



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA**

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS
TERMOSENSIBLES A PARTIR DEL
COPOLÍMERO QUITOSANA-*g*-POLI(*N*-VINIL
CAPROLACTAMA) CON POTENCIAL
APLICACIÓN EN ENCAPSULACIÓN DE
FÁRMACOS**

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERO EN MATERIALES

Presenta

Jorge Luis Loya Duarte

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

Agradecimientos

Al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora, a mis profesores por brindarme las herramientas necesarias para forjarme como Ingeniero en Materiales, y a mis compañeros de clase por el apoyo recibido para alcanzar diferentes metas.

Al Departamento de Investigación en Física, en especial al laboratorio de Biofísica médica, a cargo del Dr. Martín Rafael Pedroza Montero, por permitirme utilizar sus instalaciones para llevar a cabo mi investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento para realización de este trabajo, a partir del proyecto de problema nacionales 248982, y el proyecto de retención 2017/291229

Al Dr. Jesús Daniel Fernández Quiroz, por brindarme siempre su apoyo durante este año de investigación. Le agradezco por las enseñanzas y las diferentes técnicas aprendidas, las cuales fueron factores clave para la realización de este trabajo. De igual forma le agradezco por la amistad y los consejos brindados.

A Dios ya que gracias a él he logrado concluir mi carrera de manera satisfactoria.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Félix Enrique Loya Urbalejo y Marisela Duarte Rodríguez por brindarme siempre su apoyo y amor en mis diferentes metas y proyectos, siempre sacándome adelante y motivándome para no desalentarme en las diferentes pruebas que presenta la vida. A mis hermanos por siempre ver el lado positivo de las cosas y demostrarme su apoyo incondicional durante toda mi vida. A mis abuelos quienes fueron y seguirán siendo una gran figura de vida para mí, y a los cuales agradezco los diferentes ejemplos y enseñanzas brindadas durante los años. A mis abuelas por enseñarme los valores necesarios para crecer como buena persona y por brindarme todo ese cariño y amor incondicional. A toda mi familia, por estar siempre pendientes de mi en cada meta alcanzada, así como apoyarme y aconsejarme en diferentes etapas de mi vida.

De la misma manera quiero dedicar este trabajo a Priscila quien se ha convertido en una persona muy especial para mí, brindándome su apoyo, cariño y ayuda durante los últimos años.

A mis amigos, compañeros y a todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido para el logro de mis objetivos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Hipótesis	3
I.2. Objetivo General	3
I.3. Objetivos Específicos.....	4
II. ANTECEDENTES	5
II.1. Materiales Poliméricos	5
II.1.1. Polímeros Naturales	5
II.1.2. Polímeros Sintéticos.....	6
II.2. Copolímeros.....	8
II.3. Polímeros Inteligentes.....	9
II.4. Polímeros Termosensibles.....	10
II.5. Poli(N-vinil caprolactama)	10
II.6. Quitosana.....	11
II.7. Copolímero Quitosana-graft-poli(N-vinil caprolactama)	11
II.8. Métodos de Obtención de Nanopartículas Poliméricas.....	13
II.9. Aplicaciones Biomédicas de Nanopartículas Termosensibles	14
II.10. Técnicas de Caracterización	15
II.10.1. Espectroscopía FTIR.....	15
II.10.2. Espectroscopía Raman	16
II.10.3. Análisis Termogravimétrico	16
II.10.4. Dispersión de Luz Dinámica	17
II.10.5. Potencial- ζ	17
II.10.6. Turbidimetría	18
II.10.7. Microscopía Electrónica de Barrido	18

II.10.8. Microscopía de Fuerza Atómica	18
III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	20
III.1. Materiales	20
III.2. Preparación de los Materiales.....	20
III.2.1. Purificación de la Quitosana	20
III.2.2. Síntesis de PVCL-COOH	21
III.2.3. Síntesis del copolímero Cs-g-PVCL	21
III.2.4. Preparación de nanopartículas a partir de Cs-g-PVCL.....	22
III.2.5. Preparación de NP cargadas con doxorubicina	22
III.3. Caracterización de los materiales	23
III.3.1. Espectroscopía FTIR.....	23
III.3.2. Espectroscopía Raman	23
III.3.3. DLS	23
III.3.4. AFM.....	24
III.3.5. UV-vis.....	24
III.3.6. Análisis termogravimétrico (TGA).....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
IV.1. Preparación de materiales	26
IV.2. Formación de Nanopartículas a Partir de Cs-g-PVCL	26
IV.3. Caracterización morfológica.....	29
IV.4. Caracterización fisicoquímica	30
IV.5. Análisis Termogravimétrico.....	33
IV.6. Propiedades Térmicas de las Nanopartículas.....	35
IV.6.1. Análisis Turbidimétrico	35
IV.6.2. Análisis por Dispersión de Luz Dinámica	37
IV.7. Encapsulación de fármacos	38
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
V.1. Conclusiones	40
V.2. Recomendaciones	41
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de la trayectoria del proceso de polimerización desarrollada por (a) policondensación, y (b) poliadición.....	7
2	Arreglo estructural de los copolímeros (a) aleatorio; (b) alternado; (c) en bloque; y (d) de injerto.....	9
3	Estructura química de (a) poli(<i>N</i> -vinil caprolactama); y (b) quitosana.....	11
4	Estructura química del copolímero Cs- <i>g</i> -poli(<i>N</i> -vinil caprolactama).....	12
5	Métodos para preparación de nanopartículas de quitosana.	13
6	Proceso de formación de nanopartículas a partir de la gelificación ionotrópica entre la quitosana y el tripolifosfato sódico	14
7	Procedimiento experimental del proceso de formación de NP-Cs- <i>g</i> -PVLC por gelificación ionotrópica.....	27
8	Formación de nanopartículas a partir Cs- <i>g</i> -PVCL-18, mediante análisis visual: □ solución, ● nanopartículas, and Δ agregados.....	27
9	Distribución del tamaño hidrodinámico de nanopartículas obtenidas a partir de Cs- <i>g</i> -PVCL-18.....	29
10	Morfología de las nanopartículas obtenidas a partir de Cs- <i>g</i> -PV-18: (a) imagen AFM, (b) perfil de tamaños.....	30
11	(a) Espectro FTIR de la quitosana pura, la PVCL y el copolímero Cs- <i>g</i> -PVCL-18. (b) Espectro FTIR de Cs- <i>g</i> -PVCL-18 y de sus nanopartículas.....	31
12	Espectro Raman en la región de 1000-600 cm ⁻¹ de la quitosana pura, PVCL y copolímero Cs- <i>g</i> -PVCL-18.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
13	Análisis Termogravimétrico (a) y termogravimétrico diferencial (b) curvas de PVCL, quitosana y Cs-g-PVCL-18..	34
14	Absorbancia resultante a partir del copolímero Cs-g-PVCL-18 y sus nanopartículas en agua. La grafica interna muestra la dependencia del tamaño de cadena injerta con respecto a sus CPT. Condiciones: 1mg mL ⁻¹ , pH 6, Calentamiento: 1 °C min ⁻¹ , λ=450 nm.....	36
15	Efecto de la temperatura en (a) Dh); (b) PDI; y (c) Potencial-ζ de NP-Cs-g-PVCL-18 ● calentamiento, ○ enfriamiento. Concentración: 1 mg mL ⁻¹ en agua, pH 6, velocidad de calentamiento: 0.25 min ⁻¹	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Etapas de polimerización por radicales libres en cadena.....	8
II	Efecto de la concentración de TPP y copolímero en el tamaño hidrodinámico de NP-Cs- <i>g</i> -PVCL-18.....	28
III	Eventos térmicos de los materiales analizados por TGA...	35
IV	Características de nanopartículas de Cs- <i>g</i> -PVCL cargadas con DOX.....	39

RESUMEN

En los últimos años, la encapsulación de fármacos en nanopartículas poliméricas ha sido una alternativa que se ha estudiado intensamente para solventar la baja efectividad y daños colaterales que puede provocar su administración convencional. En particular, los polímeros capaces de reaccionar reversiblemente ante estímulos han sido de gran interés para aplicaciones en el área biomédica. Justamente, el copolímero termosensible quitosana-*g*-poli (*N*-vinil caprolactama) (Cs-*g*-PVCL) es un candidato para este tipo de aplicaciones, ya que en diversos reportes se ha manifestado su biocompatibilidad y no-toxicidad. Una de las principales características de este material es su solubilidad en agua a pH neutro, además de que sus propiedades termosensibles dependen de su arquitectura molecular.

El objetivo de este trabajo fue preparar nanopartículas a partir del copolímero quitosana-*g*-poli(*N*-vinil caprolactama), analizando sus condiciones de preparación y la influencia de la arquitectura molecular en sus propiedades termosensibles, así como evaluar su capacidad para encapsular fármacos antitumorales. Con lo cual, se encontró que la formación de nanopartículas a partir de Cs-*g*-PVCL depende fuertemente de la concentración de tripolifosfato de sodio y copolímero utilizadas. Además, la respuesta termosensible de las NP fue dependiente de la longitud de cadena de PVCL injertada. En general, se obtuvieron nanopartículas pseudo-esféricas con diámetro hidrodinámico alrededor de 150 nm y potencial- ζ de +35 mV; la eficiencia de encapsulación de doxorubicina fue en torno a 83%, y la capacidad de carga aproximada de 10%. Estas NP mostraron propiedades ventajosas para la aplicación potencial como sistemas de liberación controlada de fármacos antitumorales.

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la investigación relacionada con materiales inteligentes ha tenido un notable interés en diversas áreas de aplicación como biotecnología, textiles, alimentos, biomedicina entre otras. Estos materiales tienen la capacidad de responder de manera reversible ante algún estímulo externo como la temperatura, pH, campo eléctrico, campo magnético, fuerza iónica, entre otros (Aguilar and San Román, 2014).

En el área biomédica, por ejemplo, son de interés los materiales que pueden responder a estímulos de temperatura y pH en rangos fisiológicos, y que pueden ser una alternativa para la administración controlada de fármacos, la ingeniería de tejidos y otras aplicaciones en los campos biomédicos. Como se sabe, los tratamientos convencionales contra el cáncer carecen de especificidad hacia células tumorales malignas, con lo cual reducen su eficacia y además pueden producir efectos colaterales en células normales. Por esta razón, en los últimos años, la encapsulación de fármacos es una alternativa que se ha estudiado intensamente para solventar esta problemática. Numerosos sistemas de tamaño nanométrico que involucran la encapsulación de fármacos han sido evaluados como potenciales vehículos de liberación controlada y dirigida de moléculas bioactivas (Fitzpatrick et al., 2012).

En este sentido, algunos polímeros sintéticos y naturales han sido explorados como potenciales sistemas acarreadores de fármacos antitumorales. El interés de las nanopartículas poliméricas como acarreadores de moléculas bioactivas, radica en la capacidad de cruzar las barreras biológicas y de proteger los fármacos ante estímulos externos.

Uno de los biopolímeros que han estudiado mayormente es la quitosana, debido a que presenta propiedades biocompatibles, biodegradables y no tóxicas con el

organismo. Este polímero natural es susceptible a ser modificado químicamente y con lo cual desarrollar nuevos materiales o mejorar las propiedades de este. La quitosana cuenta con dos grupos capaces de cumplir con dicha labor, posee grupos hidroxilo primarios (C6) y secundarios (C3) y un grupo amino (C2) obtenido a partir del proceso de desacetilación (Peniche et al., 2003).

A menudo, se ha buscado la manera de combinar los polímeros naturales con polímeros sintéticos, para mejorar y/o combinar las propiedades de ambos y tener mayor aplicabilidad. En relación con el área biomédica, los polímeros termosensibles han despertado gran interés debido a su capacidad de responder de manera reversible a variaciones en la temperatura en rango fisiológico, produciendo una separación de fase en solución acuosa.

En este sentido, la poli(*N*-vinil caprolactama) (PVCL) es un polímero termosensible que se presenta como un gran candidato para ser aplicado en el área biomédica, esto debido a su biocompatibilidad. Lo característico de este material es el momento en el que ocurre el cambio de fase en solución acuosa, donde se puede apreciar alrededor de los 37 °C, la cual es una temperatura cercana a las condiciones fisiológicas. Dicha temperatura de transición puede ser modificada, alterando la longitud de cadena y la concentración de la solución, y de esta forma buscar obtener materiales para diferentes aplicaciones (Cortez-Lemus and Licea-Claverie, 2016; Medeiros et al., 2010).

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

Precisamente, se ha reportado la preparación de nanopartículas a partir de este copolímero termosensible, en los cuales se ha evidenciado su capacidad para aplicaciones de acarreamiento de diversos fármacos antitumorales (Rejinold et al., 2016, 2014; Sanoj Rejinold et al., 2015). Sin embargo, aún no se ha reportado el efecto que tiene la arquitectura molecular del copolímero en las propiedades termosensibles y fisicoquímicas de sus nanopartículas.

Con este fin, el presente trabajo comprende el desarrollo de un protocolo para la obtención de nanopartículas a partir del copolímero Cs-*g*-PVCL, variando las condiciones de preparación y analizando su efecto en las propiedades de las nanopartículas. Así mismo, se desea conocer la influencia de la longitud de la cadena de PVCL injertada en las propiedades termosensibles y fisicoquímicas de las nanopartículas.

I.1. Hipótesis

Las nanopartículas obtenidas a partir del copolímero Cs-*g*-PVCL exhibirán propiedades termosensibles dependientes de la longitud de cadena de PVCL injertada, cuya temperatura de transición de fase se encontrará en el rango fisiológico. Así mismo, el presente estudio va a permitir determinar el rango de preparación idóneo de las nanopartículas para su potencial aplicación como sistema de encapsulación de fármacos.

I.2. Objetivo General

Obtener nanopartículas a partir del copolímero quitosana-*graft*-poli(*N*-vinil caprolactama), analizando sus condiciones de preparación y la influencia de la arquitectura molecular en sus propiedades termosensibles, y evaluar su capacidad para encapsular fármacos antitumorales.

I.3. Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar el copolímero termosensible quitosana-g-PVCL de acuerdo con metodología establecida.
- Establecer las condiciones idóneas para la formación de nanopartículas termosensibles a partir del copolímero Cs-g-PVCL, y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas y termosensibles.
- Evaluar la capacidad de encapsulación de las nanopartículas, utilizando doxorrubicina como fármaco modelo.

II. ANTECEDENTES

II.1. Materiales Poliméricos

Los polímeros son macromoléculas conformadas por un gran número de especies moleculares denominadas monómeros, las cuales están unidas por medio de enlaces químicos de tipo covalente. Se pueden clasificar según su origen, en naturales o sintéticos, los cuales se describen a continuación (Bahadur and Sastry, N.V., 2006).

II.1.1. Polímeros Naturales

A través del proceso de evolución los organismos vivos han utilizado los polímeros naturales para muchas aplicaciones como una superficie de protección, membranas, almacenamiento de energía, sistema esquelético, y para muchos motivos más. Estas macromoléculas son producidas a partir de síntesis biológicas, y pueden clasificarse de manera general en polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y poliisoprenos (Bahadur & Sastry, 2005).

En este sentido, los polisacáridos cumplen con diversas funciones en los organismos vivos, como reservas energéticas y estructurales, entre otro tipo de funciones más especializadas. Estos biopolímeros están conformados por la unión de una gran cantidad de monosacáridos, a partir de enlaces glucosídicos. A diferencia de otros polímeros naturales, los polisacáridos tienen peso molecular y polidispersión de cadenas moleculares variable. En la actualidad, son usuales en industrias de fibras, textiles, biomédico, cosmético y farmacéutico. Estos materiales cuentan con propiedades biológicas de interés para estas áreas, y además tiene la capacidad de formar hidrogeles, micro y nanopartículas, lo cual es atractivo para la ingeniería y diseño de nuevos materiales empleados en ciencias de la salud (Goycoolea, Remuñón-López, & Alonso, 2009).

Uno de los polímeros naturales más abundante en el planeta es la quitina la cual brinda soporte estructural y cuenta con la capacidad de proteger a los organismos que lo contienen. Este polisacárido se somete a un proceso de desacetilación para eliminar sus grupos acetilo ($C=O-CH_3$) y dar lugar a la formación de grupos reactivos aminos (NH_2), y de esta manera obtener quitosana (Peniche et al., 2008, p. 25; Rinaudo, 2006).

II.1.2. Polímeros Sintéticos

De acuerdo con la definición sugerida por *Carothers* (1929), los polímeros pueden clasificarse de acuerdo con su composición o estructura como poliadicionados o policondensados. Los primeros se refieren a aquellos polímeros cuya composición química tiene la misma composición química que el monómero de partida; en el caso de los policondensados, la composición química de la unidad repetida carece de algunos átomos que están presentes en la unidad monomérica (Galego Fernández et al., 1987). Por su parte, existen dos principales mecanismos de polimerización: en cadena y por pasos. La polimerización en cadena es típica de los poliadicionados, mientras que los policondensados siguen reacciones que proceden por pasos discretos (Figura 1).

Para este trabajo, es de interés la polimerización por radicales libres en cadena, la cual consiste en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Tabla I). La etapa de iniciación comprende la generación de especies reactivas o radicales, a partir de la ruptura homolítica de un enlace químico o por transferencia de electrones. Estas especies reactivas (radicales libres) reaccionan con la molécula monomérica por apertura del enlace- π para formar un nuevo radical (monómero activado), lo que da pie a al crecimiento de la cadena polimérica. La terminación de esta reacción en cadena sucede por destrucción del centro reactivo, lo cual puede ocurrir por acoplamiento o desproporción.

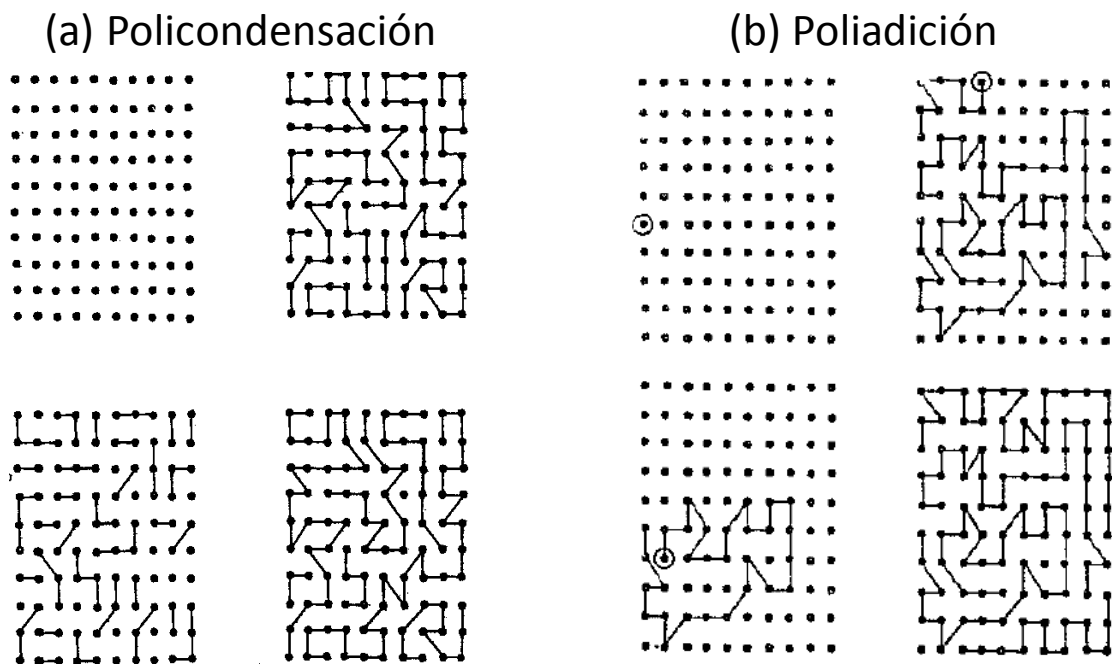


FIGURA 1. Esquema de la trayectoria del proceso de polimerización para (a) policondensación, y (b) poliadicción. Fuente: (Galego Fernández et al., 1987).

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

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

TABLA I. Etapas de polimerización por radicales libres en cadena.^a

Etapa	Características	Ecuaciones generales
Iniciación	<ul style="list-style-type: none"> ○ Un iniciador se divide homolíticamente ○ El par electrónico de un monómero vinílico de doble enlace C-C es susceptible a ser atacado fácilmente por un radical libre. 	$I \xrightarrow{K_d} 2R \cdot$ $R_d = k_d[I]$
	<ul style="list-style-type: none"> ○ La velocidad de iniciación controla la velocidad del proceso de polimerización de radicales libres. 	$R \cdot + M \xrightarrow{K_i} RM \cdot$ $R_i = 2k_i \cdot f \cdot [I]$
Propagación	<ul style="list-style-type: none"> ○ Es una reacción bimolecular producida por la adición sucesiva de monómeros al nuevo radical libre. 	$RM \cdot + M \xrightarrow{K_p} RMM \cdot$ $R_p = k_p [R - M \cdot][M]$
Terminación (transferencia de cadena)	<ul style="list-style-type: none"> ○ La reacción en cadena comienza a detenerse, debido a la inestabilidad de los radicales que han dejado de seguir produciendo radicales libres. ○ Dos cadenas en crecimiento se acoplan, estableciendo un nuevo enlace químico que unirá las respectivas cadenas. 	$RM \cdot + \cdot MR \xrightarrow{K_{tc}} RMMR$ $R_{tc} = 2k_{tc} [M \cdot - R]^2$

^aFuente: Fernández Quiroz D, 2009.

II.2. Copolímeros

Un copolímero es una macromolécula que contiene dos o más unidades monoméricas de distinta identidad química. De acuerdo con el arreglo estructural que presentan, los copolímeros se clasifican en aleatorios, alternados, por bloques y de injerto (Figura 2).

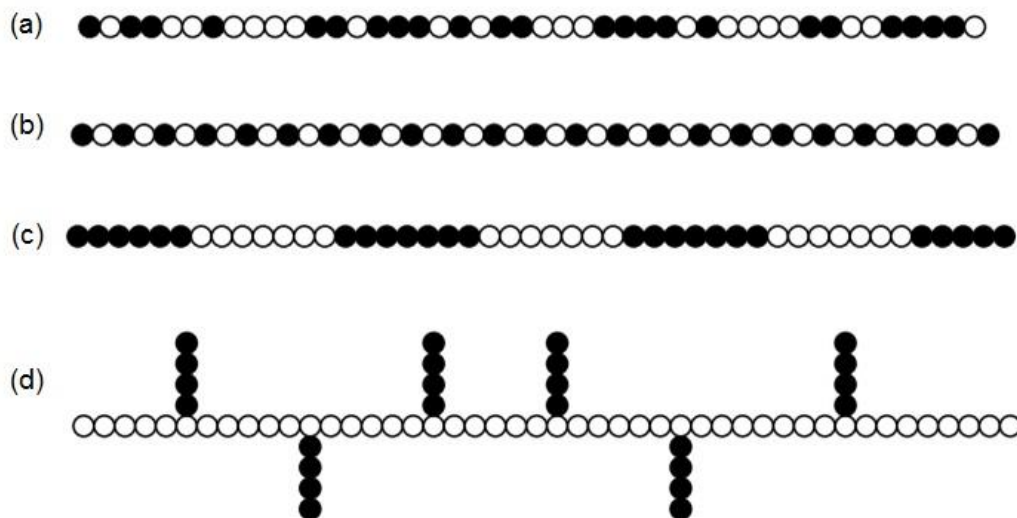


FIGURA 2. Arreglo estructural de los copolímeros (a) aleatorio; (b) alternado; (c) en bloque; y (d) de injerto.

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

II.3. Polímeros Inteligentes

Los polímeros inteligentes son aquellos que tienen la habilidad de responder reversiblemente ante cambios ligeros en el ambiente a su alrededor. Estímulos como la temperatura, pH, fuerza iónica, campos eléctricos o magnéticos y el estrés mecánico, pueden afectar el nivel de varias fuentes de energía y, por tanto, alterar las interacciones moleculares en puntos críticos de inicio. Los cambios se manifiestan de una o varias maneras, ya sea en su morfología, características de

su superficie, solubilidad, balance hidrofílico/hidrofóbico, entre otras (Aguilar and San Román, 2014; Kumar et al., 2007; Talelli et al., 2014).

II.4. Polímeros Termosensibles

Estos polímeros inteligentes responden reversiblemente ante estímulos de temperatura, y pueden clasificarse como *i)* memoria de forma, *ii)* materiales cristalinos líquidos, y *iii)* soluciones poliméricas sensibles. En particular, estos últimos son de interés en aplicaciones biomédicas, ya que pueden utilizarse en la encapsulación/liberación de fármacos. Estos polímeros experimentan una transición de fase reversible, en el estado de hidratación de sus cadenas, como consecuencia de cambio de temperatura. Estos materiales pueden presentar una temperatura de solución crítica baja (LCST), en la que la contribución de entalpía del agua unida por hidrógeno a la cadena del polímero es inferior a la ganancia entrópica del sistema como un todo y depende en gran medida de la capacidad de unión de hidrógeno de las unidades monoméricas constituyentes. La LCST de un polímero se puede modificar, mediante la variación del co-monómero hidrófobo o hidrófilo (Hoogenboom, 2014; Kumar et al., 2007).

II.5. Poli(*N*-vinil caprolactama)

La poli(*N*-vinil caprolactama) (PVCL) es un polímero termosensible que se presenta como un gran candidato para ser aplicado en el área biomédica, esto debido a su biocompatibilidad (Figura 3a). La PVCL es un polímero soluble en agua termosensible y biocompatible. Este polímero cuenta con una LCST entre 32 y 40 °C, la cual depende fuertemente del peso molecular y la concentración. En las proximidades de la transición, las macromoléculas de PVCL pueden adoptar una conformación específica más o menos densa que implica núcleos micelares hidrofóbicos. Estas propiedades resultan atractivas para aplicaciones biomédicas y ambientales (Cortez-Lemus and Licea-Claverie, 2016).

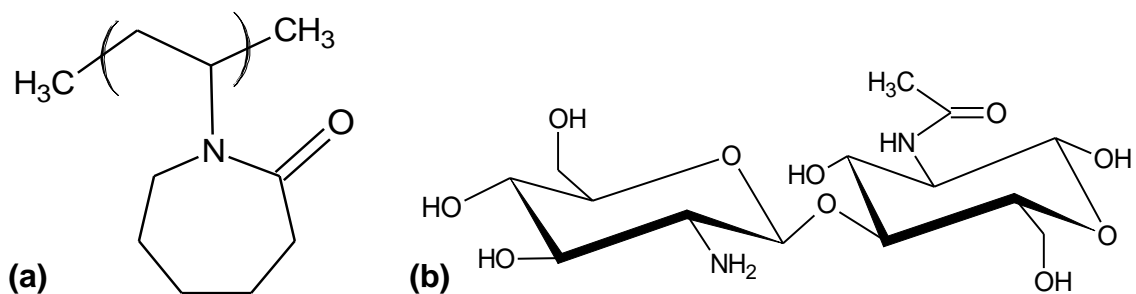


FIGURA 3. Estructura química de (a) poli(*N*-vinil caprolactama); y (b) quitosana.

II.6. Quitosana

La quitosana (Cs) es un amino-polisacárido lineal que se obtiene por la desacetilación de la quitina. Se compone principalmente de dos estructuras unitarias: 2-amino-2-desoxi-D-glucosa y N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa unidos por el enlace β (1→4) (Figura 3b). Su biodegradabilidad, biocompatibilidad y bajo nivel de toxicidad hacen de la quitosana un material interesante para aplicaciones biomédicas. La quitosana puede ser químicamente modificada por medio de su grupo amino que se encuentra en el C2 o por sus grupos hidroxilos primario en el C6 y secundario en el C3, y de esta manera obtener estructuras moleculares para diferentes aplicaciones (Peniche et al., 2008). Entre las modificaciones típicas de este biopolímero se encuentran la N-acilación, O-acilación, N-ftaloilación, tosilación y reacciones de injerto.

II.7. Copolímero Quitosana-*graft*-poli(*N*-vinil caprolactama)

La conjugación de quitosana con PVCL (Cs-*g*-PVCL) se realizó por primera vez en 2008 (Prabaharan et al., 2008) a partir del método *graft onto*. El proceso involucra dos pasos: *i*) la polimerización de *N*-vinilcaprolactama con terminación carboxilo; y *ii*) el injerto de la PVCL-COOH en la cadena de quitosana. Cs-*g*-PVCL (Figura 4) se obtiene a partir de la amidación entre los grupos terminales carboxilo de la PVCL, y los grupos aminos libres de la fracción desacetilada de la Cs. En

artículos pioneros la reacción se llevó a cabo con ácido acético como disolvente y el sistema EDC/NHS como agentes activadores de los grupos terminales -COOH (Prabaharan et al., 2008; Rejinold et al., 2016, 2014, 2011).

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

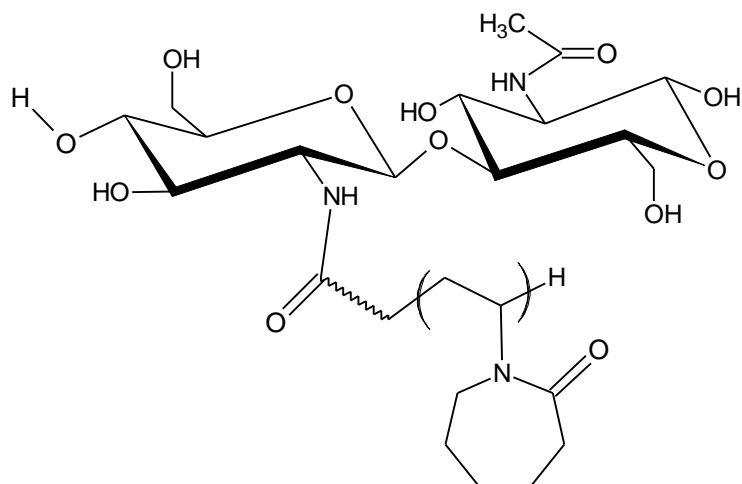


FIGURA 4. Estructura química del copolímero Cs-g-poli(*N*-vinil caprolactama)

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

Una de las características principales de este material, es su solubilidad en agua a temperatura por debajo de su LCST. Recordemos que la Cs solamente es soluble en medio ácido; este hecho es una evidencia de la adecuada conjugación de Cs/PVCL. Este material termosensible cuenta con propiedades favorables para encapsulación y entrega de fármacos (Argüelles-Monal et al., 2018).

II.8. Métodos de Obtención de Nanopartículas Poliméricas

Existen varios métodos para obtener nanopartículas (NP) a partir de quitosano y sus derivados. Algunos procesos incluyen el auto-ensamblaje o entrecruzamiento, de esta manera la estructura de las cadenas poliméricas se ordena en escala nanoscópica por interacciones intermoleculares o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. Los métodos para la formación de nanopartículas a partir de quitosano se presentan en la Figura 5.

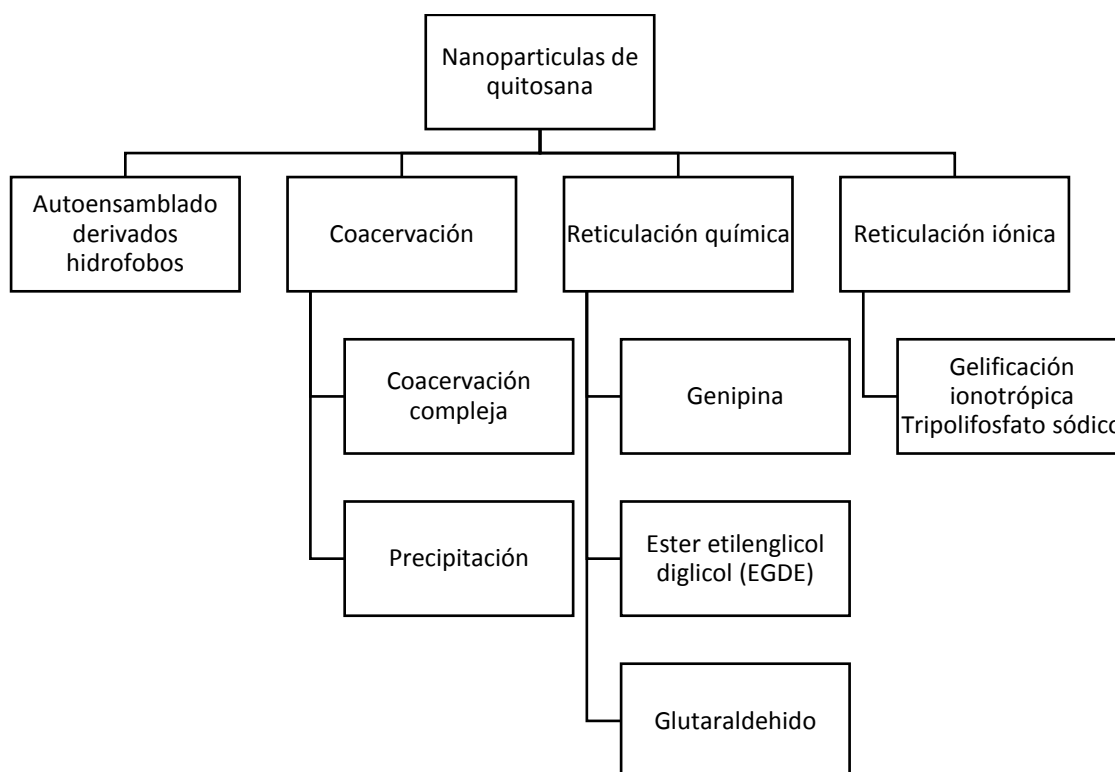


FIGURA 5. Métodos para preparación de nanopartículas a partir de quitosana.

Cabe destacar que, a pesar de la cantidad de agentes químicos existentes para la formación de nanopartículas a partir de quitosana, solo unos pocos cuentan con potencial real para el futuro desarrollo de aplicaciones farmacéuticas. Por ejemplo, la gelificación ionotrópica utilizando tripolifosfato de sodio es uno de los métodos más estudiados (Figura 6), la cual ocurre debido a las interacciones electroestáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa con los grupos aminos libres de la Cs. El tamaño de partícula obtenido por este método varía según el pH del medio y a la fuerza iónica, logrando obtener NP entre 100 y 350 nm y potencial- ζ en un rango de +30 y +50mV (Goycoolea et al., 2009; Paz et al., 2011).

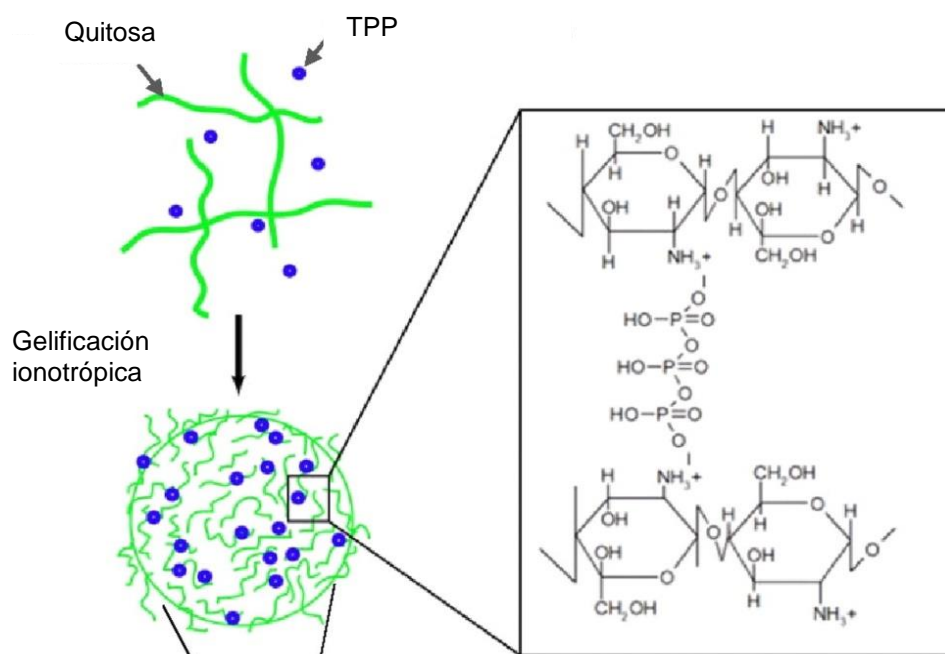


FIGURA 6. Proceso de formación de nanopartículas a partir de la gelificación ionotrópica entre la quitosana y el tripolifosfato sódico.

II.9. Aplicaciones Biomédicas de Nanopartículas Termosensibles

Estudios previos han reportado la preparación de NP a partir del copolímero Cs-g-PVCL y su capacidad como transportadoras de sustancias antitumorales, como

el 5-Fluracilo y la cúrcuma. Las NP presentaron temperatura de transición en el rango de 38-45°C en medio acuoso, con un diámetro promedio de 150 nm, el cual aumento hasta los 200 nm cuando se cargan con la sustancia antitumoral. Según estudios realizados de liberación de fármacos, citotoxicidad, pruebas *in vitro* con células y apoptosis, estas NP podrían resultar buenas candidatas para utilizarse como liberadoras de fármacos antitumorales (Rejinold et al., 2011).

En otro estudio, se reporta la liberación de fármaco en función del pH y de la temperatura del medio, en la cual se observó un incremento en la liberación al encontrarse por arriba de su LCST en condiciones acidas (Sanoj Rejinold et al., 2011). Por otro lado, NP-Cs-*g*-PVCL cargadas con cúrcuma se conjugaron con NP metálicas para evaluar su viabilidad como posible sistema de terapia contra el cáncer asistida por radiofrecuencia. De esta manera, al inducir el calentamiento asistido por radiofrecuencia, el sistema alcanzó la temperatura de transición de fase y el fármaco fue liberado. Estas NP presentaron tamaño alrededor de los 170 nm y un potencial Z de +18 mV (Rejinold et al., 2014).

II.10. Técnicas de Caracterización

En esta sección se describen los rasgos fundamentales de las técnicas de caracterización empleadas para el desarrollo de este trabajo de investigación.

II.10.1. Espectroscopía FTIR

Constituye una técnica espectroscópica de amplio uso basada en la excitación de los modos de vibración de las moléculas por absorción de la radiación infrarroja. Aunque esta comprende longitudes de onda (λ) entre visible y microondas, la región de infrarrojo medio entre 4000-300 cm^{-1} es la más empleada desde un punto de vista práctico. Durante la excitación es necesaria una vibración del momento dipolar de la molécula para que se produzca

absorción en el IR que puede asociarse a vibraciones de tensión (simétrica o asimétrica) o de deformación. El espectro infrarrojo de un compuesto proporciona gran información sobre sus propiedades internas como: composición química, impurezas, interacción entre sustituyentes, análisis de grupos funcionales, etc. Por lo que es de gran importancia en análisis cualitativo.

II.10.2. Espectroscopía Raman

La teoría de la dispersión Raman, demuestra que el fenómeno está relacionado con los cambios vibracionales cuantizados que se producen en la absorción infrarroja. Por tanto, la diferencia de longitud de onda entre la radiación visible incidente y dispersada corresponde a las longitudes de onda de la región del infrarrojo medio. Sin embargo, los tipos de grupos funcionales que identifican cada uno de los espectrómetros, permite que estas técnicas sean complementarias. Los espectros Raman se obtienen al irradiar una muestra con una potente fuente laser de radiación monocromática visible o infrarroja. Durante la irradiación, se registra el espectro de la radiación dispersada un cierto ángulo con un espectrómetro adecuado.

II.10.3. Análisis Termogravimétrico

La termogravimetría (TG) es la rama del análisis térmico que examina el cambio de masa de una muestra en función de la temperatura en el modo de exploración o en función del tiempo en el modo isotérmico. No todos los eventos térmicos provocan un cambio en la masa de la muestra (por ejemplo, fusión, cristalización o transición vítrea), pero hay algunas excepciones muy importantes que incluyen desorción, absorción, sublimación, vaporización, oxidación, reducción y descomposición. TG se utiliza para caracterizar la descomposición y la estabilidad térmica de los materiales bajo una variedad de condiciones y para examinar la cinética de los procesos fisicoquímicos que ocurren en la muestra.

Las características de cambio de masa de un material dependen fuertemente de las condiciones experimentales empleadas. Factores tales como masa de muestra, volumen y forma física, la forma y naturaleza del porta muestras, la naturaleza y presión de la atmósfera en la cámara de muestra y la velocidad de exploración tienen influencias importantes sobre las características de la curva TG registrada (Hatakeyama and Quinn, 1999).

II.10.4. Dispersión de Luz Dinámica

Esta técnica es de importancia básica y elemental para conocer el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas. El cual incluye cualquier capa de hidratación o solvente que rodea las partículas. También, permite conocer la distribución del tamaño de las partículas (índice de polidispersidad).

II.10.5. Potencial- ζ

Se mide a partir de mediciones de la movilidad electroforética de las partículas. Dicha movilidad se refiere a la velocidad que una partícula obtiene por el campo eléctrico utilizado. La velocidad y el campo eléctrico son datos correspondientes, por lo que si \vec{E} incrementa de igual forma lo hace \vec{v} . Por lo que la movilidad electroforética no dependerá del campo eléctrico.

$$\text{Ec. (1)} \quad \mu = \frac{\vec{v}}{\vec{E}} = \frac{q}{k}$$

La movilidad electroforética depende de la carga de la partícula y del coeficiente de fricción. Este último es afectado por la viscosidad del medio, el tamaño y la forma de la partícula. Mientras que la carga puede variar por el pH del buffer o por la fuerza iónica del medio.

$$\text{Ec. (2)} \quad |\vec{v}| = \frac{q \cdot |\vec{E}|}{k}$$

Tomando la ecuación anterior se establece que la velocidad de la partícula se verá afectada por la intensidad del campo eléctrico. La movilidad es una constante física para una sustancia si se mantiene sin modificaciones el medio (pH, fuerza iónica, viscosidad) y la temperatura.

II.10.6. Turbidimetría

A partir de mediciones por turbidimetría es posible determinar la temperatura incipiente de transición de fase en una disolución o en un sistema nanoparticulado. Este parámetro es de gran importancia en los materiales que presentan una respuesta reversible ante cambios de temperatura.

II.10.7. Microscopía Electrónica de Barrido

Esta técnica, proporciona información sobre la morfología superficial de los materiales aumenta. En un microscopio electrónico se barre mediante un rastreo programado la superficial del sólido con un haz de electrones de energía elevada y como consecuencia de ello se producen en la superficie diversas señales. En las micrografías, las áreas oscuras corresponden a zonas de baja reflectividad y las áreas blancas a zonas rugosas y relieves superficiales. Es importante recubrir metálicamente las muestras, para permitir la conductividad de la superficie, y así eliminar la estática y aumentar la reflectividad electrónica.

II.10.8. Microscopía de Fuerza Atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM) consta de cuatro partes principales: un cantilever con una punta afilada, generalmente hecha de silicio o nitruro de silicio, montado debajo; un escáner que maneja el cantilever; un diodo láser; y un detector sensible a la posición. A medida que la punta explora la superficie, las

interacciones entre la punta del AFM y las características de la superficie provocan el desplazamiento del cantilever.

Este desplazamiento se mide al detectar la deflexión de un rayo láser débil, generado por el diodo láser, que se refleja en la parte posterior del cantilever con el detector de fotodiodo. El microscopio de fuerza atómica crea imágenes topográficas de la superficie dibujando la desviación del rayo láser ya que su punta escanea la superficie. Este diseño mejoró en gran medida la sensibilidad del diseño del microscopio ya que el movimiento de la palanca se puede amplificar fácilmente por la trayectoria de la luz. Sin embargo, el punto más importante de este diseño para propósitos biomédicos es que hace posible la operación de microscopía de fuerza atómica en ambientes ambientales o en soluciones acuosas a temperatura ambiente o a 37 °C. Estas condiciones son necesarias para obtener imágenes de muestras biológicas nativas en sus entornos fisiológicos (Chang et al., 2012).

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen los pasos seguidos para el desarrollo del presente trabajo. Primeramente, se hace una breve descripción de los materiales de partida que se utilizaron. Posteriormente, se indica el método utilizado para la preparación de las nanopartículas a partir del copolímero Cs-*g*-PVCL, así como la información básica de la caracterización llevada a cabo.

III.1. Materiales

La mayoría de los reactivos y solventes utilizados para la realización de este trabajo fueron utilizados tal y como se recibieron, con excepción de del ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) (ACVA, recristalizado con etanol) y la quitosana. Para todos los experimentos se utilizó agua pura Tipo 2 con una conductancia $\leq 0.2\mu\text{S}/\text{cm}$.

III.2. Preparación de los Materiales

Este apartado comprende los detalles de la purificación de la quitosana, la síntesis del homopolímero y copolímeros, así como la metodología seguida para la formación de las nanopartículas. Así mismo, se describe las técnicas de caracterización utilizadas.

III.2.1. Purificación de la Quitosana

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

III.2.2. Síntesis de PVCL-COOH

La polimerización se realizó de acuerdo con el método reportado para obtener PVCL-COOH ($\bar{M}_n = 18$ kDa) por Fernández et al (2015). Brevemente, el monómero se disolvió en isopropanol (concentración 1 M), el oxígeno se eliminó mediante dos ciclos de congelación-vacío-descongelación ya que este puede afectar al material. Después se colocó en un baño de aceite previamente calentado a 60 °C, se agregó el ACVA (relación molar monómero/iniciador: 100/0.3) cuidadosamente para iniciar la reacción en cadena; la reacción permaneció bajo atmósfera de nitrógeno a 60 °C y agitación constante durante 4 h. Se retiró el matraz y se colocó en un baño de agua fría para detener la reacción. El producto se purificó por diálisis (membranas de 8 kDa) contra etanol (12 h), etanol-agua 1:1 (12 h), y agua pura (24 h). El material se congeló, liofilizó y almacenó en lugar seco.

III.2.3. Síntesis del copolímero Cs-g-PVCL

Se sintetizó el material por medio de la amidación de los grupos aminos en la quitosana con los grupos terminales -COOH de la PVCL, utilizando DMTMM como activador de sus grupos carboxílicos. Para esto, se preparó una disolución de Cs en HCl (0.5% en peso) a temperatura ambiente. Posteriormente, se adiciona la PVCL-18 al frasco de reacción junto con la DMTMM; la reacción de injerto permanece a temperatura ambiente, agitación constante durante 3 d. La conjugación se detiene por adición de acetona pura, lo cual ocasiona la precipitación del material. El producto se purificó con lavados con acetona y por extracción Soxhlet durante 48 h, para asegurar la eliminación de cadenas de PVCL no injertadas en la quitosana. El copolímero Cs-g-PVCL-18 se disolvió en agua, se congeló y liofilizó. Los copolímeros Cs-g-PVCL-04 y Cs-g-PVCL-26 puros (cadenas de PVLC injertadas con \bar{M}_n de 4 y 26 kDa, respectivamente) fueron donados por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

III.2.4. Preparación de nanopartículas a partir de Cs-g-PVCL

Para obtener las nanopartículas a partir del copolímero Cs-g-PVCL, se llevó a cabo el entrecruzamiento ionotrópico con tripolifosfato de sodio, de acuerdo con el método planteado por (Calvo et al., 1997) con ligeras modificaciones. Brevemente, se disuelve el copolímero en agua mili-Q y se coloca en agitación constante a una temperatura ambiente. Simultáneamente, se preparó una disolución de TPP en agua. Las nanopartículas de Cs-g-PVCL se formaron espontáneamente al adicionar gota a gota el TPP a la solución de copolímero, bajo agitación magnética moderada. Posteriormente, la muestra se sónico (procesador ultrasónico Q500, QSONICA) durante 5 minutos con una amplitud del 35%. Las NP-Cs-g-PVCL se centrifugaron para eliminar posibles residuos y se re-suspendieron en agua.

Para evaluar las condiciones idóneas para la formación de nanopartículas se siguió el método reportado por Calvo y col. (1997). Se evaluaron diferentes factores para el tamaño y distribución de las partículas, tales como concentración de TPP, concentración de copolímero y la relación copolímero/TPP. En todos los casos, la relación v/v de copolímero/TPP fue de 10 a 1. La apariencia de las nanopartículas se analizó visualmente para identificar la formación de nanopartículas, agregados y solución polimérica simple.

III.2.5. Preparación de NP cargadas con doxorubicina

La capacidad de las NP-Cs-g-PVCL como sistema de encapsulación de fármacos, se evaluó utilizando doxorubicina (DOX) como fármaco antitumoral modelo. En este caso, se preparó una disolución acuosa (pH 6) del copolímero con la cantidad deseada de doxorubicina (la relación p/p de copolímero/DOX fue de 5:1 y 10:1); posteriormente, se adicionó gota a gota la solución de TPP (concentraciones de 20 %, 25 % y 30 % p/p). La eficiencia de encapsulación (EE,

ecuación 3) y capacidad de carga del fármaco (LC, ecuación 4) en el sistema NP-Cs-g-PVCL, se determinaron de forma indirecta a partir de mediciones por espectrofotometría UV-vis a 480 nm. Para ello se preparó por triplicado, una curva de calibración usando un rango de concentraciones seriada entre 0.1 y 8×10^{-4} mg mL⁻¹.

$$\text{Ec. (3)} \quad EE(\%) = \frac{W_{dox\ Total} - W_{dox\ libre}}{W_{dox\ Total}} \times 100$$

$$\text{Ec. (4)} \quad LC(\%) = \frac{W_{dox\ Total} - W_{dox\ libre}}{W_{NP}} \times 100$$

III.3. Caracterización de los materiales

III.3.1. Espectroscopía FTIR

Los espectros FT-IR se efectuaron en modo de reflexión atenuada en un espectrómetro FT-IR Perkin Elmer Frontier. Las muestras se analizaron a temperatura ambiente por 16 escaneos a una resolución de 4 cm⁻¹.

III.3.2. Espectroscopía Raman

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

III.3.3. DLS

Las mediciones de DLS y ζ -potencial se realizaraon al mismo tiempo en un Möbiu ζ (Wyatt Technologies), bajo temperaturas controladas. El sistema Möbiu ζ utiliza un láser de modo longitudinal único de 45 mW que funciona a una longitud

de onda de 532 nm. Las mediciones se realizaron con un ángulo de dispersión de 163.5°. La muestra se sometió a un programa de calentamiento por temperatura de 0,25 °C min⁻¹. A cada temperatura, la muestra se mantuvo en equilibrio durante 40 min antes de las mediciones. Las soluciones PVCL y Cs-g-PVCL se filtraron 0,2 µm justo antes de las mediciones. Posteriormente, las muestras se cargaron en una cubeta de cuarzo de 45 µL con conjunto de electrodos. La recopilación y el análisis de datos se llevó a cabo con el software DYNAMICS 7.8.0.26 (Wyatt Technology Corporation).

III.3.4. AFM

Las características topográficas de las muestras NP-Cs-g-PVCL se siguieron por AFM. Las imágenes se obtuvieron utilizando un equipo de sistema XE-Bio (Park Systems Corp., Suwon, Corea) en modo de no contacto, utilizando un cantilever NCHR. La recopilación de datos y el análisis se procesaron utilizando el software XEI 1.8 (Park Systems Corp.).

III.3.5. UV-vis

La LCST se determinó utilizando un espectrofotómetro Shimadzu Biospec 1601 Double Beam UV-Vis equipado con un dispositivo controlador de temperatura termoeléctrico de célula CPS-240A (Shimadzu). El análisis se realizó midiendo la absorbancia del sistema (1 mg ml⁻¹) a 450 nm. La velocidad de calentamiento/enfriamiento fue a 1 °C min⁻¹, de 25 a 60 °C. En todos los casos, las soluciones tenían un pH de 6. La LCST se definió como la temperatura incipiente de la transición de fase del sistema durante la rampa de calentamiento de las soluciones acuosas de polímero. Se aplicaron ciclos de calentamiento y enfriamiento.

III.3.6. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se realizó en un TGA Pyrys (Perkin Elmer). Las muestras se analizaron en un intervalo de RT a 600 °C a 10 °C min⁻¹, en 10 mL de flujo de nitrógeno min⁻¹. La recolección de datos y el análisis se llevaron a cabo con el software de la serie Puris.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Preparación de materiales

La quitosana se sometió a un proceso de filtrado, principalmente para eliminar posibles residuos contenidos en el producto comercial original y de cierta forma homogeneizar el tamaño de las cadenas macromoleculares, de acuerdo con la metodología reportada por Fernández-Quiroz et al. (2015). El producto obtenido presentó coloración ligeramente amarillenta, y altamente poroso debido al procesamiento de secado por liofilizado.

Por otro lado, la PVCL-COOH se sintetizó a partir de polimerización radicalica controlada de acuerdo con la metodología reportada por Fernández-Quiroz *et al* (2015). Se utilizó ACVA como iniciador debido a que cuenta con grupos carboxílicos en su estructura lo que promoverá a que las cadenas posean estos grupos terminales, y de esta manera puedan reaccionar con los grupos amino libres de la quitosana. Al variar las concentraciones de iniciador, monómero, disolvente o realizando la reacción a distintas temperaturas se pueden obtener diferentes tamaños de cadenas poliméricas. De acuerdo con el método reportado, se obtuvo un polímero con un tamaño de cadena de 18 Mn (kDa), con aspecto altamente poroso de color blanco, debido al proceso de secado del material mostrando similitud a un algodón convencional.

IV.2. Formación de Nanopartículas a Partir de Cs-g-PVCL

En este apartado se describe la preparación de nanopartículas a partir del copolímero Cs-g-PVCL, obtenidas de forma espontánea en medio acuoso (pH 6) y a temperatura ambiente (Figura 7). Para investigar la factibilidad de la preparación de NP-Cs-g-PVCL-18 por gelificación ionotrópica, se siguió un protocolo similar al desarrollado por Calvo et al., (1997). Se realizaron una serie

de experimentos controlando la interacción del copolímero con el contraión TPP, para determinar los parámetros óptimos para la formación de las nanopartículas.

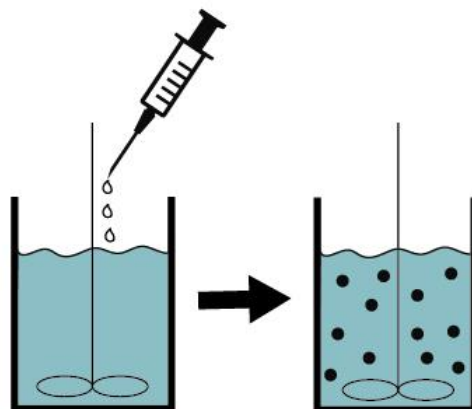


FIGURA 7. Procedimiento experimental del proceso de formación de NP-Cs-g-PVLC por gelificación ionotrópica.

La Figura 8 muestra los resultados del estudio de la preparación de las formulaciones copolímero/TPP, en las cuales se puede observar que la formación de NP es posible solamente bajo ciertas concentraciones de TPP y copolímero.

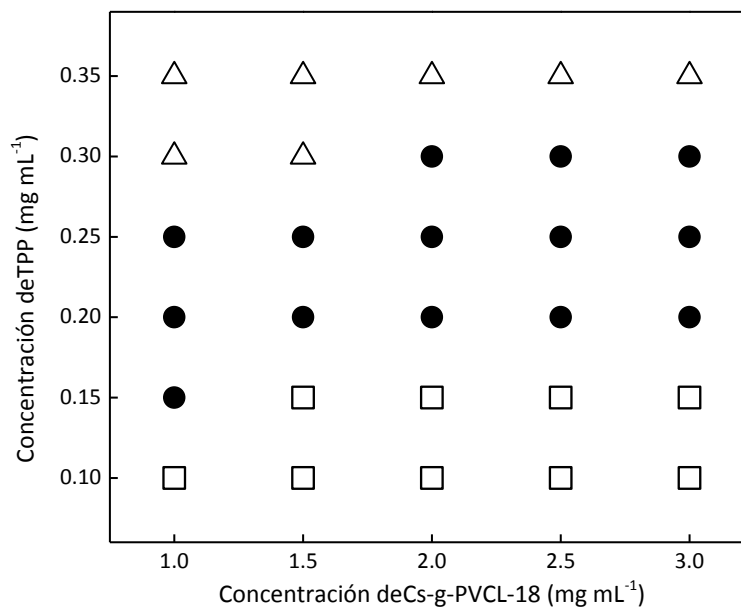


FIGURA 8. Formación de nanopartículas a partir Cs-g-PVCL-18, mediante análisis visual: □ solución, ● nanopartículas, and Δ agregados.

En el intervalo de concentración del copolímero de 1-3 mg mL⁻¹, la formación de NP se favorece preferentemente adicionando TPP en concentraciones de 0.2 a 0.25 mg mL⁻¹, aunque para algunas concentraciones de copolímero es posible la formación de NP utilizando 0.15 o 0.30 mg mL⁻¹. Por otro lado, los experimentos que permanecieron en solución fueron debido a que la cantidad de TPP adicionada no era suficiente para favorecer el entrecruzamiento de todo el copolímero; de igual manera, la adición excesiva de TPP a la disolución polimérica provocó que el material precipitara.

La Tabla II muestra los datos del tamaño hidrodinámico obtenidos por DLS para diferentes relaciones w/w de copolímero/TPP. Se observa claramente un incremento en el diámetro hidrodinámico (D_H) con el incremento en la concentración de copolímero utilizado y la concentración de TPP utilizado, obteniéndose NP de 156 a 308 nm.

TABLA II. Efecto de la concentración de TPP y copolímero en el tamaño hidrodinámico de NP-Cs-*g*-PVCL-18.^a

Concentración de copolímero (mg mL ⁻¹)	Concentración de TPP (mg mL ⁻¹)		
	0.2	0.25	0.30
1	156±3.4	165.5±3.2	175.7±1.9
2	202±2.3	218±2.1	237.2±2.05
3	239.4±2.1	282±3.1	308.2±3.3

^a En todos los casos, la relación v/v de copolímero/TPP fue de 10:1.

La Figura 9 muestra la distribución de tamaño hidrodinámico del sistema NP-Cs-*g*-PVCL-18, preparadas a partir de la relación p/p de copolímero/TPP de 1/0.2. El gráfico obtenido por DLS muestra una curva monomodal cuyo D_H se encuentra alrededor de 156 nm, con índice de polidispersidad de 0.20. Estas NP presentaron un potencial- ζ de +35 mV. Este valor favorece que las nanopartículas

se mantengan de forma coloidal y estables en suspensión, evitando la formación de agregados. De acuerdo con Azouri et al., (2006), un sistema coloidal suspendido que presente un potencial- ζ por arriba de +25 mV o por debajo de -25 mV se considera un sistema estable.

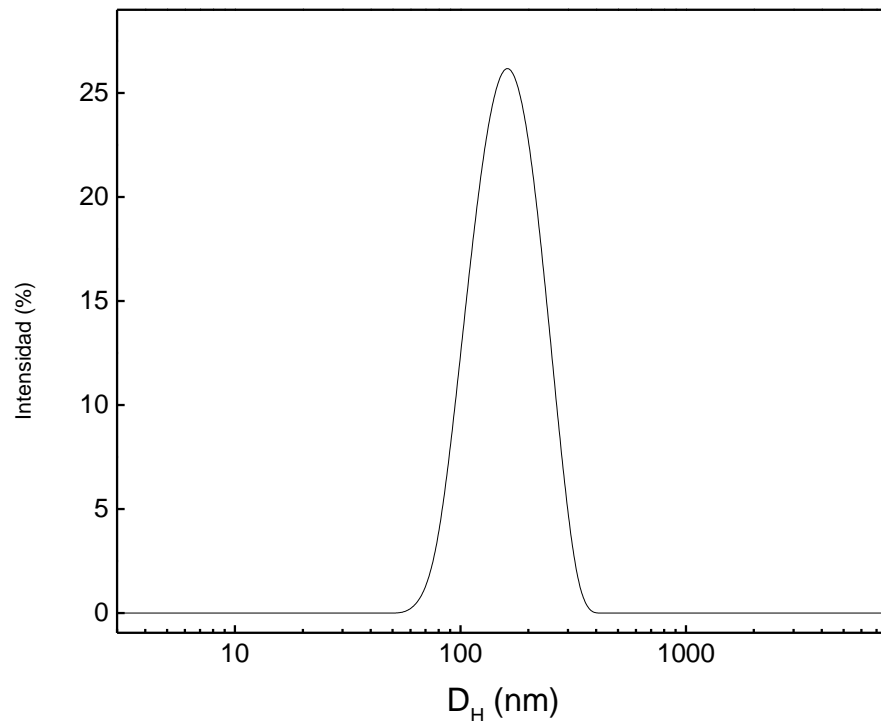


FIGURA 9. Distribución del tamaño hidrodinámico de nanopartículas obtenidas a partir de Cs-*g*-PVCL-18

IV.3. Caracterización morfológica

La morfología de la NP se analizó mediante AFM. La Figura 10a permite apreciar que las NP exhiben una morfología pseudo-esférica, además de que no se observa agregación de las NP. De acuerdo con el análisis del perfil de tamaño de las NP (escaneo de región de la imagen obtenida por AFM), se observa un diámetro alrededor de 115 nm y altura entre 2.8-6.5 nm (Figura 10b). Este resultado es ligeramente inferior a los valores obtenidos por DLS, debido probablemente al proceso de secado aplicado.

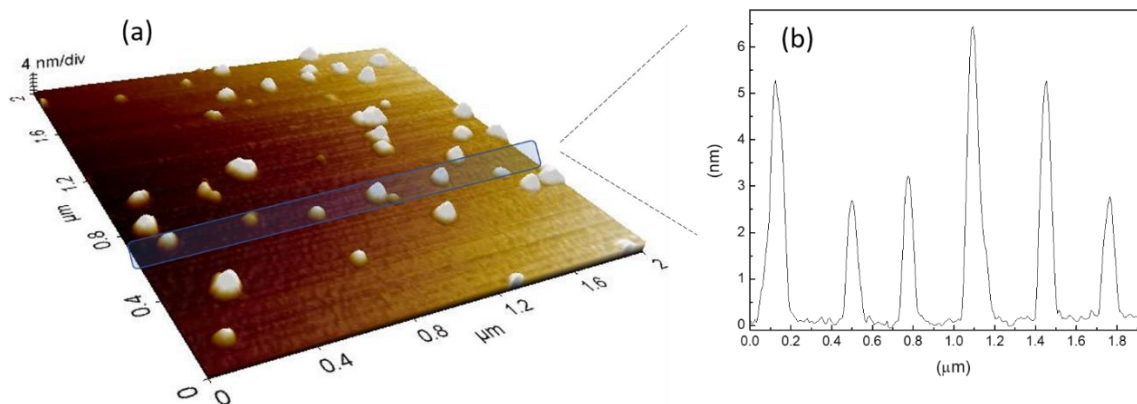


FIGURA 10. Morfología de las nanopartículas obtenidas a partir de Cs-g-PV-18: (a) imagen AFM, (b) perfil de tamaños.

IV.4. Caracterización fisicoquímica

La formación de la amidación entre la PVCL y la quitosana se confirmó mediante el análisis de espectroscopia FTIR y RAMAN. En la Figura 11 (a) se puede observar el espectro FTIR de la quitosana pura, la PVCL y el copolímero obtenido. La quitosana presenta bandas en 1657cm^{-1} la cual se debe a su amida (amida I, por vibración de estiramiento de $\text{C}=\text{O}$), 1584cm^{-1} por su amida II (amida II, debido a la vibración por deformación de $\text{N}-\text{H}$), 1155cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$, vibración de fuerza asimétrica). Por otro lado, la PVCL presenta picos característicos en 1618cm^{-1} (banda amida I), 1440cm^{-1} (banda deformacional $\text{C}-\text{H}$), 841cm^{-1} (vibración por estiramiento de $\text{C}-\text{N}$) y 715cm^{-1} (vibración de deformación $\text{N}-\text{H}$ fuera del plano). Las bandas presentes en los espectros de la Cs y la PVCL se pueden apreciar de igual manera, en el espectro del copolímero CS-g-PVCL. Se pueden apreciar corrimientos de banda en el espectro del copolímero de la amida I y II situadas en 1619cm^{-1} y 1515cm^{-1} de la Cs, esto confirma la amidación de los grupos carboxilos en la PVCL con los grupos amina en la Cs.

En la Figura 11 (b) se muestra el espectro FTIR del copolímero Cs-g-PVCL-18 y el de las nanopartículas obtenidas. En el espectro de las NPs se pueden

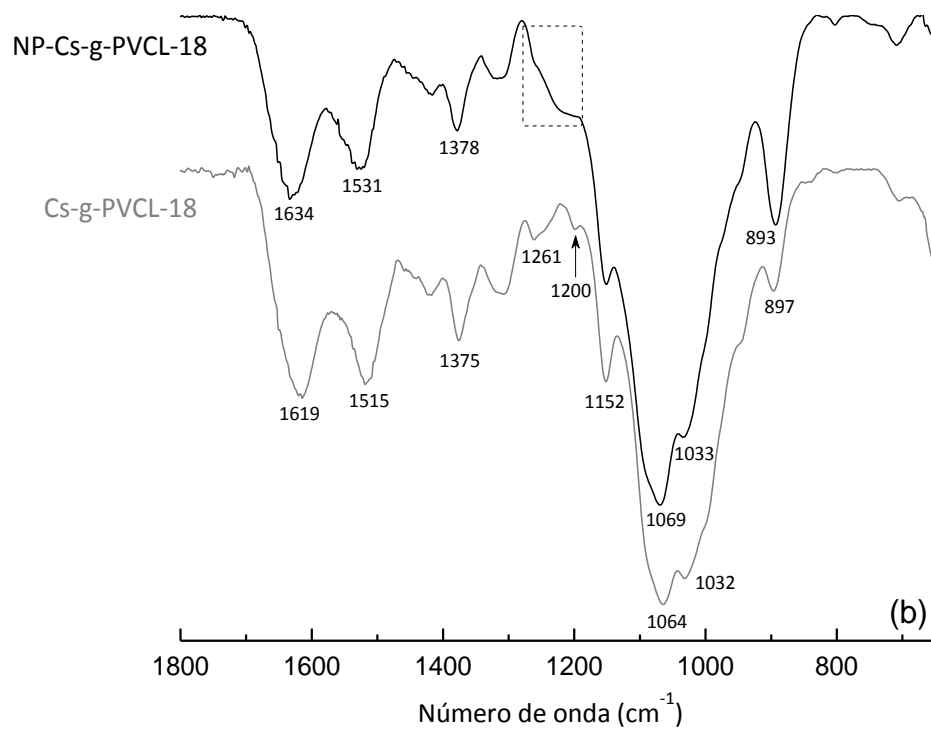
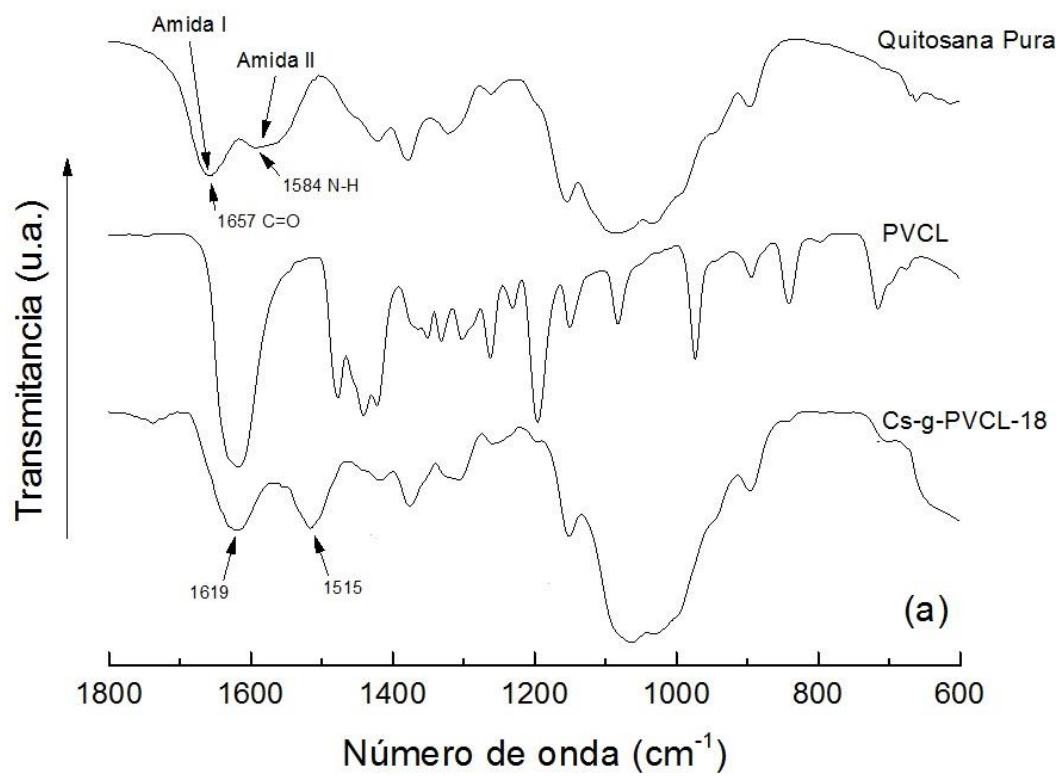


FIGURA 11. (a) Espectro FTIR de la quitosana pura, la PVCL y el copolímero Cs-g-PVCL-18. (b) Espectro FTIR de Cs-g-PVCL-18 y de sus nanopartículas.

observar las bandas características de la Cs: amida I y amida II en 1634 cm^{-1} y 1531 cm^{-1} respectivamente. Este corrimiento de banda, se debe a la interacción iónica entre los grupos amino cargados positivamente y los grupos del TPP cargados negativamente (Fernández-Gutiérrez, 2015). De acuerdo con Socrates (2001), la región entre $1260\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ se debe a la vibración por estiramiento del grupo $\text{P}=\text{O}$. En 893 cm^{-1} aparecen las vibraciones de estiramiento de grupos $\text{P}-\text{O}-\text{P}$ (Socrates, 2001).

Se analizaron las muestras por Raman (Figura 12) para corroborar que la quitosana fue injertada con la PVCL adecuadamente. La PVCL muestra bandas características a 848 cm^{-1} (estiramiento de C-N), en 807 cm^{-1} (vibración por N-H) y 705 cm^{-1} (vibración de deformación N-H fuera del plano). Estas mismas bandas aparecen en el espectro Raman del copolímero de injerto.

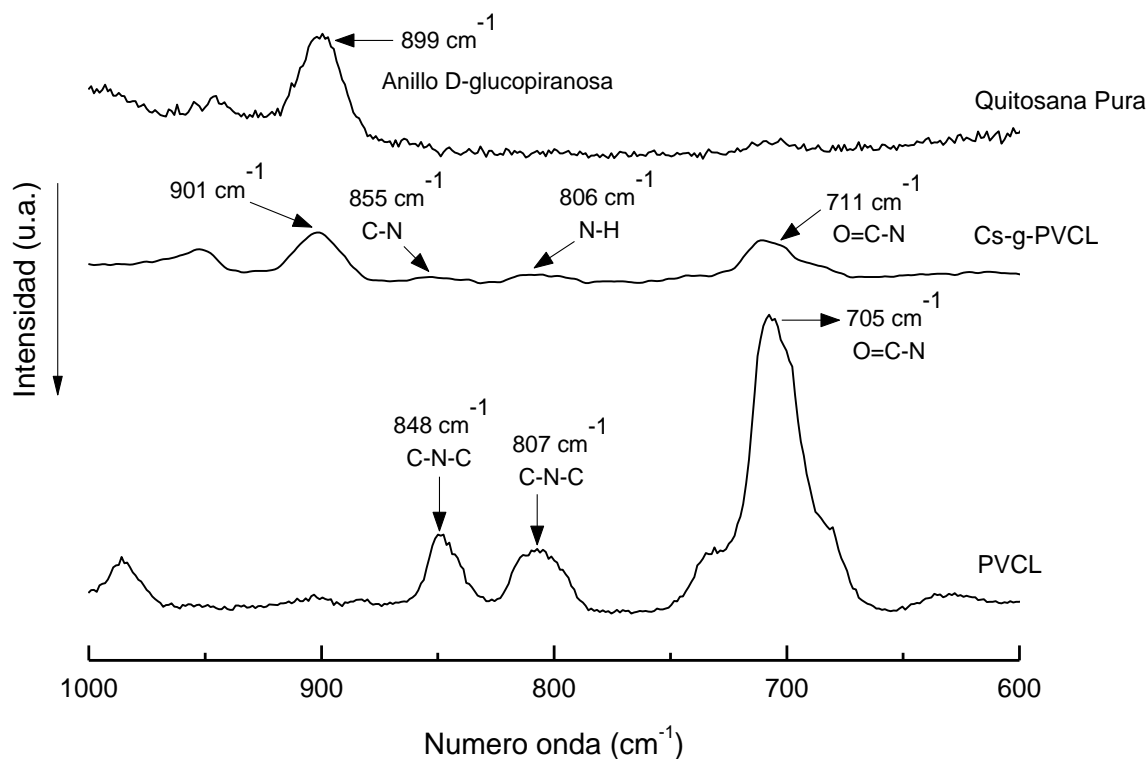


FIGURA 12. Espectro Raman en la región de $1000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ de la quitosana pura, PVCL y copolímero Cs-g-PVCL-18.

Por otro lado, los espectros de la quitosana y del copolímero de injerto presentan una banda alrededor de 900 cm^{-1} debido al estiramiento del anillo de D-glucopiranososa. Por lo que estos espectros Raman confirman la formación de enlaces amida.

IV.5. Análisis Termogravimétrico

Las curvas termogravimétricas (TG) y termogravimétricas diferenciales (DTG) para Cs, PVCL y Cs-g-PVCL se muestran en la Figura 13. Se puede observar en la curva de la quitosana principalmente, una pérdida de peso alrededor de los $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, este se debe a la humedad con la que contaba el material. Seguido de una pérdida de peso mayor en un rango de los $300\text{-}330\text{ }^{\circ}\text{C}$, esto se debe a la deshidratación de los anillos sacáridos y la despolimerización y descomposición de la quitosana.

La PVCL presenta una mayor resistencia a la temperatura en comparación con la Cs. Este polímero presenta su pérdida máxima de peso en un rango de $385\text{-}450\text{ }^{\circ}\text{C}$, esto se debe a su despolimerización térmica. En el caso del copolímero se observan tres pérdidas de peso. La primera al igual que en la Cs, se debe a la pérdida humedad alrededor de los $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. El segundo cambio es atribuido a la desintegración de los restos desacetilados de la quitosana, cabe destacar que, en este caso, la degradación máxima ocurrió alrededor de los $230\text{-}250\text{ }^{\circ}\text{C}$, más de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ de diferencia en comparación con la Cs pura.

Según lo descrito por Fernández-Quiroz et al., (2015) esto demuestra que la PVCL fue injertada en la estructura de la quitosana correctamente, ya que una disminución en la estabilidad térmica de la Cs se presenta cuando esta ha sido modificada químicamente, esto debido a la pérdida de enlaces hidrogeno en su cadena por el proceso de injertación. Por último, la tercera pérdida de peso del copolímero presentada en $400\text{-}450\text{ }^{\circ}\text{C}$, se debe a la desintegración de las

cadena de PVCL injertada en la Cs. El peso perdido en este último paso depende de la longitud de cadena de PVCL injertada.

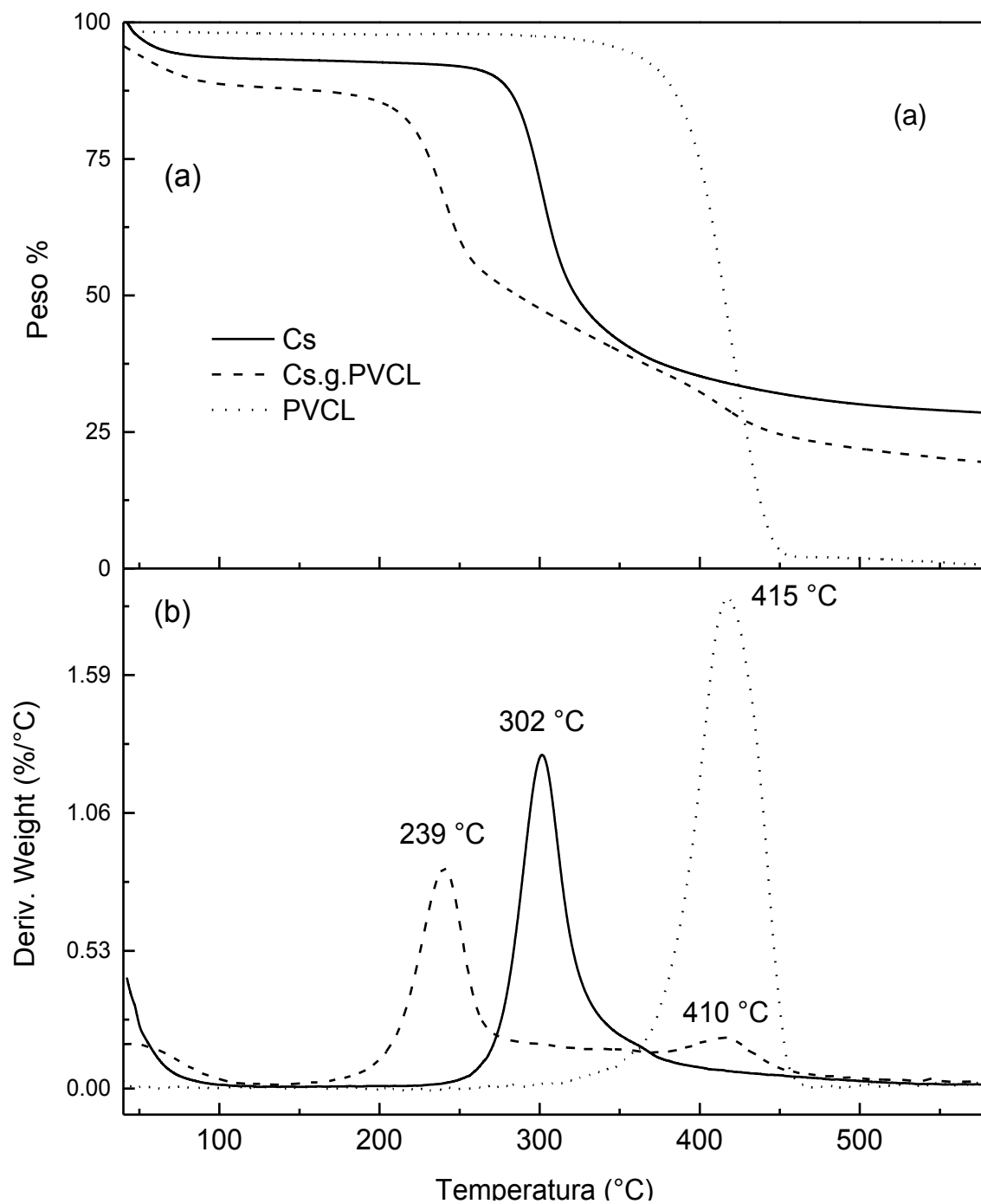


FIGURA 13. Análisis Termogravimétrico (a) y termogravimétrico diferencial (b) curvas de PVCL, quitosana y Cs-g-PVCL-18.

La Tabla III muestra un resumen de los principales eventos térmicos de la PVCL, la Cs y el copolímero Cs-g-PVCL.

TABLA III. Eventos térmicos de los materiales analizados por TGA.

Muestra	TGA (°C)		DTG (°C)	Residuo a 600 °C
	T _{5%} ^a	T _{50%} ^a	T _{max} ^b	(%)
Quitosa	64	323	302	28
PVCL	352	415	415	0
Cs-g-PVCL	44	286	239	18

^aT_{5%} y T_{50%} son las temperaturas a las que el material perdió dicho porcentaje en peso.

^bT_{max} es la temperatura a la cual ocurrió a mayor velocidad el proceso de descomposición.

IV.6. Propiedades Térmicas de las Nanopartículas

Para conocer el efecto de la longitud de cadena de PVCL injertada en las propiedades termosensibles de las NP, se llevaron a cabo experimentos por turbidimetría y por DLS.

IV.6.1. Análisis Turbidimétrico

La sensibilidad ante estímulos de temperatura fue analizada por turbidimetría. Este método nos permite determinar el punto de nueve (CPT), la cual nos indica la temperatura a la cual el material comienza a cambiar de fase. La Figura 14 muestra el calentamiento del copolímero CS-g-PVCL-18 y de sus nanopartículas con una concentración de 1 mg mL⁻¹ en H₂O con un pH 6. La temperatura de transición de fase resultante para el copolímero en solución fue de 38.2 °C, mientras que las nanopartículas presentaron una CPT en 39.6 °C. Los resultados fueron similares para todos los sistemas de nanopartículas obtenidos.

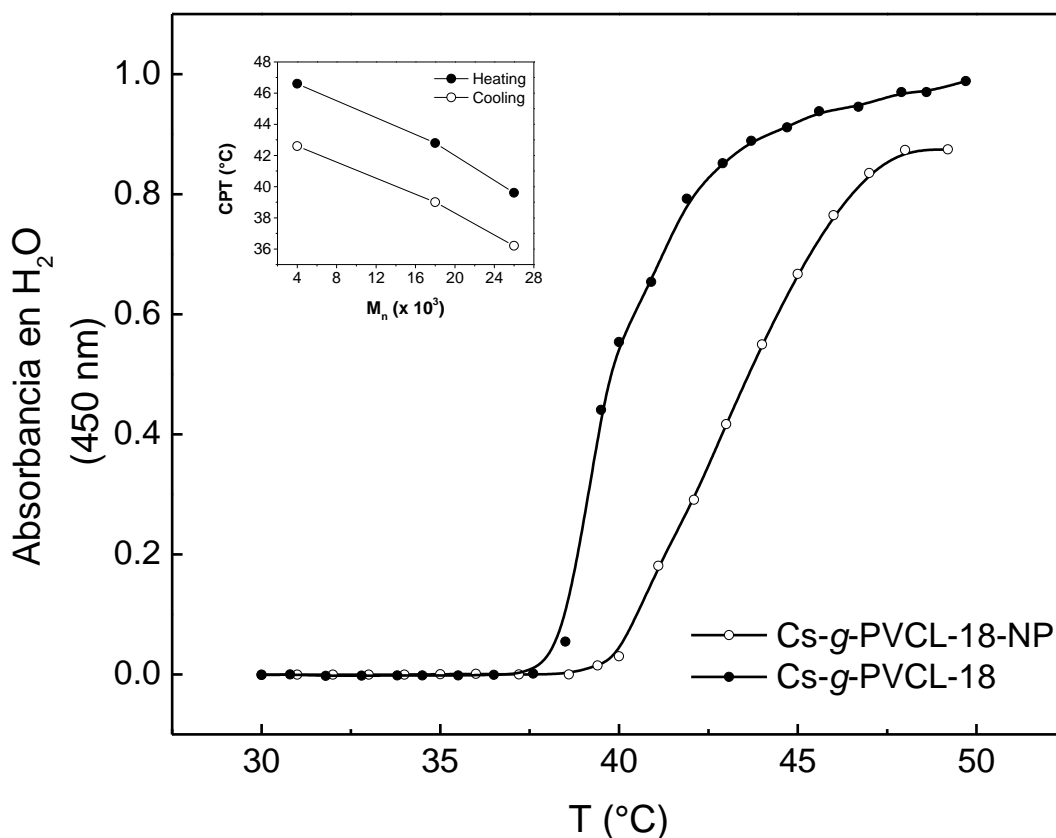


FIGURA 14. Absorbancia resultante a partir del copolímero Cs-g-PVCL-18 y sus nanopartículas en agua. La grafica interna muestra la dependencia del tamaño de cadena injerta con respecto a sus CPT. Condiciones: 1 mg mL^{-1} , pH 6, Calentamiento: $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, $\lambda=450\text{ nm}$.

El efecto reversible se confirmó por medio de ciclos de calentamiento-enfriamiento en las muestras. Las muestras analizadas presentaron una CPT similar al momento del calentamiento y enfriamiento, mostrando valores muy cercanos entre cada una (Figura 12). Este comportamiento se asocia con un proceso de histéresis, el cual se ve beneficiado por la contracción de las mismas cadenas en el proceso de deshidratación. Para las nanopartículas, la histéresis se modera principalmente debido al número limitado de cambios conformacionales debido a las restricciones topológicas de las cadenas laterales de PVCL.

IV.6.2. Análisis por Dispersión de Luz Dinámica

De igual forma se analizó la termo sensibilidad de las nanopartículas por medio de DLS. La figura (15) muestra el efecto de la temperatura en el D_H , el PDI y el potencial- ζ para NP-Cs-g-PVCL-18.

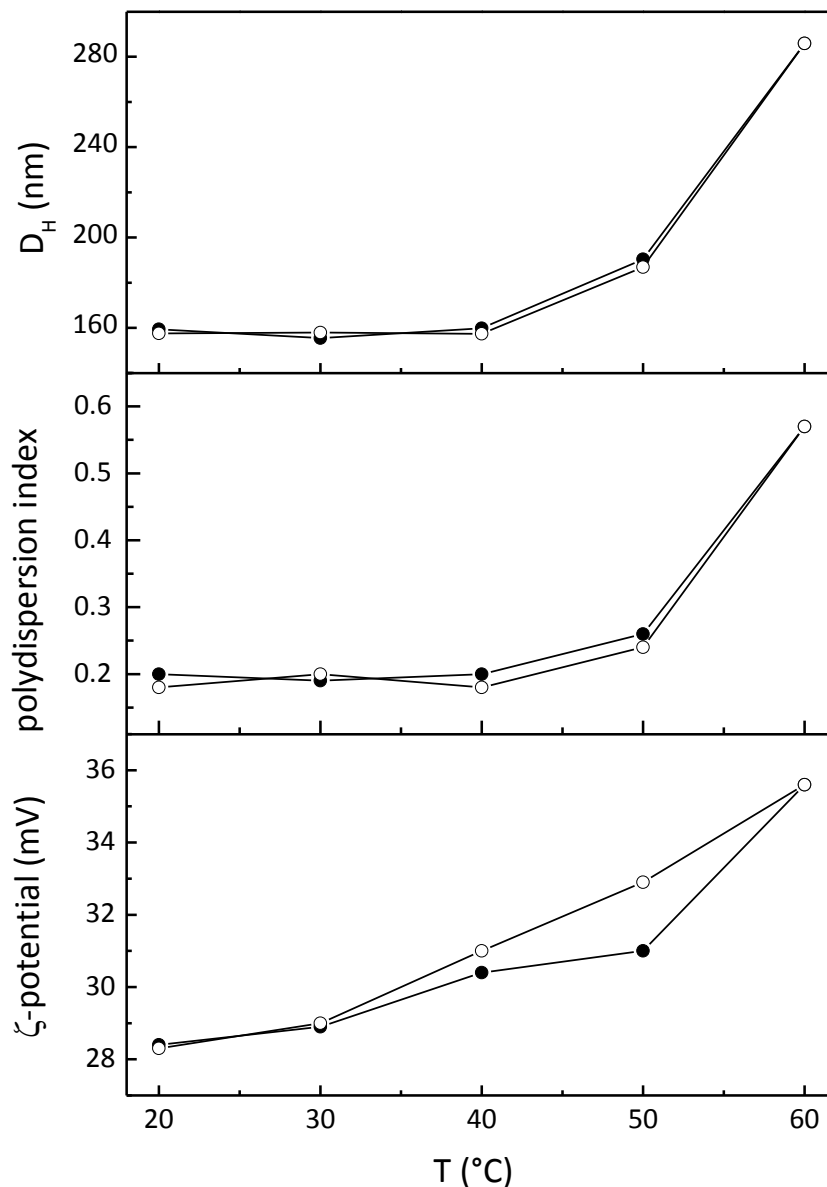


FIGURA 15. Efecto de la temperatura en (a) D_H ; (b) PDI; y (c) Potencial- ζ de NP-Cs-g-PVCL-18 ● calentamiento, ○ enfriamiento. Concentración: 1 mg mL^{-1} en agua, pH 6, velocidad de calentamiento: 0.25 min^{-1} .

Se puede observar que por debajo de su LCST el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas es alrededor de los 160nm, sin embargo, al aumentar la temperatura a 60 °C pueden alcanzar un tamaño de 280 nm. Este cambio está asociado a la transición de fase de este copolímero termosensible, la cual se debe a la asociación hidrofóbica de las NP. Por otro lado, el potencial-Z se encuentra alrededor de los +28 mV, naturalmente este parámetro es positivo debido a la presencia de grupos aminos de la quitosana. Estas nanopartículas cargadas positivamente favorecen la atracción de las células vivas cargadas negativamente. Estudios previos de esta copolímero en solución, han sugerido que la razón de estos cambios de tamaño en las nanopartículas están correlacionados a una transición altamente cooperativa en donde ocurre un cambio en el equilibrio hidrofóbico/hidrofílico de las macromoléculas injertadas.(Fernández-Quiroz et al., 2016)

IV.7. Encapsulación de fármacos

Se encapsuló el fármaco Doxorubicina variando la relación de copolímero:fármaco y copolímero:TPP, para evaluar la influencia de estos parámetros en la eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (LC). En la Tabla IV se pueden observar los resultados obtenidos. Evidentemente los valores de EE y LC aumentaron con la concentración inicial de doxorubicina para todas las muestras. Por otro lado, se puede decir que al aumentar la concentración inicial de TPP la EE y la LC aumentan en ambos casos, alcanzando valores hasta de 85 % y 9.1 %, respectivamente. Estos valores son ligeramente más altos que los adquiridos por otros sistemas similares de nanopartículas. (Sanoj Rejinold et al., 2015; Soares et al., 2016).

De acuerdo con estos resultados es posible establecer que el sistema NP-Cs-g-PVCL tiene la habilidad para encapsulación de fármacos antitumorales, conservando sus propiedades fisicoquímicas.

TABLA IV. Características de nanopartículas de Cs-g-PVCL-18 cargadas con DOX

Muestra	Proporción de Masa Copolímero:DOX	[TPP]	EE (%)	LC (%)
DOX-01	5:1	20%	65	1.6
DOX-02	5:1	25%	81	1.8
DOX-03	5:1	30%	85	9.1
DOX-04	10:1	20%	20	0.5
DOX-05	10:1	25%	42	0.8
DOX-06	10:1	30%	83	8.6

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1. Conclusiones

En este trabajo se lograron obtener nanopartículas termosensibles a partir del copolímero Cs-*g*-PVCL por gelificación ionotrópica en medio acuoso (pH 6), usando tripolifosfato de sodio como entrecruzante. La formación de estas nanopartículas depende fuertemente de la concentración de tripolifosfato de sodio y copolímero utilizadas, las cuales pueden obtenerse en concentraciones de copolímero entre 1 y 3 mg mL⁻¹, y la concentración de TPP entre 0.20 - 0.25 mg mL⁻¹.

Las nanopartículas obtenidas mostraron una temperatura de transición de fase reversible alrededor de 39 °C, la cual fue dependiente de la longitud de cadena de PVCL injertada. Los nanosistemas presentaron morfología pseudo-esféricas con diámetro hidrodinámico alrededor de 150 nm y potencial- ζ de +35 mV. Así mismo, las nanoformulaciones exhibieron excelente capacidad para encapsulación de fármacos antitumorales, alcanzando por encima de 80% de eficiencia de encapsulación de la sustancia modelo. Estas características son prometedoras para la aplicación potencial como sistemas de liberación controlada de fármacos antitumorales.

V.2. Recomendaciones

Se recomienda estudiar la liberación del fármaco encapsulado a partir de las nanopartículas del copolímero Cs-*g*-PVCL, en dependencia de la temperatura y el pH del medio. Lo cual proporcionará las condiciones a las cuales se libera de manera controlada la mayor cantidad de la sustancia antitumoral.

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

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

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M.R., San Román, J., 2014. Introduction to smart polymers and their applications, in: *Smart Polymers and Their Applications*. Woodhead Publishing, pp. 1–11.
- Argüelles-Monal, W.M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Recillas-Mota, M.T., Montiel-Herrera, M., 2018. Chitosan Derivatives: Introducing New Functionalities with a Controlled Molecular Architecture for Innovative Materials. *Polymers* 10, 342. <https://doi.org/10.3390/polym10030342>
- Azouri, A., Ge, M., Xun, K., Sattler, K., Lichwa, J., Ray, C., 2006. Zeta Potential Studies of Titanium Dioxide and Silver Nanoparticle Composites in Water-Based Colloidal Suspension. <https://doi.org/10.1115/MN2006-17072>
- Bahadur, P., Sastry, N.V., 2006. *Principles of Polymer Science*, Second Edition, 2a ed.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1997. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63, 125–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)
- Chang, K.-C., Chiang, Y.-W., Yang, C.-H., Liou, J.-W., 2012. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Med. J.* 24, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2012.08.002>
- Cortez-Lemus, N.A., Licea-Claverie, A., 2016. Poly(N-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular. *Prog. Polym. Sci.* 53, 1–51. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.08.001>
- D'Este, M., Eglin, D., Alini, M., 2014. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water. *Carbohydr. Polym.* 108, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.070>

- Farkaš, P., Čížová, A., Bekešová, S., Bystrický, S., 2013. Comparison of EDC and DMTMM efficiency in glycoconjugate preparation. *Int. J. Biol. Macromol.* 60, 325–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.014>
- Fernández-Gutiérrez, 2015. Bioactive Chitosan Nanoparticles Loaded with Retinyl Palmitate: A Simple Route Using Ionotropic Gelation - Fernández-Gutiérrez - 2015 - Macromolecular Chemistry and Physics - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/macp.201500034> (accessed 8.4.18).
- Fernández-Quiroz, D., González-Gómez, Á., Lizardi-Mendoza, J., Vázquez-Lasa, B., Goycoolea, F.M., Román, J.S., Argüelles-Monal, W.M., 2016. Conformational study on the thermal transition of chitosan-*g*-poly(*N*-vinylcaprolactam) in aqueous solution. *Colloid Polym. Sci.* 294, 555–563. <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3816-0>
- Fernández-Quiroz, D., González-Gómez, Á., Lizardi-Mendoza, J., Vázquez-Lasa, B., Goycoolea, F.M., San Román, J., Argüelles-Monal, W.M., 2015. Effect of the molecular architecture on the thermosensitive properties of chitosan-*g*-poly(*N*-vinylcaprolactam). *Carbohydr. Polym.* 134, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.069>
- Fitzpatrick, S.D., Fitzpatrick, L.E., Thakur, A., Mazumder, M.A.J., Sheardown, H., 2012. Temperature-sensitive polymers for drug delivery. *Expert Rev. Med. Devices* 9, 339–351. <https://doi.org/10.1586/erd.12.24>
- Galego Fernández, N., Martínez Sánchez, R., Peniche-Covas, C., Prieto González, S., Rieumont Briones, J., 1987. *Química-Física de los Polímeros*.
- Goycoolea, F., REMUÑÁN-LÓPEZ, C, ALONSO, M. J., 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. *Monogr. Real Acad. Nac. Farm.* 2009, 103–131.

- Hatakeyama, T., Quinn, F.X., 1999. Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer science, 2. ed. ed. Wiley, Chichester.
- Hoogenboom, R., 2014. Temperature-responsive polymers: properties, synthesis and applications, in: Smart Polymers and Their Applications. Woodhead Publishing, pp. 15–44.
- Kumar, A., Srivastava, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2007. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.* 32, 1205–1237. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.003>
- Medeiros, S.F., Barboza, J.C.S., Ré, M.I., Giudici, R., Santos, A.M., 2010. Solution polymerization of N-vinylcaprolactam in 1,4-dioxane. Kinetic dependence on temperature, monomer, and initiator concentrations. *J. Appl. Polym. Sci.* 118, 229–240. <https://doi.org/10.1002/app.32204>
- Odian, G., 2004. Principles of Polymerization, 4th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Paz, L.E.C. de, Resin, A., Howard, K.A., Sutherland, D.S., Wejse, P.L., 2011. Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on Streptococcus mutans Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3892–3895. <https://doi.org/10.1128/AEM.02941-10>
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F.M., 2008. Chapter 25 - Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications A2 - Gandini, Mohamed Naceur BelgacemAlessandro, in: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. Elsevier, Amsterdam, pp. 517–542.
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Peniche, H., Acosta, N., 2003. Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromol. Biosci.* 3, 511–520. <https://doi.org/10.1002/mabi.200300019>
- Prabaharan, M., Grailer, J.J., Steeber, D.A., Gong, S., 2008. Stimuli-Responsive Chitosan-graft-Poly(N-vinylcaprolactam) as a Promising Material for Controlled Hydrophobic Drug Delivery. *Macromol. Biosci.* 8, 843–851. <https://doi.org/10.1002/mabi.200800010>

- Rejinold, N.S., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Tamura, H., Jayakumar, R., 2011. Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier. *Carbohydr. Polym.* 83, 776–786. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.052>
- Rejinold, N.S., Thomas, R.G., Muthiah, M., Chennazhi, K.P., Park, I.-K., Jeong, Y.Y., Manzoor, K., Jayakumar, R., 2014. Radio frequency triggered curcumin delivery from thermo and pH responsive nanoparticles containing gold nanoparticles and its in vivo localization studies in an orthotopic breast tumor model. *RSC Adv.* 4, 39408–39427. <https://doi.org/10.1039/C4RA05727A>
- Rejinold, N.S., Thomas, R.G., Muthiah, M., Lee, H.J., Jeong, Y.Y., Park, I.-K., Jayakumar, R., 2016. Breast Tumor Targetable Fe₃O₄ Embedded Thermo-Responsive Nanoparticles for Radiofrequency Assisted Drug Delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.* 12, 43–55. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2135>
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31, 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Sanoj Rejinold, N., Muthunarayanan, M., Divyarani, V.V., Sreerekha, P.R., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Tamura, H., Jayakumar, R., 2011. Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *J. Colloid Interface Sci.* 360, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.04.006>
- Sanoj Rejinold, N., Thomas, R.G., Muthiah, M., Chennazhi, K.P., Manzoor, K., Park, I.-K., Jeong, Y.Y., Jayakumar, R., 2015. Anti-cancer, pharmacokinetics and tumor localization studies of pH-, RF- and thermo-responsive nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 74, 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.044>
- Soares, P.I.P., Sousa, A.I., Silva, J.C., Ferreira, I.M.M., Novo, C.M.M., Borges, J.P., 2016. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for

doxorubicin: Optimization and modelling. *Carbohydr. Polym.* 147, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.028>

Socrates, G., 2001. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3rd ed. John Wiley & Sons.

Talelli, M., Duro-Castaño, A., Rodríguez-Escalona, G., Vicent, M.J., 2014. 11 - Smart polymer nanocarriers for drug delivery, in: *Smart Polymers and Their Applications*. Woodhead Publishing, pp. 327–358.