se lavó 5 veces con agua desionizada para la eliminación de los precursores restantes. Las NPMs se secaron a 50 °C en vacío previo a su caracterización.

6.6. Caracterización de nanopartículas magnéticas (NPMs)

6.6.1. Espectroscopia de infrarrojo de nanopartículas magnéticas

La estructura química de las nanopartículas magnéticas permite elucidar las interacciones que existen entre la superficie de las nanopartículas y un recubrimiento, su determinación se realizó utilizando un espectrofotómetro de FTIR / FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer de 4000 a 500 cm^{-1} .

6.6.2. Espectroscopia de absorción atómica de nanopartículas magnéticas

La cuantificación de cobalto y hierro de las nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto se llevó cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica SpectraAA 220 marca Varian.

6.6.3. Potencial Z

Para conocer la estabilidad de las dispersiones de nanopartículas magnéticas se llevó a cabo la determinación de su potencial Z en agua. Esta se realizó en un equipo Zetasizer Nano Zen 3600 en una celda de vidrio en las muestras de nanopartículas hidrofílicas dispersadas en agua destilada (pH 7.0 ± 0.1) a 25 °C y para las muestras de nanopartículas hidrofóbicas

dispersadas en agua se llevó a cabo agitación manual de la celda entre cada medición para evitar su posible agregación en un medio acuoso durante el tiempo de análisis.

6.6.4. Difracción de Rayos X de Polvo

Para determinar la estructura cristalina, llevar a cabo la comparación con una referencia obtenida del ICDD y determinar el tamaño de partícula⁹¹ se llevó a cabo el análisis de difracción de rayos X de polvos de las muestras de magnetita y ferrita de cobalto mediante un difractómetro de rayos X, modelo D8 ADVANCE DAVINCI en modo Theta-Theta. De los resultados obtenidos se llevó a cabo el cálculo de tamaño de cristal mediante la ecuación de Scherrer.

6.6.5. Curvas de histéresis magnética de NPMs

Las curvas de histéresis de NPMs se obtuvieron den un magnetómetro SQUID, MPMS3 de Quantum Design Inc. utilizando una magnetización de 0 a 40000 Oe en el primer ciclo, de 40000 a -40000 Oe en el segundo ciclo y de -40000 a 40000 Oe en el tercer ciclo a 280 K.

6.7. Síntesis de microburbujas

La síntesis de microburbujas magnéticas con una capa externa de PVA y una capa interna de PLA se llevó a cabo por medio de un proceso de doble emulsión (w/o/w). Se preparó una solución orgánica con PLA o CPP (0.50 g) en cloruro de metileno (10.0mL). Para generar las burbujas de la primera emulsión se adicionó agua desionizada (1.0 mL) y Span 80 (0.5 mL) a la solución orgánica y fue sonicada (500 Watts, 20% Amplitud, Frecuencia de 20 kHz) con una inyección constante de N₂ por 5 minutos. La primera emulsión fue adicionada a una solución (10.0 mL) de PVA 5% (m/v) que incluía Tween 80 (0.5 mL) y metotrexato (0.25 mg/mL), finalmente fue mezclada mecánicamente durante 2 horas; para formar una emulsión con burbujas de dos capas sin el disolvente orgánico.¹

6.8. Síntesis de microburbujas magnéticas

La síntesis de microburbujas magnéticas con una capa externa de PVA y una capa interna de PLA se llevó a cabo por medio de un proceso de doble emulsión con deposición interfacial (w/o/w). Se tomó una muestra de 90.0 mg del precipitado suspendiéndose en 50 mL de cloruro de metileno formando un stock de NPMs (NPM-1). Se preparó una solución orgánica con la solución NPMs-1 (1.0 mL), y PLA o CPP (0.50 g) en cloruro de metileno (10.0mL). Para generar las burbujas de la primera emulsión se adicionó agua desionizada (1.0 mL) y Span 80 (0.5 mL) a la solución orgánica y fue sonicada (500 Watts, 20% Amplitud, Frecuencia de 20 kHz) con

una inyección constante de N₂ por 5 minutos. La primera emulsión fue adicionada a una solución (10.0 mL) de PVA 5% (m/v) que incluía Tween 80 (0.5 mL) y metotrexato (0.25 mg/mL), finalmente fue mezclada mecánicamente durante 2 horas; para formar una emulsión con burbujas de dos capas sin el disolvente orgánico.¹

6.9. Aislamiento de partículas del medio de síntesis

Para llevar a cabo la separación del sistema del medio de síntesis se llevó a cabo la centrifugación. Para ello se colocaron las dispersiones en una centrifugadora Sorvall Primo R, y se llevó a cabo la centrifugación a 300 RCF, una vez separado el botón de la dispersión se guardaba el sobrenadante y el botón era resuspendido en un volumen de 30 mL de agua desionizada.⁹²

6.10. Cuantificación de metotrexato en microburbujas

La eficiencia de encapsulamiento se realizó considerando la diferencia entre la concentración inicial de metotrexato en la solución de PVA y la concentración en el sobrenadante después de la separación mediante centrifugación, en relación con la cantidad de sistema obtenido. La cuantificación se llevó a cabo utilizando la curva de calibración descrita en el anexo I.

6.11. Liofilización de los sistemas sintetizados

Para llevar a cabo las siguientes pruebas se eliminó el agua de 1 mL de muestra mediante liofilización, primero se comparó el efecto de la congelación sobre la estabilidad de los sistemas utilizando N₂ líquido para llevar a cabo la precongelación, y la respectiva liofilización a -35°C y presión \leq a 0.035 mbar por 24 horas. conservando las muestras a 4°C durante el resto de los experimentos y comparando estos sistemas con aquellos congelados de manera convencional en un congelador a -18°C. Ambas metodologías fueron evaluadas mediante microscopía SEM después de finalizar su liofilización.

6.12. Determinación de morfología y tamaño de partícula por microscopía SEM

Para determinar la distribución de tamaño de partícula se llevó a cabo la medición de los sistemas generados utilizando microscopía SEM, considerando la distribución de tamaño de para 100 partículas obtenidas mediante el programa imageJ[®] del National Institutes of Health, Bethesda, Maryland US y realizando la comparación de sus parámetros estadísticos mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.II ver. 16.2.04[®].

6.13. Evaluación del uso de membranas de diálisis en la liberación del fármaco antineoplásico modelo (metotrexato)

Para evaluar si la membrana de diálisis sería una barrera limitante a la difusión se preparó una disolución de metotrexato sódico en solución PBS con una concentración de 0.3 mg/mL, aproximadamente la misma concentración en que se llevaría a cabo la liberación a partir de los sistemas poliméricos e híbridos. Se colocó por triplicado 1.0 mL de la solución de metotrexato sódico dentro de una bolsa de diálisis (Celulosa regenerada, 55 kD, 7.5 mm de diámetro interno) obstruidas mediante cierres con pesos magnéticos. Los sistemas se colocaron en vasos termostatados con 50 mL de solución PBS pH 7.4 ± 0.1 a una temperatura de 37 ± 0.5 °C con agitación magnética. Se tomaron alícuotas de 2 mL a los 10, 20, 30, 40, 50, 70 y 90 minutos con reposición de medio para determinar la eficiencia de la membrana como barrera realizando la cuantificación de metotrexato sódico mediante espectroscopia UV-visible utilizando la curva de calibración mostrada en el anexo II.

6.14. Liberación del fármaco antineoplásico modelo (metotrexato)

El estudio de liberación se realizó por triplicado en solución PBS con pH 7.4 ± 0.1 a 37 ± 0.5 °C con agitación magnética constante, colocando 1 mL de solución PBS con 10 mg de cada sistema en una bolsa de diálisis antes de colocarse en 49 mL de medio para un volumen final de 50 mL. Para determinar la cantidad de fármaco liberado fueron tomadas muestras de 2 mL durante 12 horas (0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 600, y 720 min) con reposición de volumen a cada muestreo, considerando condiciones sink para la solubilidad de metotrexato de 2600 mg/L; finalmente se realizó la cuantificación de metotrexato mediante espectroscopia UV a longitud de onda de 305.78 nm. Los datos obtenidos se analizaron mediante el macro DDSolver 1.0 para Excel para analizar el modelo de liberación más adecuado para los sistemas.⁹³

Para llevar a cabo la selección del modelo se considera el coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1, la menor suma de cuadrados (SS), el mayor criterio de selección del modelo (MSC), y el menor criterio de Akaike (AIC).⁸⁴

6.15. Evaluación de los sistemas como sistemas diagnósticos *in vitro*

Para llevar a cabo la evaluación de la respuesta ecogénica de los sistemas generados se utilizó como tejido modelo el fruto de *Vitis vinifera*, y como medio de propagación una dispersión de gelatina al 5%. Se utilizó un sistema ecográfico DM 2200 Vet de Mindray Medical International

Co. con una sonda convexa de frecuencia central de 6.5 MHz. El análisis de repuesta ecogénica se realizó mediante el análisis fotométrico de las imágenes obtenidas en modo B considerando una región de interés (RDI) fija de 760 x 530 pixeles (402800 pixeles²) y realizando la comparación de sus parámetros estadísticos mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.II ver. 16.2.04[©].

6.16. Evaluación de las propiedades mecánicas de los sistemas generados

Se llevó a cabo la evaluación de los sistemas generados por medio de membranas con la misma composición de polímeros que los sistemas sintetizados y se determinó el módulo de Young, el porcentaje de elongación máximo y la fuerza de resistencia a la ruptura utilizando un texturómetro Mecmesin Multitest modelo 1-i con celda de carga de 50 N usando el software Emperor™ (Force) ver. 1.18-305 a 0.03 mm/min usando membranas de 2 cm x 4 cm con área de análisis de 0.0004 m² hasta un desplazamiento máximo de 50 mm.

Las membranas analizadas se fabricaron mediante el método de evaporación de disolvente, para lo que se fabricó una primera membrana como soporte utilizando 2 mL de una solución de 0.025 g/mL de PVA en agua usando moldes de silicón a 35 ° C y presión reducida, sin retirar el primer soporte se adicionó distintos volúmenes una solución de 0.025 g/mL de polímero hidrofóbico en cloroformo (PLA o CPP) según se muestra en la tabla 5:

Tabla 5. Proporciones utilizadas en la evaluación mecánica de películas modelo basadas en microburbujas magnéticas.

Muestra	Proporción de PVA (%)	Polímero hidrofóbico	Proporción de Polímero hidrofóbico (%)	Proporción de PVA: Polímero hidrofóbico
PVA	100	NA	0	1.00: 0.00
PVA-PLA 0.25	80	PLA	20	1.00: 0.25
PVA-PLA 1.00	50	PLA	50	1.00: 1.00
PVA-CPP 0.25	80	CPP	20	1.00: 0.25
PVA-CPP 1.00	50	CPP	50	1.00: 1.00

Capítulo 7. Resultados y discusión

La obtención de microburbujas magnéticas por el método de doble emulsión requiere la síntesis de nanopartículas magnéticas previa a la preparación de la primera emulsión; en este trabajo se llevó a cabo la síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita obtenidas por el método de coprecipitación con cloruros de Fe^{3+} y Fe^{2+} y de nanopartículas de ferrita de cobalto obtenidas por el método de coprecipitación con cloruros de Fe^{3+} y Co^{2+} así como el método de síntesis solvotermal, para el cual se prepararon y caracterizaron precursores basados en acetilacetatos de Fe^{3+} y Co^{2+} . Los resultados obtenidos de la síntesis de nanopartículas magnéticas se muestran en los puntos 7.1, 7.2 y 7.3 respectivamente.

7.1. Síntesis de precursores para la síntesis solvotermal de ferrita de cobalto

La síntesis de acetilacetatos de Fe (III) y Co (II) se llevó a cabo obteniéndose un precipitado cristalino de color rojo para la reacción de Fe (III) con acetilacetona y un precipitado cristalino con forma de agujas de color anaranjado para la reacción de Co (II) con acetil acetona.

La síntesis de ferrita de cobalto por medio de descomposición solvotermal requiere la obtención de precursores basados en compuestos de coordinación de hierro y cobalto en una proporción molar de Fe: Co de 2: 1. Los compuestos de coordinación de Fe^{3+} y Co^{2+} pueden presentar distintas geometrías de acuerdo con el ligante empleado y el número de coordinación, esto depende de las condiciones de síntesis. En el caso particular del ligante acetilacetona se pueden unir al centro metálico en diversas proporciones 2:1 (geometría octaédrica con la coordinación de dos moléculas de agua) o 3:1 (geometría octaédrica); por lo que la caracterización mediante diversas técnicas se lleva a cabo con la finalidad de determinar la proporción metal-ligante y asignar una posible estequiometría de reacción.

Una vez que se confirmó la obtención de acetilacetato de Fe (III) y Co (II) se prosiguió con la reacción de obtención de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto por medio de la síntesis solvotermal.

7.2. Caracterización de precursores de la síntesis solvotermal de ferrita de cobalto

7.2.1. Análisis de infrarrojo con reflectancia ATR (ATR-FTIR) de precursores

Para determinar si se obtuvieron los acetilacetatos de hierro (III) y cobalto (II) se llevó a cabo el análisis por ATR-FTIR de los materiales obtenidos, secando las muestras a 60 °C en vacío durante 24 horas antes de llevarse a cabo su análisis. Los resultados de este análisis se

muestran en la figura 11 y la asignación de señales de acetilacetona y sus complejos con Fe^{3+} y Co^{2+} se sintetiza en las tablas 6, 7 y 8:

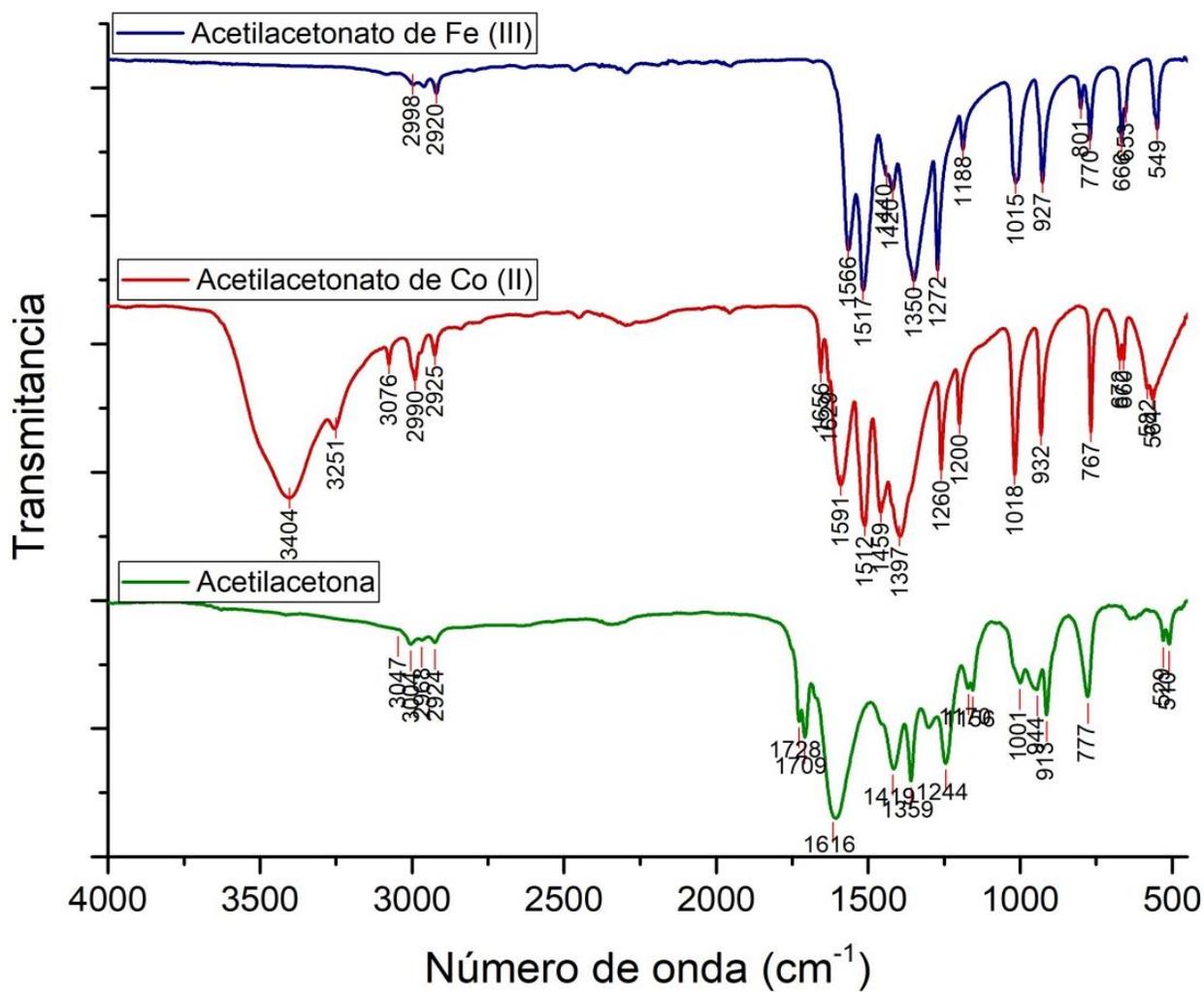


Figura 11. Espectro de FTIR de los derivados de acetilacetonato obtenidos.

Tabla 6. Bandas del espectro FTIR del complejo de acetilacetona.

Muestra	Banda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Asignación de señales
Acetilacetona "acac"	3004	-CH ₃	Estiramiento asimétrico v_{as} (CH ₃)
	2968	-CH ₃	Estiramiento asimétrico v_{as} (CH ₃)
	2924	-CH ₃	Estiramiento simétrico v_s (CH ₃)
	1728	C=O	δ (CH) / ν (C-CH ₃)
	1709	-CH ₂ -CO-CH ₃	ν_s (C-C C-O) + δ (OH)
	1616	-CH ₂ -CO-CH ₃	ν (C-C) + ν (C-O)
	1419	-CH ₂ -CO-CH ₃	ν_s (C-C C-O) + δ (CH) + δ (OH) + ν (C-CH ₃)
	1359	-CH ₃	δ_s (CH ₃)
	1244	-CH ₂ -CO-CH ₃	ν_s (C-C C-O) + ν (C-CH ₃) + δ (OH)
	1170	-CH ₂ -, -CH ₃	δ (CH ₃) olefinico
	1001	-CH ₃	ρ_r (CH ₃)
	944	-OH	γ (OH)
	913	-CH ₂ -CO-CH ₃	ν (C-CH ₃) + ν (C-O)
	639	-CH ₂ -CO-CH ₃	π (CH ₂ -CO-C)
510	CO-CH ₂ -CO	Deformación de anillo	

Una vez que se obtuvo el espectro FTIR de acetilacetona como referencia se prosiguió con los precipitados obtenidos para determinar los cambios más significativos. En los tres espectros se observan bandas alrededor de 550 y de 650 cm⁻¹, sin embargo, la intensidad y ancho de las señales se ve modificado para los precipitados obtenidos y se atribuye a la vibración metal oxígeno.^{27,94}

Tabla 7. Bandas del espectro FTIR del complejo de acetilacetona y Fe³⁺.

Muestra	Banda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Asignación de señales
Fe(acac) _n	2996	-CH ₃	Estiramiento asimétrico v_{as} (CH ₃)
	2960	-CH ₃	Estiramiento asimétrico v_{as} (CH ₃)
	2920	-CH ₃	Estiramiento simétrico v_s (CH ₃)
	1566	-CH ₂ -CO-CH ₃	ν (C-C) + ν (C-O)
	1517	-CH ₂ -CO-CH ₃	ν (C-C) + ν (C-O)
	1442	-CH ₂ -CO-CH ₃	δ (CH)+ ν (C-C)
	1422	-CH ₃	Torsión en modo degenerado dentro del plano δ_d (CH ₃)
	1350	-CH ₃	Torsión simétrica dentro del plano δ_s (-CH ₃)
	1272	-CH ₂ -CO-CH ₃	ν (C-CH ₃) + ν (C-C)
	1188	-CH ₂ -, -CH ₃	Δ (CH) / ν (C-CH ₃)
	1015	-CH ₃	ρ_r (CH ₃)
	927	-CH ₂ -CO-CH ₃	ν (C-C) + ν (C-O)
	770	-CH ₂ -, -CH ₃	π (CH)
	660	-CH ₃ , FeO	ν (C-CH ₃) + deformación de anillo
	653	-CH ₂ -CO-CH ₃	π (CH ₂ -CO-C)

	549	FeO	Deformación de anillo+ ν (FeO)
--	-----	-----	------------------------------------

La señal de estiramiento de C-O del grupo carbonilo presente a 1709 cm^{-1} en el espectro de acetilacetona se encuentra ausente en el espectro de $\text{Fe}(\text{acac})_n$, y aparecen dos señales nuevas en 1517 y 1462 cm^{-1} en su lugar, siendo características de la vibración asimétrica ($\nu_{\text{as}} -\text{COO}^-$) y la vibración simétrica ($\nu_{\text{s}} -\text{COO}^-$), la diferencia ($\Delta_{-\text{COO}}$) de estas dos bandas puede ser utilizada para distinguir el tipo de interacción entre el carboxilato y el metal; si $\Delta_{-\text{COO}} (<110\text{ cm}^{-1})$ se considera que corresponde a una interacción tipo quelato bidentado, si $\Delta_{-\text{COO}} (140-190\text{ cm}^{-1})$ corresponde a una interacción tipo puente bidentado y si $\Delta_{-\text{COO}} (200-320\text{ cm}^{-1})$ corresponde a una interacción monodentada.^{27,94} La diferencia entre la vibración asimétrica y la vibración simétrica obtenida para el compuesto $\text{Fe}(\text{acac})_n$ ($\Delta_{-\text{COO}}: 1517-1462= 55\text{ cm}^{-1}$) lo que indica una coordinación con interacción tipo quelato bidentado.

Tabla 8. Bandas del espectro FTIR del complejo de acetilacetona y Co^{2+} .

Muestra	Banda (cm^{-1})	Grupo funcional	Asignación de señales
$\text{Co}(\text{acac})_n$	3404	-OH	Estiramiento del enlace O-H
	2990	-CH ₃	Estiramiento asimétrico $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
	2961	-CH ₃	Estiramiento asimétrico $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
	2925	-CH ₃	Estiramiento simétrico $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$
	1591	-CH ₂ -CO-CH ₃	$\nu(\text{C-C}) + \nu(\text{C-O})$
	1512	-CH ₂ -CO-CH ₃	$\nu(\text{C-C}) + \nu(\text{C-O})$
	1459	-CH ₂ -, -CH ₃	$\delta(\text{CH}) + \nu(\text{C-C})$
	1397	-CH ₃	Torsión en modo degenerado dentro del plano $\delta_{\text{d}} \delta_{\text{d}}(\text{CH}_3)$
	1365	-CH ₃	Torsión simétrica dentro del plano $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$
	1260	-CH ₂ -, -CH ₃	$\nu(\text{C-CH}_3) + \nu(\text{C-C})$
	1200	-CH ₂ -, -CH ₃	$\delta(\text{CH}) + \nu(\text{C-CH}_3)$
	1018	-CH ₃	$\rho_{\text{r}}(\text{CH}_3)$
	932	-CH ₂ -CO-CH ₃	$\nu(\text{C-C}) + \nu(\text{C-O})$
	767	-CH ₂ -, -CH ₃	$\pi(\text{CH})$
	660	-CH ₃ , CoO	$\nu(\text{C-CH}_3) + \text{deformación de anillo} + \nu(\text{CoO})$
	650	-CH ₂ -CO-CH ₃	$\pi(\text{CH}_2\text{-CO-C})$
565	Co-O	Deformación de anillo + $\nu(\text{FeO})$	

La señal de estiramiento de C-O del grupo carbonilo presente a 1709 cm^{-1} en el espectro de acetilacetona se encuentra ausente en el espectro de $\text{Co}(\text{acac})_n$, y aparecen dos señales nuevas a 1512 y 1459 cm^{-1} en su lugar, siendo características de la vibración asimétrica ($\nu_{\text{as}} -\text{COO}^-$) y la vibración simétrica ($\nu_{\text{s}} -\text{COO}^-$), la diferencia ($\Delta_{-\text{COO}}$) de estas dos bandas puede ser utilizada para distinguir el tipo de interacción entre el carboxilato y el metal.^{27,94} La diferencia

entre la vibración asimétrica y la vibración simétrica obtenida para las $\text{Co}(\text{acac})_n$ (Δ_{COO} : 1512-1459 = 53 cm^{-1}) lo que indica una coordinación con interacción tipo quelato bidentado.

En el espectro de FTIR del compuesto de Co^{2+} se observan bandas características de la vibración O-H en 3404 cm^{-1} , por esto se llevó a cabo el análisis elemental y el análisis térmico de las muestras mediante termogravimetría (TG) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar si existía la presencia de agua en la esfera de coordinación.

7.2.2. Análisis térmico de precursores de la síntesis solvotermal

Para determinar si las bandas de O-H observadas en el análisis de infrarrojo de la muestra de acetilacetonato de cobalto eran debido a la presencia de agua en la esfera de coordinación de dicho compuesto o debido a la presencia de humedad en la muestra, se analizó de manera simultánea la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la termogravimetría (TG) para ambas muestras como se muestran en las figuras 12 a 15:

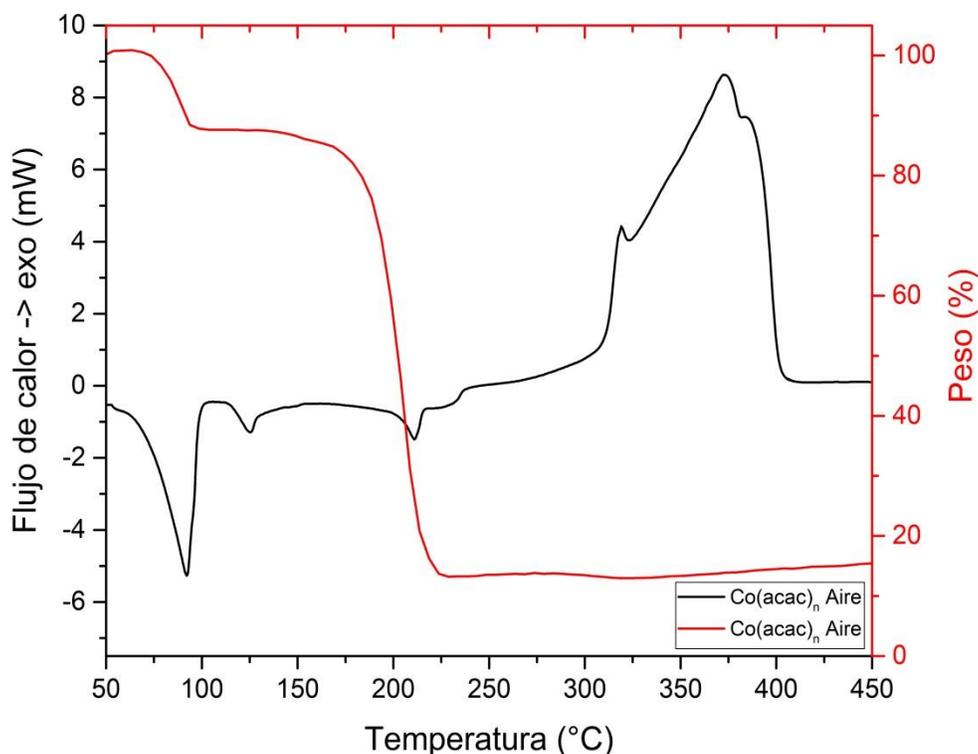


Figura 12. Análisis por DSC (negro) y TG (rojo) del compuesto de coordinación obtenido de Co^{2+} y acetilacetona en atmósfera de aire.

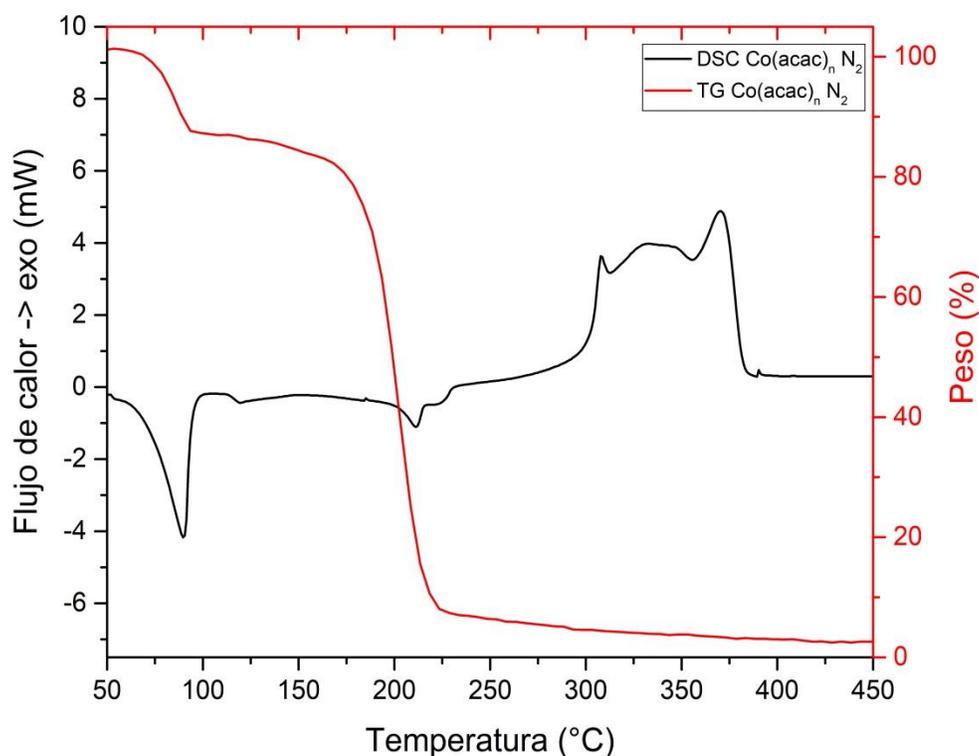


Figura 13. Análisis por DSC (negro) y TG (rojo) del compuesto de coordinación obtenido de Co^{2+} y acetilacetona en atmósfera de N_2 .

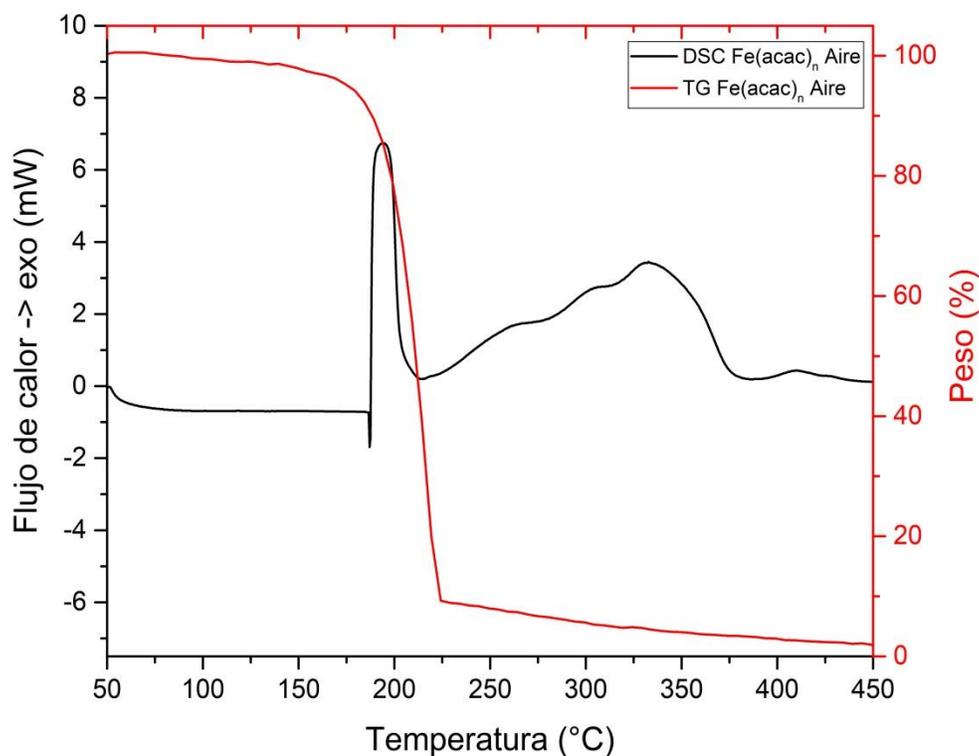


Figura 14. Análisis por DSC (negro) y TG (rojo) del compuesto de coordinación obtenido de Fe^{3+} y acetilacetona en atmósfera de aire.

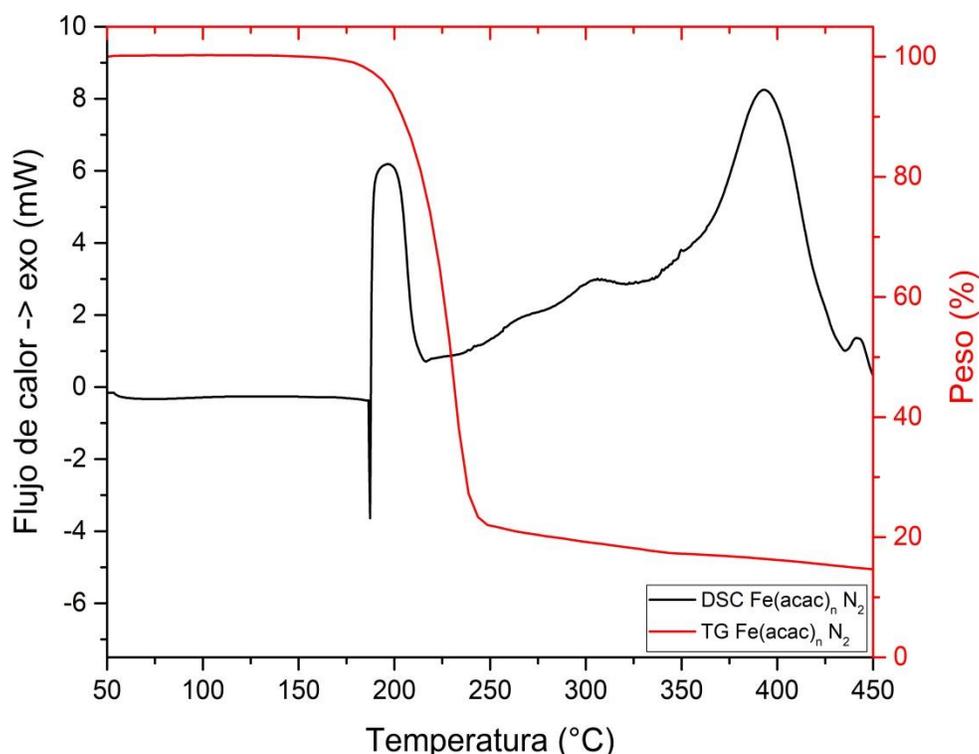


Figura 15 Análisis por DSC (negro) y TG (rojo) del compuesto de coordinación obtenido de Fe^{3+} y acetilacetona en atmósfera de N_2 .

En el análisis por DSC y TG del compuesto de Co^{2+} se observa un pico endotérmico antes de los 100°C , el cual corresponde a la pérdida de agua de la esfera de coordinación por parte del compuesto; así como la descomposición del acetilacetonato entre 250 y 400°C , dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno para ambos compuestos.

7.2.3. Análisis elemental de precursores de la síntesis solvotermal

Para determinar el número de ligantes en los compuestos de coordinación obtenidos se llevó a cabo el análisis elemental con los resultados presentados en las tablas 9 y 10. Los resultados muestran sólo los valores de mayor ajuste después de llevar cabo la evaluación de la composición teórica considerando la coordinación con 1, 2 o 3 ligantes de acetilacetona.

Tabla 9. Análisis elemental del compuesto de coordinación obtenido de $\text{Co}(\text{acac})_n$.

$\text{Co}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$	Composición teórica (%)	Composición experimental (%)
Co	19.96	-
C	40.67	41.66
H	6.83	6.06
N	0.00	0.14

Tabla 10. Análisis elemental del compuesto de coordinación obtenido de $\text{Fe}(\text{acac})_n$.

$\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$	Composición teórica (%)	Composición experimental (%)
Fe	15.68	-
C	50.55	51.22
H	6.79	5.78
N	0.00	0.21

Los resultados de análisis elemental concuerdan con la formación de compuestos con Fe^{3+} y Co^{2+} con 3 y 2 ligantes de acetilacetonato, respectivamente. Los resultados de ATR-FTIR, análisis térmico y análisis elemental nos permiten proponer las reacciones mostradas en las figuras 16 y 17 en la obtención de precursores para llevar a cabo la síntesis de NPM de ferrita de cobalto por descomposición solvotermal.

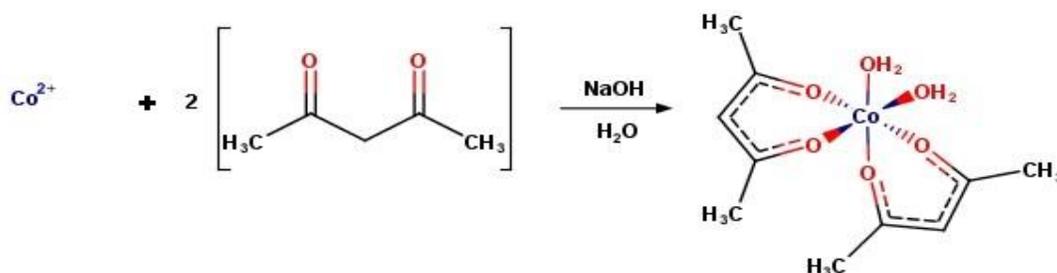


Figura 16. Reacción de síntesis de acetilacetonato de cobalto II $[\text{Co}(\text{acac})_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})]$.

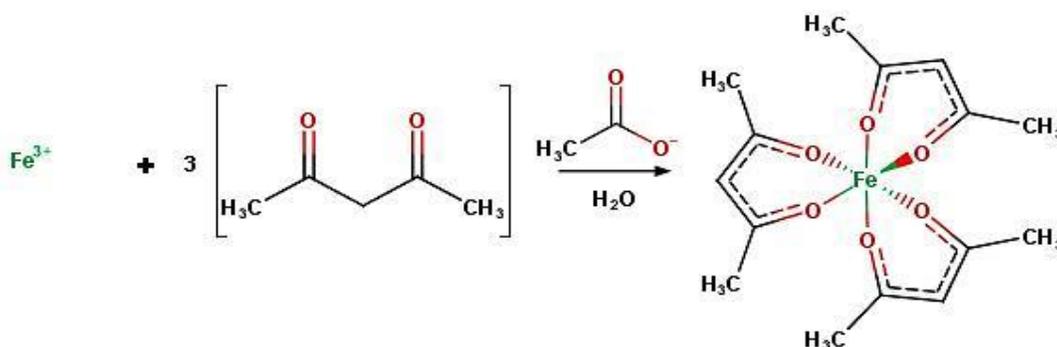


Figura 17. Reacción de síntesis de acetilacetonato de hierro III $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$.

7.3. Síntesis de nanopartículas magnéticas

Una vez se confirmó la obtención de los acetilacetonato de Fe (III) y acetilacetonato de Co (II) se prosiguió con la síntesis de nanopartículas magnéticas de magnetita por el método de coprecipitación y de ferrita de cobalto por los métodos de síntesis solvotermal y de coprecipitación. En todos los métodos de síntesis se obtuvieron precipitados de color negro los cuales fueron separados del medio de reacción mediante decantación magnética, lavados para eliminar los remanentes de sus precursores y secados en un horno a 60°C a presión reducida antes de llevarse a cabo su caracterización.

7.4. Caracterización de nanopartículas magnéticas (NPM's)

La síntesis de nanopartículas de magnetita y ferrita de cobalto tuvo como objetivo la obtención de materiales ferrimagnéticos con propiedades superparamagnéticas, tamaños nanométricos y baja o nula coercitividad magnética, así como la mayor saturación magnética posible a fin de obtener sistemas híbridos basados en microburbujas magnéticas por el método de doble emulsión. Para ello, además de sus propiedades magnéticas, fue necesario obtener materiales con mayor afinidad por disolventes orgánicos que por el agua por lo que se llevó a cabo la funcionalización de su superficie con ácido oleico. Los productos obtenidos en las variaciones de síntesis probadas se muestran en la tabla 11:

Tabla 11. Clave de muestras de NPM's sintetizadas.

Clave de muestra	Material	Método de síntesis	Recubrimiento
COHFSC	Ferrita de cobalto	Coprecipitación	-
COHBSC	Ferrita de cobalto	Coprecipitación	Ácido oleico
COHBSH	Ferrita de cobalto	Síntesis solvotermal	Ácido oleico
MagHFSC	Magnetita	Coprecipitación	-
MagHBSC	Magnetita	Coprecipitación	Ácido oleico

7.4.1. Dispersión de nanopartículas magnéticas

A fin de obtener sistemas híbridos basados en microburbujas magnéticas por el método de doble emulsión se requirió evaluar si las NPMs obtenidas podían ser dispersadas en un disolvente orgánico no miscible con el agua. La distribución de las partículas obtenidas en agua ($\rho: 1.00 \text{ g/cm}^3$) y diclorometano ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rho: 1.33 \text{ g/cm}^3$) se presenta en la figura 18:

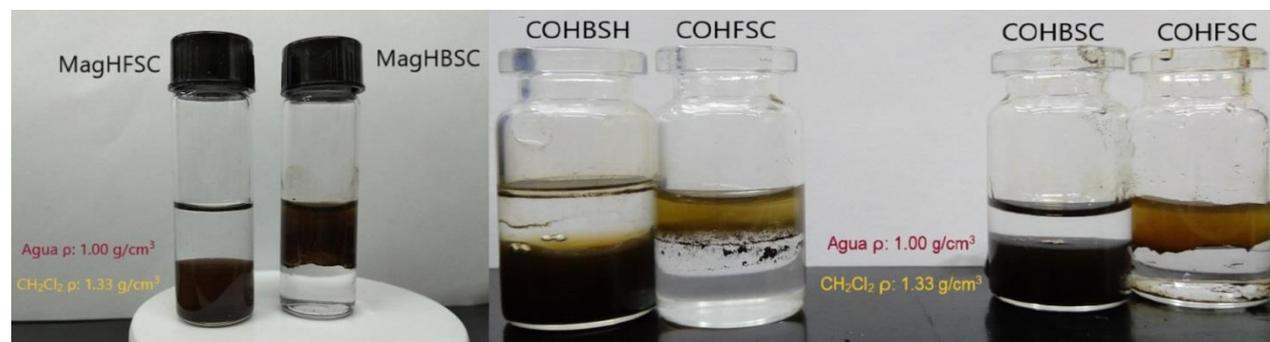


Figura 18. Distribución de NPM de magnetita (izquierda) y NPM de ferrita de cobalto (derecha) en agua/diclorometano.

Se llevaron a cabo estudios de potencial zeta de las partículas sintetizadas para determinar su estabilidad cinética en suspensión. El potencial zeta de nanopartículas MagHFSC fue de $-22.1 \pm 2.1 \text{ mV}$ y de COHFSC de $-34.0 \pm 3.1 \text{ mV}$ lo que indica la adsorción de iones negativos a la

capa de Stern a una distancia que permite la rápida agregación. Por otra parte, en las nanopartículas MagHBSC el potencial fue de -5.94 ± 2.2 mV, de COHBSH de -7.89 ± 0.7 mV y de COHBSC de -3.99 ± 0.5 mV.

En el caso de las nanopartículas hidrofílicas (MagHFSC y COHFSC), la superficie contiene una gran cantidad de grupos hidroxilo que atraen cationes a la capa de Stern y a su vez atraen aniones como contraiones para completar la capa difusa (por lo que se obtiene un signo negativo), en cambio el recubrimiento con ácido oleico para las nanopartículas hidrofóbicas (MagHBSC, COHBSH y COHBSC) disminuye la cantidad de grupos hidroxilo disponibles. La rápida agregación indica la una baja adsorción de iones a la capa de Stern a una distancia que permitiese la repulsión entre partículas, es por ello que se considera que un sistema nanoparticulado con un potencial zeta mayor a +30 mV o menor a -30 mV será estable en dispersión.⁹⁵

La comparación de las NPM's de magnetita y ferrita de cobalto en cuanto a la presencia o ausencia de ácido oléico durante la síntesis muestra una diferencia en las características de dispersión en solventes polares y no polares, siendo necesario la adsorción del ácido oleico para lograr su dispersión en diclorometano sin modificar sus propiedades magnéticas para su posterior uso en la elaboración de las microburbujas magnéticas mediante el método de doble emulsión.

7.4.2. Difracción de rayos X de polvos de NPMs

A partir de la difracción de rayos X de polvos es posible calcular el tamaño de partícula de la muestra utilizando la ecuación Debay-Scherrer⁹¹, la cual establece que el tamaño de partícula es inversamente proporcional al ancho a media altura de la señal de máxima intensidad en el difractograma (FWHM, por sus siglas en inglés) y al coseno del ángulo la señal de máxima intensidad de acuerdo a la ecuación 15:

$$D = \frac{0.94\lambda}{\beta \cos \theta_{\beta}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde λ es la longitud de onda del rayo incidente (1.541874 Å para la lámpara de Cu-K alpha), β al ancho a media altura de la señal de máxima intensidad (FWHM) en el difractograma y θ_{β} corresponde al ángulo de la señal de máxima intensidad.⁹¹

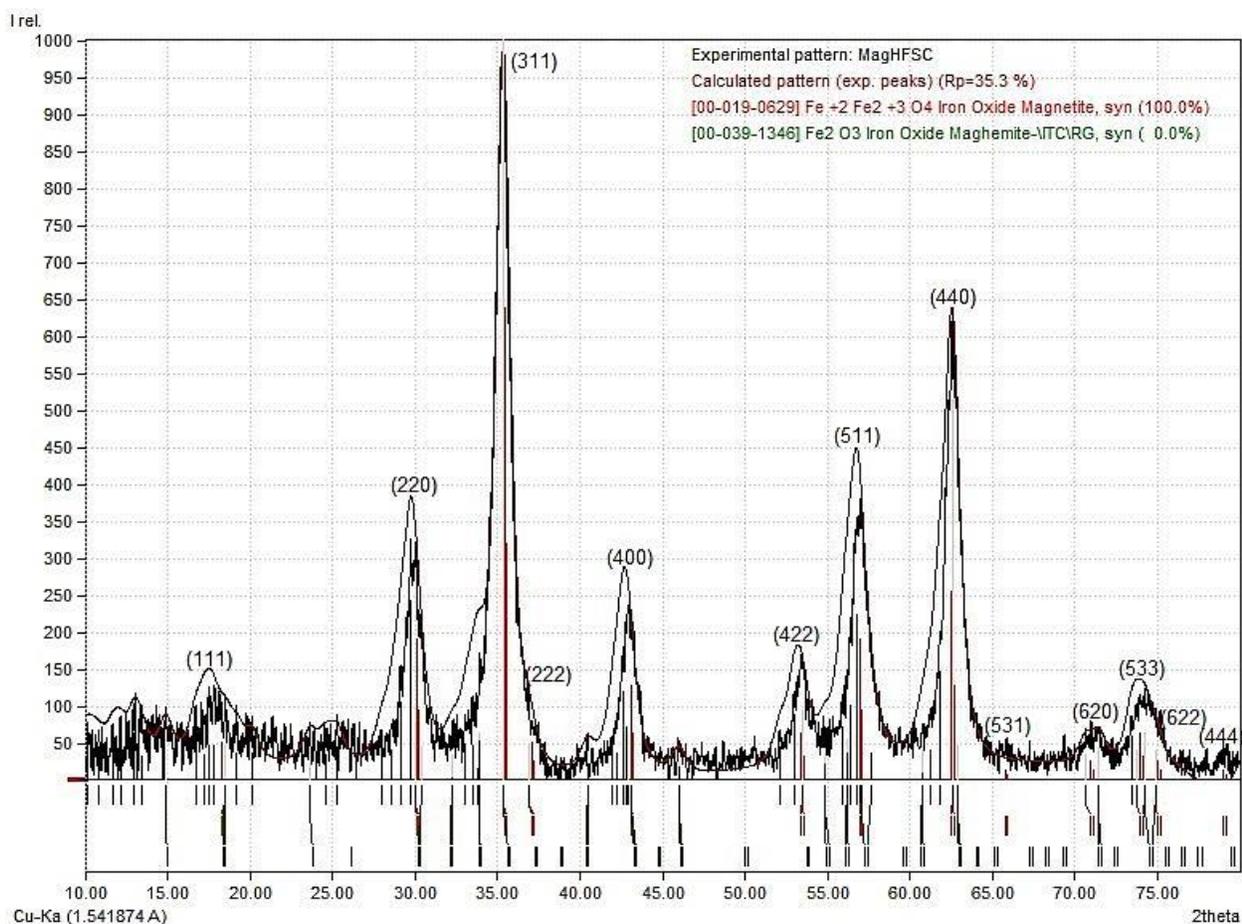


Figura 19. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-MagHFSC.

Los resultados presentados en los difractogramas de las figuras 19 a 23 fueron comparados con la base de datos PDF-2 (2013) del JCPDS utilizando el programa MATCH!-Phase identification from powder diffraction ver. 3.5.0.99[®]. El difractograma de la muestra NPM- NPM-MagHFSC tiene la reflexión de mayor intensidad a 35.44° en 2θ correspondiente al plano (311), además se observan el resto de reflexiones propias de la magnetita (111), (220), (222), (400), (422), (511), (440), (531), (620), (533), (622) y (444) características de una celda unitaria cúbica centrada en las caras. Las reflexiones de alta intensidad obtenidas son características para sistemas cristalinos de tamaño nanométrico.^{96,97}

El tamaño de partícula calculado para la muestra NPM-MagHFSC es de 9.59 nm considerando un FWHM de 0.9095, el valor de FWHM se obtuvo utilizando el ajuste gaussiano mediante el programa OriginPro 2016 b9.3.226[®].

El difractograma obtenido se comparó con el difractograma de magnetita (00-019-0629) y con el de maghemita (00-039-1346) obteniéndose un porcentaje de coincidencia de 100.0% para la magnetita y de 0% para la maghemita.

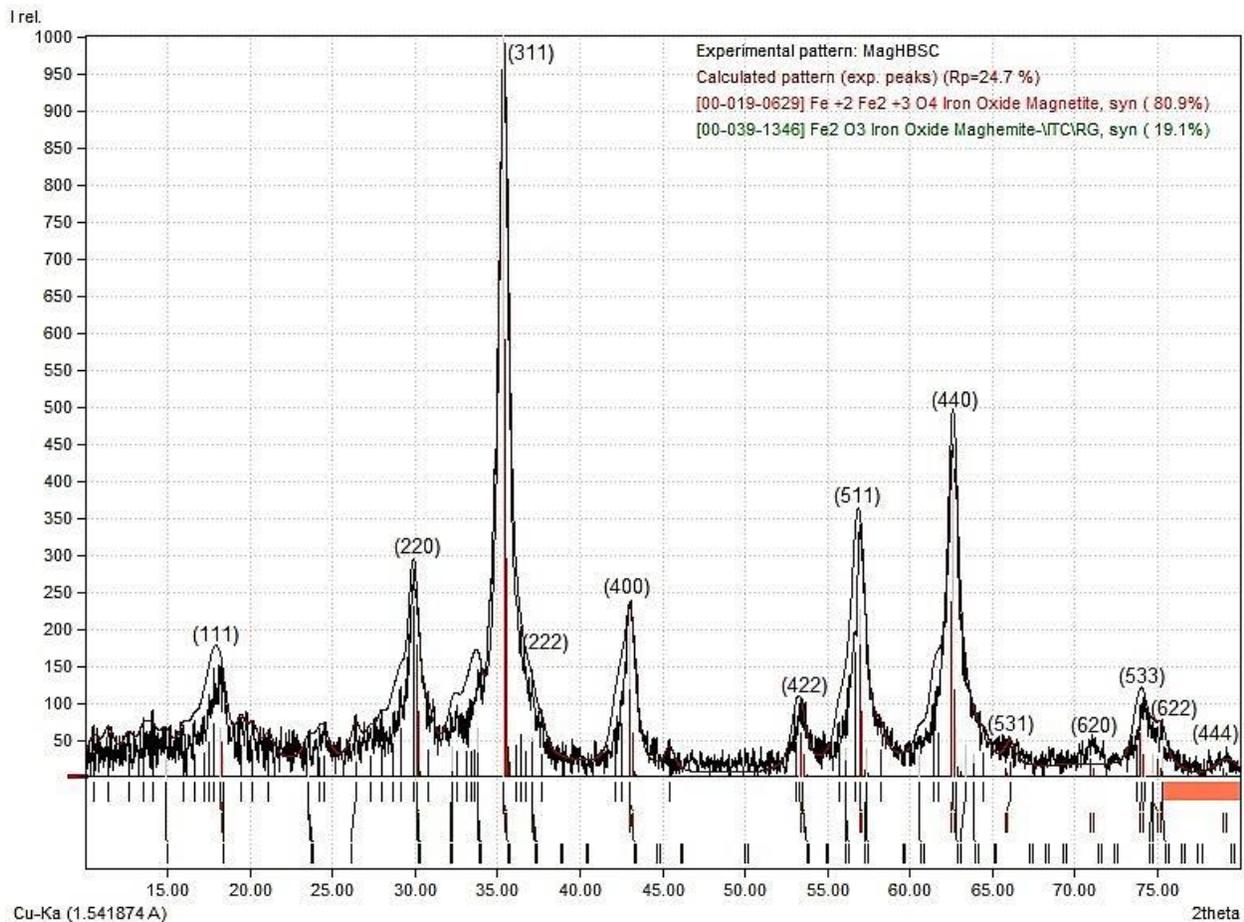


Figura 20. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-MagHBSC.

El difractograma de la muestra NPM-MagHBSC tiene la reflexión de mayor intensidad a 35.4653° en 2θ correspondiente al plano (311), además se observan el resto de reflexiones propias de la magnetita (111), (220), (222), (400), (422), (511), (440), (531), (620), (533), (622) y (444) características de una celda unitaria cúbica centrada en las caras como es para la magnetita. Las reflexiones de alta intensidad obtenidas son características para sistemas cristalinos de tamaño nanométrico.^{96,97}

El difractograma obtenido se comparó con el difractograma de magnetita (00-019-0629) y con el de maghemita (00-039-1346) obteniéndose un porcentaje de coincidencia de 80.9% para la magnetita y de 19.1% para la maghemita. La diferencia en los porcentajes obtenidos se

adjudica a la modificación del pH por la adición de ácido oléico durante la síntesis; pues en un pH más cercano a la neutralidad se propicia la formación de maghemita.⁹⁸

El tamaño de partícula calculado para la muestra NPM-MagHBSC es de 10.55 nm considerando un FWHM de 0.8268, el valor de FWHM se obtuvo utilizando el ajuste gaussiano mediante el programa OriginPro 2016 b9.3.226®.

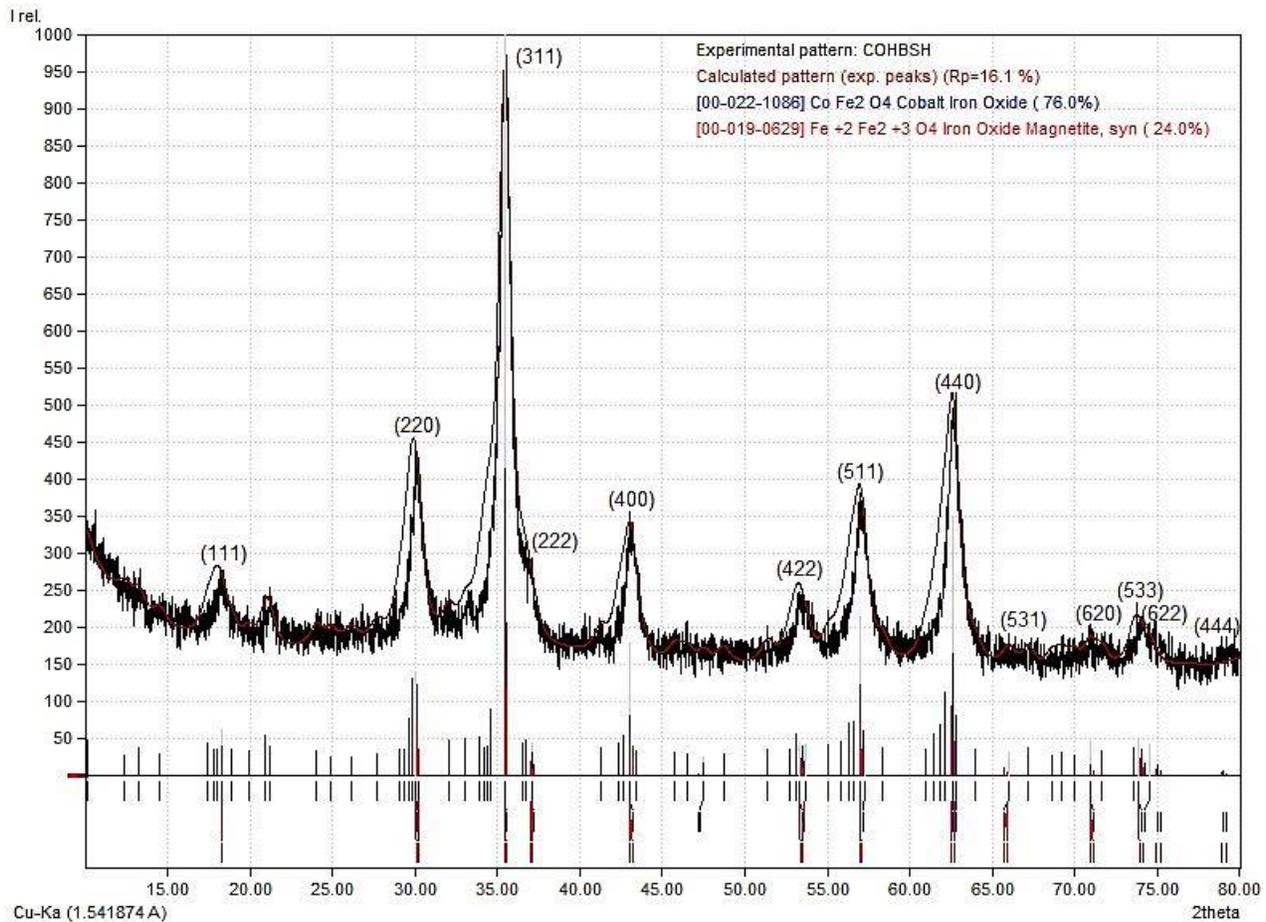


Figura 21. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-COHBSH.

El difractograma de la muestra NPM-COHBSH tiene la señal de mayor intensidad a 36.0234° en 2θ correspondiente al plano (311), además se observan el resto de reflexiones propias de la ferrita de cobalto (111), (220), (222) (400), (422), (511), (440), (531), (620), (533), (622) y (444) características de una celda unitaria cúbica como es para la ferrita de cobalto. Las reflexiones de alta intensidad obtenidas son características para sistemas cristalinos de tamaño nanométrico.^{96,97}

El difractograma obtenido se comparó con el difractograma de CoFe_2O_4 (00-022-1086) y magnetita (00-019-0629) obteniéndose un porcentaje de coincidencia de 76.0% para CoFe_2O_4 y de 24.0% para la magnetita.

El tamaño de partícula calculado para la muestra NPM-CFHBSH es de 8.4 nm considerando un FWHM de 1.0400, el valor de FWHM se obtuvo utilizando el ajuste gaussiano mediante el programa OriginPro 2016 b9.3. 226®.

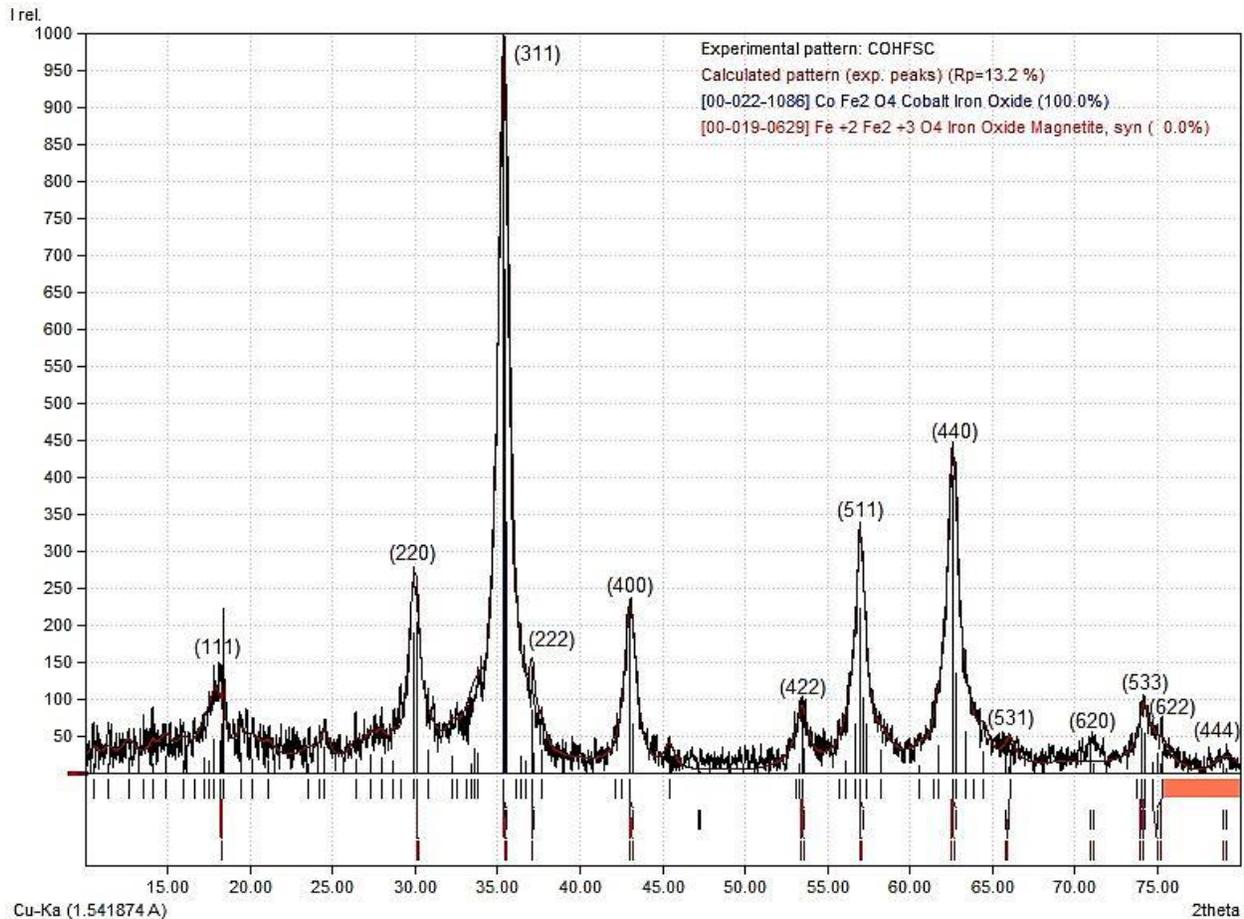


Figura 22. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-COHFSC.

El difractograma de la muestra NPM-COHFSC tiene la señal de mayor intensidad a 36.2710° y es asociada al plano (311) en 2θ correspondiente al plano (311), además se observan el resto de reflexiones propias de la ferrita de cobalto (111), (220), (222), (400), (422), (511), (440), (531), (620), (533), (622) y (444) características de una celda unitaria cúbica centrada en las caras como es para la ferrita de cobalto. Las reflexiones de alta intensidad obtenidas son características para sistemas cristalinos de tamaño nanométrico.^{96,97}

El difractograma obtenido se comparó con el difractograma de CoFe_2O_4 (00-022-1086) y magnetita (00-019-0629) obteniéndose un porcentaje de coincidencia de 100.0% para CoFe_2O_4 y de 0.0% para la magnetita.

El tamaño de partícula calculado para la muestra NPM- COHBSH es de 11.5 nm considerando un FWHM de 0.7600, el valor de FWHM se obtuvo utilizando el ajuste gaussiano mediante el programa OriginPro 2016 b9.3. 226®.

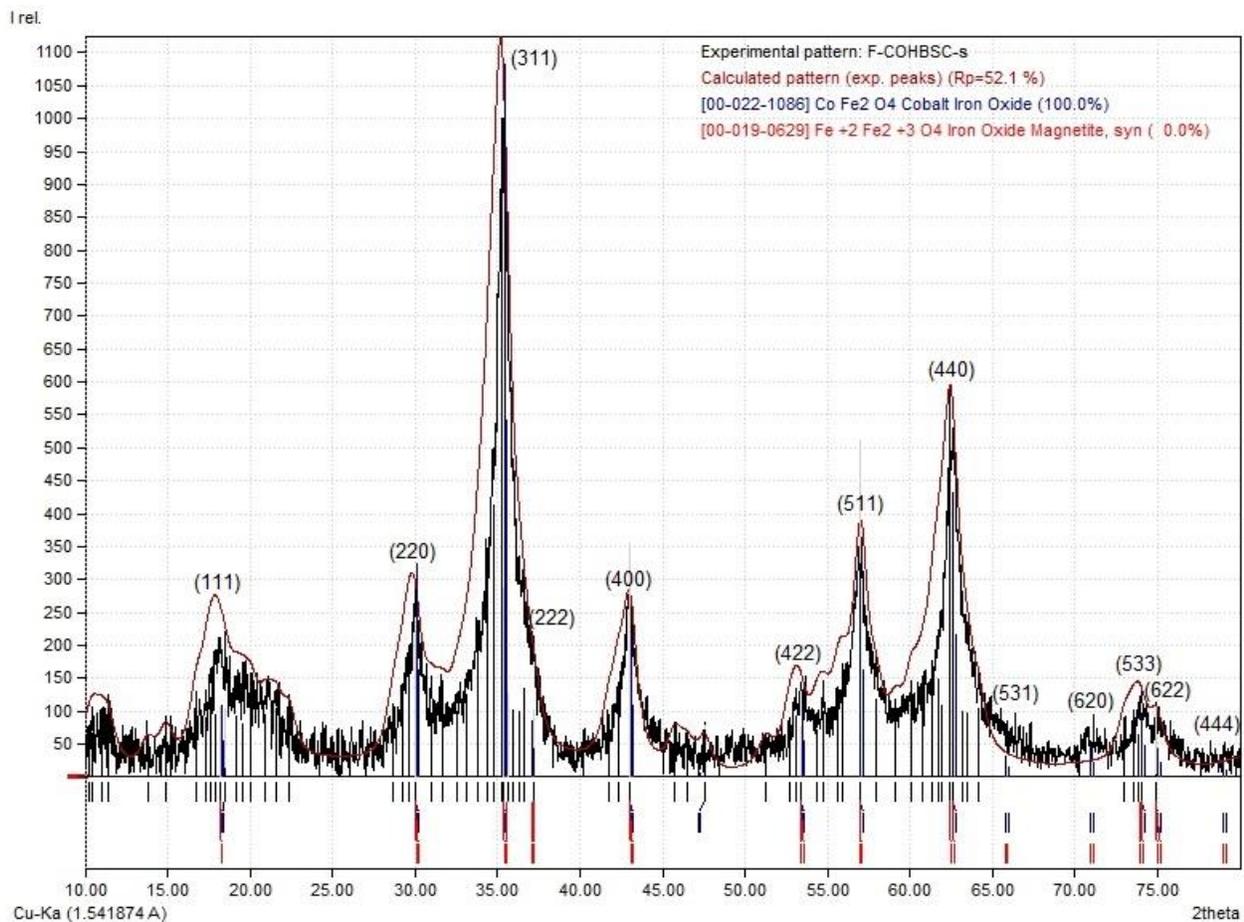


Figura 23. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-COHBSH.

El difractograma de la muestra NPM-COHBSH tiene la señal de mayor intensidad a 36.2921° y es asociada al plano (311), así como señales asociadas a los planos (111), (220), (222) (400), (422), (511), (440), (531), (620), (533), (622) y (444) características de una celda unitaria cúbica centrada en las caras como es para la magnetita; además de mostrar señales anchas y con ruido, lo que es característico para sistemas cristalinos de tamaño nanométrico.^{96,97}

El difractograma obtenido se comparó con el difractograma de CoFe_2O_4 (00-022-1086) y magnetita (00-019-0629) obteniéndose un porcentaje de coincidencia de 100.0% para CoFe_2O_4 y de 0.0% para la magnetita.

El tamaño de partícula calculado para la muestra NPM-CFHBSC es de 8.87 nm considerando un FWHM de 0.98568, el valor de FWHM se obtuvo utilizando el ajuste gaussiano mediante el programa OriginPro 2016 b9.3. 226®.

7.4.3. Caracterización por microscopía electrónica de NPMs

Se llevó a cabo la microscopía electrónica de transmisión de los cinco tipos de NPMs sintetizados y se muestran en las figuras 24 y 25:

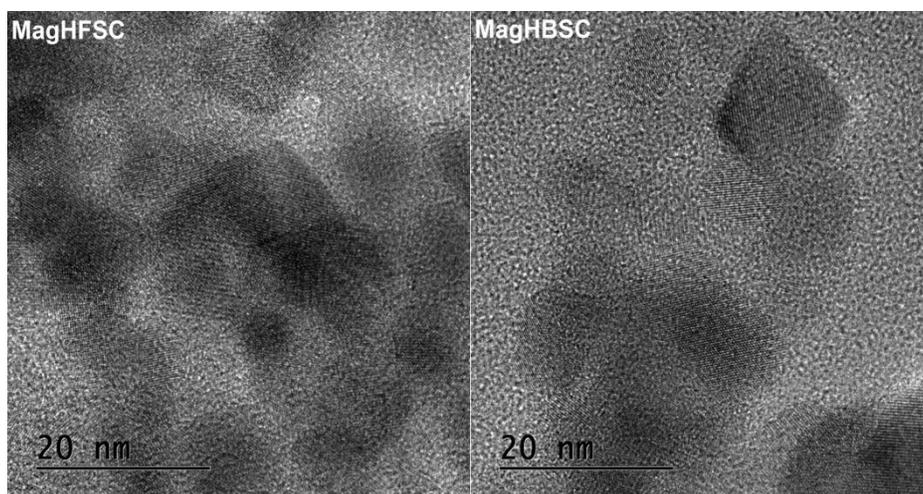


Figura 24. Micrografías TEM de nanopartículas de magnetita obtenidas por el método de coprecipitación.

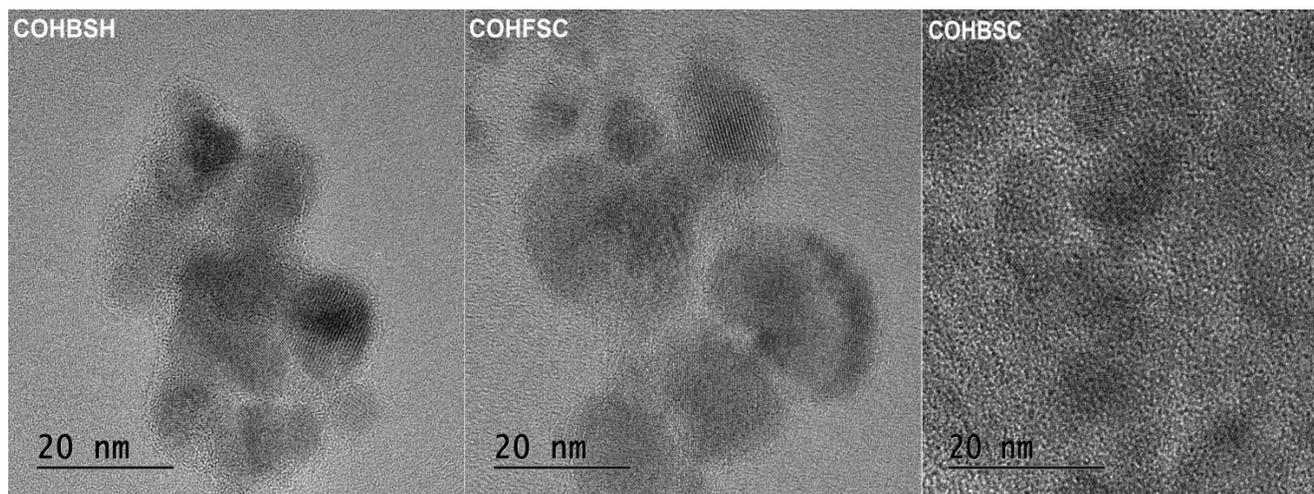


Figura 25. Micrografías TEM de nanopartículas de ferrita de cobalto obtenidas por el método de síntesis solvotermal y por el método de coprecipitación.

Mediante el análisis de las micrografías de las NPMs con el programa ImageJ® (N:25) se determinaron tamaños de partícula de 8.8 ± 1.1 nm para MagHFSC, 8.7 ± 1.1 nm para MagHBSC, 7.9 ± 1.2 nm para COHBSH, 8.2 ± 1.4 nm para COHFSC y 8.0 ± 1.5 nm para COHBSC. Esto confirma la obtención de NPMs tanto por el método de coprecipitación de magnetita, como de coprecipitación y síntesis solvotermal para ferrita de cobalto.

Las micrografías obtenidas de nanopartículas sintetizadas en presencia de ácido oleico muestran una diferencia en el contraste en la región cercana a las nanopartículas que no se logra observar en las nanopartículas sintetizadas en ausencia de ácido oleico y se atribuye a la adsorción de este en superficie.

Las figuras 26 y 27, ilustran la microscopía TEM de la MagHBSC y COHBSC respectivamente, donde se puede observar claramente la red cristalina de estas nanopartículas. A partir de la información obtenida de la difracción de rayos X de polvos de las muestras se realizó un análisis de difracción de electrones usando el software Gatan DigitalMicrograph® 3.01.598.0, asignando los índices de Miller, obteniéndose las distancias interplanares, y el eje de zona para cada muestra.

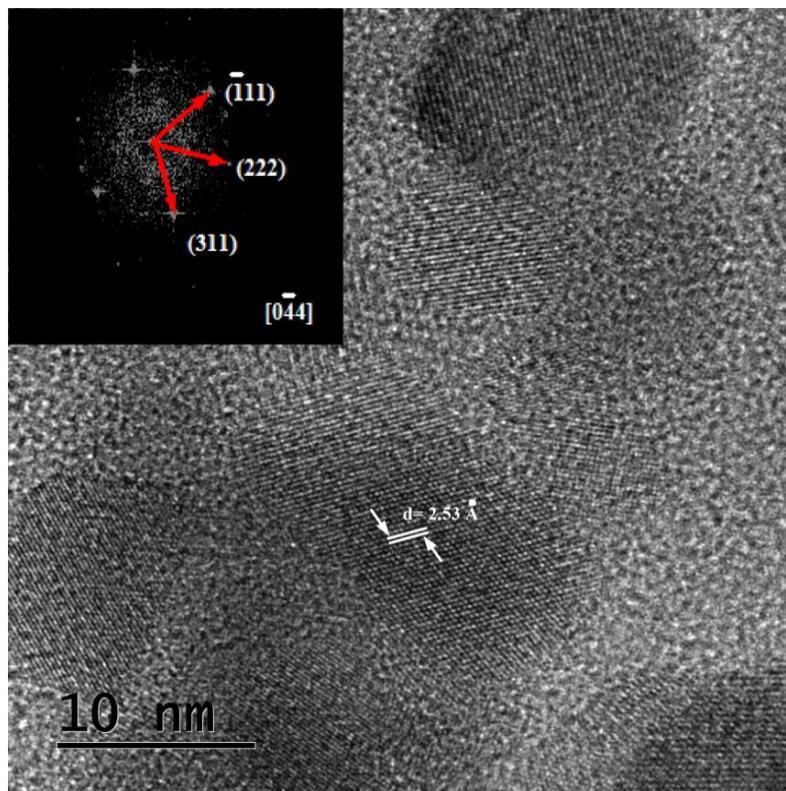


Figura 26. Micrografía TEM y difracción de electrones de nanopartículas magnéticas de MagHBSC con eje de zona $[\bar{0}44]$.

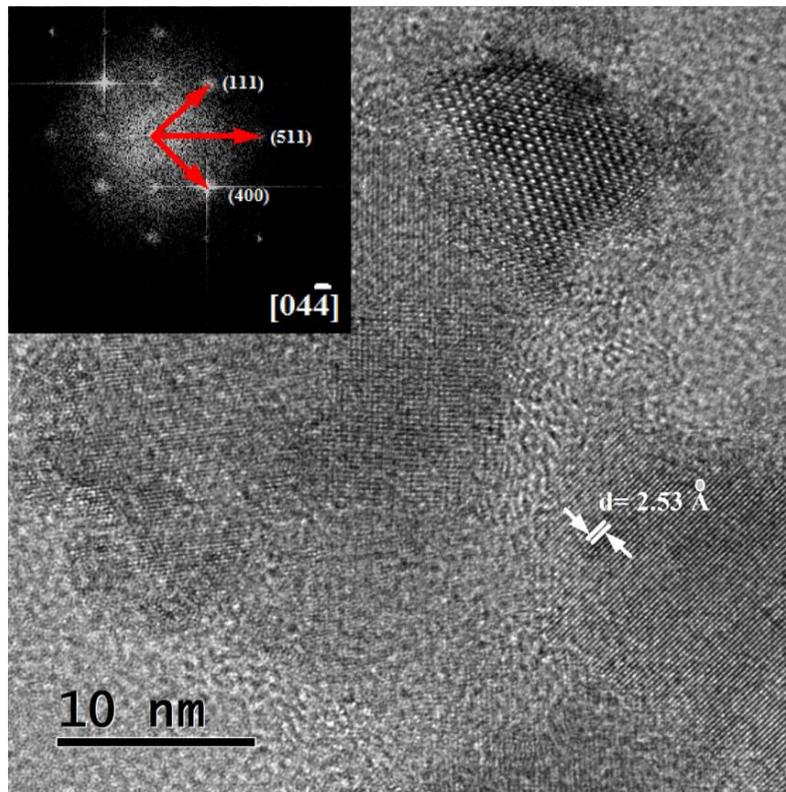


Figura 27. Micrografía TEM y difracción de electrones de nanopartículas magnéticas de COHBSC con eje de zona $[04\bar{4}]$.

El análisis de espectroscopía EDS para las muestras de NPMs se llevó a cabo en cúmulos de muestras observadas por medio de microscopía SEM para obtener una proporción más representativa del total de material obtenido. Los resultados muestran la diferencia de cobalto en la composición de ambos materiales observándose una proporción cercana a 2:1 del área bajo la curva para COHBSC y ausencia en MagHBSC. Las figuras 28 y 29 presentan los resultados obtenidos para las muestras de MagHBSC y COHBSC respectivamente.

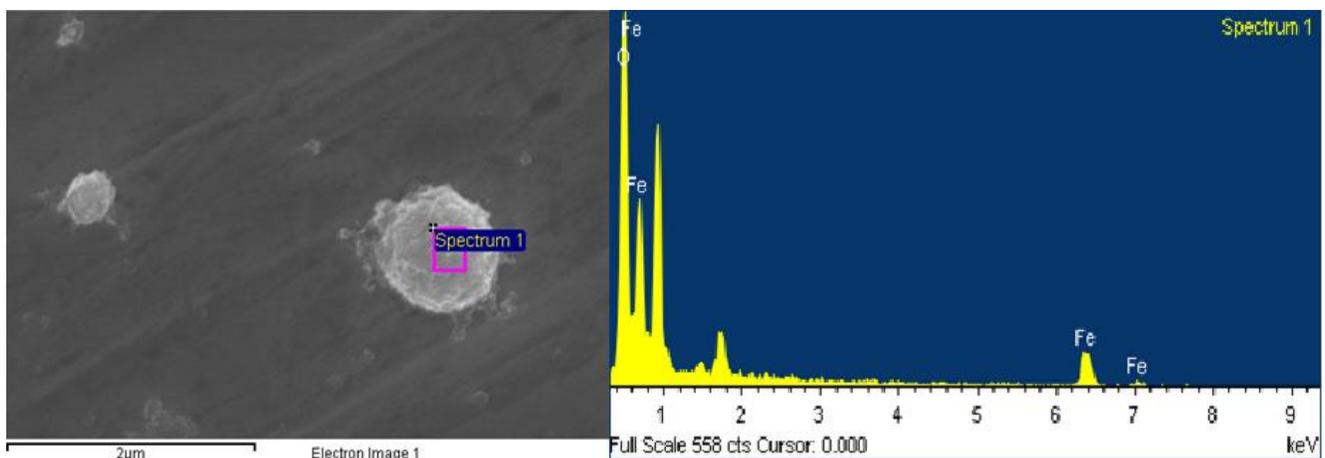


Figura 28. Espectroscopía EDS para cúmulo de NPM-MagHBSC.

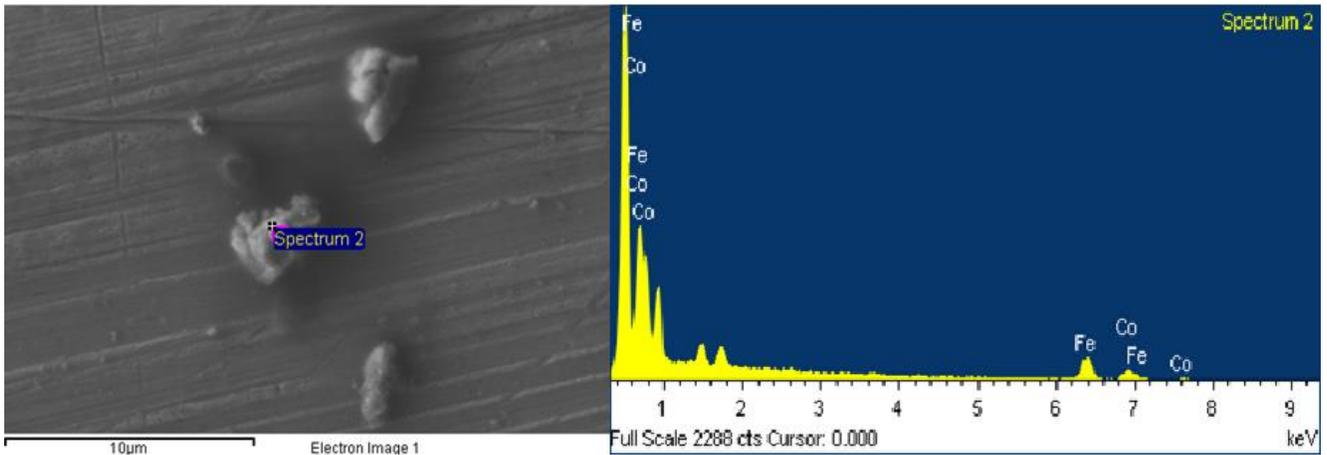


Figura 29. Espectroscopía EDS para cúmulo de NPM-COHBS.

7.4.4. Curvas de histéresis de NPMs

Se estudió la magnetización en función del campo para todas las nanopartículas, en la figura 29 se pueden observar esos resultados.

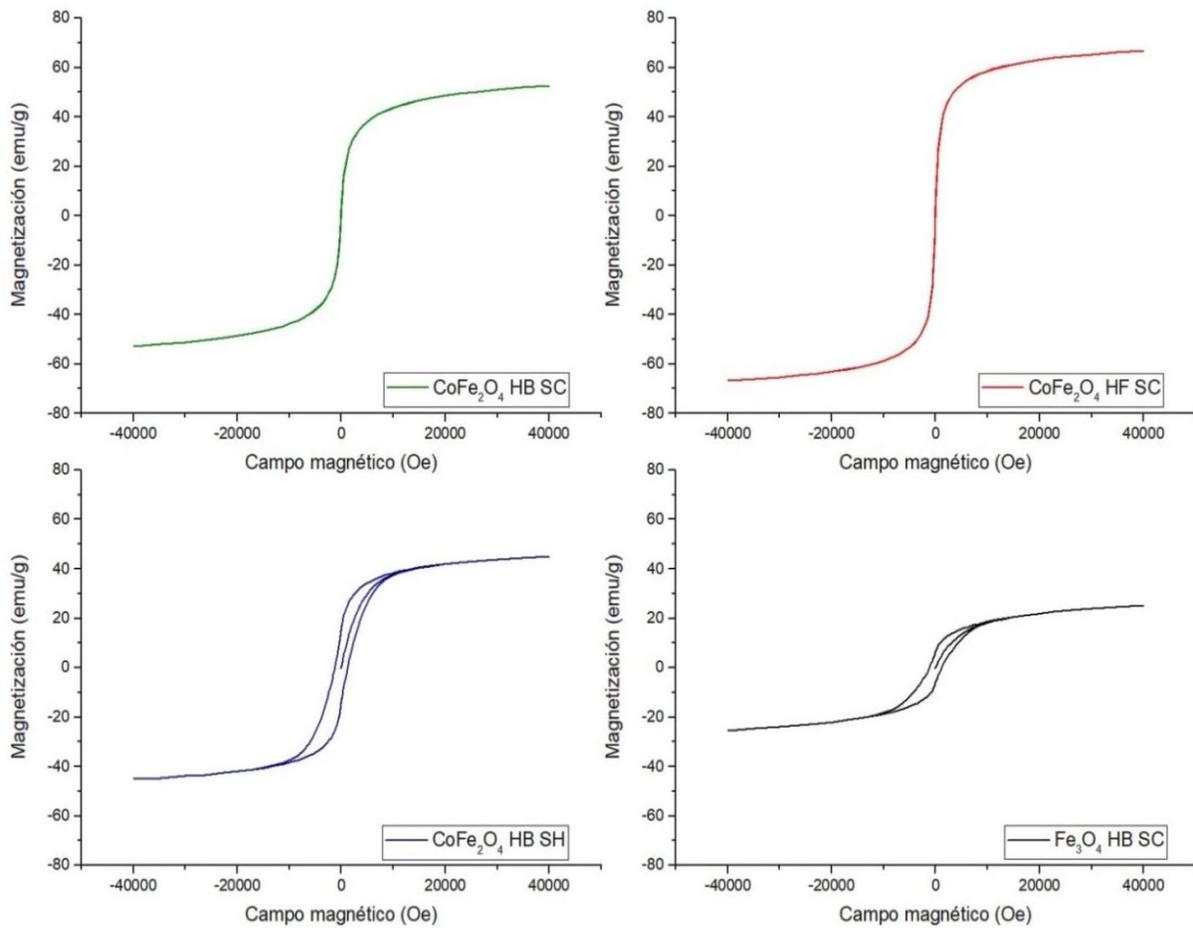


Figura 30. Curvas de histéresis de NPM a 280 K.

Las curvas de histéresis de las NPM muestran un comportamiento similar al superparamagnetismo para la ferrita de cobalto obtenida mediante síntesis por coprecipitación; mientras que para la ferrita de cobalto hidrofóbica obtenida mediante síntesis solvotermal y magnetita hidrofóbica obtenida mediante coprecipitación se observan un poco de histéresis, esto corresponde a comportamientos de materiales con multidominios magnéticos. La coercitividad encontrada en las muestras con histéresis se muestra en la tabla 12. La magnetización es mayor para las partículas hidrofílicas, como era de esperarse, ya que la masa de las partículas hidrofóbicas contiene también al oleato coordinado en superficie, lo que provoca el fenómeno de dilución magnética.

Tabla 12. Propiedades físicas de NPM sintetizadas.

Material	Tamaño TEM (nm)	Tamaño ec. Scherrer (nm)	Potencial Z (mV)	Saturación magnética (emu/g)	Coercitividad magnética (Oe)
MagHFS C	8.7 ± 1.1	9.6	-22.1 ± 2.1	-	-
MagHBS C	8.8 ± 1.1	10.5	-5.94 ± 2.2	25.14	1184.66
COHBSH	7.9 ± 1.2	8.4	-7.89 ± 0.7	44.83	1215.24
COHFSC	8.2 ± 1.4	11.5	-34.0 ± 3.1	65.32	30.93
COHBSC	8.0 ± 1.5	8.9	-3.99 ± 0.5	52.89	30.03

De manera macroscópica los productos obtenidos de la síntesis por coprecipitación y la síntesis solvotermal de ferrita de cobalto no muestran cambio en el polvo negro obtenido, sin embargo, el producto de la síntesis por coprecipitación de magnetita muestra un cambio a un color marrón con el paso del tiempo debido a la posible oxidación de este material a maghemita.⁴⁰⁻⁴³

Las nanopartículas de ferrita de cobalto mantienen durante un mayor tiempo sus propiedades superparamagnéticas por lo que se consideran mejores candidatos en su uso para detección mediante resonancia magnética de imagen y para la generación de hipertermia.⁴³

Los resultados obtenidos por difracción de rayos X de polvos, espectroscopia atómica y por las curvas de histéresis magnética muestran la obtención de nanopartículas de ferrita de cobalto con alta pureza por medio del método de coprecipitación y con presencia de magnetita por el método de síntesis solvotermal. Por medio del método de síntesis hidrotermal es probable que ocurra la reacción lateral de formación de magnetita, tal como ocurre en la

síntesis llevada a cabo por Sun *et al.*⁹⁹ en condiciones experimentales similares excepto por la ausencia de acetilacetonato de cobalto (II).

7.4.5. Espectroscopia atómica de NPMs de ferrita de cobalto

Para cuantificar la proporción de hierro y cobalto de las NPMs se llevó a cabo la espectroscopia atómica de NPMs de ferrita de cobalto esperando una proporción 2:1 de Fe: Co considerando una fórmula mínima de CoFe_2O_4 . Los resultados de las tres muestras de ferrita de cobalto se muestran en la tabla 13:

Tabla 13. Resultados de espectroscopia atómica en el análisis de NPMs.

Elemento	Concentración (ppm)	Porcentaje (%)	Proporción hierro : cobalto
NPM-COHBSH			
Hierro	180068.28	70.07	2.34: 1.00
Cobalto	76927.00	29.93	
Suma	256995.28		
NPM-COHFSC			
Hierro	404178.41	66.90	2.02: 1.00
Cobalto	199936.52	33.10	
Suma	604114.83		
NPM-COHBSC			
Hierro	414178.39	67.44	2.07: 1.00
Cobalto	199936.45	32.56	
Suma	624114.84		

La tabla 13 muestra concordancia con la proporción esperada de hierro:cobalto (2:1) en el caso de las NPM-COHFSC y NPM-COHBSC, sin embargo, en la muestra de NPM-COHBSH se observa una desviación a esta proporción misma que se atribuye a la formación de magnetita durante su síntesis.

7.4.6. Análisis de infrarrojo con reflectancia ATR. (ATR-FTIR) de NPMs

Una vez se confirmó que se obtuvieron los materiales con propiedades cercanas al superparamagnetismo, tamaños nanométricos y baja o nula coercitividad magnética, así como la mayor saturación magnética posible y una mayor afinidad por disolventes orgánicos que por el agua por lo que después de llevar a cabo la funcionalización de su superficie con ácido oleico se llevaron a cabo estudios de FTIR para verificar y comprender el mecanismo de adsorción del ácido en la superficie de las NPMs hidrofóbicas mediante la comparación con las nanopartículas hidrofílicas y el ácido oléico utilizado para su síntesis.

Los resultados de FTIR de NPMs de magnetita hidrofílica e hidrofóbica obtenidas por medio del método de síntesis por coprecipitación se muestran en la figura 31 y la tabla 14:

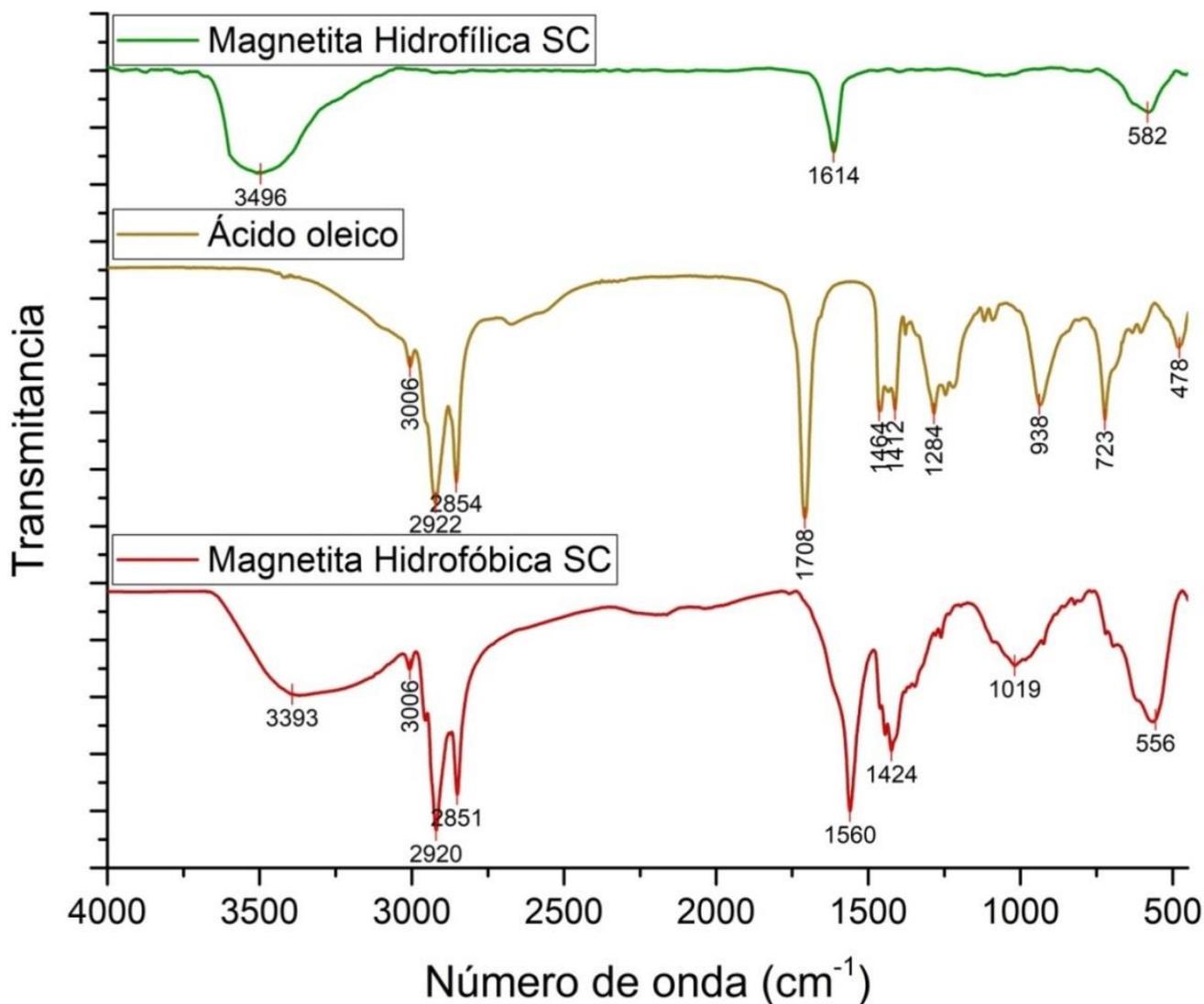


Figura 31. Análisis de ATR-FTIR de NPMs de magnetita.

El espectro de absorción del ácido oleico muestra dos señales agudas en 2922 y 2854 cm^{-1} atribuidas al estiramiento asimétrico y el estiramiento simétrico de CH_2 respectivamente, estas señales también se encuentran en el espectro de las NPMs de magnetita hidrofóbica (MagHBSC) en 2920 y 2851 cm^{-1} . En el espectro del ácido oleico la señal a 1708 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del doble enlace del grupo carbonilo, junto con dos señales; una ancha en 1246 cm^{-1} y otra más débil en 1424 cm^{-1} , debido a la torsión y estiramiento del grupo carboxilo. La torsión de O-H del grupo carboxilo en el plano y fuera del mismo aparecen a 1412 y 938 cm^{-1} , respectivamente.

En el espectro de MagHBSC la señal asimétrica y la señal simétrica de estiramiento de $-\text{CH}_2-$ se desplazan a 2920 y 2851 cm^{-1} respectivamente. Las moléculas de ácido oleico se adsorbieron en la superficie del sólido, por lo que las señales características se desplazaron a un región de frecuencias menor a la indicada por la cadena hidrocarbonada.²⁷ Este fenómeno sugiere la obtención de una monocapa en la superficie de las nanopartículas con un alto empaquetamiento de moléculas de adsorbato en estado cristalino. Es importante observar que la señal de estiramiento de C-O del grupo carboxilo presente a 1708 cm^{-1} en el espectro de ácido oléico se encuentra ausente en el espectro de las NPMs, y aparecen dos señales nuevas a 1560 y 1424 cm^{-1} en su lugar, siendo características de la vibración asimétrica ($\nu_{\text{as}} -\text{COO}^-$) y la vibración simétrica ($\nu_{\text{s}} -\text{COO}^-$), la diferencia ($\Delta_{-\text{COO}}$) de estas dos bandas puede ser utilizada para distinguir el tipo de interacción entre el carboxilato y el metal; si $\Delta_{-\text{COO}}$ ($<110\text{ cm}^{-1}$) se considera corresponde una interacción tipo quelato bidentado, si $\Delta_{-\text{COO}}$ ($140-190\text{ cm}^{-1}$) corresponde a una interacción tipo puente bidentado y si $\Delta_{-\text{COO}}$ ($200-320\text{ cm}^{-1}$) corresponde a una interacción monodentada.^{27,94} La diferencia entre la vibración asimétrica y la vibración simétrica obtenida para las NPM COHBSC ($\Delta_{-\text{COO}}$: $1560-1424=136\text{ cm}^{-1}$) lo que indica una coordinación con interacción tipo puente bidentado. Este resultado se explica debido a que las secuencias de unión de los ácidos carboxílicos en la superficie de las nanopartículas fue una combinación de moléculas unidas de manera simétrica y de moléculas que se unieron con ángulo a la misma. Se demuestra una fuerte adsorción con la aparición de la señal a 1089 cm^{-1} del estiramiento C-O por un enlace sencillo. La tabla 14 resume estos resultados:

Tabla 14. Asignación de bandas observadas en el espectro de FTIR de NPM de magnetita

Material	Banda (cm^{-1})	Grupo funcional	Asignación de señales
Ácido Oleico	2922	$-\text{CH}_2-$	Estiramiento asimétrico de $-\text{CH}_2-$
	2854	$-\text{CH}_2-$	Estiramiento asimétrico de $-\text{CH}_2-$
	1708	C=O	Estiramiento del carbonilo
	1464	$-\text{COOH}$	Torsión en el plano del dímero del carboxilo
	1412	C=O	Torsión/estiramiento del carboxilo
	1284	C=O	Torsión/estiramiento del carboxilo
	938	$-\text{COOH}$	Torsión fuera del plano del dímero del carboxilo
MagHFS C	3385	O-H	Estiramiento del enlace O-H
	582	FeO	ν (FeO)
MagHBS C	3393	O-H	Estiramiento del enlace O-H
	2920	$-\text{CH}_2-$	Estiramiento asimétrico de $-\text{CH}_2-$
	2851	$-\text{CH}_2-$	Estiramiento asimétrico de $-\text{CH}_2-$
	1560	$-\text{COO}^-$	Vibración asimétrica ($\nu_{\text{as}} -\text{COO}^-$)

	1424	-COO ⁻	Vibración simétrica(ν_s -COO ⁻)
	1019	C-O	Estiramiento de enlace sencillo C-O
	556	FeO	ν (FeO)

Se realizaron estudios de FTIR de los acetilacetonatos de hierro (III) y cobalto (II), así como de ácido oleico para verificar y comprender el mecanismo de adsorción del ácido en la superficie de las NPM de ferrita de cobalto hidrofóbica obtenida mediante síntesis solvotermal comparando los espectros los cuales corresponden a la figura 32.

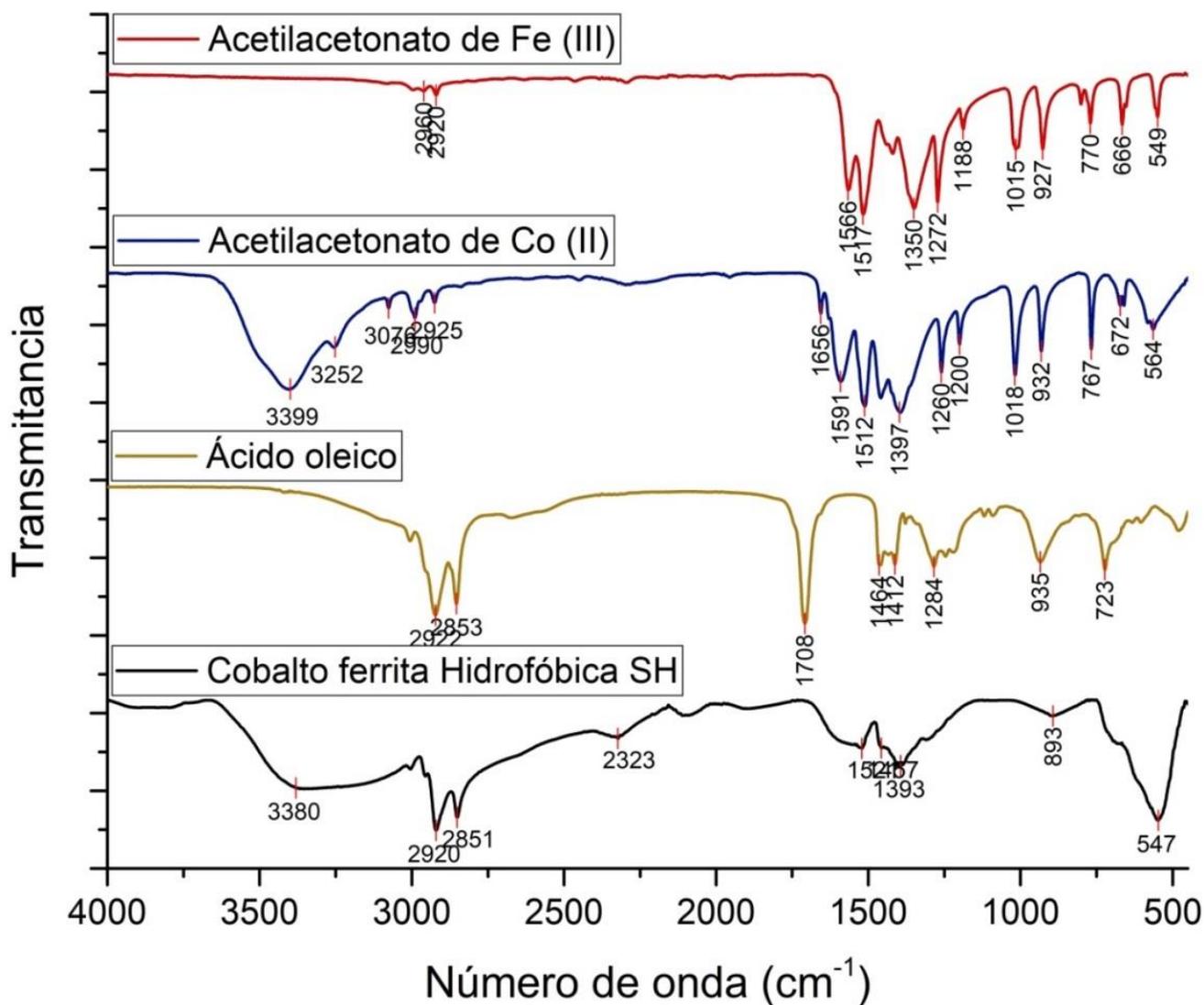


Figura 32. Análisis de ATR-FTIR de NPMs de ferrita de cobalto hidrofóbica obtenida mediante síntesis solvotermal.

El espectro de absorción del ácido oleico muestra dos señales agudas en 2926 y 2853 cm^{-1} atribuidas al estiramiento asimétrico y el estiramiento simétrico de CH_2 respectivamente, estas

señales también se encuentran en el espectro de las NPMs de ferrita de cobalto en 2920 y 2853 cm^{-1} . En el espectro del ácido oleico la señal a 1708 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del doble enlace del grupo carbonilo, junto con dos señales; una ancha en 1304 cm^{-1} y otra más débil en 1412 cm^{-1} , debido a la torsión y estiramiento del grupo carboxilo. La torsión de O-H del grupo carboxilo en el plano y fuera del mismo aparecen a 1464 y 935 cm^{-1} , respectivamente.

En el espectro de COHBSC la señal asimétrica y la señal simétrica de estiramiento de $-\text{CH}_2-$ se desplazan a 2920 y 2853 cm^{-1} respectivamente. Las moléculas de ácido oleico se adsorbieron en la superficie del sólido, por lo que las señales características se desplazaron a un región de frecuencias menor a la indicada por la cadena hidrocarbonada.²⁷ Este fenómeno sugiere la obtención de una monocapa en la superficie de las nanopartículas con un alto empaquetamiento de moléculas de adsorbato en estado cristalino. Es importante observar que la señal de estiramiento de C-O del grupo carboxilo presente a 1708 cm^{-1} en el espectro de ácido oléico se encuentra ausente en el espectro de las NPMs, y aparecen dos señales nuevas a 1520 y 1401 cm^{-1} en su lugar. La diferencia entre la vibración asimétrica y la vibración simétrica obtenida para las NPM COHBSC ($\Delta_{\text{-COO}}$: 1520-1401= 119 cm^{-1}) lo que indica una coordinación con interacción tipo quelato bidentado. Este resultado se explica debido a que las secuencias de unión de los ácidos carboxílicos en la superficie de las nanopartículas fue una combinación de moléculas unidas de manera simétrica y de moléculas que se unieron con ángulo a la misma. Se demuestra una fuerte adsorción debido a la aparición de la señal a 893 cm^{-1} del estiramiento C-O por un enlace sencillo.

Se realizaron estudios de FTIR de ácido oleico para verificar y comprender el mecanismo de adsorción del ácido en la superficie de las NPM de ferrita de cobalto hidrofóbica obtenida mediante coprecipitación mediante la comparación con las nanopartículas hidrofílicas y el ácido oléico utilizado para su síntesis, los cuales corresponden a la figura 33.

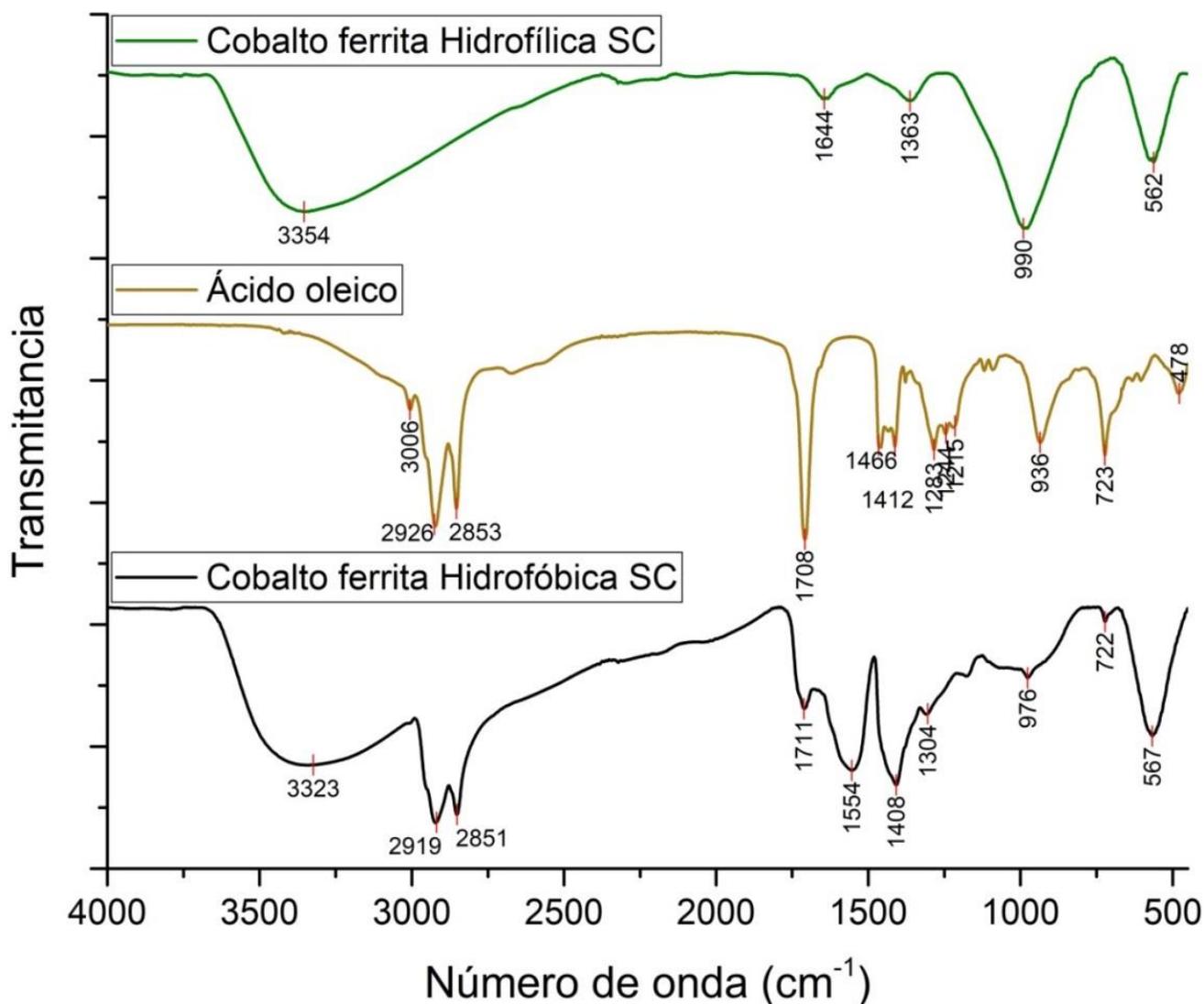


Figura 33. Análisis de ATR-FTIR de NPMs de ferrita de cobalto obtenida mediante coprecipitación.

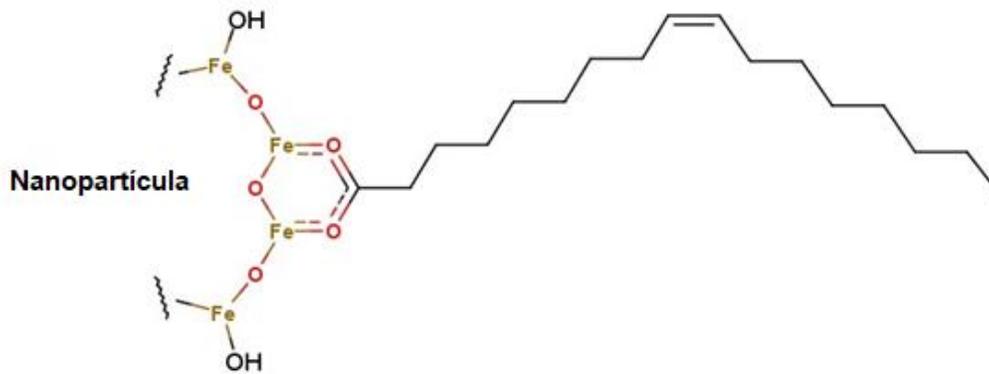
El espectro de absorción del ácido oleico muestra dos señales agudas en 2926 y 2853 cm^{-1} atribuidas al estiramiento asimétrico y el estiramiento simétrico de CH_2 respectivamente, estas señales también se encuentran en el espectro de las NPMs de ferrita de cobalto en 2919 y 2851 cm^{-1} . En el espectro del ácido oleico la señal a 1708 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del doble enlace del grupo carbonilo, junto con dos señales; una ancha en 1304 cm^{-1} y otra más débil en 1408 cm^{-1} , debido a la torsión y estiramiento del grupo carboxilo. La torsión de O-H del grupo carboxilo en el plano y fuera del mismo aparecen a 1466 y 936 cm^{-1} , respectivamente. En el espectro de COHBSC la señal asimétrica y la señal simétrica de estiramiento de $-\text{CH}_2-$ se desplazan a 2919 y 2851 cm^{-1} respectivamente. Las moléculas de ácido oleico se adsorbieron en la superficie del sólido, por lo que las señales características se desplazaron a

un región de frecuencias menor a la indicada por la cadena hidrocarbonada.²⁷ Este fenómeno sugiere la obtención de una monocapa en la superficie de las nanopartículas con un alto empaquetamiento de moléculas de adsorbato en estado cristalino. Es importante observar que la señal de estiramiento de C-O del grupo carboxilo presente a 1708 cm⁻¹ en el espectro de ácido oléico se encuentra ausente en el espectro de las NPMs, y aparecen dos señales nuevas a 1554 y 1408 cm⁻¹. La diferencia entre la vibración asimétrica y la vibración simétrica obtenida para las NPM COHBSC (Δ_{COO^-} : 1554-1408= 146 cm⁻¹) lo que indica una coordinación con interacción tipo puente bidentado. Este resultado se explica debido a que las secuencias de unión de los ácidos carboxílicos en la superficie de las nanopartículas fue una combinación de moléculas unidas de manera simétrica y de moléculas que se unieron con ángulo a la misma. Se demuestra una fuerte adsorción debido a la aparición de la señal a 976 cm⁻¹ del estiramiento C-O por un enlace sencillo. La tabla 15 resume los resultados obtenidos:

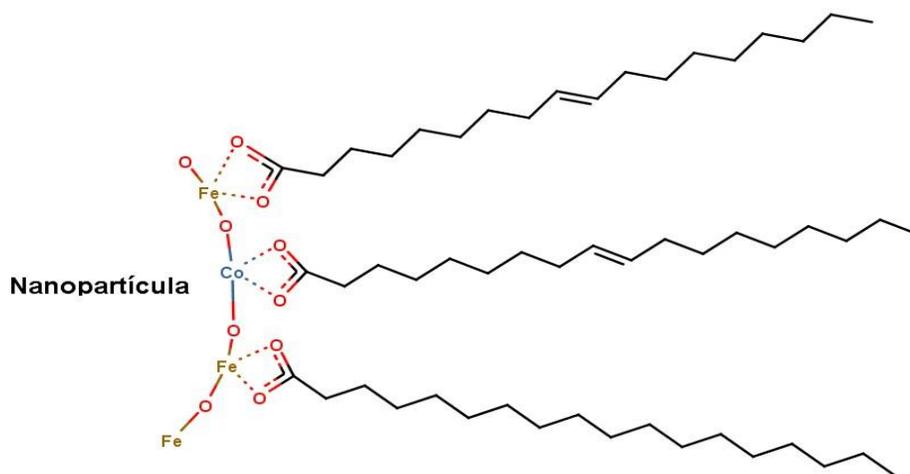
Tabla 15. Asignación de señales observadas en el espectro de FTIR de NPM de cobaltoferrita.

Material	Banda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Asignación de señales
Ácido Oleico	2922	-CH ₂ -	Estiramiento asimétrico de -CH ₂ -
	2852	-CH ₂ -	Estiramiento asimétrico de -CH ₂ -
	1708	C=O	Estiramiento del carbonilo
	1461	-COOH	Torsión en el plano del dímero del carboxilo
	1412	C=O	Torsión/estiramiento del carboxilo
	1283	C=O	Torsión/estiramiento del carboxilo
	934	-COOH	Torsión fuera del plano del dímero del carboxilo
COHFSC	3354	O-H	Estiramiento del enlace O-H
	562	FeO, CoO	$\nu(\text{FeO}), \nu(\text{CoO})$
COHBSC	3323	O-H	Estiramiento del enlace O-H
	2919	-CH ₂ -	Estiramiento asimétrico de -CH ₂ -
	2851	-CH ₂ -	Estiramiento asimétrico de -CH ₂ -
	1554	-COO ⁻	Vibración asimétrica ($\nu_{\text{as}} \text{-COO}^-$)
	1408	-COO ⁻	Vibración simétrica ($\nu_{\text{s}} \text{-COO}^-$)
	976	C-O	Estiramiento de enlace sencillo C-O

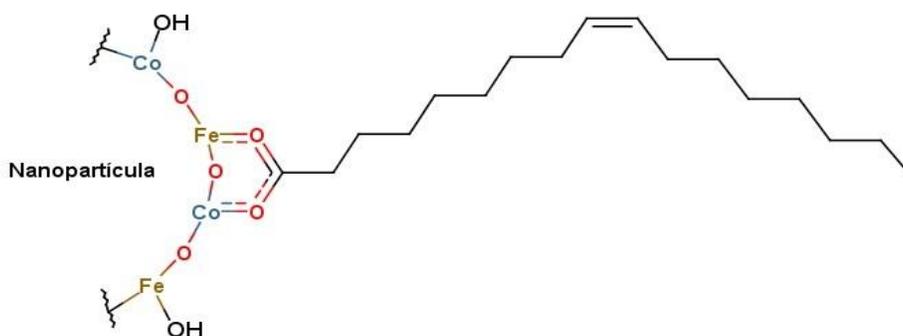
La coordinación de ácido oleico con el hierro o el cobalto en la superficie de las nanopartículas magnéticas disminuye la intensidad de carga debido a la disminución en grupos hidroxilo disponibles como grupos electrodonadores y se refleja en la disminución del valor absoluto de potencial Z en las NPMs recubiertas como se muestra en la tabla 12. El esquema 5 representa la forma en que se coordina el ácido oleico en un átomo de hierro de una partícula de magnetita, el mismo fenómeno se puede presentar en los esquemas 6 y 7:



Esquema 5. Representación de la coordinación de ácido oleico en superficie de una nanopartícula de MagHBSC.



Esquema 6. Representación de la coordinación de ácido oleico en superficie de una nanopartícula de COHBSH.



Esquema 7. Representación de la coordinación de ácido oleico en superficie de una nanopartícula de COHBSC.

Los tres tipos de nanopartículas muestran una efectiva dispersión en cloruro de metileno, por lo que todas pueden ser incluidas en la fase hidrofóbica para la síntesis de microburbujas, sin

embargo, la síntesis de nanopartículas con mezcla de fases en el caso de COHBSH dificulta observar los efectos del tipo de NPM sobre las propiedades de las microburbujas por lo que se decidió continuar evaluando microburbujas sintetizadas sólo con MagHBSC y COHBSC.

7.5. Síntesis y caracterización de sistemas poliméricos e híbridos

La síntesis de microburbujas (MB) se llevó a cabo en ausencia de nanopartículas magnéticas (\emptyset), en presencia de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto hidrofóbica (Co) o en presencia de nanopartículas magnéticas de magnetita hidrofóbica (Fe) tanto de ácido Poli-L-láctico (PLA) y de carbonato de polipropileno (CPP) como se muestra en la tabla 16:

Tabla 16. Claves de sistemas poliméricos e híbridos con metotrexato sintetizados.

		Tipo de nanopartícula magnética (NPM)		
		Ausente	Magnetita hidrofóbica	Ferrita de cobalto hidrofóbica
Polímero hidrofóbico (Capa interna)	Ácido poli-L-láctico	MBPLA\emptyset	MBPLAFe	MBPLACo
	Carbonato de polipropileno	MBCPP\emptyset	MBCPPFe	MBCPPCo

Una vez se llevó a cabo la síntesis de los seis sistemas propuestos se prosiguió su separación del medio mediante centrifugación, los residuos de PVA y metotrexato que no coalecieron con los sistemas fueron guardados para llevar a cabo su cuantificación.

7.5.1. Porcentaje de carga de metotrexato en sistemas poliméricos e híbridos

La cuantificación de PVA se realizó mediante gravimetría tomando alícuotas iguales para el sobrenadante considerando la cantidad de metotrexato en el medio, las cantidades de metotrexato remanentes se muestran en la tabla 17:

Tabla 17. Cantidad de PVA Adsorbida por los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados.

Sistema	Masa de sistema obtenida (mg)	Masa de PVA adsorbida (g)	Proporción PVA: Polímero hidrofóbico
MBPLA\emptyset	494.6	0.8721	1.76
MBPLAFe	481.7	0.8542	1.77
MBPLACo	482.2	0.8735	1.81
MBCPP\emptyset	492.7	0.8436	1.71
MBCPPFe	486.5	0.8592	1.77
MBCPPCo	481.2	0.8629	1.79

La cuantificación de metotrexato en los residuos de síntesis se realizó mediante espectroscopia UV-Visible; sin embargo, se observa una modificación del máximo de

absorción, así como del ancho del pico debido a la interacción entre las cadenas de PVA y metotrexato¹⁰⁰ como se presenta en la figura 34.

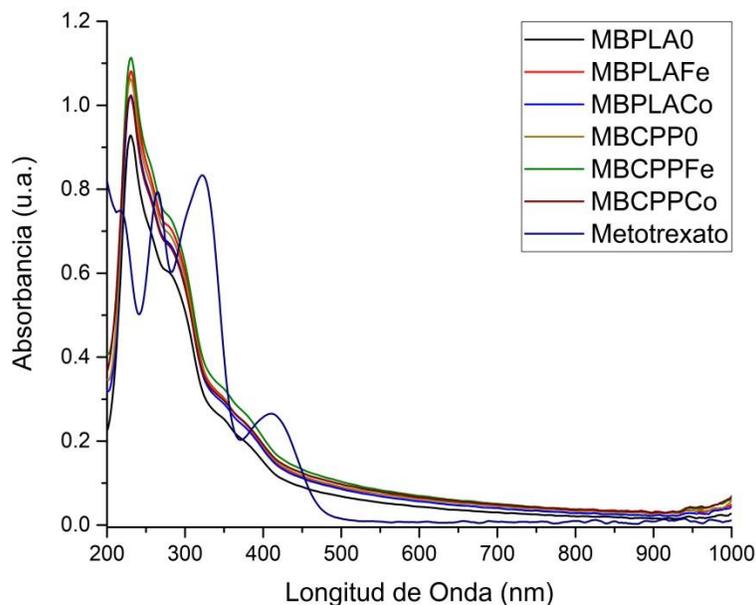


Figura 34. Espectro de UV Visible de los sobrenadantes obtenidos mediante la centrifugación de los sistemas poliméricos e híbridos.

Para llevar a cabo la cuantificación de metotrexato en los sobrenadantes se llevó a cabo una curva de calibración mediante la técnica de adiciones estándar utilizando metotrexato sódico USP como estándar interno para los 6 sistemas de manera independiente. Y los resultados se muestran a continuación en la tabla 18:

Tabla 18. Eficiencia de carga de metotrexato en la síntesis de sistemas poliméricos e híbridos basados en microburbujas.

Sistema	Masa de sistema obtenida (mg)	Masa de metotrexato / miligramo de sistema (mg)	Porcentaje de carga (%)
MBPLA0	494.6	0.0316	62.52
MBPLAFe	481.7	0.0314	60.50
MBPLACo	482.2	0.0309	59.60
MBCPP0	492.7	0.0318	62.67
MBCPPFe	486.5	0.0319	62.08
MBCPPCo	481.2	0.0319	61.40

Los sobrenadantes no contienen las microburbujas, pero están compuestos por los restos de PVA y metotrexato, y en todos ellos se observa la formación de geles de alta viscosidad. Para

evitar la generación de residuos peligrosos y aprovechando la viscosidad de los sobrenadantes, se considera que estos podrían ser administrados en los sitios cercanos a tumores para llevar a cabo la oclusión de su microvasculatura, disminuyéndose la captación de nutrientes mientras se libera metotrexato por medio de su difusión desde la oclusión formada, es decir, las dispersiones de PVA-metotrexato posiblemente funcionen como agentes embolizantes (ej. dispositivo Contour™) además de fungir como sistema de liberación de metotrexato.¹⁰¹

7.5.2. Microscopía electrónica de sistemas poliméricos e híbridos

Se llevó a cabo la determinación de distribución de tamaño de partícula y morfología mediante microscopía SEM de los 6 sistemas poliméricos e híbridos sintetizados. Para ello se colocó una dispersión acuosa de los sistemas y se llevó a cabo su congelación utilizando nitrógeno líquido previo a su liofilización en los portaobjetos del microscopio electrónico. Las micrografías obtenidas se muestran a continuación en la figura 35 y los histogramas de distribución de tamaño de partícula en la figura 36:

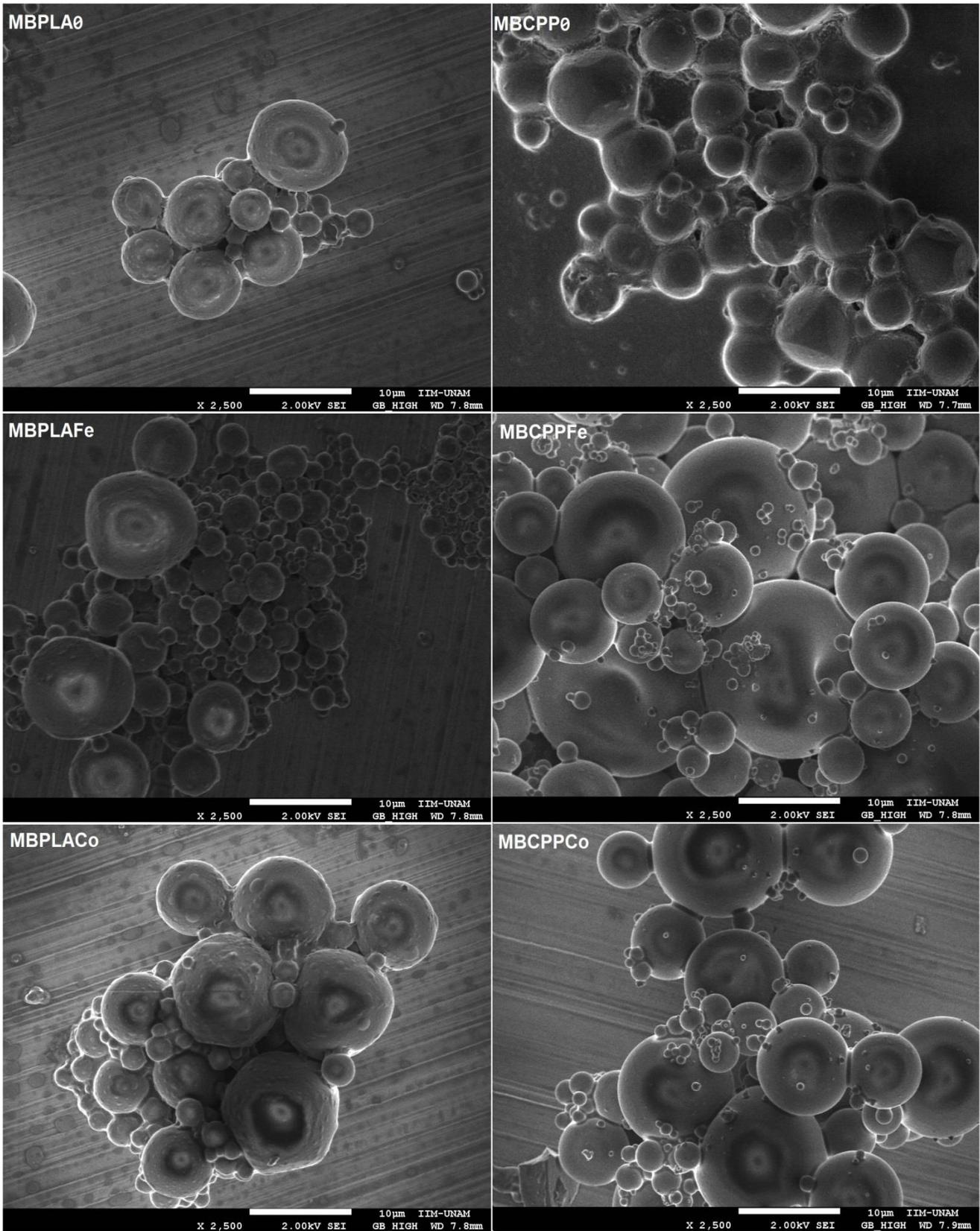


Figura 35. Micrografías SEM de sistemas poliméricos e híbridos mediante congelación con nitrógeno líquido.

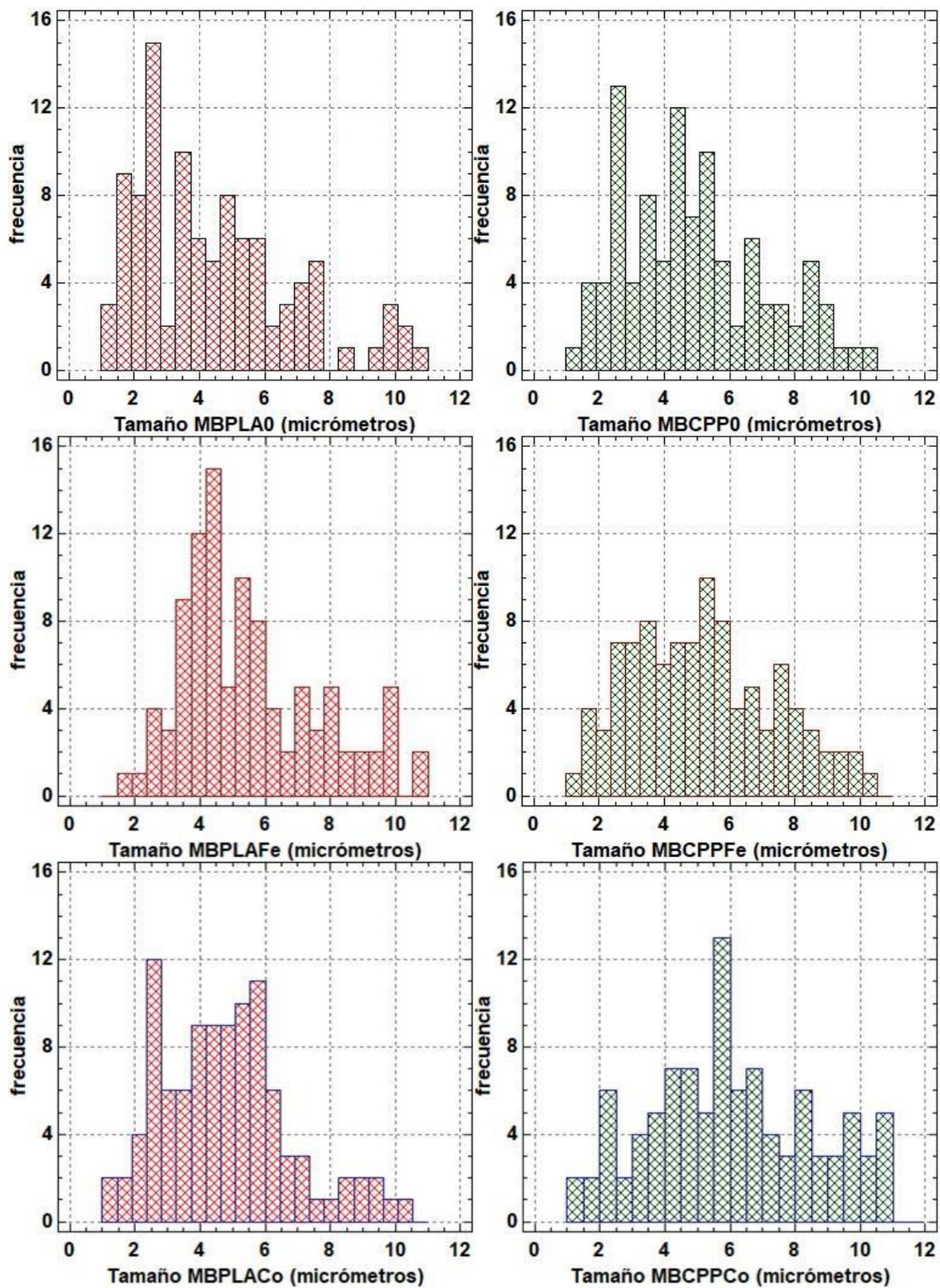


Figura 36. Distribución de tamaño de partícula en micrografías SEM (N: 100) de sistemas poliméricos e híbridos.

Para llevar a cabo la comparación de las distribuciones de tamaño de partícula para los sistemas poliméricos e híbridos se llevó a cabo una evaluación del ajuste a diversas distribuciones y se presenta en la tabla 19 comparando la distribución con mejor ajuste con el ajuste obtenido por la distribución normal:

Tabla 19. Ajuste de datos no censurados de distribución de tamaño de partículas para sistemas poliméricos e híbridos. En negro se presenta la distribución que mejor modela los datos obtenidos, mientras en rojo se representa el ajuste a una distribución normal.

Muestra	Distribución	Número de parámetros	Log Verosimilitud	KS D
MBPLA0	Gamma	2	-204.675	0.05084
	Normal	2	-209.607	0.07343
MBCPP0	Gamma	2	-212.032	0.06601
	Normal	2	-217.583	0.08869
MBPLAFe	Birnbaum-Saunders	2	-208.894	0.06727
	Normal	2	-216.523	0.1292
MBCPPFe	Weibull	2	-216.728	0.04556
	Normal	2	-219.777	0.06594
MBPLACo	Birnbaum-Saunders	2	-193.686	0.08111
	Normal	2	-221.583	0.2106
MBCPPCo	Weibull	2	-236.201	0.0507
	Normal	2	-237.995	0.06382

*Nota: Un mejor ajuste a modelo se presenta con el mayor Log de Verosimilitud y menor KS D.

El ajuste de las distribuciones de tamaño de partícula de los sistemas poliméricos e híbridos muestra distribuciones no paramétricas por lo que se llevó a cabo la comparación mediante los diagramas de cajas y bigotes, así como las pruebas estadísticas correspondientes y se muestra en la figura 37

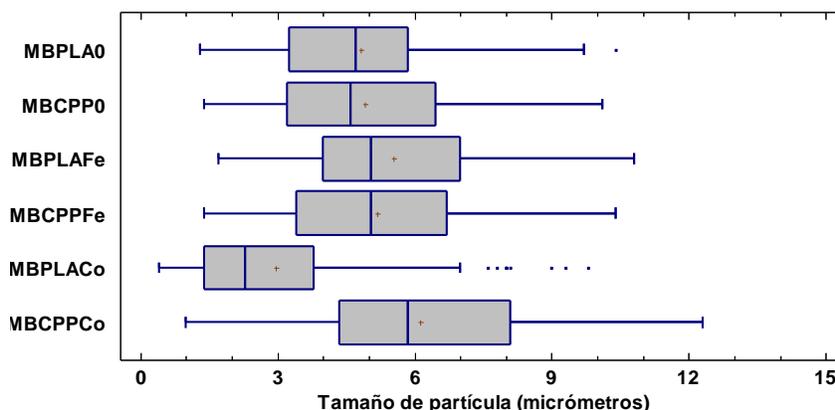


Figura 37. Diagrama de cajas y bigotes para distribuciones de tamaño de partícula de los sistemas poliméricos e híbridos.

En la figura 37 se observan diferencias de los valores de varianza y de las medianas por lo que se llevó cabo la prueba de verificación de la varianza y la prueba de la mediana de Mood (debido a que las muestras de MBPLA \emptyset y MBPLACo muestran puntos anómalos) mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.II ver. 16.2.04[®]. Los resultados se muestran en las tablas 20 y 21:

Tabla 20. Resultados de la prueba de verificación de la varianza para las distribuciones de tamaño de partícula de los sistemas poliméricos e híbridos.

Comparación	Sigma ₁	Sigma ₂	Prueba de F	Valor-P
MBPLA \emptyset / MBCPP \emptyset	1.978	2.142	0.853	0.4288
MBPLA \emptyset / MBPLAFe	1.978	2.120	0.871	0.4926
MBPLA \emptyset / MBCPPFe	1.978	2.190	0.816	0.3132
MBPLA \emptyset / MBPLACo	1.978	2.230	0.787	0.2352
MBPLA\emptyset / MBCPPCo	1.978	2.627	0.567	0.0051
MBCPP \emptyset / MBPLAFe	2.142	2.120	1.021	0.9162
MBCPP \emptyset / MBCPPFe	2.142	2.190	0.957	0.8277
MBCPP \emptyset / MBPLACo	2.142	2.230	0.923	0.6914
MBCPP\emptyset / MBCPPCo	2.142	2.627	0.665	0.0435
MBPLAFe / MBCPPFe	2.120	2.190	0.937	0.7467
MBPLAFe / MBPLACo	2.120	2.230	0.904	0.6156
MBPLAFe / MBCPPCo	2.120	2.627	0.651	0.0338
MBCPPFe / MBPLACo	2.190	2.230	0.965	0.8578
MBCPPFe / MBCPPCo	2.190	2.627	0.695	0.0714
MBPLACo / MBCPPCo	2.230	2.627	0.720	0.1041

Tabla 21. Resultados de la prueba de la mediana de Mood para las distribuciones de tamaño de partícula de los sistemas poliméricos e híbridos [α : 0.05].

Muestra	Tamaño de muestra	n \leq	n $>$	Mediana	LC inferior 95.0%	LC superior 95.0%
MBPLA \emptyset	100	49	51	4.70	4.1	5.1
MBCPP \emptyset	100	51	49	4.60	4.1	5.2
MBPLAFe	100	45	55	5.05	4.4	5.6
MBCPPFe	100	43	57	5.05	4.3	5.6
MBPLACo	100	84	16	2.30	2.0	2.6
MBCPPCo	100	31	69	5.85	5.2	6.6

Estadístico = 63.6664 Valor-P = **2.11842E⁻¹²**

A pesar de mantener constantes las proporciones de los componentes y las condiciones de síntesis para los seis sistemas, se observa una diferencia en la distribución de tamaño de partícula. Esta variación se atribuye al trabajo resultante de la modificación de la tensión interfacial por efecto de la composición de la fase interna de la microburbuja según describe la ecuación 16, como fue desarrollada para el modelo de Young para el equilibrio interfacial:¹⁰²

$$dw = \Delta p dV = \frac{2\gamma}{R_s} dV \quad \text{Ecuación 16}$$

Durante el análisis de microscopía SEM de los sistemas poliméricos e híbridos se logró observar la degradación de los polímeros que componen a las microburbujas como se muestra en la figura 38:

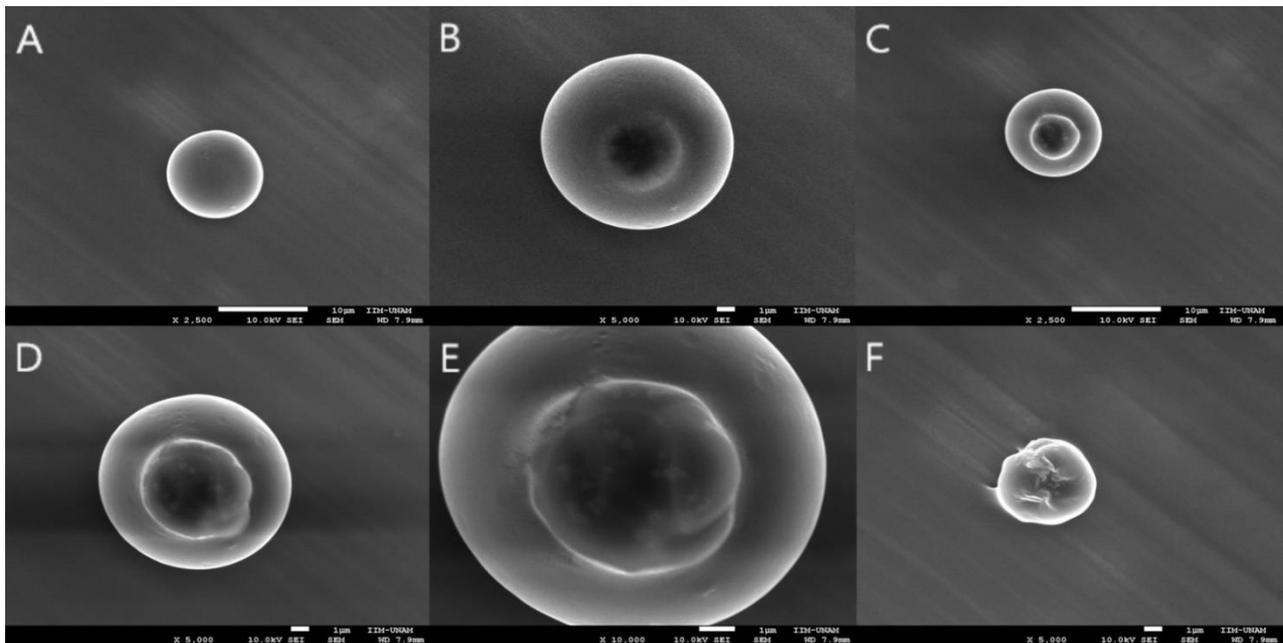


Figura 38. Progresión en el proceso de erosión de MBCPP0. El tiempo en que se realizaron las micrografías por muestra fueron A: 0 s, B: 8 s, C: 29 s. D: 54 s, E: 85 s, y F: 114 s.

La erosión de los polímeros en la microburbuja debido a la incidencia del haz de electrones permite observar un núcleo hueco que confirma la obtención de microburbujas mediante la inyección de N₂ durante la formación de la primera emulsión.

En la imagen A, se observa una partícula al parecer sólida que no presenta erosión, sin embargo, a medida que el tiempo que el haz de electrones incide en la partícula aumenta se observa claramente un núcleo de menor densidad (figura 37 B a D). En la imagen E ya se ha alcanzado la máxima erosión observándose además incrustaciones al interior de la

microburbuja los cuales pueden atribuirse a las NPM's, por último, en F se observa el colapso de la microburbuja. Cabe destacar que las imágenes en las micrografías de la figura 37 no están en la misma escala debido a que se hicieron los acercamientos cuando se observó la erosión, se hicieron así para observar más claramente cada paso de la erosión.

Los sistemas obtenidos mostraron flotabilidad a pesar de estar compuestos por polímeros de mayor densidad que el agua (PLA 1.21-1.43 g/cm³, CPP 1.26 g/cm³ y PVA 1.19 g/cm³), lo que confirma la obtención de sistemas con un núcleo hueco.

7.5.3. Potencial zeta de sistemas poliméricos e híbridos

Se llevó a cabo la medición de potencial Z de los sistemas poliméricos e híbridos y se muestra en la tabla 22 junto con su distribución de tamaño de partícula:

Tabla 22. Tamaño y potencial zeta de sistemas poliméricos e híbridos.

Material	Tamaño SEM (μm) [$\alpha:0.05$]	Potencial Z (mV)
MBPLA \emptyset	4.06 - 5.1	-34.6 \pm 0.1
MBPLAFe	4.13 - 5.2	-38.1 \pm 1.2
MBPLACo	4.40 - 5.6	-35.1 \pm 3.7
MBCPP \emptyset	5.30 - 5.6	-39.9 \pm 4.4
MBCPPFe	2.00 - 2.6	-39.8 \pm 0.3
MBCPPCo	5.17 - 6.6	-40.8 \pm 3.5

Considerando que las muestras de los sistemas poliméricos e híbridos fueron dispersadas en agua, el metotrexato que se encuentra adsorbido y disperso en la capa externa de los sistemas tiene una carga negativa en 99.90% del metotrexato (calculado mediante el programa MarvinSketch 17.22.0[©] de Chemaxon Ltd., como se muestra en la figura 39, lo que provee de una alta densidad de carga comparada con la que podría ser observada de estar compuesta únicamente por PVA casi neutro como en las nanopartículas obtenidas por Andreasen *et al.*¹⁰³

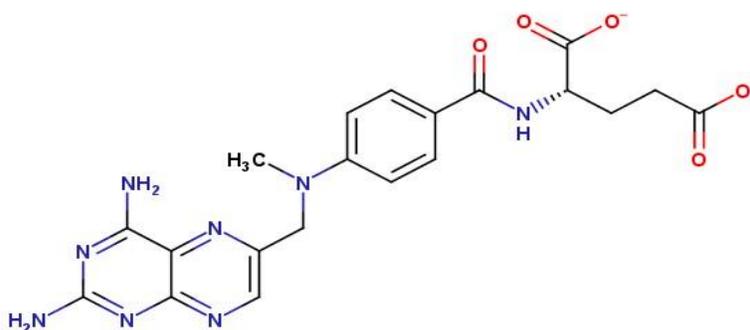


Figura 39. Especie predominante de la solubilización de metotrexato en agua a pH: 7.

La intensidad de carga, así como el signo de la misma es congruente con la suposición de que a pesar de existir variaciones en la composición de la fase interna de los sistemas poliméricos e híbridos la superficie de las microburbujas no muestra cambios significativos para todos los sistemas.

7.6. Evaluación de los sistemas poliméricos e híbridos como sistemas terapéuticos *in vitro*

Para llevarse a cabo la evaluación de los sistemas generados como sistemas de liberación farmacéuticos se llevó a cabo una prueba preliminar del impacto de la membrana de diálisis en la cinética de liberación de metotrexato con la finalidad de demostrar que la membrana no constituye una barrera importante para la difusión y su cuantificación.

La figura 40 muestra que la difusión de fármaco libre a través de la membrana es cercana al 100% en 2 horas, lo que representa que la membrana no impide la difusión del fármaco, por lo que puede considerarse que es apropiada para la prueba de liberación.¹⁰⁴ Así mismo no existen modificaciones en el espectro de UV-Visible del fármaco libre por lo que se considera la membrana no representa un factor significativo en la selectividad para la cuantificación del fármaco libre.

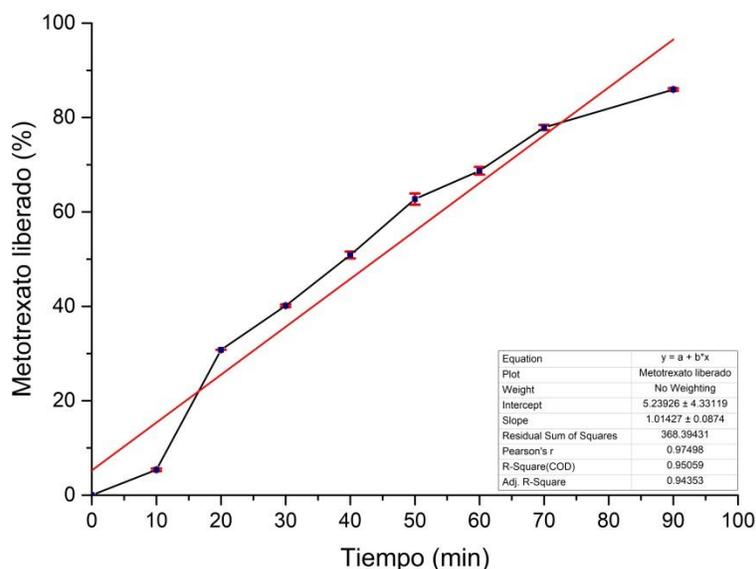


Figura 40. Liberación de metotrexato libre a partir de la bolsa de diálisis.

Para llevar a cabo la evaluación como sistemas terapéuticos se llevó a cabo la liberación de metotrexato a temperatura constante en solución PBS pH 7.4 ± 0.1 a 37 ± 0.5 °C simulando condiciones fisiológicas para cuantificar la liberación del fármaco y se evaluó la cinética

mediante diferentes modelos cinéticos de liberación. Para llevar a cabo la cuantificación de fármaco liberado del sistema se realizó una curva de calibración mediante espectroscopia UV-Visible, donde se determinó un pico máximo de absorción a 307.11 nm durante 12 horas. La figura 41 muestra la cinética de liberación promedio para los seis sistemas:

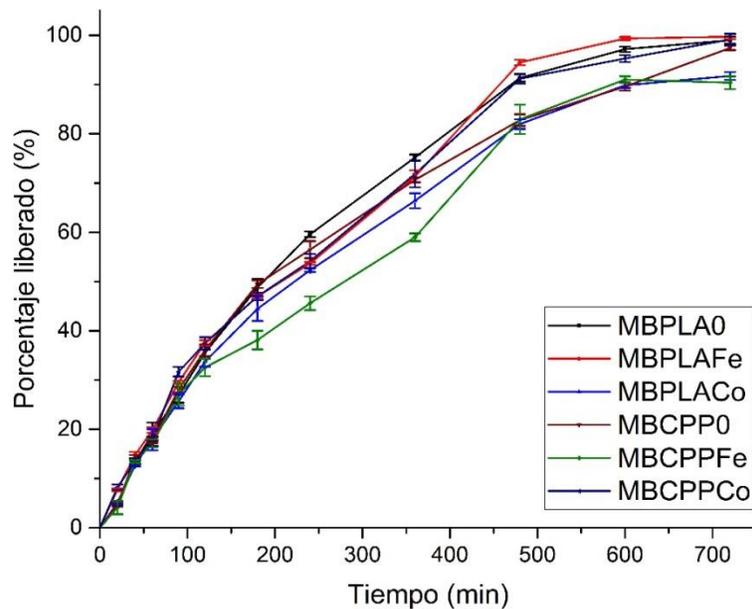


Figura 41. Cinética de liberación promedio para los sistemas poliméricos e híbridos.

Antes de evaluar la dependencia de la liberación de metotrexato y su relación con las características de los sistemas sintetizados como sistemas de liberación de fármacos se llevó a cabo la comparación de los perfiles de liberación mediante la prueba de f_2 en toda permutación. La prueba de f_2 se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del documento:

“FDA. Guidance for Industry: SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Dissolution Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation. In. Rockville, MD, 1997.”

En la tabla 23 se muestran los valores de f_2 obtenidos, así como la similitud o diferencia entre los perfiles de liberación de los seis sistemas poliméricos e híbridos sintetizados utilizando mismas condiciones y tiempos de muestreo con sólo un punto por arriba del 80% de metotrexato liberado en todos los sistemas. La prueba de f_2 no reconoce diferencia al cambiar el perfil de prueba y el de referencia, sin embargo, la prueba de f_2 es sensible al número de puntos evaluados, en especial una vez se ha alcanzado la meseta (la FDA recomienda el uso de un solo punto una vez se ha alcanzado la meseta).

Tabla 23. Prueba de f_2 para todas las combinaciones de sistemas poliméricos e híbridos.

Comparación (Referencia / Prueba)	Valor de f_2	Similitud de perfiles de liberación
MBPLA \emptyset / MBCPP \emptyset	71.77	Existe similitud
MBPLA \emptyset / MBPLAFe	76.78	Existe similitud
MBPLA \emptyset / MBCPPFe	54.64	Existe similitud
MBPLA \emptyset / MBPLACo	63.01	Existe similitud
MBPLA \emptyset / MBCPPCo	77.18	Existe similitud
MBCPP \emptyset / MBPLAFe	65.68	Existe similitud
MBCPP \emptyset / MBCPPFe	60.34	Existe similitud
MBCPP \emptyset / MBPLACo	75.19	Existe similitud
MBCPP \emptyset / MBCPPCo	71.94	Existe similitud
MBPLAFe / MBCPPFe	56.55	Existe similitud
MBPLAFe / MBPLACo	61.94	Existe similitud
MBPLAFe / MBCPPCo	84.54	Existe similitud
MBCPPFe / MBPLACo	71.78	Existe similitud
MBCPPFe / MBCPPCo	58.30	Existe similitud
MBPLACo / MBCPPCo	65.76	Existe similitud

En ninguna de las permutaciones de la prueba de f_2 se detecta diferencia, por lo que se prosiguió a comparar el ajuste de la cinética de liberación con los modelos matemáticos para determinar el mecanismo de liberación como se muestra en las figuras 42 a 47 para los seis sistemas de manera independiente.

Junto con los gráficos de ajuste a modelo se muestran los parámetros estadísticos determinados para cada uno de ellos marcando en color rojo aquel que se considera como el modelo más adecuado para la descripción de los datos experimentales las tablas 24 a 29 muestran estos resultados.

Figura 42. Modelos cinéticos de liberación promedio de MBPLA0.

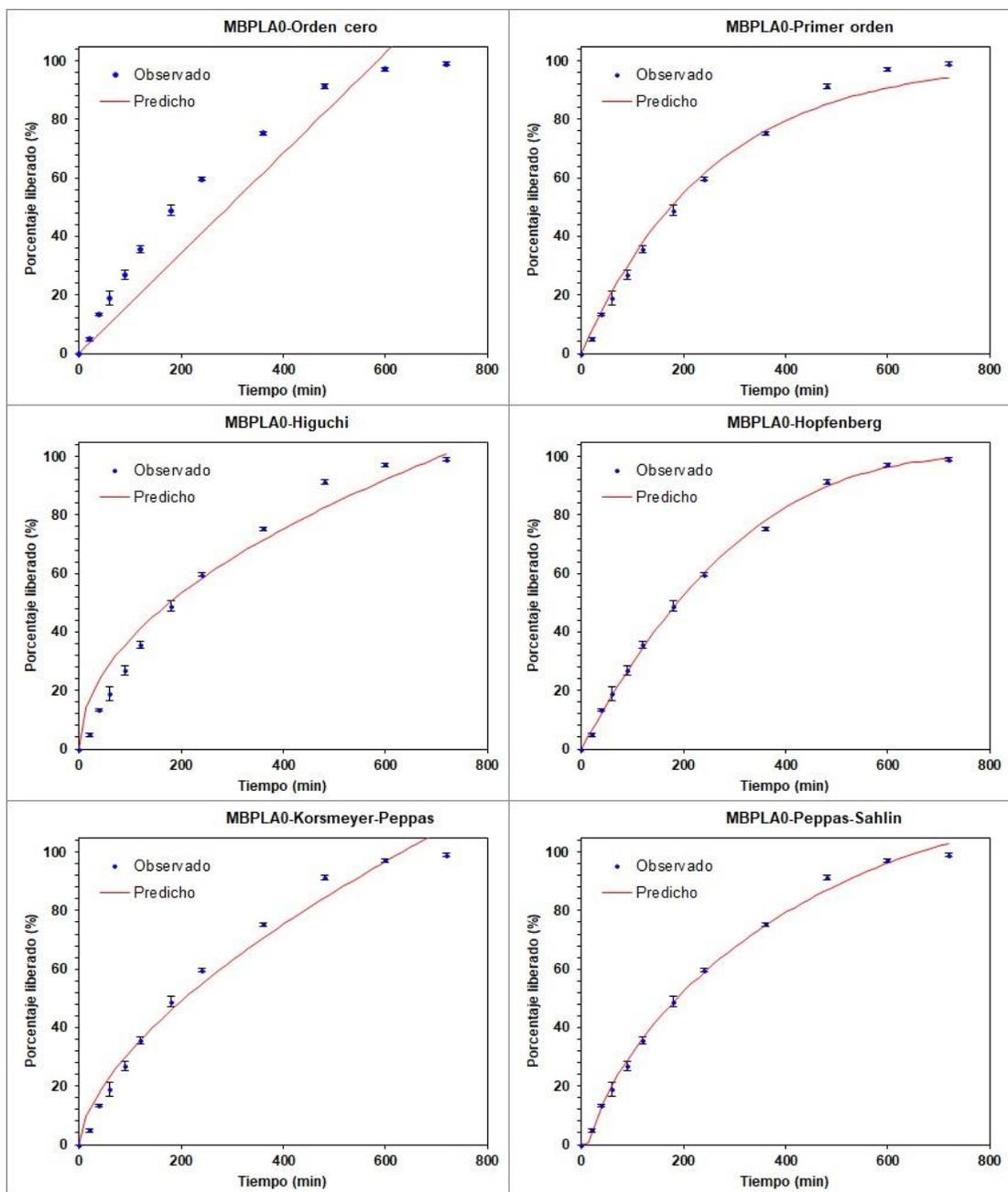


Tabla 24. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLA0.

Microburbujas poliméricas de ácido poli-(L)-láctico (MBPLA0)						
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Hopfenberg	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin
Parámetros	k_0	k_1	k_H	k_{HB}, n	k_{KP}, n	k_1, k_2, m
Rsqr	0.8599	0.9899	0.9589	0.9984	0.9798	0.9947
MSC	1.63	4.26	2.86	6.00	3.40	4.89
AIC	93.45	61.87	78.70	41.05	72.17	54.40
SS	2043.05	147.87	599.00	23.69	294.35	77.25

Figura 43. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLAFe.

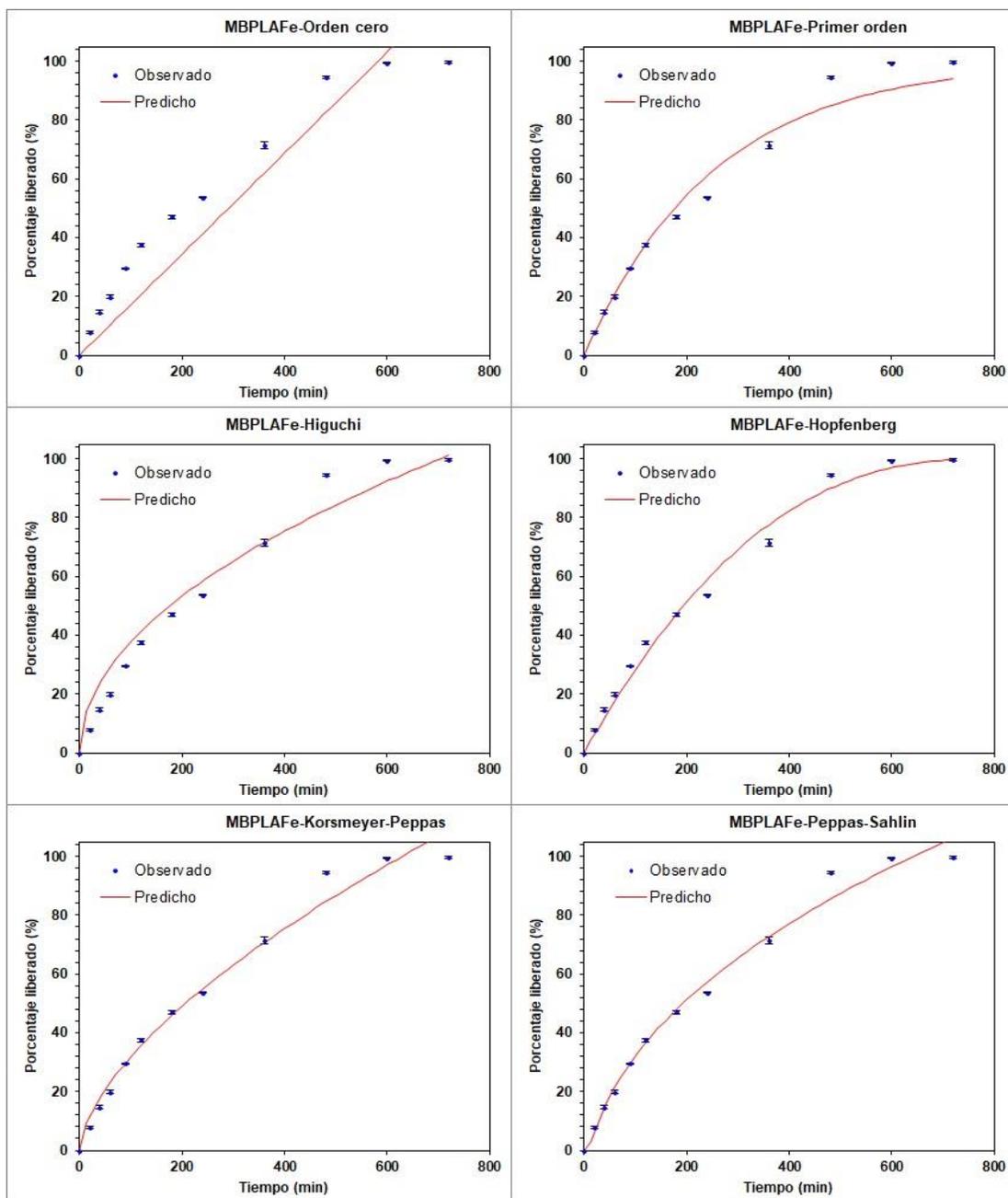


Tabla 25. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLAFe.

Microburbujas de ácido poli-(L)-láctico con NPM de magnetita (MBPLAFe)						
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Hopfenberg	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin
Parámetros	k_0	k_1	k_H	k_{HB}, n	k_{KP}, n	k_1, k_2, m
Rsqr	0.8677	0.9796	0.9626	0.9902	0.9838	0.9890
MSC	1.68	3.55	2.94	4.12	3.62	3.84
AIC	92.55	70.11	77.41	63.32	69.33	66.64
SS	1894.94	292.00	536.63	140.60	231.81	157.05

Figura 44. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLACo.

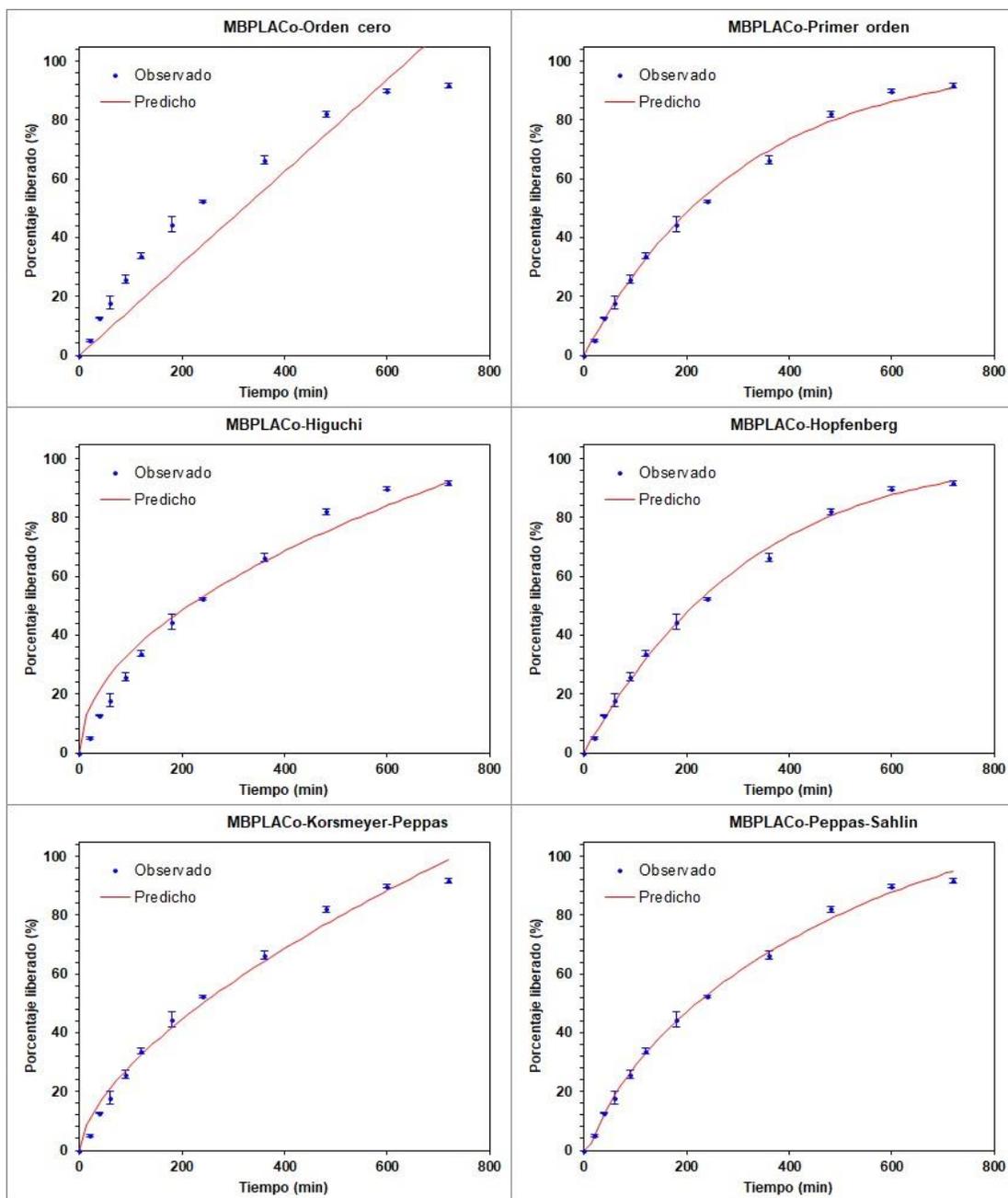


Tabla 26. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLACo.

Microburbujas de ácido poli-(L)-láctico con NPM de ferrita de cobalto (MBPLACo)						
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Hopfenberg	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin
Parámetros	k_0	k_1	k_H	k_{HB}, n	k_{KP}, n	k_1, k_2, m
Rsqr	0.8685	0.9958	0.9648	0.9967	0.9860	0.9954
MSC	1.69	5.20	3.01	5.27	3.77	4.80
AIC	90.32	48.22	74.46	47.36	65.37	53.06
SS	1572.83	49.75	420.69	39.92	167.02	55.52

Figura 45. Modelos cinéticos de liberación promedio de MBCPP0.

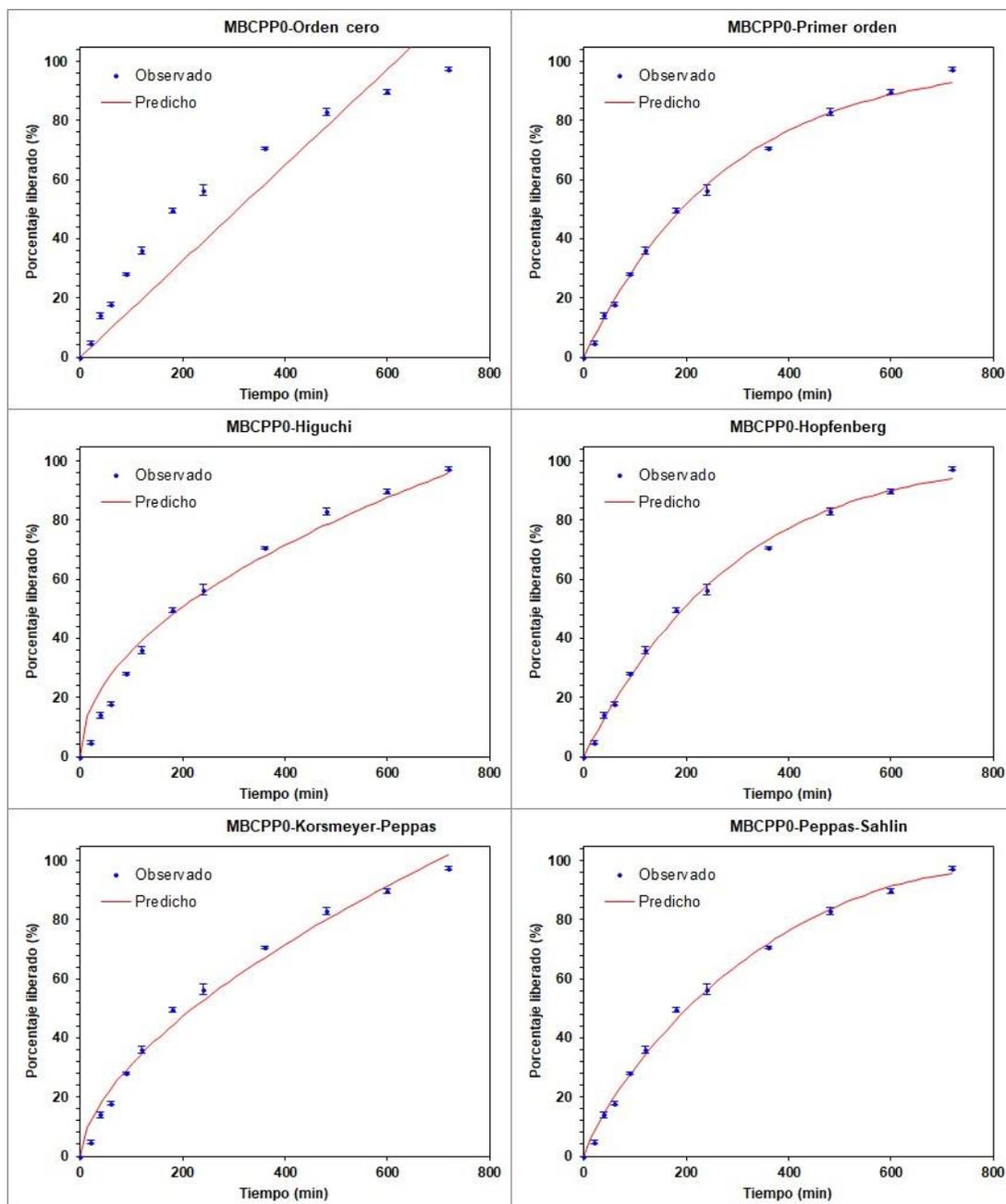


Tabla 27. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBCPP0.

Microburbujas poliméricas de carbonato de polipropileno (MBCPP0)						
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Hopfenberg	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin
Parámetros	k_0	k_1	k_H	k_{HB}, n	k_{KP}, n	k_1, k_2, m
Rsqr	0.8493	0.9963	0.9695	0.9970	0.9855	0.9964
MSC	1.55	5.25	3.15	5.30	3.72	4.97
AIC	92.65	48.24	73.47	47.70	66.60	51.55
SS	1912.25	47.22	387.15	38.36	184.53	45.34

Figura 46. Modelos cinéticos de liberación promedio de MBCPPFe.

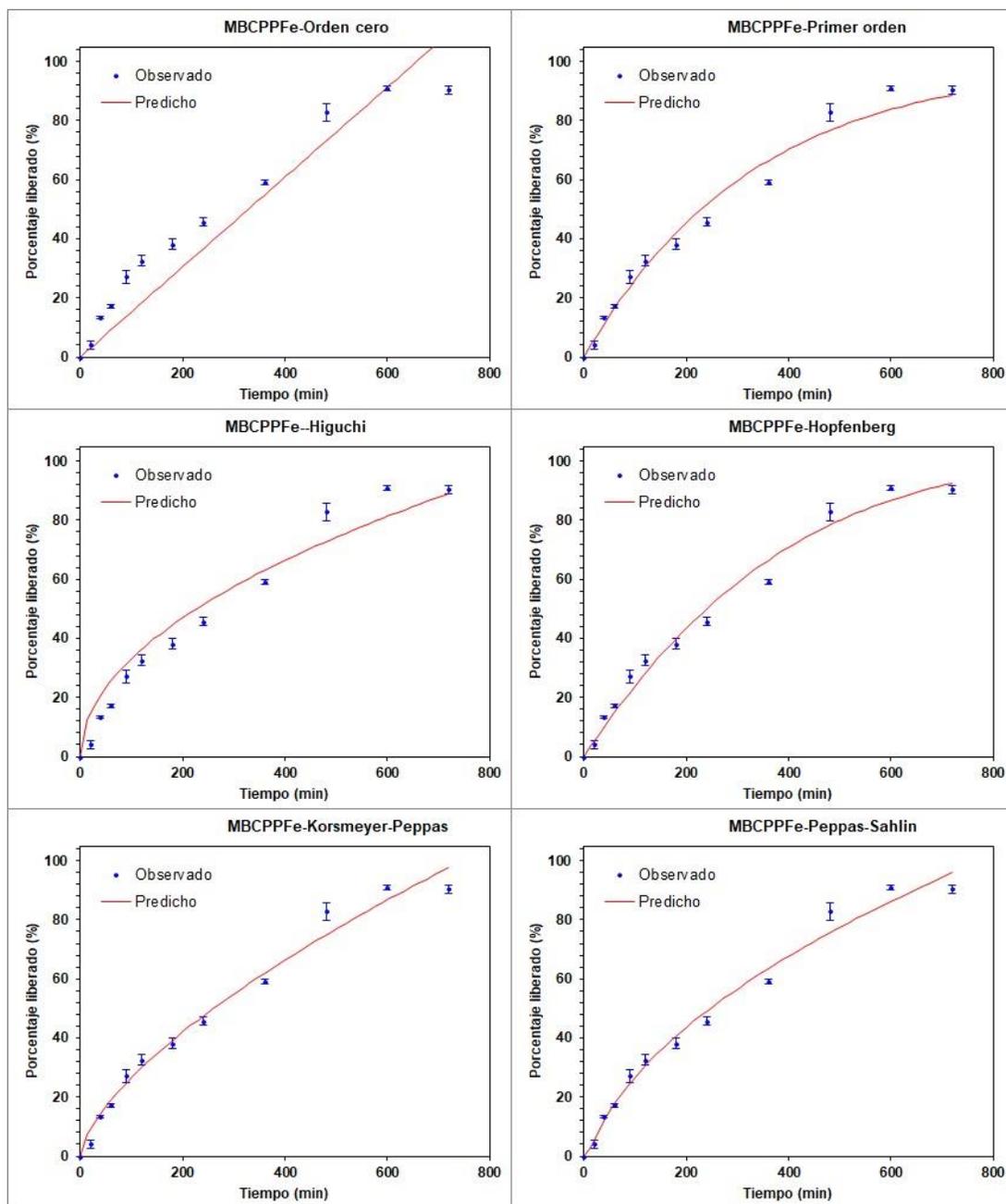


Tabla 28. Parámetros estadístico promedio de los modelos de liberación de MBCPPFe.

Microburbujas de carbonato de polipropileno con NPM de magnetita (MBCPPFe)						
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Hopfenberg	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin
Parámetros	k_0	k_1	k_H	k_{HB}, n	k_{KP}, n	k_1, k_2, m
Rsqr	0.8973	0.9796	0.9497	0.9833	0.9822	0.9853
MSC	1.96	3.58	2.66	3.63	3.58	3.61
AIC	86.94	67.56	78.51	66.92	67.54	67.10
SS	1200.29	238.62	588.00	194.92	207.35	171.48

Figura 47. Modelos cinéticos de liberación promedio de MBCPPFe.

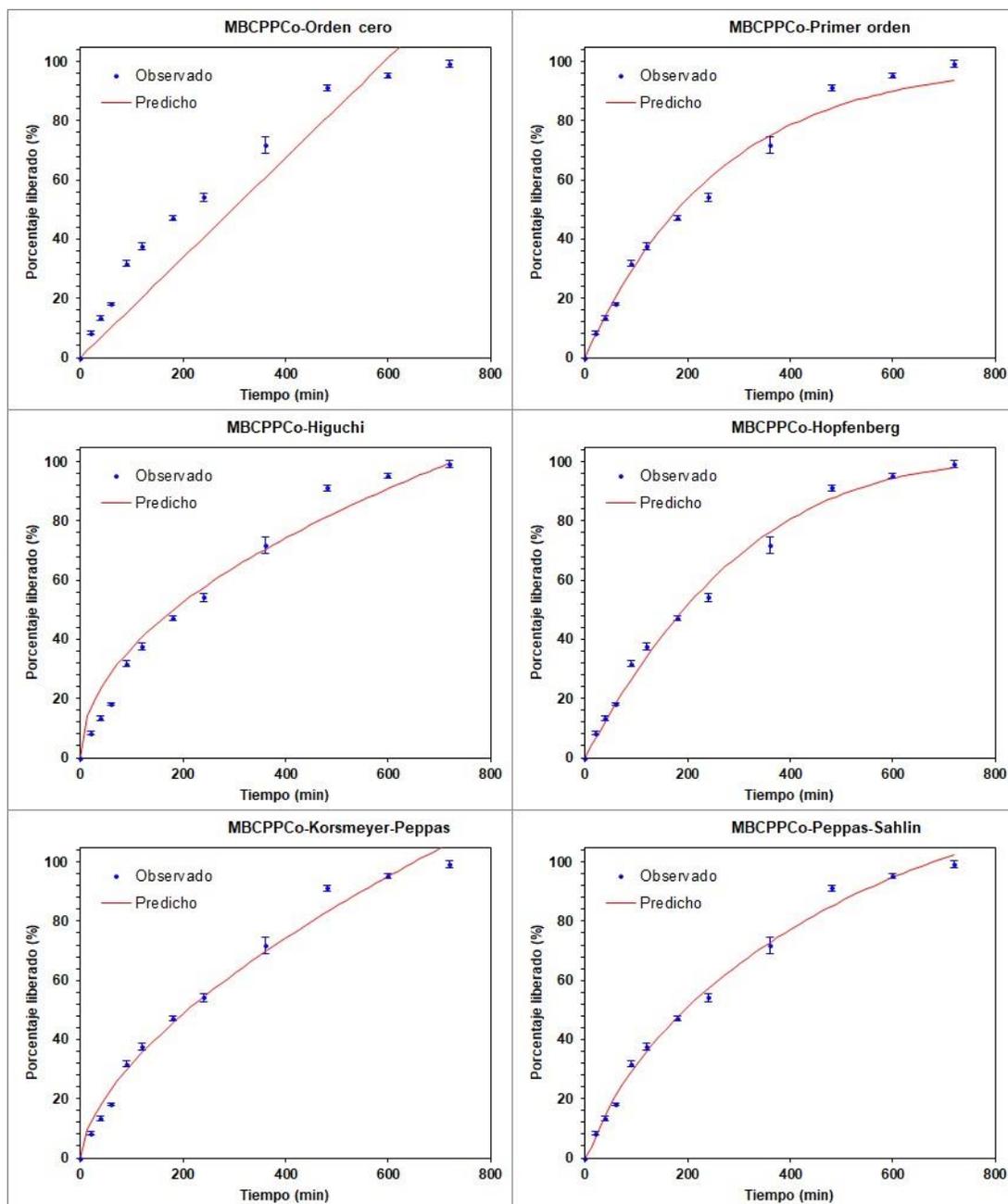


Tabla 29. Parámetros estadístico promedio de los modelos de liberación de MBCPPCo.

Microburbujas de carbonato de polipropileno con NPM de ferrita de cobalto (MBCPPCo)						
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Hopfenberg	Korsmeyer -Peppas	Peppas -Sahlin
Parámetros	k_0	k_1	k_H	k_{HB}, n	k_{KP}, n	k_1, k_2, m
Rsqr	0.8588	0.9866	0.9668	0.9921	0.9851	0.9925
MSC	1.61	3.97	3.06	4.34	3.70	4.30
AIC	92.79	64.45	75.40	60.00	67.75	60.51
SS	1932.48	183.29	453.96	108.01	204.06	101.62

Los modelos con mejor ajuste en los seis sistemas fueron el de Hopfenberg (que considera la liberación a partir de una matriz erosionable y cuyo coeficiente n está dado en función de la geometría del sistema) y Peppas-Sahlin (cuyo coeficiente m está relacionado al mecanismo de transporte del fármaco hacia el medio). La tabla 30 sintetiza los valores de constantes obtenidos para ambos modelos:

Tabla 30. Modelos de liberación que muestran mejor ajuste en los sistemas evaluados.

Microburbujas poliméricas de ácido poli-(L)-láctico (MBPLA0)			
Modelo	Ecuación	Constantes determinadas	
Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0}\right]^n$	kHB	n
		0.001	2.890
Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^m$	k ₁ , k ₂	m
		-39.8, 26.9	0.397
Microburbujas de ácido poli-(L)-láctico con NPM de magnetita (MBPLAFe)			
Modelo	Ecuación	Constantes determinadas	
Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0}\right]^n$	kHB	n
		0.001	2.587
Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^m$	k ₁ , k ₂	m
		-25.4, 16.5	0.187
Microburbujas de ácido poli-(L)-láctico con NPM de ferrita de cobalto (MBPLACo)			
Modelo	Ecuación	Constantes determinadas	
Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0}\right]^n$	kHB	n
		0.003	9.602
Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^m$	k ₁ , k ₂	m
		-24.5, 16.1	0.392
Microburbujas poliméricas de carbonato de polipropileno (MBCPP0)			
Modelo	Ecuación	Constantes determinadas	
Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0}\right]^n$	kHB	n
		0.003	11.938
Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^m$	k ₁ , k ₂	m
		1.0, -0.001	0.836
Microburbujas de carbonato de polipropileno con NPM de magnetita (MBCPPFe)			
Modelo	Ecuación	Constantes determinadas	
Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0}\right]^n$	kHB	n
		0.001	4.201
Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^m$	k ₁ , k ₂	m
		-13.4, 8.3	0.223
Microburbujas de carbonato de polipropileno con NPM de ferrita de cobalto (MBCPPCo)			
Modelo	Ecuación	Constantes determinadas	
Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0}\right]^n$	kHB	n
		0.001	3.531
Peppas-Sahlin		k ₁ , k ₂	m

	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^m$	-18.5, 12.3	0.404
--	--	-------------	-------

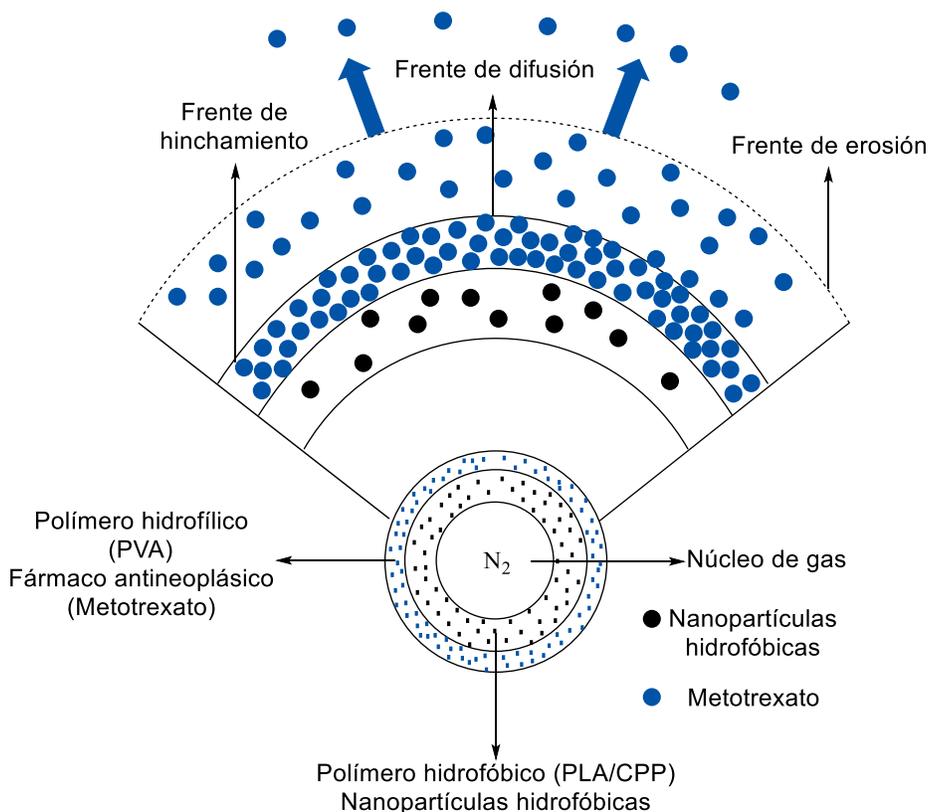
Para los seis sistemas se observa un valor de n cercano o superior a 3 para el modelo de Hopfenberg por lo que se considera la liberación de fármaco se da a partir de un sistema tipo matriz erosionable con geometría esférica. A pesar de que el modelo de Hopfenberg muestra un mejor ajuste estadístico mostrando la erosión de los sistemas con el paso del tiempo, este no explica el mecanismo de paso del metotrexato a partir de los sistemas hacia el medio, por lo que el modelo de Peppas-Sahlin resulta complementario en la descripción del mecanismo de liberación

Los resultados de la tabla 30 muestran valores de correlación altos para el modelo de Peppas-Sahlin y en su mayoría un coeficiente m menor a 0.43; al considerar una esfera (como lo demuestran las micrográficas de SEM realizadas para los seis sistemas y el ajuste al modelo de Hopfenberg) se puede asegurar que el mecanismo de transporte de metotrexato a partir de los sistemas depende de la erosión de las microburbujas.

Considerando la distribución de metotrexato únicamente en la capa externa de las microburbujas (obtenida de la segunda fase acuosa en el método de síntesis de doble emulsión) podemos suponer que el único componente de los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados que interviene en la liberación de metotrexato es el PVA de la capa externa que es un polímero liofílico en soluciones acuosas por lo que se espera que exista una relajación de las cadenas para llevarse a cabo el transporte a partir de la matriz tanto del fármaco como de las cadenas poliméricas (ancladas únicamente por interacciones enlazantes no covalentes). La relajación de las cadenas por interacción con el medio provoca su separación del sistema ocurriendo la erosión y la liberación del fármaco. Al mismo tiempo, el modelo de Peppas-Sahlin indica que el probable mecanismo de transporte del fármaco es dependiente en mayor medida, de la difusión del metotrexato desde cada uno de los sistemas; estos resultados son consistentes con lo esperado al considerar el método de síntesis de los sistemas.

Los resultados obtenidos mediante los modelos de liberación de fármacos evaluados y la prueba de f_2 muestran que no existe diferencia en el mecanismo y la rapidez de liberación de metotrexato a partir de los seis sistemas poliméricos e híbridos por efecto de la composición de la fase interna de la microburbuja, considerando el método de síntesis, la morfología, y la distribución de tamaño de partícula se concluye que la liberación de metotrexato sólo es dependiente de la capa de PVA (capa hidrofílica).

El esquema 8 es el modelo de liberación de metotrexato disperso en la fase externa de los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados por medio de la erosión de la microburbuja:



Esquema 8. Modelo de liberación de metotrexato desde sistemas poliméricos e híbridos basados en microburbujas.

La cinética de liberación demostró que no existe diferencia significativa de la liberación de metotrexato a partir de los sistemas poliméricos e híbridos por efecto de la composición de la fase interna de la microburbuja. La liberación es un proceso de difusión de metotrexato a partir de los sistemas y corresponde con lo esperado para matrices erosionables esféricas.

7.7. Evaluación ecogénica de los sistemas poliméricos e híbridos

Para llevar a cabo la evaluación como sistemas de contraste en ultrasonido de los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados se llevó a cabo la evaluación de la modificación en la respuesta ecogénica del mismo medio con la inclusión de un fruto de *vitis vinífera*. con una sonda convexa de frecuencia central de 6.5 MHz y para comparar se llevó a cabo la misma evaluación en un medio control en ausencia de nano o micropartículas como se muestra en las figuras 48 y 49:

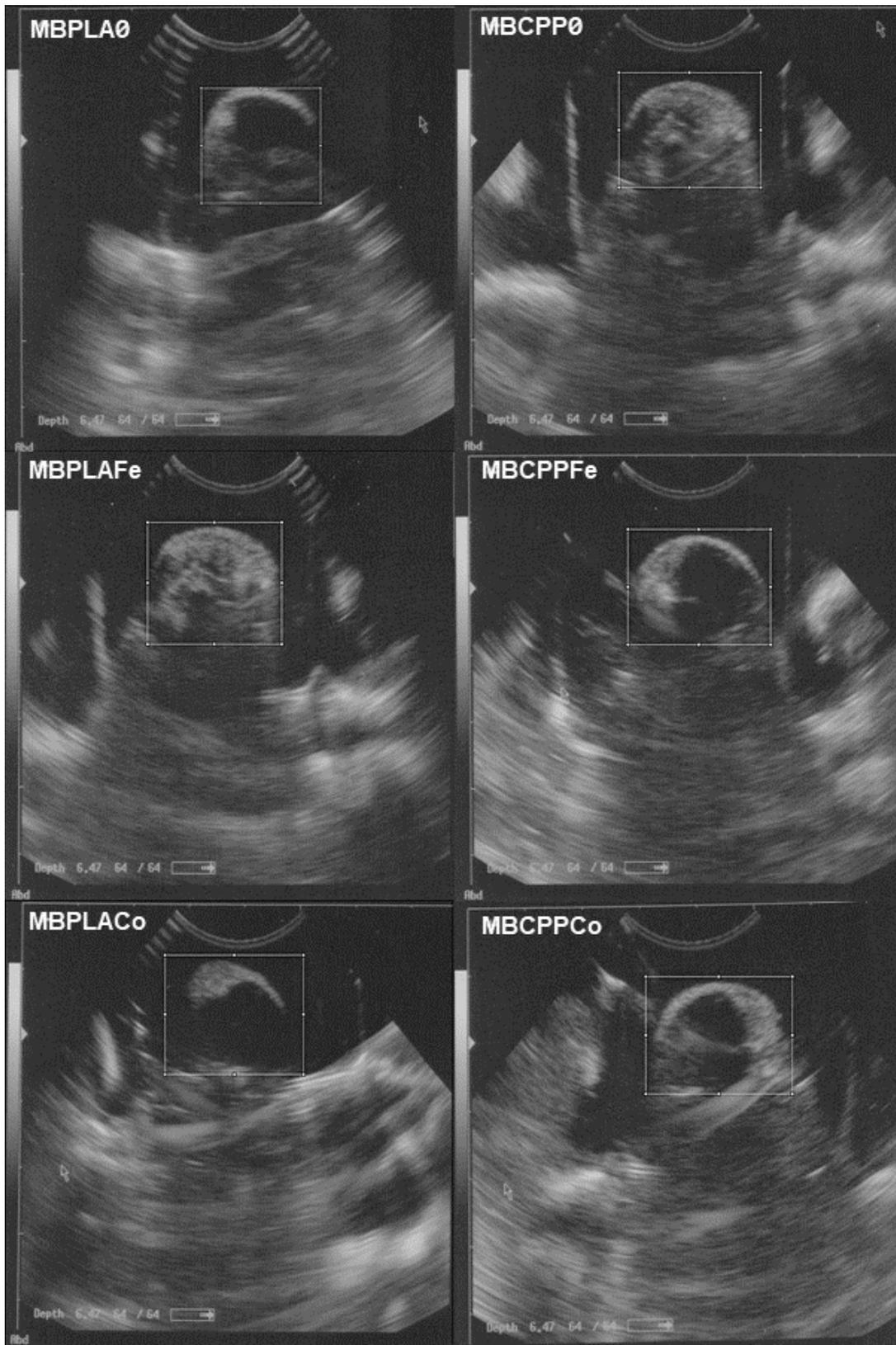


Figura 48. Ultrasonido en modo B de sistemas poliméricos e híbridos con metotrexato.

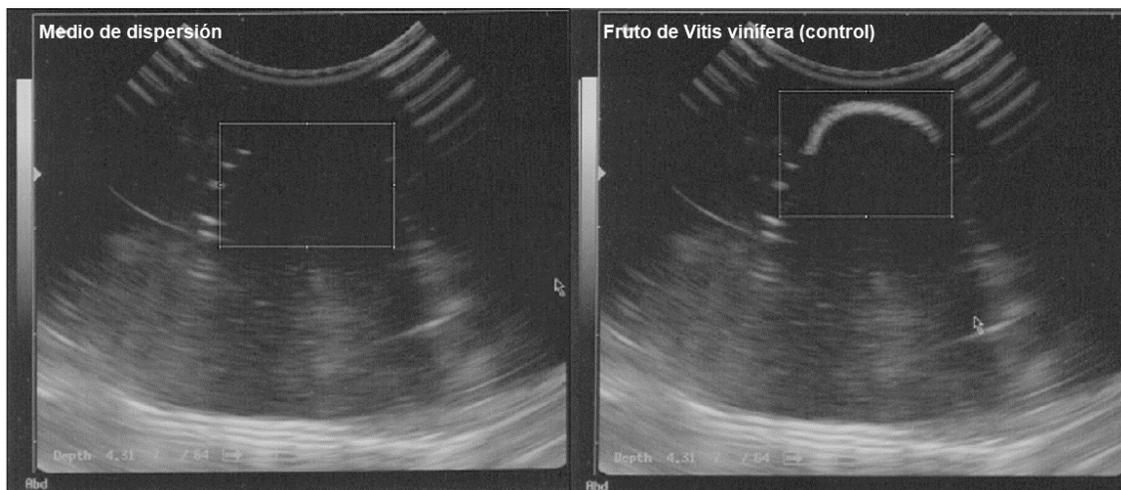


Figura 49. Ultrasonido en modo B de medio control.

El análisis de repuesta ecogénica se realizó mediante el análisis fotométrico de las imágenes obtenidas en modo B considerando una región de interés (RDI) fija y realizando la comparación de sus parámetros estadísticos considerando la distribución de utilizando comparación de distribuciones no paramétricas debido al uso del modelo de Nakagami propuesto por Shankar *et al* considerando el modelo de ultrasonido cuantitativo para tejido suave.^{105,106} Los resultados obtenidos se muestran en la figura 50 y su comparativo en la tabla 31:

Gráfico de Medianas con Intervalos del 95.0% de Confianza

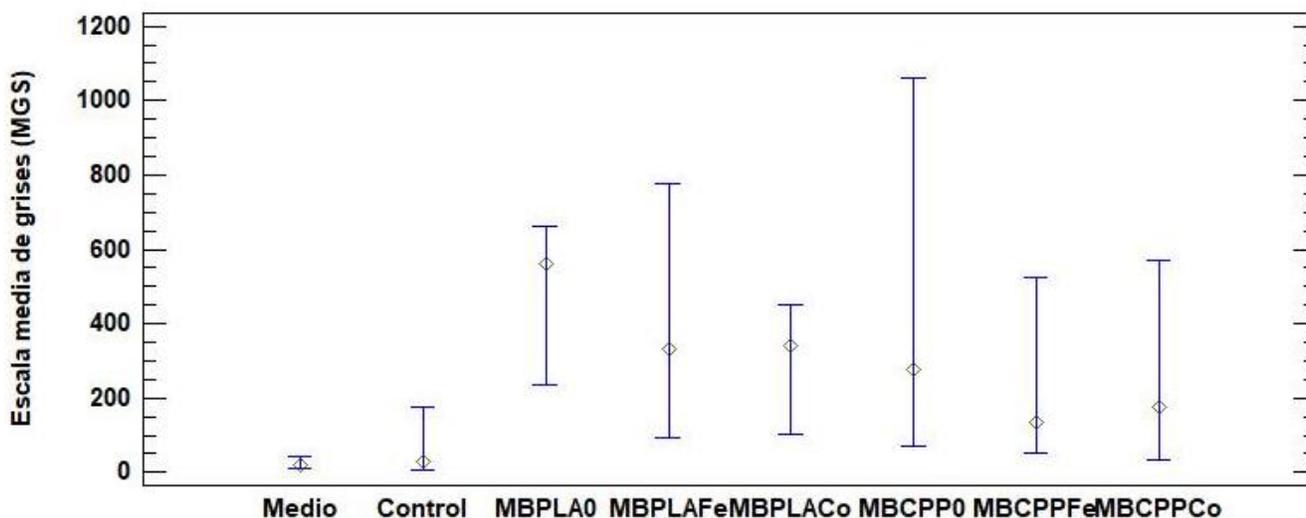


Figura 50. Gráfico de medianas de la respuesta ecogénica de los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados.

Tabla 31. Resultados de la prueba de verificación de la varianza para las distribuciones de respuesta ecogénica de los sistemas poliméricos e híbridos.

Comparación	Sigma ₁	Sigma ₂	Prueba de F	Valor-P
Medio / Control	3948.97	3483.01	1.285	0.0455
Medio / MBPLA \emptyset	3948.97	2377.23	2.759	0.0000
Medio / MBPLAF _e	3948.97	2462.87	2.571	0.0000
Medio / MBPLAC _o	3948.97	3432.37	1.324	0.0255
Medio / MBCPP \emptyset	3948.97	1961.59	4.053	0.0000
Medio / MBCPPF _e	3948.97	1886.82	4.380	0.0000
Medio / MBCPPC _o	3948.97	1924.16	4.212	0.0000
Control / MBPLA \emptyset	3483.01	2377.23	2.147	0.0000
Control / MBPLAF _e	3483.01	2462.87	2.000	0.0000
Control / MBPLAC _o	3483.01	3432.37	1.030	0.8153
Control / MBCPP \emptyset	3483.01	1961.59	3.153	0.0000
Control / MBCPPF _e	3483.01	1886.82	3.408	0.0000
Control / MBCPPC _o	3483.01	1924.16	3.277	0.0000
MBPLA \emptyset / MBPLAF _e	2377.23	2462.87	0.932	0.5724
MBPLA \emptyset / MBPLAC _o	2377.23	3432.37	0.480	0.0000
MBPLA \emptyset / MBCPP \emptyset	2377.23	1961.59	1.469	0.0022
MBPLA \emptyset / MBCPPF _e	2377.23	1886.82	1.587	0.0002
MBPLA \emptyset / MBCPPC _o	2377.23	1924.16	1.526	0.0008
MBPLAF _e / MBPLAC _o	2462.87	3432.37	0.515	0.0000
MBPLAF _e / MBCPP \emptyset	2462.87	1961.59	1.576	0.0003
MBPLAF _e / MBCPPF _e	2462.87	1886.82	1.704	0.0000
MBPLAF _e / MBCPPC _o	2462.87	1924.16	1.638	0.0001
MBPLAC _o / MBCPP \emptyset	3432.37	1961.59	3.062	0.0000
MBPLAC _o / MBCPPF _e	3432.37	1886.82	3.309	0.0000
MBPLAC _o / MBCPPC _o	3432.37	1924.16	3.182	0.0000
MBCPP \emptyset / MBCPPF _e	1961.59	1886.82	1.081	0.5353
MBCPP \emptyset / MBCPPC _o	1961.59	1924.16	1.039	0.7585
MBCPPF _e / MBCPPC _o	1886.82	1924.16	0.962	0.7546

Al observar el gráfico de medianas y las ultrasonografías obtenidas se puede asegurar que el aumento en la respuesta ecogénica es proporcional a un aumento a la escala media de grises tal como reporta Shankar *et al*¹⁰⁶, estos cambios son deseados para un medio de contraste para ultrasonido y miden la eficiencia en la respuesta ecogénica amplificada debido a la aplicación de los sistemas sintetizados. El aumento en la varianza no es algo deseable en el análisis cuantitativo de ultrasonido para tejido en condiciones normales, sin embargo, las ultrasonografías muestran que el aumento de la varianza es debido a la respuesta aumentada por el medio de contraste distribuido a lo largo del tejido lo que permitiría observar la

microvasculatura en tumores sólidos y llevar a cabo el monitoreo en la evolución de neoplasias como se muestra en la tabla 32:

Tabla 32. Resultados de la prueba de la mediana de Mood para las distribuciones de respuesta ecogénica de los sistemas poliméricos e híbridos [α : 0.05].

Muestra	Tamaño de Muestra	n<=	n>	Mediana	LC inferior 95.0%	LC superior 95.0%
Medio	256	172	84	20.5	12.82	40.73
Control	256	144	112	28.5	6.82	176.18
MBPLA \emptyset	256	103	153	562.0	235.27	662.18
MBPLAFe	256	117	139	333.0	94.45	775.19
MBPLACo	256	115	141	342.0	103.27	452.37
MBCPP \emptyset	256	120	136	276.0	71.54	1060.67
MBCPPFe	256	128	128	135.0	50.54	525.11
MBCPPCo	256	125	131	176.5	33.63	570.84

Estadístico = 49.6875 Valor-P = $1.66358E^{-8}$

Los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados demostraron un aumento en la respuesta ecogénica, así como una mayor resolución de las estructuras internas del fruto de *Vitis vinífera*; observando que los sistemas MBPLAFe y MBCPP \emptyset aumentaron la respuesta y resolución de manera más efectiva.

7.8. Evaluación mecánica de modelos de membranas basadas en los sistemas poliméricos e híbridos

Para determinar los efectos que tienen el tipo de nanopartículas magnéticas sobre la disposición estructural de los polímeros en la capa interna de la microburbuja durante la síntesis de estas, se llevó a cabo la determinación de los termogramas de los seis sistemas generados, así como de los termogramas de PVA, PLA, CPP y PCL.

El fenómeno de la transición vítrea es un proceso de no equilibrio y tiene un carácter cinético. Este hecho se manifiesta en las medidas de DSC, donde la T_g que se obtiene depende de la historia térmica de la muestra, particularmente de la velocidad de enfriamiento que es la que determina el estado inicial vítreo del polímero que se va a estudiar, así como la de la posterior velocidad de calentamiento del aparato durante la obtención del termograma. Por ello, se realiza el experimento con dos corridas iniciales, una de calentamiento y otra de enfriamiento en condiciones iguales para cada sistema y así asegurar borrar la memoria térmica. Los termogramas obtenidos se muestran en las figuras 60 a 69 del anexo I.

Las figuras 50 a 54 muestran las películas formadas por PVA, PLA y CPP, en la figura 50 se muestra la obtención de partículas de PLA que no lograron coalescer para formar una película a 25°C y a 35°C donde se observa la formación de una película discontinua por parte del PLA, mientras que las películas de CPP se forman sin discontinuidades aparentes a ambas temperaturas.

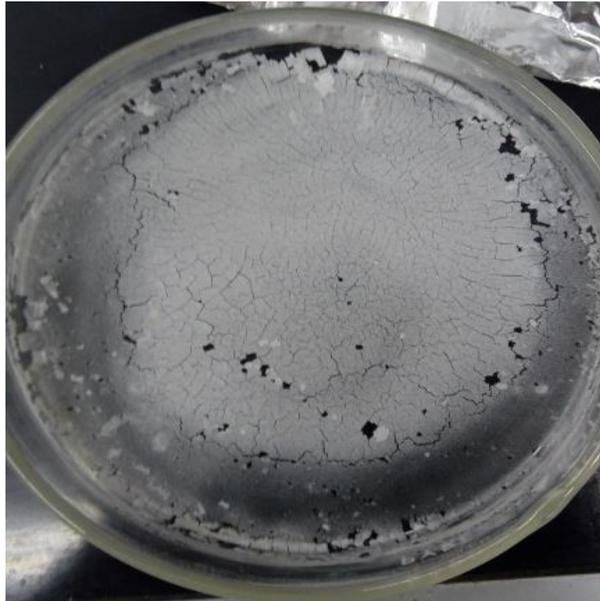


Figura 51. Película de PLA fabricada a 25°C.

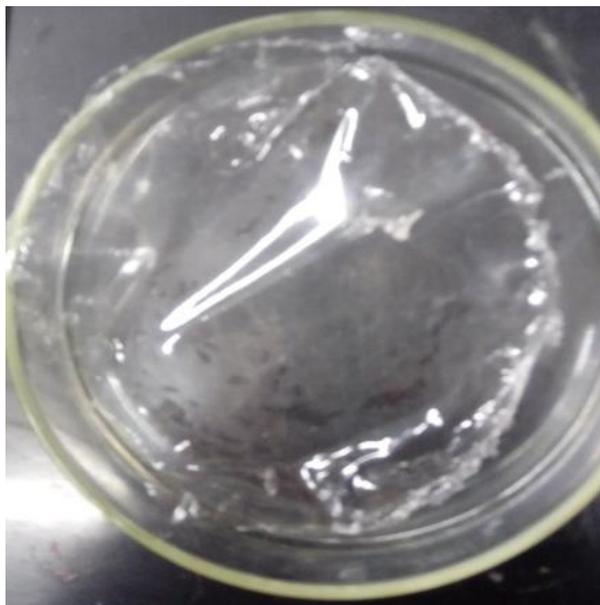


Figura 52. Película de CPP fabricada a 25°C.

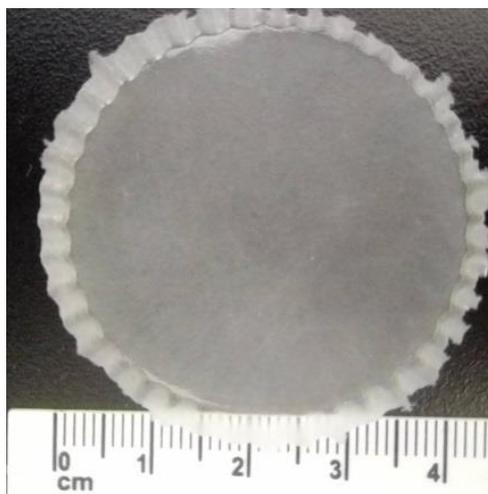


Figura 53. Película de PVA fabricada a 35°C.



Figura 54. Película de PVA-PLA fabricada a 35°C.

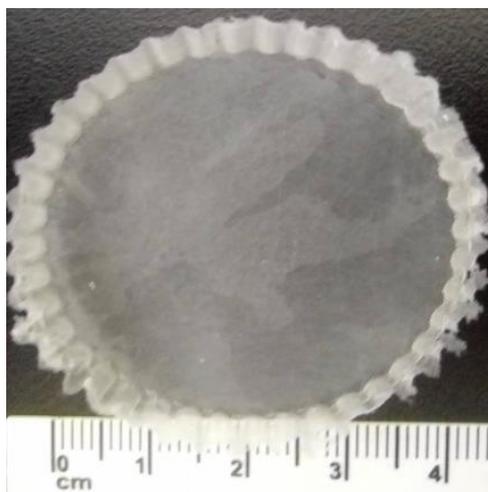


Figura 55. Película de PVA-CPP fabricada a 35°C.

En las condiciones de sonicación en que se llevó a cabo la síntesis se observa la ebullición del diclorometano; este cambio ocurre por la conversión de la energía del ultrasonido a calor tal que se llega a proveer al diclorometano de la energía requerida para alcanzar su temperatura de ebullición (33°C, 0.76 atm a 2250 m sobre el nivel del mar para la Ciudad de México); considerando entonces que la máxima temperatura alcanzada es de 33°C y observando que las temperaturas de transición vítreas determinadas por DSC para PLA es de 41.2°C (Anexo III figura 60) y para CPP es de 29.4°C (Anexo III figura 61), se puede considerar que el CPP se encuentra por encima de su temperatura de transición vítrea permitiendo la movilidad de cadenas del material para formar una red estable que permite la formación de películas continuas,^{107,108} mientras que el PLA no alcanza la temperatura de formación de película produciendo defectos macroscópicos en una película que impiden su estabilización mecánica para la óptima detección mediante ultrasonido.

Las características observadas macroscópicamente se observan a sí mismo en algunas de las partículas obtenidas a escala micrométrica como se muestran en las figuras 56 y 57:

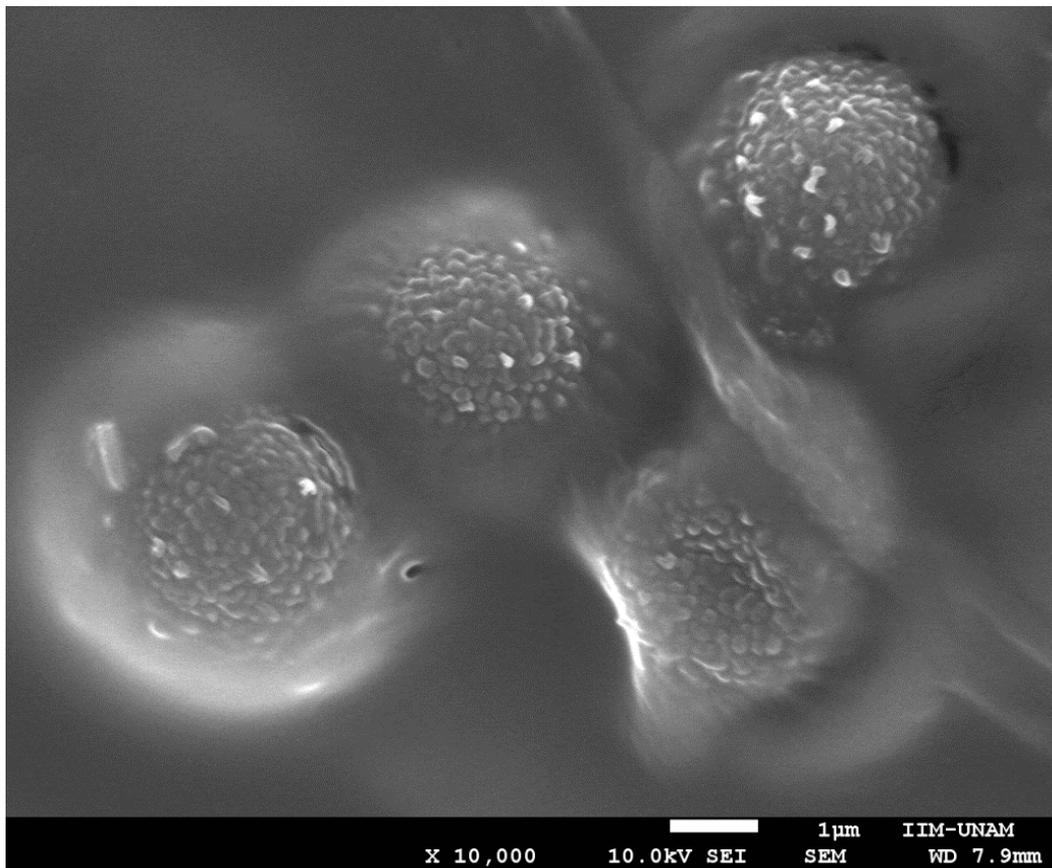


Figura 56. Micrografía SEM de MBPLAFe.

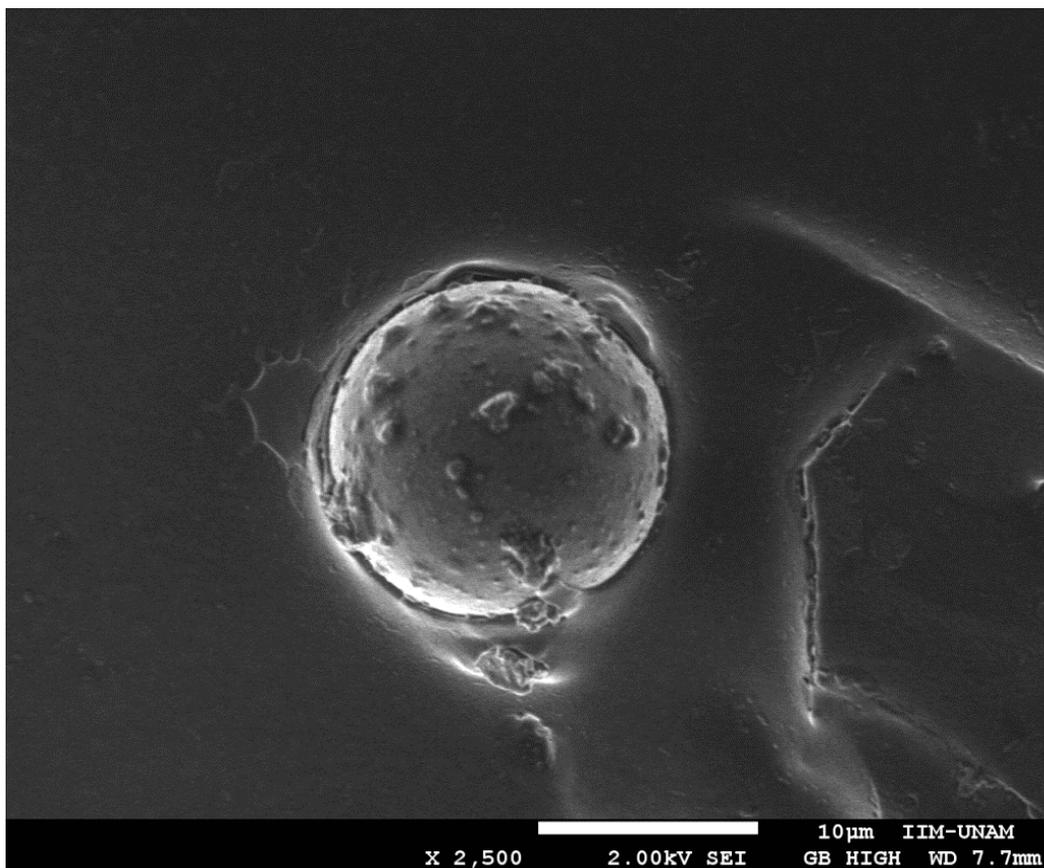


Figura 57. Micrografía SEM de MBCPPCo.

Es importante considerar que se busca obtener microburbujas con una película continua para impedir la permeación de gas desde su interior durante el tiempo de estadía en el cuerpo humano sin modificaciones en su capacidad ecogénica, por lo que se consideran más apropiadas las microburbujas formadas por CPP.

Para determinar las propiedades mecánicas de estas películas se utilizó el método de la ASTM International:

“ASTM D882-02, Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2002.”

Considerando los cálculos de módulo de Young, fuerza tensil de ruptura y porcentaje de elongación a la ruptura propuestos en este método. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 33:

Tabla 33. Propiedades mecánicas de películas modelos basadas en los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados.

Material	Módulo de Young (MPa)	Fuerza tensil de ruptura (MPa)	Elongación de ruptura (%)	Trabajo de ruptura (Nm)
PVA	2.18 ± 0.15	2.39 ± 0.38	65.83 ± 4.01	0.11181 ± 0.005
PVA-PLA 0.25	1.38 ± 0.54	1.40 ± 0.33	10.83 ± 0.76	0.02554 ± 0.002
PVA-PLA 1.00	1.41 ± 0.09	1.51 ± 0.06	61.25 ± 6.16	0.07855 ± 0.016
PVA-CPP 0.25	1.63 ± 0.01	2.04 ± 0.02	71.17 ± 0.76	0.08189 ± 0.017
PVA-CPP 1.00	2.50 ± 0.14	2.75 ± 0.28	156.25 ± 6.43	0.19270 ± 0.005

Los resultados obtenidos consideran que aquellas películas preparadas con carbonato de polipropileno tienen mejores propiedades mecánicas en comparación con aquellas preparadas con ácido poli-(L)-láctico al requerir un mayor trabajo y una mayor fuerza para llevar a cabo su ruptura soportando un mayor porcentaje de elongación, sin embargo, si la proporción de PVA:CPP es cercana 1:1 se observa un aumento en el módulo de Young, mismo que puede causar una interferencia durante la fase de rarefacción de microburbujas bajo el estímulo del ultrasonido y se requiere evaluar cuál es la proporción más adecuada para obtener la mayor respuesta ecogénica.

Capítulo 8. Conclusiones

Se obtuvieron nanopartículas de magnetita y ferrita de cobalto con un recubrimiento de ácido oleico coordinado en superficie mediante síntesis solvotermal y/o coprecipitación,

Las nanopartículas magnéticas obtenidas fueron capaces de ser dispersadas en CH₂Cl₂, para su inclusión en la capa interna de microburbujas magnéticas sintetizadas por el método de doble emulsión.

El tamaño y potencial zeta de las nanopartículas de magnetita recubierta con ácido oleico fueron de 8.8 ± 1.1 nm y de -5.94 ± 2.2 mV, mientras que para las nanopartículas de ferrita de cobalto con ácido oleico fueron de 7.9 ± 1.2 nm y de -3.99 ± 0.5 mV respectivamente. Ambos tipos de nanopartículas obtenidas demostraron ser capaces de ser dispersadas en cloruro de metileno e incluidas en la capa interna de microburbujas sintetizadas por el método de doble emulsión.

La magnetización de nanopartículas magnéticas demostró que las nanopartículas de ferrita de cobalto mantienen sus propiedades magnéticas a lo largo del tiempo por lo que se consideran

mejores candidatos en su uso para detección mediante resonancia magnética de imagen y para la generación de hipertermia.

Se obtuvieron microburbujas con una capa interna de ácido poliláctico y una capa externa de alcohol polivinílico con tamaño de $4.06 - 5.1 \mu\text{m}$ y un potencial zeta de $-34.6 \pm 0.1 \text{ mV}$, con inclusiones de magnetita hidrofóbica con tamaño de $4.13 - 5.2 \mu\text{m}$ y un potencial zeta de -38.1 ± 1.2 , y con inclusiones de ferrita de cobalto hidrofóbica con tamaño de $4.40 - 5.6 \mu\text{m}$ y un potencial zeta de -35.1 ± 3.7 .

Se obtuvieron microburbujas con una capa interna de carbonato de polipropileno y una capa externa de alcohol polivinílico con tamaño de $5.30 - 5.6 \mu\text{m}$ y un potencial zeta de $-39.9 \pm 4.4 \text{ mV}$, con inclusiones de magnetita hidrofóbica con tamaño de $2.00 - 2.6 \mu\text{m}$ y un potencial zeta de -39.8 ± 0.3 , y con inclusiones de ferrita de cobalto hidrofóbica con tamaño de $5.17 - 6.6 \mu\text{m}$ y un potencial zeta de $-40.8 \pm 3.5 \text{ mV}$.

No existió diferencia significativa en los porcentajes de carga ni en los perfiles de liberación de metotrexato a partir de los seis sistemas, por lo que se considera que la carga y liberación de metotrexato en microburbujas sintetizadas mediante el método de doble emulsión no es un proceso dependiente de la composición de la fase hidrofóbica de la microburbuja.

Los seis sistemas poliméricos e híbridos mostraron una liberación de metotrexato completa alrededor de las 12 horas, con un mecanismo mediado por el proceso de erosión de la fase externa de la microburbuja y la difusión del fármaco hacia el medio.

Las películas preparadas con carbonato de polipropileno tienen mejores propiedades mecánicas en comparación con aquellas preparadas con ácido poli-(L)-láctico al requerir un mayor trabajo y una mayor fuerza para llevar a cabo su ruptura soportando un mayor porcentaje de elongación

Los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados demostraron un aumento en la respuesta ecogénica, así como una mayor resolución de las estructuras internas del fruto de *Vitis vinífera*; observando que los sistemas MBPLAFe y MBCPP \emptyset aumentaron la respuesta y resolución de manera más efectiva.

Considerando las propiedades magnéticas de NPM obtenidas, las propiedades farmacéuticas como sistemas de liberación de metotrexato, y las propiedades mecánicas de los sistemas

obtenidos se propone a las microburbujas de MBCPPFe, MBCPP0 y MBCPPCo como aquellas más adecuadas como sistema teragnóstico basado en microburbujas magnéticas.

Capítulo 9. Perspectivas

- a) Evaluar el uso de microfluídica y modificación de proporción de tensoactivos para la producción de microburbujas en la distribución de tamaños de microburbujas magnéticas.
- b) Evaluar los efectos de la exposición de los sistemas generados a un campo magnético alterno sobre la liberación de metotrexato.
- c) Determinar la ventana de detección de microburbujas magnéticas con metotrexato en ultrasonido en modo B y en modo Doppler en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- d) Calcular la dosis y tiempos de administración en la terapia de tumores sólidos considerando la ventana terapéutica de metotrexato, la cantidad de metotrexato por gramo de microburbujas magnéticas, la cinética de liberación y la ventana de detección en ultrasonido en modo B y en modo Doppler.
- e) Evaluar el uso de los residuos de PVA en la síntesis de microburbujas magnéticas por método de doble emulsión como posible agente embolizante en modelos *in vitro* y *ex vivo*.

Capítulo 10. Referencias y bibliografía

- 1 Yang, F. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-embedded encapsulated microbubbles as dual contrast agents of magnetic resonance and ultrasound imaging. *Biomaterials* **30**, 3882-3890, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.03.051 (2009).
- 2 Bouwman, P. & Jonkers, J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat Rev Cancer* **12**, 587-598, doi:http://www.nature.com/nrc/journal/v12/n9/supinfo/nrc3342_S1.html (2012).
- 3 Claverie, J.-M. Fewer Genes, More Noncoding RNA. *Science* **309**, 1529 (2005).
- 4 Organization, W. H. World Cancer Report 2014. (WHO Press, World Health Organization, Lyon, France, 2015).
- 5 Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 417-427 (2011).
- 6 Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O. C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews* **66**, 2-25, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009> (2014).
- 7 Etzioni, R. *et al.* The case for early detection. *Nat Rev Cancer* **3**, 243-252 (2003).

- 8 Smith, R. A. *et al.* Cancer screening in the United States, 2015: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **65**, 30-54, doi:10.3322/caac.21261 (2015).
- 9 Chen, F. & Ni, Y. in *Cancer Theranostics* 95-126 (Academic Press, 2014).
- 10 Chen, X. & Wong, S. T. C. in *Cancer Theranostics* 3-8 (Academic Press, 2014).
- 11 Chen, Y.-S., Yeager, D. & Emelianov, S. Y. in *Cancer Theranostics* 139-158 (Academic Press, 2014).
- 12 Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* **5**, 65-72 (2005).
- 13 Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research* **34**, D668-672, doi:10.1093/nar/gkj067 (2006).
- 14 Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 12th edn, 1808 (McGraw-Hill Education / Medical, 2006).
- 15 Chien, Y. W. *NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS, SECOND EDITION, REVISED AND EXPANDED*,. Vol. 50 797 (Taylor & Francis Group, 1992).
- 16 Fahmy, T. M., Fong, P. M., Goyal, A. & Saltzman, W. M. Targeted for drug delivery. *Materials Today* **8**, 18-26, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)71033-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(05)71033-6) (2005).
- 17 Westwood, M. *et al.* Contrast-enhanced ultrasound using SonoVue(R) (sulphur hexafluoride microbubbles) compared with contrast-enhanced computed tomography and contrast-enhanced magnetic resonance imaging for the characterisation of focal liver lesions and detection of liver metastases: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health technology assessment (Winchester, England)* **17**, 1-243, doi:10.3310/hta17160 (2013).
- 18 Dietrich C. Frank, A. H. *Endoscopic Ultrasound: An Introductory Manual and Atlas*. 2nd edn, Vol. 1 44-59 (TPS, 2009).
- 19 Ponce C. A., E. D. Microburbujas como Agentes de Contraste para Ultrasonidos. *Revista de Posgrado de la Vla Cátedra de Medicina* **153**, 8-12 (2006).
- 20 Komljenovic, D. & Bäuerle, T. in *Cancer Theranostics* 127-137 (Academic Press, 2014).
- 21 Ng, A. & Swanevelder, J. Resolution in ultrasound imaging. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* **11**, 186-192, doi:10.1093/bjaceaccp/mkr030 (2011).

- 22 Krause, W. *Contrast Agents I: Magnetic Resonance Imaging*. (Springer Berlin Heidelberg, 2003).
- 23 Upadhyay, S., Parekh, K. & Pandey, B. Influence of crystallite size on the magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds* **678**, 478-485, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.03.279> (2016).
- 24 Moskowitz, B. M. *Hitchhiker's Guide to Magnetism*. (1991).
- 25 Mnyukh, Y. Magnetization of Ferromagnets. *American Journal of Condensed Matter Physics* **4**, 78-85, doi:10.5923/j.ajcmp.20140404.03 (2014).
- 26 Stephen, Z. R., Kievit, F. M. & Zhang, M. Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging. *Materials today (Kidlington, England)* **14**, 330-338, doi:10.1016/S1369-7021(11)70163-8 (2011).
- 27 Zhang, L., He, R. & Gu, H.-C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science* **253**, 2611-2617, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.05.023> (2006).
- 28 Sciallero, C., Grishenkov, D., Kothapalli, S. V. V. N., Oddo, L. & Trucco, A. Acoustic characterization and contrast imaging of microbubbles encapsulated by polymeric shells coated or filled with magnetic nanoparticles. *Journal of the Acoustical Society of America* **134**, 3918-3930, doi:10.1121/1.4824337 (2013).
- 29 Bañobre-López, M., Teijeiro, A. & Rivas, J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* **18**, 397-400, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpor.2013.09.011> (2013).
- 30 Vasiliki, D. & Thomas, J. L. Magnetic resonance for in vitro medical diagnostics: superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. *New Journal of Physics* **13**, 025005 (2011).
- 31 Ramos, M. *Nanopartículas magnéticas riesgos y beneficios* Nanopartículas magnéticas riesgos y beneficios thesis, Universidad Nacional Autónoma México, (2016).
- 32 Peralta, C. *Síntesis de nanopartículas magnéticas modificadas en superficie con acrilatos recubiertas mediante el método de impresión molecular usando como plantilla doxorubicina*. Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, (2014).
- 33 Lopez, J. A., González, F., Bonilla, F. A., Zambrano, G. & Gómez, M. E. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ magnetic nanofluid. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* **30**, 60-66 (2010).

- 34 M. Ahmad, M. U. M., M. Sohail, M. Faisal, H. Rashid. Comprehensive Review on Magnetic Drug Delivery Systems: A Novel Approach for Drug Targeting. *Journal of Pharmacy and Alternative Medicine* **2**, 13-21 (2013).
- 35 Israelachvili, J. N. in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)* 503-534 (Academic Press, 2011).
- 36 Byrappa, K. & Yoshimura, M. in *Handbook of Hydrothermal Technology* (eds K. Byrappa & Masahiro Yoshimura) 1-52 (William Andrew Publishing, 2001).
- 37 Li, J., Wu, Q. & Wu, J. *Synthesis of Nanoparticles via Solvothermal and Hydrothermal Methods*. (2016).
- 38 Banerjee, S. K. & Moskowitz, B. M. in *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism* (eds Joseph L. Kirschvink, Douglas S. Jones, & Bruce J. MacFadden) 17-41 (Springer US, 1985).
- 39 Intrater, J. A review of: "Ferromagnetic Materials – Structure and Properties" by R. A. McCurrie. *Materials and Manufacturing Processes* **10**, 1300-1301, doi:10.1080/10426919508935112 (1995).
- 40 Serna, C. J. & Morales, M. P. in *Surface and Colloid Science* (eds Egon Matijević & Michal Borkovec) 27-81 (Springer US, 2004).
- 41 in *Magnetic Ceramics Chemistry of Solid State Materials* (ed Raul Valenzuela) 98-190 (Cambridge University Press, 1994).
- 42 Dey, C. *et al.* Improvement of drug delivery by hyperthermia treatment using magnetic cubic cobalt ferrite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **427**, 168-174, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.024> (2017).
- 43 Kumari, M. *Magnetic Properties of Iron-oxide Nanoparticles and Methods for their Characterization*, ETH-Zürich, (2015).
- 44 Guo, G. *et al.* Mechanical and dynamic characteristics of encapsulated microbubbles coupled by magnetic nanoparticles as multifunctional imaging and drug delivery agents. *Physics in Medicine and Biology* **59**, 6729-6747, doi:10.1088/0031-9155/59/22/6729 (2014).
- 45 Kiessling, F., Fokong, S., Koczera, P., Lederle, W. & Lammers, T. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **53**, 345-348, doi:10.2967/jnumed.111.099754 (2012).

- 46 Nemeč, J. J. *et al.* Comparison of transcranial Doppler ultrasound and transesophageal contrast echocardiography in the detection of interatrial right-to-left shunts. *The American journal of cardiology* **68**, 1498-1502 (1991).
- 47 Rayleigh, L. VIII. On the pressure developed in a liquid during the collapse of a spherical cavity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **34**, 94-98, doi:10.1080/14786440808635681 (1917).
- 48 Peregrine, D. H. The Acoustic Bubble. By T. G. Leighton. Academic Press, 1994. 613 pp. £95. ISBN 0-12-441920-8. *Journal of Fluid Mechanics* **272**, 407-408, doi:10.1017/S0022112094214519 (2006).
- 49 Harkin, A., Nadim, A. & Kaper, T. J. On acoustic cavitation of slightly subcritical bubbles. *Physics of Fluids* **11**, 274-287, doi:10.1063/1.869878 (1999).
- 50 Dijkmans, P. A. *et al.* Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology* **5**, 245-256, doi:10.1016/j.euje.2004.02.001 (2004).
- 51 Medwin, H. Counting bubbles acoustically: a review. *Ultrasonics* **15**, 7-13, doi:https://doi.org/10.1016/0041-624X(77)90005-1 (1977).
- 52 Soetanto, K. & Chan, M. Fundamental studies on contrast images from different-sized microbubbles: analytical and experimental studies. *Ultrasound in Medicine & Biology* **26**, 81-91, doi:https://doi.org/10.1016/S0301-5629(99)00107-6 (2000).
- 53 Gorce, J. M., Arditi, M. & Schneider, M. Influence of bubble size distribution on the echogenicity of ultrasound contrast agents: a study of SonoVue. *Investigative radiology* **35**, 661-671 (2000).
- 54 Chomas, J. E. *et al.* Optical observation of contrast agent destruction. *Applied Physics Letters* **77**, 1056-1058, doi:10.1063/1.1287519 (2000).
- 55 Section 7—Discussion of the Mechanical Index and Other Exposure Parameters. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine* **19**, 143-168 (2000).
- 56 Sorace, A. G., Warram, J. M., Umphrey, H. & Hoyt, K. Microbubble-mediated ultrasonic techniques for improved chemotherapeutic delivery in cancer. *Journal of drug targeting* **20**, 43-54, doi:10.3109/1061186x.2011.622397 (2012).
- 57 Licha, K. in *Contrast Agents II: Optical, Ultrasound, X-Ray and Radiopharmaceutical Imaging* (ed Werner Krause) 1-29 (Springer Berlin Heidelberg, 2002).

- 58 Brismar, T. B. *et al.* Magnetite nanoparticles can be coupled to microbubbles to support multimodal imaging. *Biomacromolecules* **13**, 1390-1399, doi:10.1021/bm300099f (2012).
- 59 Cai, X., Yang, F. & Gu, N. Applications of magnetic microbubbles for theranostics. *Theranostics* **2**, 103-112, doi:10.7150/thno.3464 (2012).
- 60 Bhatia, A., Gupta, R. K., Bhattacharya, S. N. & Choi, H. J. Compatibility of biodegradable poly (lactic acid) (PLA) and poly (butylene succinate) (PBS) blends for packaging application. *Korea Australia Rheology Journal* **19**, 125-131 (2007).
- 61 Luinstra, G. A. & Borchardt, E. in *Synthetic Biodegradable Polymers* (eds Bernhard Rieger *et al.*) 29-48 (Springer Berlin Heidelberg, 2012).
- 62 Berins, M. L. & Society of the Plastics, I. *SPI plastics engineering handbook of the Society of the Plastics Industry, Inc.* (Kluwer Academic Publishers, 2000).
- 63 Eisenbrey, J. R. *et al.* Development and optimization of a doxorubicin loaded poly(lactic acid) contrast agent for ultrasound directed drug delivery. *Journal of Controlled Release* **143**, 38-44, doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.12.021 (2010).
- 64 Niu, C. *et al.* Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dual-mode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes. *Biomaterials* **34**, 2307-2317, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.12.003 (2013).
- 65 Sirsi, S. R. & Borden, M. A. State-of-the-art materials for ultrasound-triggered drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **72**, 3-14, doi:10.1016/j.addr.2013.12.010 (2014).
- 66 Sirsi, S. & Borden, M. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. *Bubble science engineering and technology* **1**, 3-17, doi:10.1179/175889709X446507 (2009).
- 67 Huang, H. Y. *et al.* SPIO nanoparticle-stabilized PAA-F127 thermosensitive nanobubbles with MR/US dual-modality imaging and HIFU-triggered drug release for magnetically guided in vivo tumor therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **172**, 118-127, doi:10.1016/j.jconrel.2013.07.029 (2013).
- 68 Lee, H. *et al.* Microbubbles used for contrast enhanced ultrasound and theragnosis: a review of principles to applications. *Biomedical Engineering Letters* **7**, 59-69, doi:10.1007/s13534-017-0016-5 (2017).
- 69 Snipstad, S. *et al.* Ultrasound Improves the Delivery and Therapeutic Effect of Nanoparticle-Stabilized Microbubbles in Breast Cancer Xenografts. *Ultrasound in*

- 70 Dimcevski, G. *et al.* A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *Journal of Controlled Release* **243**, 172-181, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.10.007> (2016).
- 71 Afadzi, M. *et al.* Mechanisms of the ultrasound-mediated intracellular delivery of liposomes and dextrans. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* **60**, 21-33, doi:10.1109/TUFFC.2013.2534 (2013).
- 72 Cavalli, R. *et al.* Preparation and in vitro characterization of chitosan nanobubbles as theranostic agents. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **129**, 39-46, doi:10.1016/j.colsurfb.2015.03.023 (2015).
- 73 Larina, I. V., Evers, B. M. & Esenaliev, R. O. Optimal drug and gene delivery in cancer cells by ultrasound-induced cavitation. *Anticancer research* **25**, 149-156 (2005).
- 74 Feril Jr, L. B. & Tachibana, K. Use of ultrasound in drug delivery systems: Emphasis on experimental methodology and mechanisms. *International Journal of Hyperthermia* **28**, 282-289, doi:10.3109/02656736.2012.668640 (2012).
- 75 Gao, Z. *et al.* Sonodynamic therapy inhibits angiogenesis and tumor growth in a xenograft mouse model. *Cancer Letters* **335**, 93-99, doi:10.1016/j.canlet.2013.02.006 (2013).
- 76 Li, P. *et al.* Ultrasound triggered drug release from 10-hydroxycamptothecin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy in mice. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **162**, 349-354, doi:10.1016/j.jconrel.2012.07.009 (2012).
- 77 Liu, H. L. *et al.* Blood-brain barrier disruption with focused ultrasound enhances delivery of chemotherapeutic drugs for glioblastoma treatment. *Radiology* **255**, 415-425, doi:10.1148/radiol.10090699 (2010).
- 78 Treat, L. H., McDannold, N., Zhang, Y., Vykhodtseva, N. & Hynynen, K. Improved anti-tumor effect of liposomal doxorubicin after targeted blood-brain barrier disruption by MRI-guided focused ultrasound in rat glioma. *Ultrasound in medicine & biology* **38**, 1716-1725, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2012.04.015 (2012).
- 79 Baghbani, F., Moztafzadeh, F., Mohandesi, J. A., Yazdian, F. & Mokhtari-Dizaji, M. Novel alginate-stabilized doxorubicin-loaded nanodroplets for ultrasonic theranosis of

- breast cancer. *International journal of biological macromolecules* **93**, 512-519, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.008 (2016).
- 80 Wang, P. *et al.* Ultrasound-responsive microbubbles for sonography-guided siRNA delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **12**, 1139-1149, doi:<https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.12.361> (2016).
- 81 Yu, F. T., Chen, X., Wang, J., Qin, B. & Villanueva, F. S. Low Intensity Ultrasound Mediated Liposomal Doxorubicin Delivery Using Polymer Microbubbles. *Molecular pharmaceutics* **13**, 55-64, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00421 (2016).
- 82 Francesca, C., Meifang, Z., Mariarosaria, T., Baldassarri, L. & Muthupandian, A. Methods of Preparation of Multifunctional Microbubbles and their In Vitro / In Vivo Assessment of Stability, Functional and Structural Properties. *Current Pharmaceutical Design* **18**, 2135-2151, doi:<http://dx.doi.org/10.2174/138161212800099874> (2012).
- 83 Fan, C. H. *et al.* SPIO-conjugated, doxorubicin-loaded microbubbles for concurrent MRI and focused-ultrasound enhanced brain-tumor drug delivery. *Biomaterials* **34**, 3706-3715, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.099 (2013).
- 84 Costa, P. & Sousa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13**, 123-133, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1) (2001).
- 85 Peppas, N. A. & Sahlin, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics* **57**, 169-172, doi:[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2) (1989).
- 86 Enscore, D. J., Hopfenberg, H. B. & Stannett, V. T. Effect of particle size on the mechanism controlling n-hexane sorption in glassy polystyrene microspheres. *Polymer* **18**, 793-800, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0032-3861\(77\)90183-5](http://dx.doi.org/10.1016/0032-3861(77)90183-5) (1977).
- 87 Goff, H. M., Hines, J., Griesel, J. & Mossman, C. Synthesis, characterization, and use of a cobalt(II) complex as an NMR shift reagent: An integrated laboratory experiment. *Journal of Chemical Education* **59**, 422, doi:10.1021/ed059p422 (1982).
- 88 Chaudhuri, M. K. & Ghosh, S. K. Notes. Novel synthesis of tris(acetylacetonato)iron(III). *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 839-840, doi:10.1039/DT9830000839 (1983).
- 89 Lu, L. T. *et al.* Synthesis of magnetic cobalt ferrite nanoparticles with controlled morphology, monodispersity and composition: the influence of solvent, surfactant,

- reductant and synthetic conditions. *Nanoscale* **7**, 19596-19610, doi:10.1039/C5NR04266F (2015).
- 90 Kim, Y. I., Kim, D. & Lee, C. S. Synthesis and characterization of CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. *Physica B: Condensed Matter* **337**, 42-51, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4526\(03\)00322-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4526(03)00322-3) (2003).
- 91 Alexander, L. & Klug, H. P. Determination of Crystallite Size with the X-Ray Spectrometer. *Journal of Applied Physics* **21**, 137-142, doi:10.1063/1.1699612 (1950).
- 92 Feshitan, J. A., Chen, C. C., Kwan, J. J. & Borden, M. A. Microbubble size isolation by differential centrifugation. *Journal of Colloid and Interface Science* **329**, 316-324, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.09.066> (2009).
- 93 Zhang, Y. *et al.* DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal* **12**, 263-271, doi:10.1208/s12248-010-9185-1 (2010).
- 94 Nakamoto, K. *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*. (Wiley, 1986).
- 95 Singh, A. K. *Engineered Nanoparticles: Structure, Properties and Mechanisms of Toxicity*. 1st edition edn, (Academic Press, 2015).
- 96 Bini, R. A., Marques, R. F. C., Santos, F. J., Chaker, J. A. & Jafelicci, M. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy silanes. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **324**, 534-539, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2011.08.035> (2012).
- 97 Smith, D. K. & Jenkins, R. The Powder Diffraction File: Past, Present, and Future. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* **101**, 259-271, doi:10.6028/jres.101.027 (1996).
- 98 Correa, J. R., Canetti, D., Castillo, R., Llópiz, J. C. & Dufour, J. Influence of the precipitation pH of magnetite in the oxidation process to maghemite. *Materials Research Bulletin* **41**, 703-713, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.materresbull.2005.10.009> (2006).
- 99 Sun, S. & Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 8204-8205, doi:10.1021/ja026501x (2002).
- 100 Connors, K. A. *Binding constants: the measurement of molecular complex stability*. (Wiley, 1987).

- 101 Vaidya, S., Tozer, K. R. & Chen, J. An Overview of Embolic Agents. *Seminars in Interventional Radiology* **25**, 204-215, doi:10.1055/s-0028-1085930 (2008).
- 102 Hiemenz, P. C., and Raj Rajagopalan. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Third edn, Vol. Volume 14 (Marcel Dekker, 1997).
- 103 Andreasen, S. Ø., Chong, S.-F., Wohl, B. M., Goldie, K. N. & Zelikin, A. N. Poly(vinyl alcohol) Physical Hydrogel Nanoparticles, Not Polymer Solutions, Exert Inhibition of Nitric Oxide Synthesis in Cultured Macrophages. *Biomacromolecules* **14**, 1687-1695, doi:10.1021/bm400369u (2013).
- 104 Moreno-Bautista, G. & Tam, K. C. Evaluation of dialysis membrane process for quantifying the in vitro drug-release from colloidal drug carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **389**, 299-303, doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.07.032 (2011).
- 105 Destrempes, F. & Cloutier, G. in *Quantitative Ultrasound in Soft Tissues* (eds Jonathan Mamou & Michael L. Oelze) 219-274 (Springer Netherlands, 2013).
- 106 Shankar, P. M. A general statistical model for ultrasonic backscattering from tissues. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* **47**, 727-736, doi:10.1109/58.842062 (2000).
- 107 Sewell, G. *Importance and measurement of minimum film-forming temperature*. Vol. 27 (1998).
- 108 Kimber, J. A., Gerst, M. & Kazarian, S. G. Fast Drying and Film Formation of Latex Dispersions Studied with FTIR Spectroscopic Imaging. *Langmuir* **30**, 13588-13595, doi:10.1021/la5035257 (2014).

Índice de tablas

Tabla 1 Características fisicoquímicas del metotrexato. ¹³	18
Tabla 2. Propiedades magnéticas de algunas ferritas. ^{40,41,43}	29
Tabla 3. Propiedades de algunos de los posibles polímeros utilizados en la síntesis de microburbujas mediante el método de doble emulsión. ⁶⁰⁻⁶²	34
Tabla 4. Mecanismo de transporte de fármaco de acuerdo con el valor de n en el modelo Peppas-Sahlin para esferas. ⁸⁵	41
Tabla 5. Proporciones utilizadas en la evaluación mecánica de películas modelo basadas en microburbujas magnéticas.	51
Tabla 6. Bandas del espectro FTIR del complejo de acetilacetona.	54
Tabla 7. Bandas del espectro FTIR del complejo de acetilacetona y Fe ³⁺	54
Tabla 8. Bandas del espectro FTIR del complejo de acetilacetona y Co ²⁺	55
Tabla 9. Análisis elemental del compuesto de coordinación obtenido de Co(acac) _n	58
Tabla 10. Análisis elemental del compuesto de coordinación obtenido de Fe(acac) _n	58
Tabla 11. Clave de muestras de NPM's sintetizadas.	60
Tabla 12. Propiedades físicas de NPM sintetizadas.	71
Tabla 13. Resultados de espectroscopia atómica en el análisis de NPMs.	72
Tabla 14. Asignación de bandas observadas en el espectro de FTIR de NPM de magnetita	74
Tabla 15. Asignación de señales observadas en el espectro de FTIR de NPM de cobaltoferrita.	78
Tabla 16. Claves de sistemas poliméricos e híbridos con metotrexato sintetizados.	80
Tabla 17. Cantidad de PVA Adsorbida por los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados.	80
Tabla 18. Eficiencia de carga de metotrexato en la síntesis de sistemas poliméricos e híbridos basados en microburbujas.	81
Tabla 19. Ajuste de datos no censurados de distribución de tamaño de partículas para sistemas poliméricos e híbridos. En negro se presenta la distribución que mejor modela los datos obtenidos, mientras en rojo se representa el ajuste a una distribución normal.....	85
Tabla 20. Resultados de la prueba de verificación de la varianza para las distribuciones de tamaño de partícula de los sistemas poliméricos e híbridos.	86
Tabla 21. Resultados de la prueba de la mediana de Mood para las distribuciones de tamaño de partícula de los sistemas poliméricos e híbridos [α: 0.05].	86
Tabla 22. Tamaño y potencial zeta de sistemas poliméricos e híbridos.	88
Tabla 23. Prueba de f ₂ para todas las combinaciones de sistemas poliméricos e híbridos. ...	91

Tabla 24. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLA \emptyset	92
Tabla 25. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLAFe. ..	93
Tabla 26. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLACo. .	94
Tabla 27. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBCPP \emptyset	95
Tabla 28. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBCPPFe. ..	96
Tabla 29. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBCPPCo. .	97
Tabla 30. Modelos de liberación que muestran mejor ajuste en los sistemas evaluados.	98
Tabla 31. Resultados de la prueba de verificación de la varianza para las distribuciones de respuesta ecogénica de los sistemas poliméricos e híbridos.	103
Tabla 32. Resultados de la prueba de la mediana de Mood para las distribuciones de respuesta ecogénica de los sistemas poliméricos e híbridos [α : 0.05].	104
Tabla 33. Propiedades mecánicas de películas modelos basadas en los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados.	110
Tabla 34. Curva de calibración de metotrexato sódico en agua.	127
Tabla 35 Curva de calibración de metotrexato sódico en solución PBS pH: 7.4	129

Índice de figuras

Figura 1. Tasa de morbilidad por 100 000 habitantes de todo tipo de cáncer excluyendo el cáncer de piel no melanoma para el año 2012.	15
Figura 2. Tasa de mortalidad por tumores en México según su localización anatómica (Hombres y mujeres).	15
Figura 3. Estructura química del ácido fólico.	17
Figura 4. Estructura química del metotrexato.	17
Figura 5. Dependencia la coercitividad magnética conforme a la teoría de dominios. ^{23,30}	26
Figura 6. Estructura cristalina de la magnetita y ferrita de cobalto en disposición tetraédrica (A) y disposición octahédrica (B). ^{38,39}	28
Figura 7. Oscilación de una microburbuja en presencia de un campo ultrasónico.	30
Figura 8. Relación radio (R) contra presión (p) para una burbuja en un líquido por efecto de ondas acústicas.	31
Figura 9. Presión de perfusión sanguínea en distintos segmentos del sistema circulatorio. ..	32
Figura 10. Representación hipotética de la concentración plasmática de microburbujas para una administración intravenosa.	35

Figura 11. Espectro de FTIR de los derivados de acetilacetonato obtenidos.	53
Figura 12. Análisis por DSC (negro) y TG (rojo) del compuesto de coordinación obtenido de Co^{2+} y acetilacetona en atmósfera de aire.	56
Figura 13. Análisis por DSC (negro) y TG (rojo) del compuesto de coordinación obtenido de Co^{2+} y acetilacetona en atmósfera de N_2	57
Figura 14. Análisis por DSC (negro) y TG (rojo) del compuesto de coordinación obtenido de Fe^{3+} y acetilacetona en atmósfera de aire.	57
Figura 15 Análisis por DSC (negro) y TG (rojo) del compuesto de coordinación obtenido de Fe^{3+} y acetilacetona en atmósfera de N_2	58
Figura 16. Reacción de síntesis de acetilacetonato de cobalto II [$\text{Co}(\text{acac})_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$].	59
Figura 17. Reacción de síntesis de acetilacetonato de hierro III [$\text{Fe}(\text{acac})_3$].	59
Figura 18. Distribución de NPM de magnetita (izquierda) y NPM de ferrita de cobalto (derecha) en agua/diclorometano.	60
Figura 19. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-MagHFSC.	62
Figura 20. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-MagHBSC.	63
Figura 21. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-COHBSH.	64
Figura 22. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-COHFSC.	65
Figura 23. Difracción de rayos X de polvos de la muestra de NPM-COHBSC.	66
Figura 24. Micrografías TEM de nanopartículas de magnetita obtenidas por el método de coprecipitación.	67
Figura 25. Micrografías TEM de nanopartículas de ferrita de cobalto obtenidas por el método de síntesis solvotermal y por el método de coprecipitación.	67
Figura 26. Micrografía TEM y difracción de electrones de nanopartículas magnéticas de MagHBSC con eje de zona [044].	68
Figura 27. Micrografía TEM y difracción de electrones de nanopartículas magnéticas de COHBSC con eje de zona [044].	69
Figura 28. Espectroscopía EDS para cúmulo de NPM-MagHBSC.	69
Figura 29. Espectroscopía EDS para cúmulo de NPM-COHBSC.	70
Figura 30. Curvas de histéresis de NPM a 280 K.	70
Figura 31. Análisis de ATR-FTIR de NPMs de magnetita.	73
Figura 32. Análisis de ATR-FTIR de NPMs de ferrita de cobalto hidrofóbica obtenida mediante síntesis solvotermal.	75

Figura 33. Análisis de ATR-FTIR de NPMs de ferrita de cobalto obtenida mediante coprecipitación.....	77
Figura 34. Espectro de UV Visible de los sobrenadantes obtenidos mediante la centrifugación de los sistemas poliméricos e híbridos.	81
Figura 35. Micrografías SEM de sistemas poliméricos e híbridos mediante congelación con nitrógeno líquido.	83
Figura 36. Distribución de tamaño de partícula en micrografías SEM (N: 100) de sistemas poliméricos e híbridos.....	84
Figura 37. Diagrama de cajas y bigotes para distribuciones de tamaño de partícula de los sistemas poliméricos e híbridos.....	86
Figura 38. Progresión en el proceso de erosión de MBCPP \emptyset . El tiempo en que se realizaron las micrografías por muestra fueron A: 0 s, B: 8 s, C: 29 s. D: 54 s, E: 85 s, y F: 114 s.....	87
Figura 39. Especie predominante de la solubilización de metotrexato en agua a pH: 7.	88
Figura 40. Liberación de metotrexato libre a partir de la bolsa de diálisis.....	89
Figura 41. Cinética de liberación promedio para los sistemas poliméricos e híbridos.	90
Figura 42. Modelos cinéticos de liberación promedio de MBPLA \emptyset	92
Figura 43. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLAFe. ...	93
Figura 44. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MBPLACo. .	94
Figura 45. Modelos cinéticos de liberación promedio de MBCPP \emptyset	95
Figura 46. Modelos cinéticos de liberación promedio de MBCPPFe.	96
Figura 47. Modelos cinéticos de liberación promedio de MBCPPFe.	97
Figura 48. Ultrasonido en modo B de sistemas poliméricos e híbridos con metotrexato.	101
Figura 49. Ultrasonido en modo B de medio control.....	102
Figura 50. Gráfico de medianas de la respuesta ecogénica de los sistemas poliméricos e híbridos sintetizados.	102
Figura 51. Película de PLA fabricada a 25°C.....	105
Figura 52. Película de CPP fabricada a 25°C.....	105
Figura 53. Película de PVA fabricada a 35°C.	106
Figura 54. Película de PVA-PLA fabricada a 35°C.	106
Figura 55. Película de PVA-CPP fabricada a 35°C.....	107
Figura 56. Micrografía SEM de MBPLAFe.....	108
Figura 57. Micrografía SEM de MBCPPCo.....	109

Figura 58. Espectro de UV-Visible de metotrexato sódico en agua.....	127
Figura 59. Curva de calibración de metotrexato sódico en agua.	127
Figura 60. Espectro de UV-Visible de metotrexato sódico en solución PBS pH: 7.4.	129
Figura 61. Curva de calibración de metotrexato sódico en solución PBS pH: 7.4	129
Figura 62. Calorimetría diferencial de barrido de alcohol polivinílico. Tg: 45.73 °C	131
Figura 63. Calorimetría diferencial de barrido de ácido poli-(L)-láctico. Tg: 41.56 °C.....	131
Figura 64. Calorimetría diferencial de barrido de carbonato de polipropileno. Tg ₁ : 26.29 °C, Tg ₂ :48.09 °C	132
Figura 65. Calorimetría diferencial de barrido de poli-(ε)-caprolactona. Tm: 57.56 °C	132
Figura 66. Calorimetría diferencial de barrido de MBPLA \emptyset . Tg: 42.83 °C.....	133
Figura 67. Calorimetría diferencial de barrido de MBPLAFe. Tg: 46.97 °C	133
Figura 68. Calorimetría diferencial de barrido de MBPLACo. Tg: 45.96 °C	134
Figura 69. Calorimetría diferencial de barrido de MBCPP \emptyset . Tg ₁ : 28.73 °C, Tg ₂ :44.73 °C	134
Figura 70. Calorimetría diferencial de barrido de MBCPPFe. Tg ₁ : 26.71 °C, Tg ₂ : 44.59 °C .	135
Figura 71. Calorimetría diferencial de barrido de MBCPPCo. Tg ₁ : 27.23 °C, Tg ₂ : 45.23 °C.	135

Capítulo 11. Anexos

Anexo I. Curva de Calibración de metotrexato sódico en agua

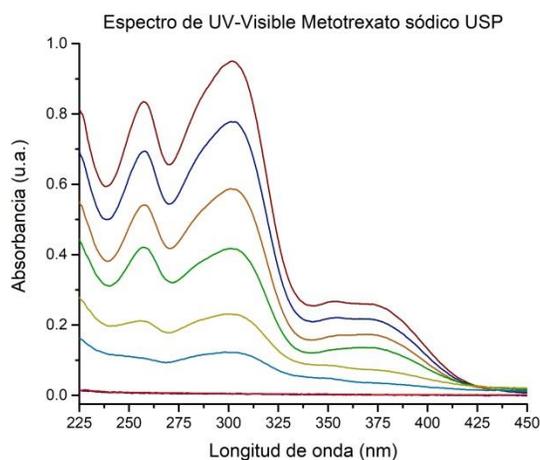


Figura 58. Espectro de UV-Visible de metotrexato sódico en agua.

Tabla 34. Curva de calibración de metotrexato sódico en agua.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia a 302.18 nm Muestra 1	Absorbancia a 302.18 nm Muestra 2	Absorbancia a 302.18 nm Muestra 3
0.024	0.950	0.950	0.957
0.020	0.777	0.785	0.784
0.016	0.616	0.604	0.612
0.012	0.426	0.420	0.420
0.008	0.280	0.270	0.282
0.004	0.122	0.120	0.118
0.000	0.004	0.005	0.006

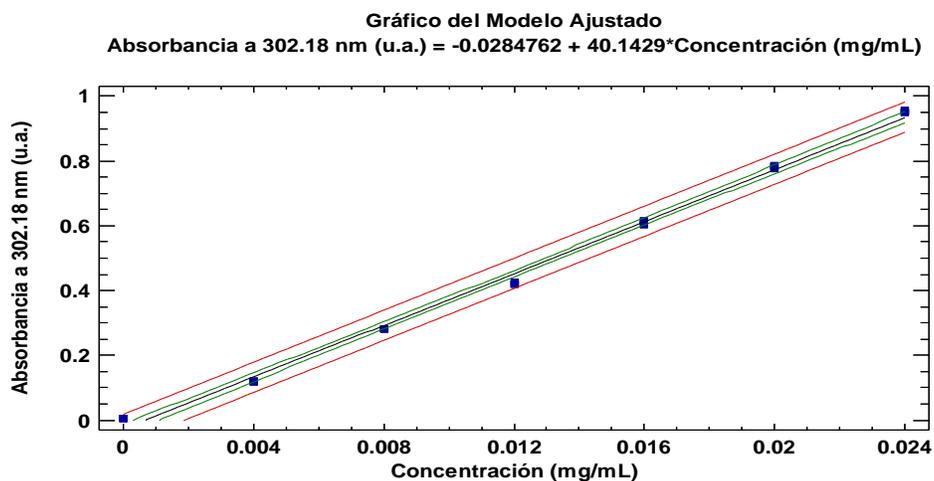


Figura 59. Curva de calibración de metotrexato sódico en agua.

Regresión Simple - Absorbancia a 302.18 nm (u.a.) vs. Concentración (mg/mL)

Variable dependiente: Absorbancia a 302.18 nm (u.a.)

Variable independiente: Concentración (mg/mL)

Modelo lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0.0284762	0.00829745	-3.43192	0.0028
Pendiente	40.1429	0.575325	69.7743	0.0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	2.16579	1	2.16579	4868.45	0.0000
Residuo	0.00845238	19	0.000444862		
Total (Corr.)	2.17424	20			

Coefficiente de Correlación = 0.998054

R-cuadrada = 99.6112 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.5908 por ciento

Error estándar del est. = 0.0210918

Error absoluto medio = 0.0169161

Estadístico Durbin-Watson = 1.31628 (P=0.0398)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.258155

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre Absorbancia a 302.18 nm (u.a.) y Concentración (mg/mL). La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Absorbancia a 302.18 nm (u.a.)} = -0.0284762 + (40.1429 \cdot \text{Concentración (mg/mL)})$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia a 302.18 nm (u.a.) y Concentración (mg/mL) con un nivel de confianza del 95.0%.

Anexo II. Curva de Calibración de metotrexato en buffer salino de fosfatos (PBS) pH:

Figura 60. Espectro de UV-Visible de metotrexato sódico en solución PBS pH: 7.4.

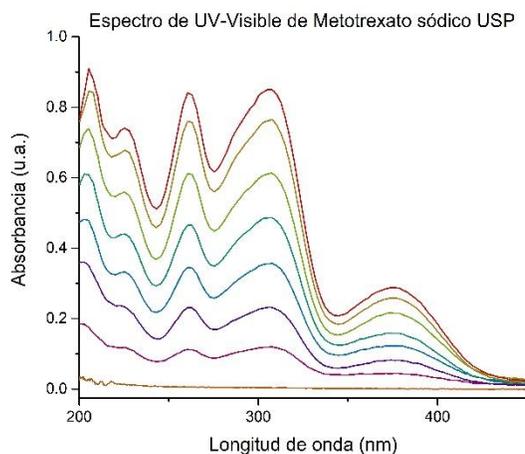


Tabla 35 Curva de calibración de metotrexato sódico en solución PBS pH: 7.4

Concentración (mg/mL)	Absorbancia a 307.11 nm Muestra 1	Absorbancia a 307.11 nm Muestra 2	Absorbancia a 307.11 nm Muestra 3
0.024	0.950	0.950	0.957
0.020	0.777	0.785	0.784
0.016	0.616	0.604	0.612
0.012	0.426	0.420	0.420
0.008	0.280	0.270	0.282
0.004	0.122	0.120	0.118
0.000	0.004	0.005	0.006

Gráfico del Modelo Ajustado
 Absorbancia a 307.11 nm = -0.0293095 + 40.1726*Concentración

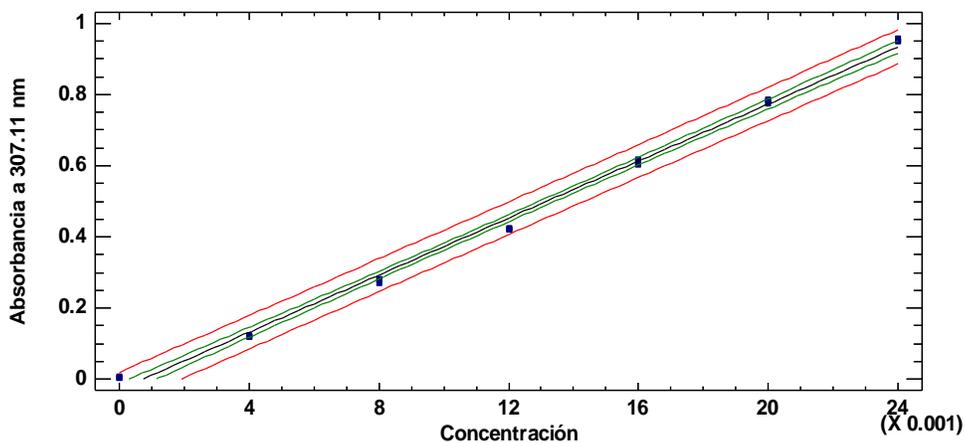


Figura 61. Curva de calibración de metotrexato sódico en solución PBS pH: 7.4

Regresión Simple - Absorbancia a 307.11 nm (u.a.) vs. Concentración (mg/mL)

Variable dependiente: Absorbancia a 307.11 nm (u.a.)

Variable independiente: Concentración (mg/mL)

Modelo lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0.0293095	0.00846624	-3.46193	0.0026
Pendiente	40.1726	0.587028	68.4339	0.0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	2.169	1	2.169	4683.19	0.0000
Residuo	0.00879976	19	0.000463145		
Total (Corr.)	2.1778	20			

Coefficiente de Correlación = 0.997978

R-cuadrada = 99.5959 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.5747 por ciento

Error estándar del est. = 0.0215208

Error absoluto medio = 0.0172902

Estadístico Durbin-Watson = 1.24772 (P=0.0268)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.292227

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre Absorbancia y Concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Absorbancia a 307.11 nm (u.a.)} = -0.0293095 + 40.1726 \cdot \text{Concentración (mg/mL)}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0%.

Anexo III. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de sistemas poliméricos e híbridos.

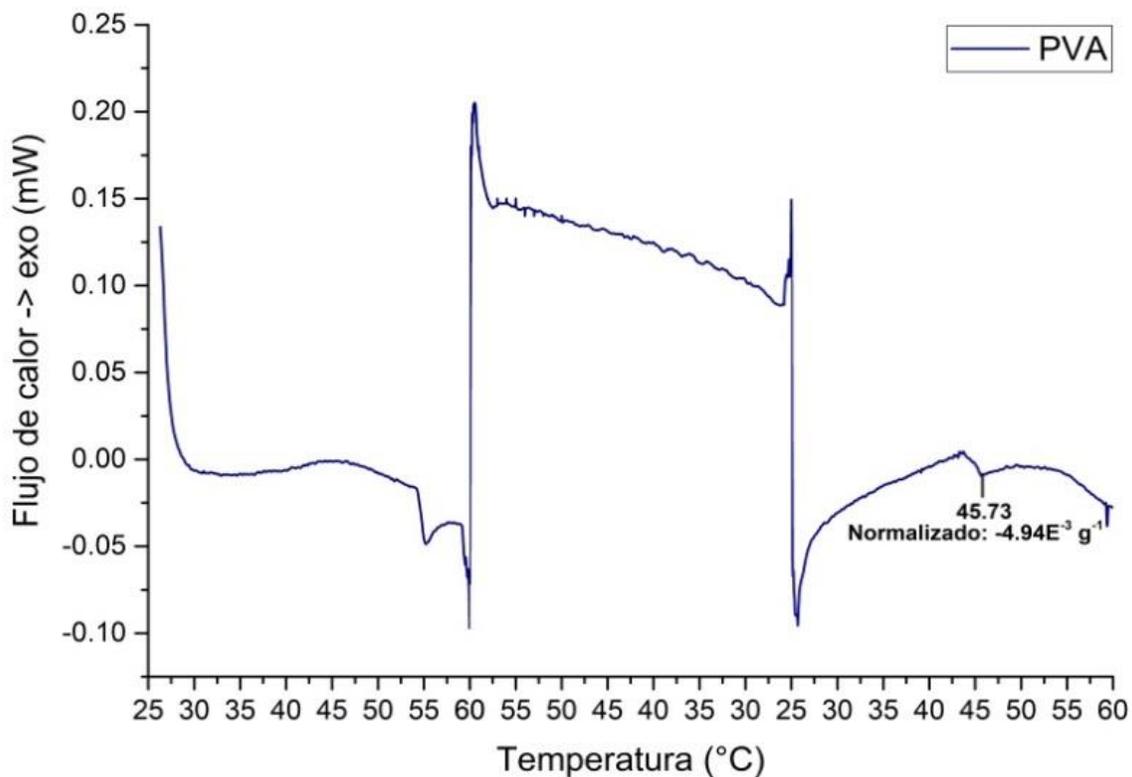


Figura 62. Calorimetría diferencial de barrido de alcohol polivinílico. Tg: 45.73 °C

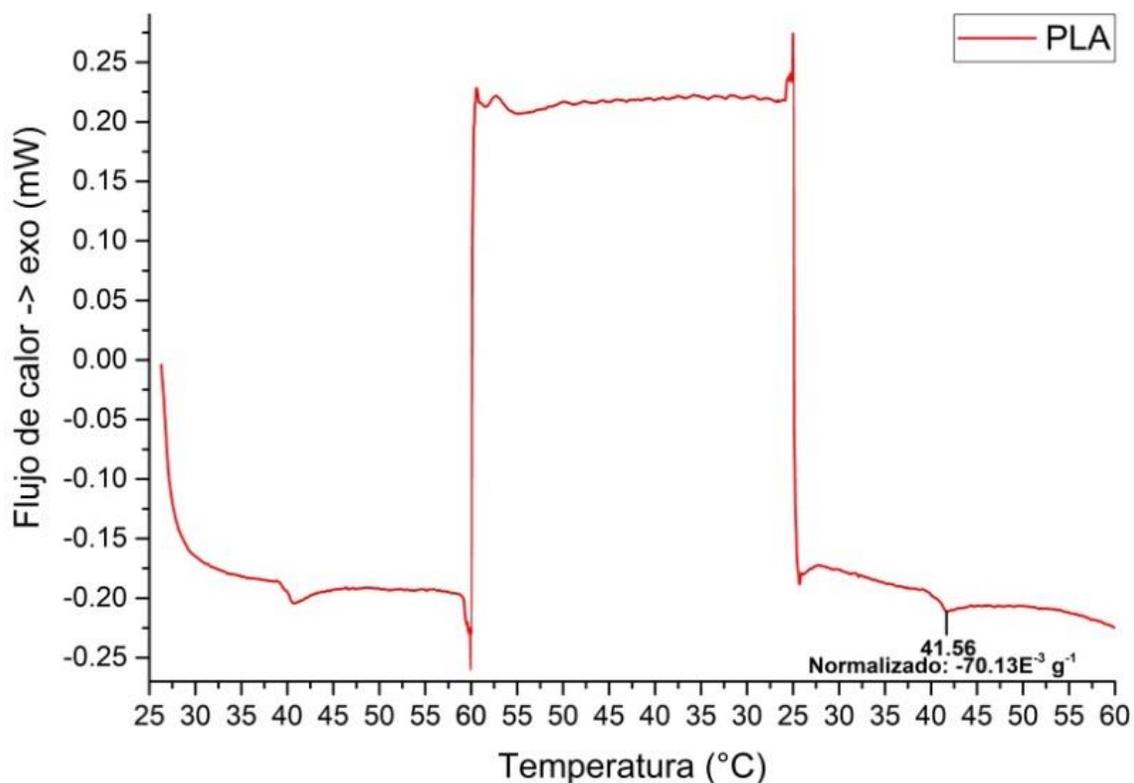


Figura 63. Calorimetría diferencial de barrido de ácido poli-(L)-láctico. Tg: 41.56 °C

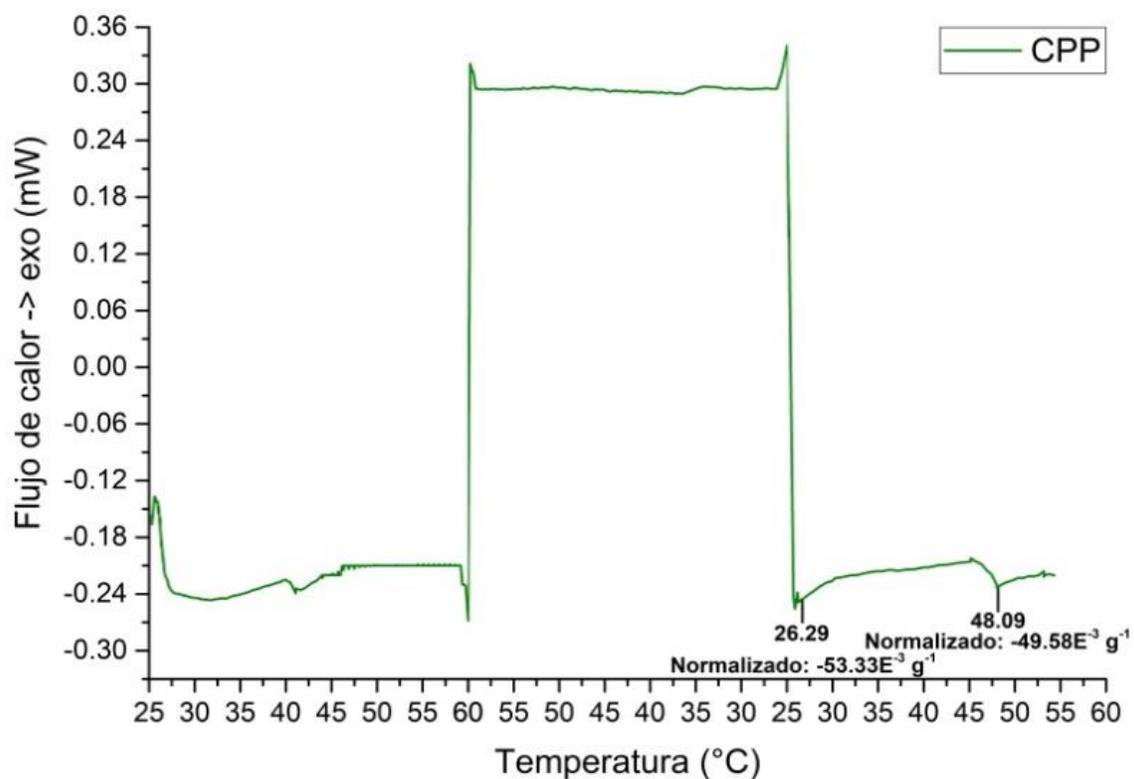


Figura 64. Calorimetría diferencial de barrido de carbonato de polipropileno. Tg₁: 26.29 °C, Tg₂:48.09 °C

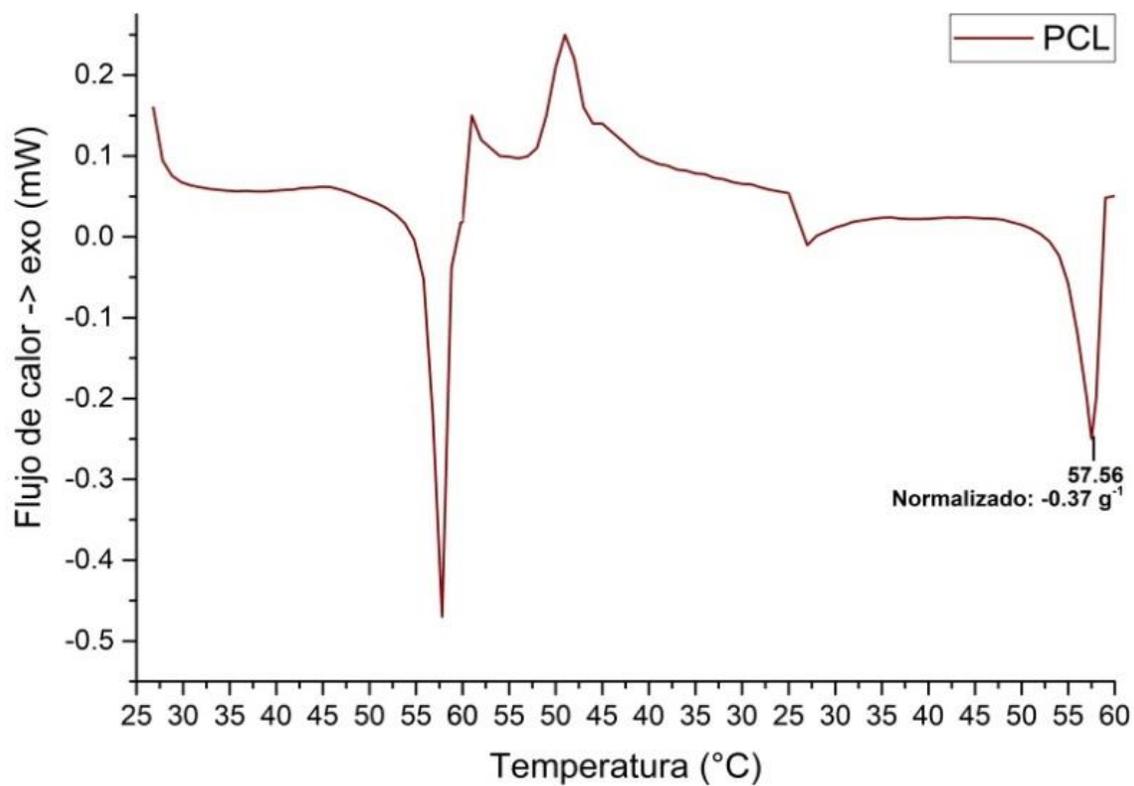


Figura 65. Calorimetría diferencial de barrido de poli-(ε)-caprolactona. T_m: 57.56 °C

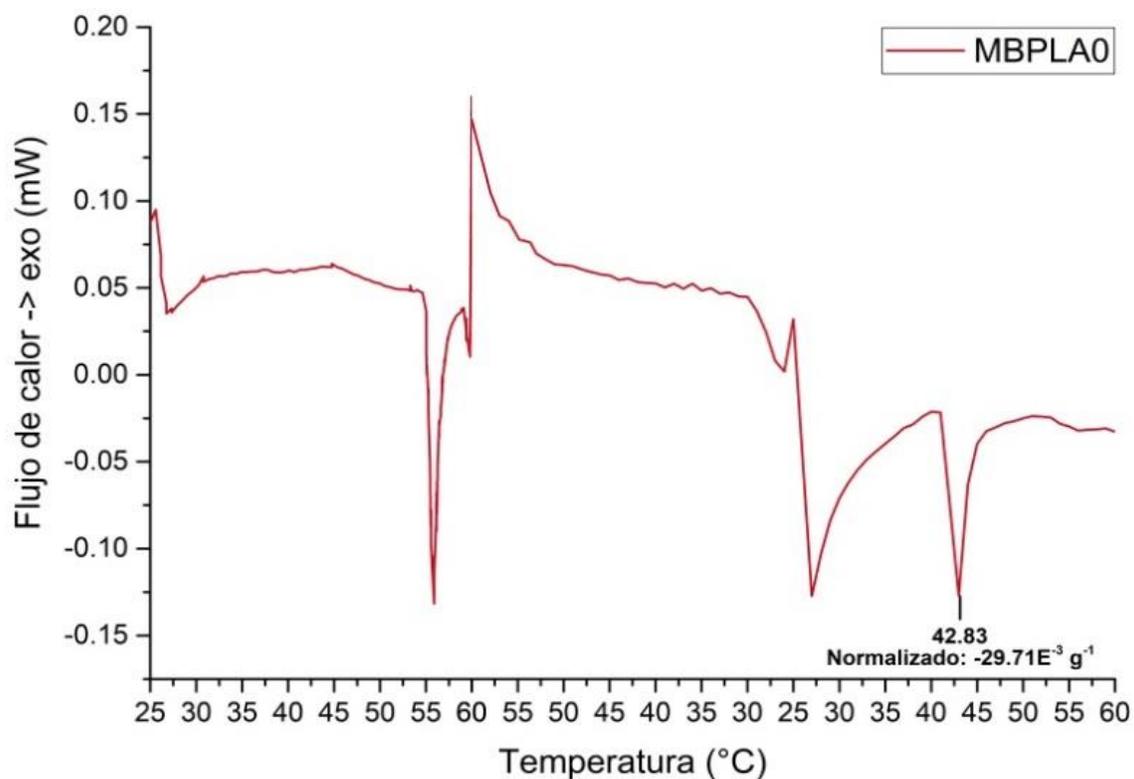


Figura 66. Calorimetría diferencial de barrido de MBPLA0. Tg: 42.83 °C

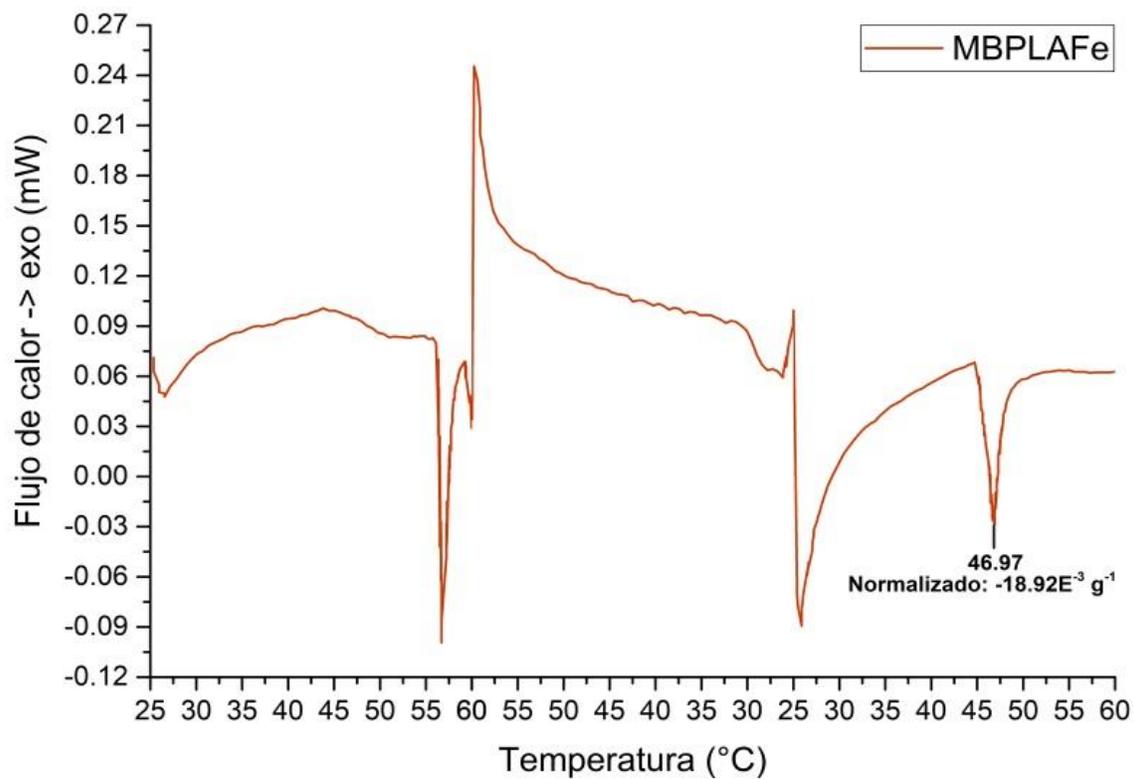


Figura 67. Calorimetría diferencial de barrido de MBPLAFe. Tg: 46.97 °C

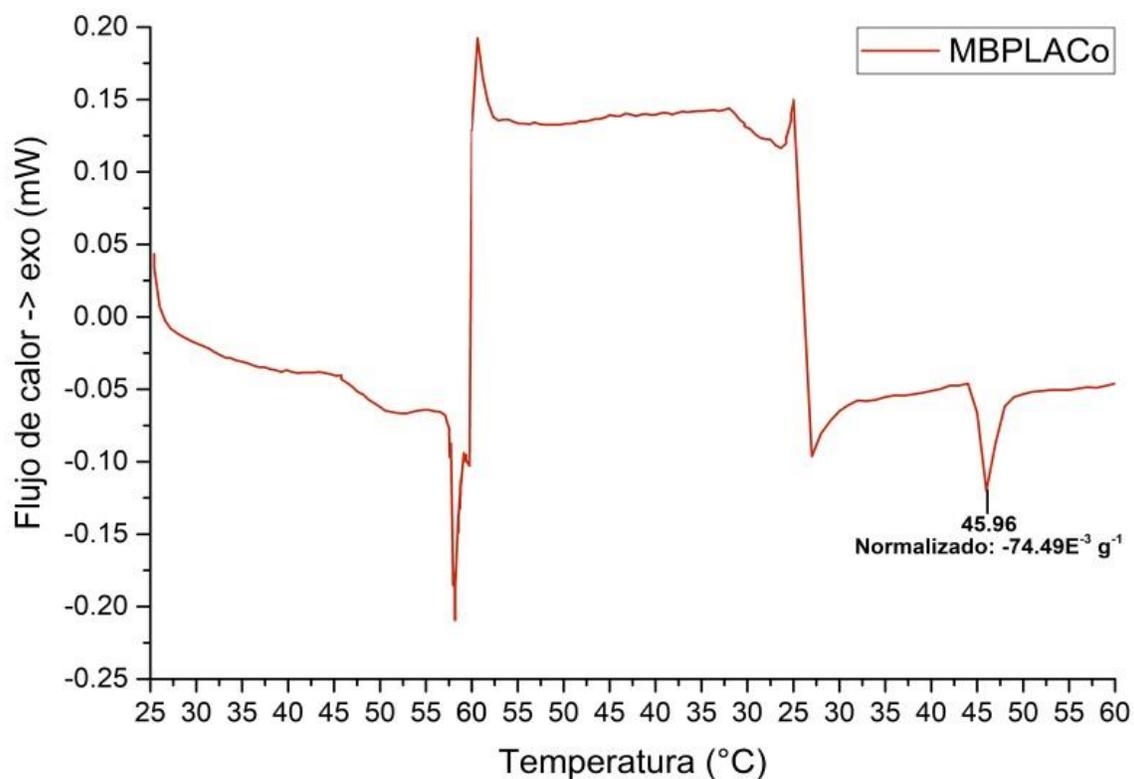


Figura 68. Calorimetría diferencial de barrido de MBPLACo. Tg: 45.96 °C

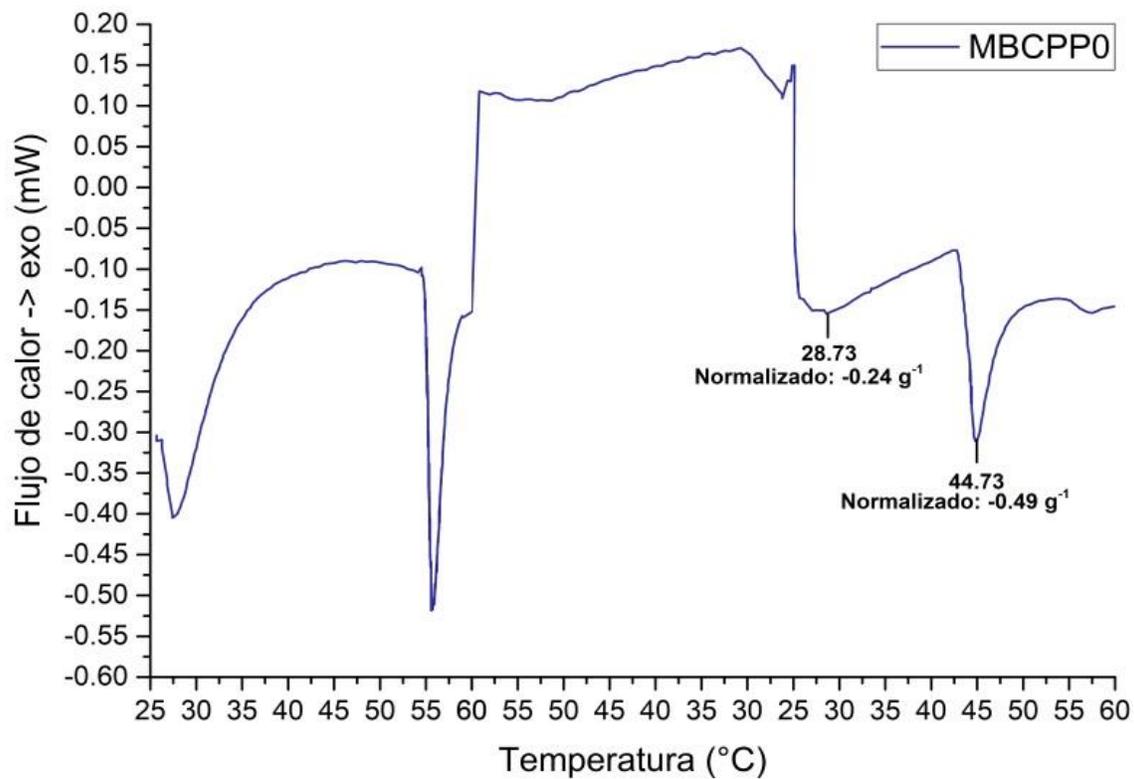


Figura 69. Calorimetría diferencial de barrido de MBCPP0. Tg₁: 28.73 °C, Tg₂:44.73 °C

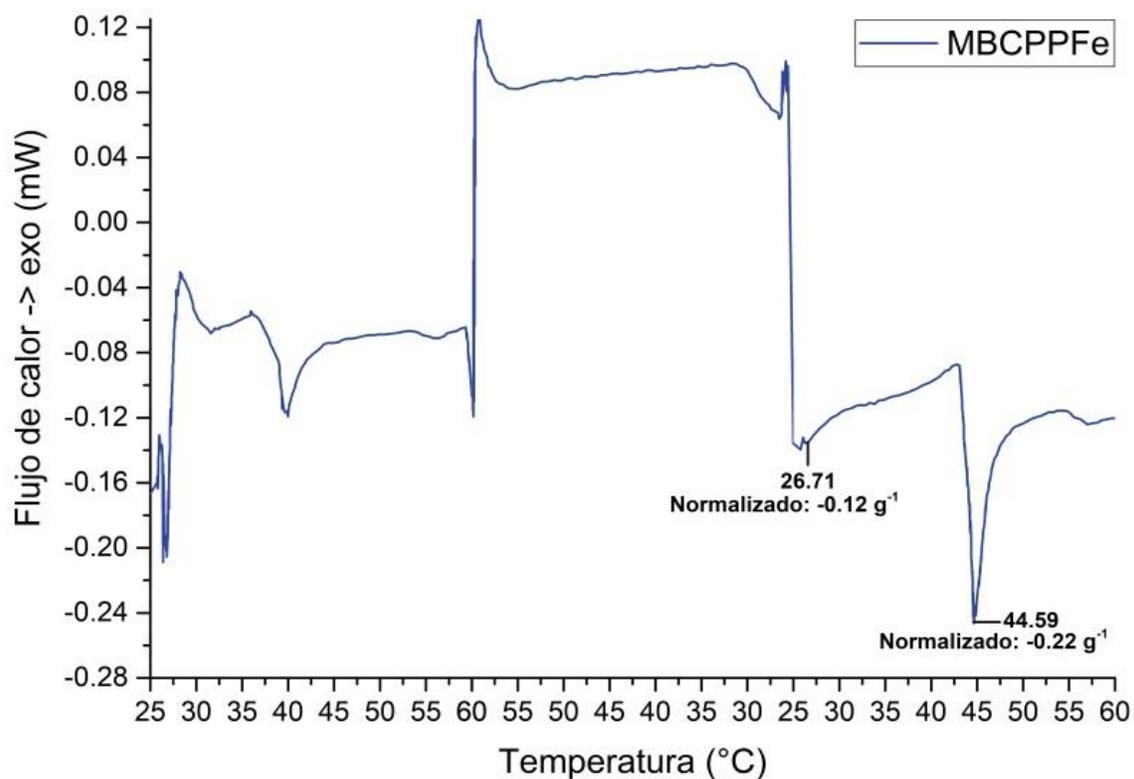


Figura 70. Calorimetría diferencial de barrido de MBCPPFe. T_{g1} : 26.71 °C, T_{g2} : 44.59 °C

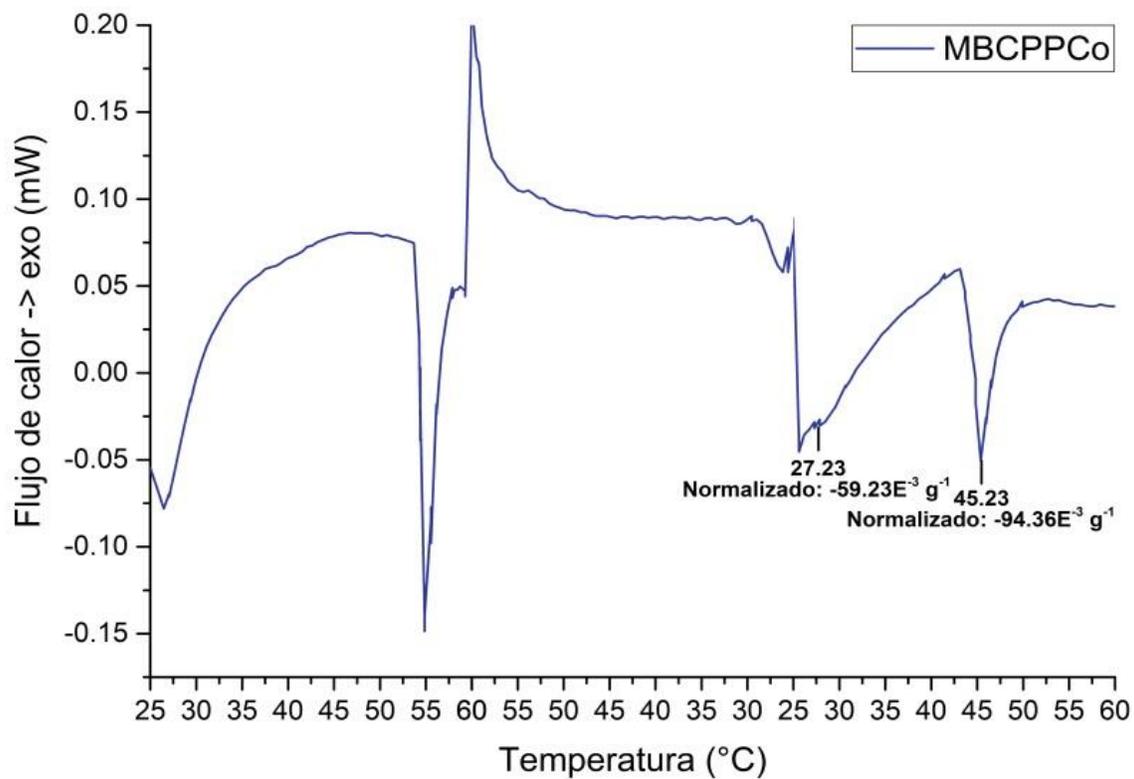


Figura 71. Calorimetría diferencial de barrido de MBCPPCo. T_{g1} : 27.23 °C, T_{g2} : 45.23 °C