



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**FABRICACIÓN DE NANOPARTICULAS DE
FIBROINA FUNCIONALIZADAS CON FOLATO
PARA SU POTENCIAL USO EN TRATAMIENTOS
DE CÁNCER**

Diego Nicolás Rincón Plazas

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Medellín, Colombia

2021



FABRICACIÓN DE NANOPARTICULAS DE FIBROINA FUNCIONALIZADAS CON
FOLATO PARA SU POTENCIAL USO EN TRATAMIENTOS DE CÁNCER

Diego Nicolás Rincón Plazas

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Bioingeniero

Asesores (a):

Carlos Augusto Murillo Usuga, Químico

Diana Marcela Escobar Sierra, Doctorado En Ciencias Químicas

Línea de Investigación:

Biomateriales

Grupo de Investigación:

Grupo de investigación en Biomateriales - Biomat

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Medellín, Colombia

2021

“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?”

Albert Einstein

A mis padres que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria y me dieron el apoyo necesario para no abandonar cuando todo parecía complicado y muy lejano de alcanzar.

De igual manera, agradezco a mis asesores de Tesis, que gracias a su apoyo, enseñanzas y correcciones hoy puedo culminar este trabajo. A los Profesores y compañeros que me han visto crecer como persona y han aportado de una u otra forma a mi desarrollo personal y profesional.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1.1. Introducción y planteamiento del Problema.....	1
1.2. Objetivos	3
1.2.1 Objetivo General.....	3
1.2.3 Objetivos Específicos	3
1.3 MARCO TEÓRICO	4
1.3.1 Cáncer.....	4
1.3.1.1 Tratamientos	4
1.3.1.2 Quimioterapia y terapia dirigida	5
1.3.1.3 Tumorigénesis y receptores de folato	6
1.3.1.4 Terapias con medicamentos dirigidos.....	8
1.3.2 Nanoportadores.....	9
1.3.2.1 Obtención de nanopartículas.....	9
1.3.2.2 Factores que afectan las propiedades de las nanopartículas.	10
1.3.2.3 Caracterización de las nanopartículas	11
1.3.2.4 Cinética de liberación de moléculas pequeñas y folato	11
1.3.3 Fibroína.....	12
1.3.3.1 Propiedades	13
1.3.4 Ácido fólico	16
1.3.4.1 Química.....	16
1.3.4.2 Absorción, transporte y distribución.....	17
1.3.4.3 Metabolismo	17
1.3.5 Inmovilización de moléculas sobre nanopartículas de fibroína.....	18
1.3.5.1 Técnicas utilizadas	18
1.3.5.2 Caracterización de la solución inmovilizada	19
REFERENCIAS.....	19
FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA DE ADECUADA ESTABILIDAD	26
2.1 Introducción	26

2.2 Metodología	27
2.2.1 Extracción y solubilización de fibroína a partir de capullos de gusano de seda <i>Bombix Mory</i>	27
2.2.2 Fabricación de las nanopartículas de fibroína.....	28
2.2.2.1 Técnica de Precipitación salina.....	28
2.2.2.2 Técnica de Congelación.....	28
2.2.3 Caracterización de las nanopartículas fabricadas	28
2.3 Resultados y Discusión	29
2.4 Conclusiones	34
REFERENCIAS	35
INMOVILIZACIÓN DE FOLATO SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA	37
3.1 Introducción	37
3.2 Metodología	38
3.2.1 Funcionalización de folato sobre las nanopartículas de fibroína.....	38
3.2.2 Caracterización de la solución funcionalizada.	39
3.3 Resultados y Discusión	40
3.4 Conclusiones	41
REFERENCIAS	41
EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL FOLATO INMOVILIZADO.	44
4.1 Introducción	44
4.2 Metodología	45
4.2.1 Evaluación de la cinética de liberación del folato.	45
4.2 Resultados y Discusión	45
4.3 Conclusiones	47
REFERENCIAS	48
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	49
5.1 Conclusiones	49
5.2 Perspectivas.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. 1.** Transformación de células epiteliales sanas en células tumorales y el efecto que tiene sobre el posicionamiento del receptor. Tras la Tumorigénesis, las uniones intercelulares (uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones huecas) se pierden y los receptores que anteriormente solo se encontraban en la superficie apical se posicionan al azar en el tumor, tomado de (Fernández et al., 2018)..... 7
- Figura 2. 1.** Gráfica de Media de población predominante vs relación SF/KH₂PO₄ para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml, obtenida por el método de precipitación salina. 30
- Figura 2. 2.** Gráfica de índice de polidispersidad vs relación SF/KH₂PO₄ para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml, obtenida por el método de precipitación salina. 30
- Figura 2. 3.** Gráfica de Media de población predominante vs relación EtOH/SF para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml y temperaturas de -15°C y -80°C, obtenida por el método de congelación. 31
- Figura 2. 4.** Gráfica de índice de polidispersidad vs relación EtOH/SF para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml y temperaturas de -15°C y -80°C, obtenida por el método de congelación. 31
- Figura 2. 5.** Imágenes SEM de nanopartículas de fibroína fabricadas por el método de precipitación salina con relación SF/KH₂PO₄ 1:3, a diferentes concentraciones: 0.15 mg/ml (A, B y C) y 1.5 mg/ml (D, E y F)..... 34
- Figura 3. 1.** Inmovilización de ácido fólico sobre fibroína en solución (Esquema propio)..... 39
- Figura 3. 2.** Espectros FTIR de AF: ácido fólico, FF: fibroína funcionalizada y Fib: fibroína. .. 41
- Figura 4. 1.** Espectro UV para el ácido fólico a concentración de 15 µg/ml. 46
- Figura 4. 2.** Perfiles de liberación de FA in vitro en nanopartículas funcionalizadas por dos métodos tras la incubación en PBS con diferentes valores de pH: 7.4 y 4.5..... 46

RESUMEN

El presente estudio explora la obtención de nanopartículas de fibroína funcionalizadas con ácido fólico como nanoportadores para la administración controlada de fármacos en tratamientos contra el cáncer. En él se muestra el proceso de la fabricación de nanopartículas (200nm aproximadamente) por medio de precipitación salina y congelación obteniendo geometrías mayoritariamente esféricas, las cuales son óptimas para aumentar su tiempo de circulación sanguínea, en el primer método, con concentración de fibroína de 0.15 mg/ml y relación SF/KH₂PO₄ de 1:3 v/v. Además, este estudio muestra con éxito la funcionalización de fibroína con ácido fólico, siendo más efectiva al realizar el acople de la molécula diana con la fibroína en solución, esto debido a la estructura extendida de la proteína lo que logra mayor disponibilidad de ácido fólico tanto en el exterior como en el interior de las nanopartículas, obteniendo una cinética de liberación mas lenta para este método.

Palabras clave: ácido fólico, fibroína, nanopartículas, cáncer, carbodiimida.

ABSTRACT

This study explores the production of fibroin nanoparticles functionalized with folic acid as nanocarriers for controlled drug delivery in cancer treatments. It shows the process of fabrication of nanoparticles (200nm approximately) by salt precipitation and freezing obtaining mostly spherical geometries, which are optimal to increase their blood circulation time, in the first method, with fibroin concentration of 0.15 mg/ml and SF/KH₂PO₄ ratio of 1:3 v/v. In addition, this study successfully shows the functionalization of fibroin with folic acid, achieving greater effectiveness when coupling the target molecule with fibroin in solution, due to the extended structure of the protein, which allows greater availability of folic acid both outside and inside the nanoparticles, getting a slower release kinetics for this method.

Keywords: folic acid, fibroin, nanoparticles, cancer, carbodiimide.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción y planteamiento del Problema

A pesar de los avances recientes para el tratamiento del cáncer, en Colombia tan sólo en 2018 se presentaron cien mil nuevos casos diagnosticados y anualmente se presentan más de treinta mil muertes, de las cuales aproximadamente la mitad son hombres afectados con cáncer de estómago, pulmón, próstata, colon-recto y leucemias, la otra mitad corresponde a mujeres con cáncer de cuello uterino, estómago, mama, pulmón, colon y recto (Ministerio de Salud, 2020). En todos los casos, el tratamiento a utilizar depende del tipo de cáncer y de qué tan avanzada esté la enfermedad. Algunos pacientes requieren de un solo tipo de tratamiento, pero la mayoría tienen combinaciones de éstos. Dentro de las opciones para el tratamiento se encuentran cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y terapia de hormonas, sin embargo, la tasa de supervivencia es baja y se presentan efectos secundarios en tejidos y órganos sanos (National Cancer Institute, 2020); por esta razón, es necesario buscar alternativas que permitan mejorar el tratamiento para este tipo de enfermedades.

Desde el punto de vista biológico, las células cancerosas tienen una propiedad inherente de sobre expresar los receptores de folato (FR) (Subia et al., 2014), dentro de los receptores que más se sobre expresan se encuentran los FR- α y los FR- β , el primero de estos se sobre expresa en gran cantidad de cánceres de origen epitelial, incluidos el cáncer de mama, pulmón, riñón y cánceres de ovario, por su parte, los FR- β se sobre expresan en cáncer de hígado, riñón, piel, pulmón, sangre y tejidos blandos, de este modo, se sabe que dicha sobre expresión es de 100 a 300 veces mayor que en las células sanas, lo que se da tras la Tumorigénesis, donde toda la arquitectura de la célula cambia, con la vasculatura desorganizándose y perdiendo las uniones, generando así una disposición caótica, y dando lugar a una asociación débil entre las células endoteliales, como consecuencia, los receptores de folato pierden su localización celular polarizada y los receptores que anteriormente solo se encontraban en la superficie apical de las células sanas ahora se posicionan al azar en las células tumorales, de este modo, esta pérdida de polarización del receptor combinada con la alta afinidad de unión de los receptores de folato para folatos oxidados como el

ácido fólico, ha llevado al desarrollo de medicamentos funcionalizados con folato. Adicional a esto, el ácido fólico presenta beneficios como su incapacidad de inducir una respuesta inmune, alta estabilidad y permeabilidad tisular, bajo peso molecular y se puede conjugar fácilmente con diversos tipos de moléculas orgánicas, anticuerpos y nanopartículas (Fernández et al., 2018).

En el caso de los fármacos anticancerosos, estos no pueden diferenciar en gran medida células cancerosas de células normales, lo que conduce a una toxicidad sistémica y efectos adversos (Estanqueiro et al., 2015) de este modo, desarrollar un portador de medicamentos que dirija de forma selectiva la quimioterapia a las células cancerosas es un desafío importante para el tratamiento de esta enfermedad. Actualmente la mayoría de fármacos utilizados en quimioterapia se encuentran en forma de inyectables, pero generan efectos secundarios sobre el paciente como ototoxicidad, calvicie y neurotoxicidad, lo que se debe en gran parte a los solventes tóxicos empleados en sus formulaciones (Kumar et al., 2016). Por otro lado, se han propuesto nuevas formulaciones libres de solventes tóxicos que consisten en sistemas de administración de fármacos a través de nanoportadores, entre los que se destacan los lípidos (Selvamuthukumar & Velmurugan, 2012), y algunas proteínas séricas como transferrina, albúmina (Kratz & Beyer, 1998) y fibroína (Chen et al., 2012), para el cual este último se considera un candidato prometedor en campos biomédicos debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad ya que, como portador de fármacos, las moléculas de fibroína poseen capacidad de controlar su degradación *in vitro* e *in vivo*, lo que puede regularse cambiando su tamaño, cristalinidad, peso molecular y grado de reticulación (M. Y. Li et al., 2013).

Los residuos de aminoácidos hidrofóbicos en las moléculas de fibroína, como la alanina, la glicina y la tirosina, pueden mejorar el recubrimiento de medicamentos a través de la interacción hidrofóbica y el empaquetamiento π - π , lo que aumenta la eficacia de carga de dicho fármaco (H. Li et al., 2016), además de lo anterior, se han reportado varios ensayos donde se ha usado la fibroína como portadora de drogas; por ejemplo, se ha utilizado en forma de nanoesferas como portadores de insulina, destacando que éstas fueron beneficiosas para mejorar la estabilidad de la insulina en el suero humano (Carino et al., 2000); también como microesferas para cargar peroxidasa de rábano picante, encontrando diferencias en la capacidad de carga con los ciclos de congelación (Wang et al., 2007), además, se ha usado para cargar Paclitaxel, un agente antitumoral con poca solubilidad en agua (Chen et al., 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo la fabricación de nanopartículas de fibroína funcionalizadas con folato mediante los métodos de congelación y SaltingOut, la cinética de liberación del folato usado como sustancia vectorizante se realizó mediante espectrometría UV, esto con la finalidad de su posible utilización como portadores de fármacos para el tratamiento del cáncer.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Evaluar nanopartículas de fibroína funcionalizadas con folato como potencial alternativo para tratamiento de cáncer.

1.2.3 Objetivos Específicos

- Fabricar nanopartículas de fibroína de adecuada estabilidad.
- Inmovilizar folato sobre la superficie de las nanopartículas de fibroína.
- Evaluar la cinética de liberación del folato inmovilizado.

1.3 MARCO TEÓRICO

1.3.1 Cáncer

El cáncer es la enfermedad responsable de una de cada ocho muertes en todo el mundo (American Cancer Society, Inc., 250 Williams St., NW, Atlanta, GA 30303-1002, 2007), abarcando más de 100 enfermedades distintas con diversos factores de riesgo y epidemiología que se originan en la mayoría de los tipos de células y órganos del cuerpo humano, los cuales se caracterizan por su proliferación relativamente desenfrenada de células que pueden invadir más allá de los límites normales de los tejidos y hacer metástasis en órganos lejanos (Stratton et al., 2009).

Se cree que todos los tipos de cáncer comparten una patogenia común, dado que cada uno es el resultado de un proceso de evolución que ocurre entre las poblaciones celulares dentro de los microambientes proporcionados por los tejidos de un organismo multicelular. El desarrollo del cáncer se basa en dos procesos, la adquisición continua de variación genética hereditaria en células individuales por mutación más o menos aleatoria y la selección natural que actúa sobre la diversidad fenotípica resultante, dicha selección puede eliminar las células que han adquirido mutaciones o puede fomentar células portadoras de alteraciones que dan la capacidad de proliferar y sobrevivir de manera más eficaz que sus vecinas, la mayoría de los cuales tienen un potencial de crecimiento anormal limitado y son invisibles o se manifiestan como crecimientos benignos comunes, como lunares en la piel. Sin embargo, ocasionalmente una sola célula adquiere un conjunto de mutaciones suficientemente ventajosas que le permiten proliferar de forma autónoma, invadir tejidos y hacer metástasis (Stratton et al., 2009).

1.3.1.1 Tratamientos

La selección del tratamiento y su progreso depende del tipo de cáncer, su ubicación y etapa de progresión. La cirugía, la radiación, la quimioterapia y la radioterapia son algunos de los métodos de tratamiento tradicionales más utilizados, aunque algunas de las modalidades modernas incluyen terapia basada en hormonas, modalidades anti-angiogénicas, terapias con células madre, inmunoterapia e inmunoterapia basada en células dendríticas. Los efectos secundarios asociados con los métodos tradicionales de tratamiento del cáncer resaltan el alcance de los nuevos métodos

de tratamiento del cáncer, mientras que los diferentes sistemas de tratamientos novedosos incluyen el tratamiento contra la capacidad angiogénica de los cánceres, viroterapia oncolítica, control hereditario de las vías apoptóticas y de ataque de tumores, técnicas antisentido y ARNi. Estos tratamientos se emplean contra el cáncer de cerebro, próstata, pulmón, mama, colorrectal, páncreas, hígado, cabeza y cuello, vejiga, piel, ovario y neoplasias renales (Dorai & Aggarwal, 2004).

1.3.1.2 Quimioterapia y terapia dirigida

La quimioterapia actúa para provocar cambios en las células tumorales para que dejen de crecer o mueran; por lo tanto, las dos ramas de los fármacos quimioterapéuticos son citostáticos (fármacos biológicos) y citotóxicos, respectivamente (DeVita & Chu, 2008), sin embargo, los medicamentos quimioterapéuticos también se dirigen a las células normales, lo que puede resultar en una variedad de efectos secundarios dependiendo de la dosis, como pérdida de cabello, náuseas, fatiga, vómitos, etc. Como resultado de un tratamiento con quimioterapia, los pacientes se vuelven inmunodeprimidos; esto puede resultar en infecciones complicadas y consecuentemente la muerte. De los fármacos quimioterapéuticos descubiertos, un total de 132 están aprobados por la FDA. Estos fármacos están diseñados para dirigirse específicamente a las células tumorales y matarlas por efecto genotóxico, es decir, la producción de especies reactivas de oxígeno, sin embargo, hasta cierto punto, las células normales del cuerpo también se ven afectadas (Abbas & Rehman, 2018).

Los sistemas de administración de fármacos dirigidos a tumores han surgido como una estrategia prometedora en el tratamiento del cáncer, esto debido a que evitan en gran medida los efectos secundarios adversos característicos de la quimioterapia convencional, a que dirigirse a biomarcadores particulares que se sobre expresan específicamente en células tumorales permite la entrega selectiva de carga citotóxica al tejido canceroso, minimizando así los efectos secundarios tóxicos en el paciente. En los últimos años, se han identificado muchos receptores con sobreexpresión en células cancerosas, como el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) y los receptores de anhidrasa carbónica IX y biotina. Además de estos, el receptor de folato (FR) ha atraído una atención considerable en el campo (Fernández et al., 2018).

1.3.1.3 Tumorigénesis y receptores de folato

La Tumorigénesis es un proceso de múltiples etapas que comienza con la transformación celular, seguido de la hiperproliferación y termina con la adquisición de potencial invasivo, propiedades angiogénicas y establecimiento de lesiones metastásicas. Este proceso puede ser activado por cualquiera de los diversos carcinógenos ambientales, agentes inflamatorios y promotores tumorales (Dorai & Aggarwal, 2004).

En los últimos años se ha propuesto que el suministro de fármacos para el tratamiento de cáncer mediado por el receptor de folato (FR) puede brindar especificidad hacia el tejido canceroso, mejorar la liberación sostenida del fármaco y promover la citotoxicidad efectiva hacia las células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo* (Subia et al., 2014) ya que se considera una sustancia vectorizante para receptores de folato, lo que se explica debido a que cuando se da la Tumorigénesis, la arquitectura de la célula se desordena, dando lugar a una asociación débil entre las células endoteliales, y como consecuencia, los FR pierden su polarización, y se distribuyen aleatoriamente sobre la superficie de la célula afectada, y por lo tanto, a terminar sobre expresados como se muestra en la Figura 1. 1, donde se observa que los FR en una célula sana tienen una localización celular polarizada, mientras que en la célula cancerígena se distribuyen aleatoriamente por toda la superficie celular, dando lugar a que estos sean accesibles para los conjugados de drogas en la circulación sanguínea.

Lo anterior se puede aprovechar inmovilizando folato sobre nanopartículas, ya que puede aumentar la especificidad y el suministro dirigido de dichas nanopartículas hacia tejidos cancerosos.

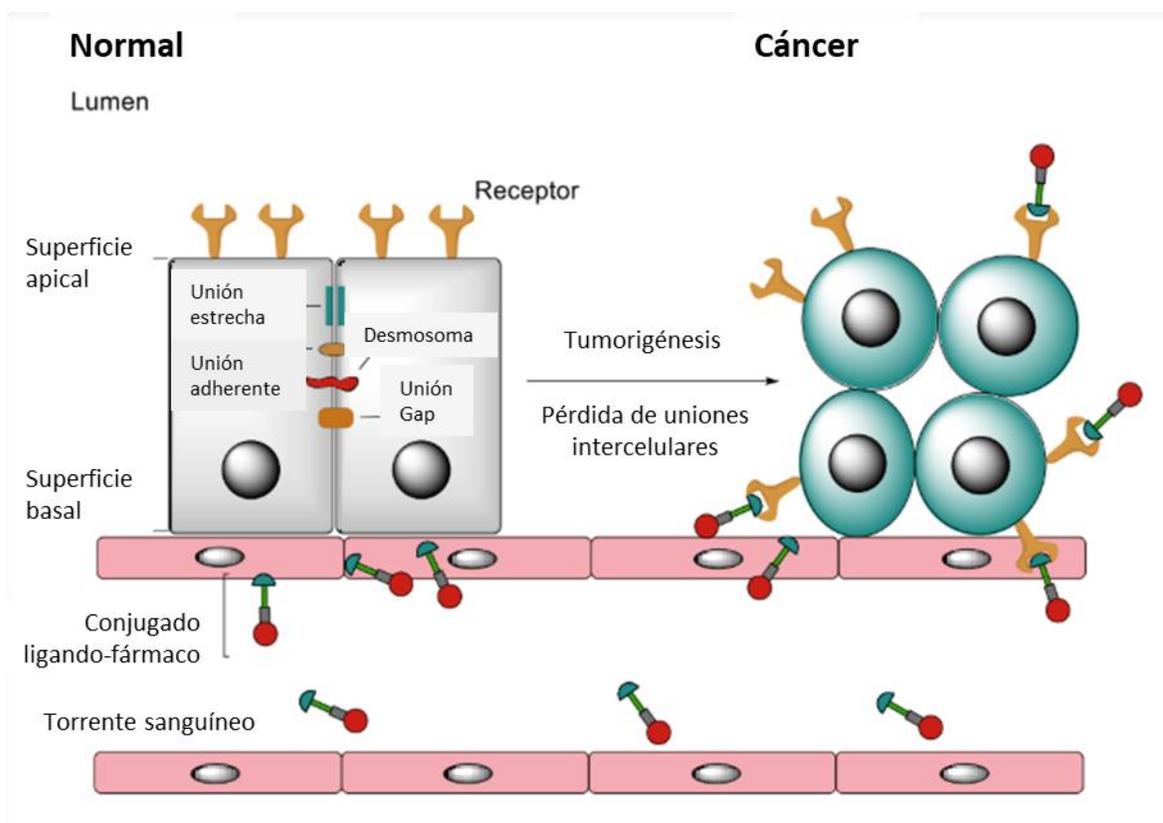


Figura 1. 1. Transformación de células epiteliales sanas en células tumorales y el efecto que tiene sobre el posicionamiento del receptor. Tras la Tumorigénesis, las uniones intercelulares (uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones huecas) se pierden y los receptores que anteriormente solo se encontraban en la superficie apical se posicionan al azar en el tumor, tomado de (Fernández et al., 2018).

La pérdida en la polarización del receptor, combinada con la alta afinidad de unión de los FR para folatos oxidados, como el ácido fólico (FA) ha llevado al desarrollo de portadores de medicamentos con FA, este presenta beneficios como incapacidad de inducir una resistencia inmunitaria, alta estabilidad y permeabilidad tisular, bajo peso molecular y se puede conjugar fácilmente con diversos tipos de moléculas orgánicas, anticuerpos y nanopartículas, y se sabe que sólo hay ciertas posiciones en la estructura del ácido fólico donde se pueden unir los conjugados sin comprometer la alta fuerza de unión al FR, y que estas posiciones son los ácidos carboxílicos ya que permiten realizar acoples de carbodiimida, el cual el cual se considera el método más popular y versátil para marcar o reticular a ácidos carboxílicos, funciona activando grupos carboxilo para la reacción directa con aminas primarias a través de la formación de enlaces amida.

Debido a que ninguna parte de su estructura química se convierte en parte del enlace final entre las moléculas conjugadas, las carbodiimidias se consideran reticuladores de carboxilo a amina de longitud cero (Ulrich, 2007).

1.3.1.4 Terapias con medicamentos dirigidos

Actualmente se están realizando numerosos esfuerzos para descubrir y desarrollar fármacos, que interfieren específicamente con varias vías de transducción de señales presentes exclusivamente en las células cancerosas y, por lo tanto, ofrecen oportunidades para adaptar tratamientos individualizados basados en el conjunto único de dianas moleculares producidas por el tumor del paciente (Vasir & Labhasetwar, 2005).

Los fármacos contra el cáncer pueden asociarse con los sistemas portadores de fármacos coloidales tales como micelas poliméricas, nanopartículas y liposomas, que luego pueden dirigirse activamente a células tumorales específicas por medio de ligandos o anticuerpos contra receptores de superficie celular asociados a tumores. Esta estrategia de administración de fármacos dirigida puede superar los mecanismos celulares de resistencia a múltiples fármacos y mejorar la selectividad de la administración de fármacos a las células cancerosas, y dado que los agentes anticancerosos encapsulados en nanopartículas no pueden ser reconocidos por los mecanismos de eflujo celular pueden evitar el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos y ser capaces de acumularse pasivamente en el tejido tumoral utilizando el efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR), cuando se preparen en tamaños apropiados y con propiedades de circulación prolongada en el torrente sanguíneo.

Otra ventaja es que se pueden lograr modificaciones superficiales de las nanopartículas que permitirían interacciones bioquímicas específicas con las proteínas/receptores expresados en las células tumorales (Vasir & Labhasetwar, 2005), una vez que una nanopartícula unida a folato llega a una célula tumoral, la ligadura de la partícula al folato puede mejorar su eficacia terapéutica, ya que el folato no solo aumentaría la retención de la nanopartícula en la masa tumoral, sino que también facilitaría la captación de la partícula por una endocitosis mediada por FR (Xia & Low, 2010).

1.3.2 Nanoportadores

Los nanoportadores son sistemas portadores de fármacos coloidales que tienen un tamaño de partícula submicrométrico típicamente, 500 nm. Los nanoportadores se han investigado exhaustivamente en las últimas décadas, para la administración de fármacos, debido a su alta relación de superficie a volumen, éstos tienen la capacidad de alterar las propiedades básicas y la bioactividad de los fármacos. La farmacocinética y la biodistribución mejoradas, la disminución de las toxicidades, la solubilidad y la estabilidad mejoradas, la liberación controlada y la administración de agentes terapéuticos en un sitio específico son algunas de las características que los nanoportadores pueden incorporar en los sistemas de administración de fármacos, además, las propiedades fisicoquímicas de los nanoportadores se pueden ajustar variando su composición, tamaño, forma y propiedades superficiales, por lo que se busca utilizar nanoportadores en la administración de medicamentos para tratar enfermedades de manera efectiva con efectos secundarios mínimos (Din et al., 2017).

Con el fin de suministrar medicamentos a las células tumorales, se deben superar ciertos obstáculos como son las barreras fisiológicas, la resistencia a los medicamentos a nivel celular, y los procesos de distribución, biotransformación y eliminación del fármaco (Brigger et al., 2002), para ello, un posible mecanismo de direccionamiento consiste en inmovilizar sustancias vectorizantes y fármacos sobre la superficie de las nanopartículas coloidales, o también introduciéndolas dentro de dicha estructura, ya que también se consideran un sistema de depósito (Linder & Markus, 2005).

1.3.2.1 Obtención de nanopartículas

Existen varios métodos para la fabricación de nanopartículas con la ventaja de propiciar variados tamaños de nanopartículas que puedan contener otras moléculas.

La desolvatación el método más usado, el cual consiste en reducir la solubilidad de la proteína por adición de un agente desolvatante, lo que conduce a la separación de fases, así, la adición del agente desolvatante conlleva a cambios de conformación en la estructura de la proteína que resultan en coacervación o precipitación de ésta. Llegándose a reportar tamaños entre 35 nm y 125 nm (Zhao et al., 2015).

Otro método para la fabricación de nanopartículas es el de precipitación salina (salting out), como el reportado por (Lammel et al., 2010) el cual se basa en que las partes hidrofóbicas de una proteína pueden interactuar entre ellas debido a la adición de un electrolito, de este modo, con el aumento de la concentración de sal, los iones de ésta atraen algunas de las moléculas de agua, lo que resulta en la eliminación de la barrera de agua entre las moléculas de proteína y el aumento de las interacciones proteína-proteína, por lo tanto, las moléculas de proteína se agregan y precipitan de la solución, y con el cual se han obtenido tamaños entre 486 nm y 1200 nm.

Por otra parte, el método de atomización de líquidos por medio de fuerzas eléctricas conocido como electrospraying, reportado por (Qu et al., 2014), permite obtener partículas entre 59 y 75 nm, y es un método útil para la producción rápida y de alto rendimiento de las nanopartículas.

Técnicas como estas, si bien permiten obtener nanopartículas con diferentes rangos de tamaño, también presentan limitaciones para su aplicación a la síntesis de nanopartículas, debido al alto peso molecular y la naturaleza proteica de ésta, lo que dificulta el control en el tamaño de las nanopartículas.

1.3.2.2 Factores que afectan las propiedades de las nanopartículas.

Factores, como el peso molecular, la cristalinidad de la proteína, las propiedades del fármaco encapsulado y las condiciones de preparación afectan la formación de las partículas, el tamaño medio, la distribución de tamaño, el potencial zeta de superficie, la encapsulación del fármaco y los perfiles de liberación y estabilidad.

Es así como, en la formación de partículas, los disolventes orgánicos juegan un papel importante, la acetona, el metanol y el etanol pueden inducir a nanopartículas a partir de la solución acuosa de proteína, mientras que el acetonitrilo sólo agrega las moléculas sin formar partículas finas (Pham & Tiyaboonchai, 2020).

En cuanto al tamaño y distribución de tamaño, todos los métodos mencionados anteriormente producen diferentes tamaños de partículas con una distribución de tamaño relativamente estrecha (índices de polidispersidad de $<0,5$), lo que indica las cualidades aceptables de los sistemas, mientras que para los potenciales zeta de partículas, los FNP normalmente heredan cargas

negativas a pH 7,0 (es decir, -20 a -30 mV) de sus respectivas cargas moleculares de proteína (Pham & Tiyaboonchai, 2020)

1.3.2.3 Caracterización de las nanopartículas

Las propiedades fisicoquímicas, como el tamaño y la química de la superficie, pueden afectar dramáticamente el comportamiento de las nanopartículas en sistemas biológicos, y podrían, en parte, determinar la biodistribución, seguridad y eficacia de una partícula. La caracterización fisicoquímica de una nanopartícula incluye la morfología, la química de la superficie y el estado de agregación/aglomeración (McNeil, 2005).

Debido a su pequeño tamaño y su polidispersidad, las nanopartículas no se logran observar mediante microscopía óptica con frecuencia, por lo que se requiere microscopía electrónica (SEM o TEM) para medir el tamaño y la forma de las nanopartículas. La microscopía electrónica de barrido (SEM) se puede utilizar para obtener información sobre el tamaño, la distribución del tamaño y la forma de los nanomateriales, mientras que el TEM por tener una resolución más alta puede proporcionar mayor detalle a escala atómica, como información sobre la estructura cristalina y la granularidad de una muestra (HALL et al., 2007).

Adicionalmente, técnicas de dispersión de luz como la DLS pueden proporcionar una medida del tamaño de partícula en solución, para medir el diámetro hidrodinámico, ya que es una técnica muy sensible a las moléculas biológicas flexibles "blandas", como los polímeros, las proteínas y los anticuerpos, porque provocan un arrastre de fricción significativo, que puede influir en la velocidad del movimiento de las partículas bajo la difusión browniana. Sin embargo, debido a que DLS mide el diámetro hidrodinámico de la esfera equivalente, no proporciona información sobre la forma de las partículas, es por ello que se utilizan en conjunto con el fin de resolver las ambigüedades asociadas con cualquiera de las técnicas de medición por sí solas (Berne B, 2000).

1.3.2.4 Cinética de liberación de moléculas pequeñas y folato

A pesar del hecho de que la mayoría de los productos farmacéuticos en el mercado son moléculas pequeñas, aún poseen varias desventajas como hidrofobicidad, baja permeabilidad, vida media corta, orientación y distribución inespecíficas y resistencia a los medicamentos poco después del tratamiento inicial. Los nanoportadores pueden superar eficazmente estos problemas

mencionados, ya que los nanoportadores pueden tener un tamaño entre 10 y 200 nm para prolongar el tiempo de circulación sistémica, y pueden ser eliminados a través del sistema reticuloendotelial (los mayores a 200 nm) o, por el riñón (los menores a 10 nm) (Hoshyar et al., 2016).

Las moléculas pequeñas atrapadas en las nanopartículas se pueden dividir en tres grupos, que incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes de fluorescencia para el seguimiento de partículas y compuestos naturales con diversos efectos terapéuticos. El primer grupo contiene medicamentos de uso común como doxorubicina, gemcitabina, floxuridina, paclitaxel, curcumina, metotrexato, emodina y cisplatino. El segundo grupo se compone de varios tintes, tanto hidrófilos como lipófilos, como rodamina B, azul alcian, violeta cristal, verde de indocianina e isotiocianato de fluoresceína. Y el tercer grupo, de los compuestos naturales es muy variado y ha ganado mucho interés debido a su capacidad para tratar diversas enfermedades, aunque a menudo poseen una baja solubilidad en agua y un extenso metabolismo sistémico, lo que conduce a una baja eficacia terapéutica (Hoshyar et al., 2016).

La farmacocinética describe el cambio en la cantidad de moléculas de fármaco dentro del cuerpo debido a la absorción, distribución y eliminación. Específicamente en las estrategias de focalización del folato, la "carga", que es un fármaco o un agente de formación de imágenes, se une al ácido fólico mediante un enlazador y, en conjunto, este sistema se conoce como conjugado de folato. El proceso de liberación en las células tumorales tiene un tiempo medio de aproximadamente 6h in vitro (Yang et al., 2006), y la velocidad de descarga del conjugado de folato del tumor al plasma es relativamente lenta en comparación con los procesos de internalización y liberación, por ello, es importante el momento en el que ocurre el proceso de liberación para el diseño de medicamentos contra el cáncer, ya que el medicamento debe liberarse dentro de las células tumorales (después de la internalización, pero antes de descargarse del tumor al plasma) (Tsai et al., 2014).

1.3.3 Fibroína

La fibroína es una proteína que puede ser extraída del capullo del gusano de seda *Bombyx mori*, rico en bloques hidrófobos formadores de láminas β unidos por pequeños segmentos o separadores

de bloques hidrófilos; tiene regiones cristalinas compuestas de repeticiones de glicina-x, donde x es alanina, serina, treonina o valina. El resultado de esto es una proteína hidrófoba que se autoensambla para formar materiales fuertes y resistentes (Rockwood et al., 2011). La fibroína de seda se usa como biomaterial para la producción de películas (Kundu et al., 2008) andamios tridimensionales (M. Li et al., 2008), hidrogeles (Sidorin et al., 1963), fibras electrohiladas (Jin et al., 2002) y microsferas (Wang et al., 2007). Así como otras proteínas naturales, la fibroína ha sido utilizada como un sistema portador de fármacos debido a su naturaleza química y física, donde la influencia del pH y la temperatura en el comportamiento de fase de la fibroína en solución lo hace un candidato interesante para aplicaciones de administración de fármacos, además, los abundantes grupos funcionales que posee la fibroína ofrecen la ventaja de incorporar más funcionalidades y modificaciones mediante derivatización química (Kundu et al., 2010).

1.3.3.1 Propiedades

La fibroína es un biomaterial ideal para las formulaciones de nanopartículas, ya que posee propiedades potenciales como solubilidad en agua, biocompatibilidad, biodegradabilidad con productos no tóxicos y modificabilidad de la estructura.

1.3.3.1.1 Solubilidad

La fibroína en su forma regenerada posee una alta solubilidad acuosa, que es de hasta un 10% p/v, la cual está correlacionada fuertemente con sus polimorfos cristalinos, por lo que se convierte en una ventaja en la fabricación de nanopartículas, ya que no se requiere o requiere menos cantidad de disolventes orgánicos, en comparación con otros materiales comunes para este fin, y por tanto, la toxicidad no deseada causada por el exceso de disolventes orgánicos para los sistemas corporales humanos y el medio ambiente es limitada (Pham & Tiyaboonchai, 2020). Además, el pH juega un papel en la solubilidad de la fibroína. El punto isoeléctrico de la fibroína es 4.53 (3.6-5.2), por lo tanto, tiene carga negativa a un pH normal de 7.0, por lo que un valor de pH cercano al punto isoeléctrico de la fibroína reduce su carga, generando una fuerza menos repulsiva, lo que disminuye su solubilidad y hace que las moléculas se agreguen, mientras que en pH ácido la solubilidad de la fibroína se verá incrementada mediante la protonación de los residuos de aminoácidos del polímero (Foo et al., 2006).

1.3.3.1.2 Biocompatibilidad

La fibroína es un polímero altamente biocompatible para uso clínico. En los EE. UU., La cantidad de productos biomédicos comerciales y patentes de investigación relacionadas con este biomaterial se encuentra en aumento (Pham & Tiyaboonchai, 2020), pero la aprobación clínica de los biomateriales a base de seda ha sido limitada porque no se pueden ignorar algunos eventos inmunológicos adversos asociados con el uso de esta (Kundu et al., 2010), algunos investigadores se centraron en la inmunogenicidad y antigenicidad de los sistemas de seda y no informaron signos de infección y solo una mínima inflamación o respuestas inmunitarias muy leves (Meinel & Kaplan, 2012), aunque la capa externa de sericina de la seda podría provocar reacciones de hipersensibilidad retardadas, además, el papel de la sericina en los efectos adversos causados por la seda se ha debatido recientemente porque se demostró que la sericina podría inducir reacciones alérgicas y de inmunogenicidad, investigaciones recientes sobre la sericina para aplicaciones biomédicas ha arrojado resultados iniciales positivos, y se ha sugerido que, independientemente de la presencia de sericina, otros compuestos lixiviables podrían ser la causa principal de los efectos adversos causados por la seda, sin embargo, la eliminación de la sericina sigue siendo un paso esencial para el procesamiento de fibroína de seda, debido a que este proceso induce una respuesta inmunogénica más baja que otros biomateriales comunes, como el poli (ácido láctico-co-glicólico) sintético (PLGA) e incluso el colágeno, lo que indica su aceptable biocompatibilidad (Nguyen et al., 2019).

1.3.3.1.3 Biodegradabilidad

La biodegradabilidad es una de las propiedades más notables de la fibroína, que conduce a la capacidad de controlar las características de las plataformas biomédicas basadas en fibroína. De acuerdo con la literatura, la degradabilidad de la fibroína depende en gran medida de sus plataformas biomédicas, lo que se debe principalmente a los efectos de las enzimas proteolíticas como las proteínas y, en menor medida, a la hidrólisis. Como proteína natural, la fibroína se degrada en aminoácidos subproductos no tóxicos que pueden ser absorbidos, metabolizados y excretados favorablemente por las funciones normales del cuerpo. En cuanto a las tasas de degradación, estas dependen de muchos factores, a saber, los tipos de enzimas (es decir, proteasa

XIV, α -quimotripsina), cristalinidad de fibroína, plataformas biomédicas, métodos de preparación y modelos experimentales (Pham & Tiyaboonchai, 2020).

1.3.3.1.4 Modificación química: Reacciones de acople (carbodiimida)

La capacidad de modificar, tanto genética como químicamente, la estructura inherente es crucial para un biomaterial, ya que podría aumentar la versatilidad de este (es decir, producir más funciones, mejorar la unión e interacciones celulares específicas, reducir los efectos secundarios). Debido a esto, la fibroína es un candidato adecuado debido a sus residuos de aminoácidos como Serina (Ser), Treonina (Thr) y Ácido Aspártico (Asp), que proporcionan grupos funcionales que incluyen hidroxilo y carboxílico que pueden formar enlaces covalentes y no covalentes con otros reactivos (Pham & Tiyaboonchai, 2020).

El acoplamiento de carbodiimida es un método estándar utilizado para hacer reaccionar aminas primarias con ácidos carboxílicos, lo que da como resultado la formación de un enlace amida. Esta reacción tiene un amplio uso en la química de las proteínas, ya que muchas proteínas contienen estos grupos funcionales en sus cadenas laterales de aminoácidos o en los extremos N y C terminales. La fibroína contiene un buen número de aspártico y ácido glutámico, así como una pequeña cantidad de residuos de lisina que pueden participar en esta reacción (Murphy & Kaplan, 2009).

El 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) se encuentra dentro de las carbodiimidias más fácilmente disponibles y comúnmente utilizadas, este reacciona con grupos ácido carboxílico para formar un intermedio activo de O-acilourea que reacciona fácilmente con aminas primarias, por lo tanto, dicha amina primaria forma un enlace amida con el grupo carboxilo original, y se libera un subproducto EDC como un derivado de urea soluble. La N- hidroxisuccinimida (NHS) a menudo se incluye en los protocolos de acoplamiento EDC para mejorar la eficiencia o crear productos intermedios estables en seco, así, el EDC acopla el NHS a los carboxilos, formando un éster del NHS que es considerablemente más estable que el intermedio O-acilousarea mientras que permite una conjugación eficiente con aminas primarias a pH fisiológico (Ulrich, 2007), de este modo, dicha reacción puede ser utilizada en la fabricación de nanopartículas de fibroína con el fin de aprovechar los ácidos carboxílicos presentes en las moléculas de ácido fólico, y las aminas

terminales de la fibroína, disponibles principalmente en sus residuos reactivos (Murphy & Kaplan, 2009).

1.3.4 Ácido fólico

El ácido fólico (FA) es un cofactor soluble en agua de varias enzimas. Las plantas y las bacterias son capaces de sintetizar folato; sin embargo, los seres humanos y otros animales son incapaces de sintetizar ácido fólico; en consecuencia, es un nutriente esencial (Donnelly, 2001); y es una de las biomoléculas dirigidas a células cancerosas con alto receptor sobre expresado para evitar la barrera de membrana formidable de tumores con vasculatura mal formada. Como tipo de vitamina, el FA es esencial para la biosíntesis de bases de nucleótidos y la proliferación celular, y se transporta utilizando las proteínas asociadas a las membranas celulares o el receptor de ácido fólico (FR) mediante endocitosis mediada por receptores. Los FR tiene sobreexpresión en varios carcinomas humanos, incluidos los de mama, ovario, riñón, pulmón, etc. y se considera una plataforma diana específica del tumor debido a su accesibilidad a fármacos intravenosos. Debido al alto nivel de expresión de FR en tejidos cancerosos se ha relacionado directamente con la supervivencia de las células cancerosas en la quimioterapia estándar, por lo tanto, la selectividad del cáncer al FA y conjugados de FA se puede considerar como un enfoque potente en la administración dirigida basada en NP de agentes terapéuticos contra el cáncer en el diagnóstico y la terapia del cáncer (Narmani et al., 2019).

1.3.4.1 Química

El ácido fólico se deriva de tres estructuras químicas distintas. Estos son el anillo de pteridina, 6-metilpterina, ácido p-aminobenzoico (PABA) y ácido glutámico. El número de residuos de glutamato varía ampliamente en los folatos naturales. Se pueden unir más de ocho residuos de glutamato al ácido pterico en un enlace peptídico modificado en el grupo α -amino y γ -carboxi. Se cree que las especies de folato poliglutamato tienen mayor afinidad por las enzimas que utilizan folato como cofactor, aunque otra razón importante para la existencia de especies poliglutamadas es la retención intracelular (Shane, 1989).

El folato existe en varios estados oxidativos, cada uno de los cuales es esencial para el papel de este cofactor en el metabolismo, dentro de estos está la reducción intracelular de la porción pirazina del anillo de pteridina que conduce a la formación de dihidrofolato seguido de tetrahidrofolato, estas reacciones son catalizadas por una dihidrofolato reductasa específica de Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Donnelly, 2001).

1.3.4.2 Absorción, transporte y distribución

Los seres humanos son incapaces de realizar una síntesis de folato o de almacenar suministros apreciables a largo plazo; por lo tanto, dependemos de un suministro frecuente y adecuado en nuestras dietas. La deficiencia de folato se desarrolla relativamente rápido con respecto a otros nutrientes como la cobalamina. La absorción de folato está íntimamente ligada tanto a su distribución como a su metabolismo. Los estudios sobre la absorción de folato se han complicado por el uso de varios derivados con diferente biodisponibilidad en relación con las formas dietéticas naturales de este cofactor. Algunos estudios han utilizado derivados de folato que normalmente no se encuentran en cantidades apreciables en los alimentos naturales. Muchos otros compuestos son inestables y pueden degradarse en el intestino o tener una biodisponibilidad limitada, por otro lado, dicha absorción se ve afectada por el estado fisiológico, incluida la edad y el embarazo, el uso de drogas y numerosas enfermedades (Seyoum & Selhub, 1998).

El transporte de folato se puede descomponer en transporte pasivo y activo en el intestino. El componente de transporte activo es probablemente el más importante en base a los efectos observados de la deficiencia de folato en humanos con malabsorción congénita, por otro lado, el transporte pasivo por sí solo es incapaz de mantener los niveles de folato en humanos (Malatack, J. J., Moran, M. M., & Moughan, 1999). El transporte activo de folato en el intestino, además de la difusión pasiva, es probablemente necesario para prevenir la retrodifusión de especies de monoglutamilo (Blair et al., 1976).

1.3.4.3 Metabolismo

La importancia del folato en el mantenimiento del metabolismo de un solo carbono en las células ha dado como resultado un sistema de transporte y retención eficiente en las células. El transporte al interior de la célula se realiza mediante una de tres proteínas, el portador de folato reducido,

RFC1, un intercambiador de aniones, el receptor de folato (hFR) y el portador de folato de pH bajo. El hFR, también conocido como receptor alfa de folato, está anclado a la membrana celular con una cola de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y probablemente no forma un canal o una bomba transmembrana (Anderson et al., 1992). Suponiendo que esta proteína no se asocia con otros transportadores, su función en la entrega de folato al interior de la célula puede ser a través de la potocitosis. Se ha demostrado que esto ocurre en el túbulo proximal del riñón y otros tejidos. El metabolismo del folato utiliza complejos multienzimáticos. Se cree que esto se relaciona con el fenómeno de la canalización, que es la transferencia eficaz de un producto enzimático al sitio de unión al sustrato de una enzima asociada en el complejo sin equilibrar el sustrato con el entorno extraenzimático (Donnelly, 2001).

1.3.5 Inmovilización de moléculas sobre nanopartículas de fibroína

Muchos grupos químicamente activos, como grupos amino, grupos carboxilo y grupos sulfhidrilo, están presentes en la columna vertebral de la fibroína, y estos grupos pueden usarse para modificaciones químicas, que pueden dotar a las nanopartículas de algunas funciones avanzadas como inversión de carga, liberación controlada del fármaco y propiedad de dirección. Por ejemplo, para mejorar la propiedad de direccionamiento tumoral, Sun et al. prepararon nanopartículas cargados con fármaco y funcionalizaron aún más su superficie con ácido fólico a través de la reacción química entre los grupos amino de la fibroína de seda y los grupos carboxilo de las moléculas de ácido fólico. Las nanopartículas obtenidas podrían internalizarse específicamente por células tumorales sobreexpresadas por el receptor de folato y liberar el fármaco cargado de manera controlada. Además, encontraron que la funcionalización superficial mejoró significativamente el efecto quimioterapéutico y redujo los posibles efectos adversos del fármaco (Sun et al., 2019).

1.3.5.1 Técnicas utilizadas

El método de acoplamiento de carbodiimida con EDC permite que el grupo carboxilo del folato se conjugue covalentemente con el grupo amino de la fibroína. La química de EDC-NHS está bien establecida en la química orgánica y bioconjugada, y no solo se ha demostrado que funciona en

solución, sino también en superficies. El EDC es un agente de reticulación de longitud utilizado para acoplar grupos carboxilo a aminas primarias, típicamente mediante la formación de ésteres NHS reactivos con amina. El EDC reacciona con un carboxilo para formar un intermedio O-acil isourea reactivo con amina. Cuando este intermedio no encuentra una amina, hidrolizará y regenerará el grupo carboxilo. En presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS), se puede usar EDC para convertir grupos de ácido carboxílico en ésteres de NHS reactivos con amina. Esto se logra mezclando el EDC con una molécula que contiene ácido y agregando NHS (Bart et al., 2009).

1.3.5.2 Caracterización de la solución inmovilizada

La Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) se emplea en la caracterización de diferentes compuestos para identificar los grupos funcionales presentes en las muestras, esta técnica es sensible a la estructura ya que reflejan las vibraciones características de los grupos de átomos por lo que se emplean para identificar especialmente los grupos orgánicos (Chittur, 1998), también las bandas espectrales en los espectros vibracionales son específicas de una molécula y proporcionan información directa sobre la composición bioquímica, por otro lado, los picos de FTIR son relativamente estrechos y en muchos casos pueden estar asociados con la vibración de un enlace químico particular (o un solo grupo funcional) en la molécula (Movasaghi et al., 2008), teniendo en cuenta lo anterior, para el caso de la fibroína al realizar la espectroscopía infrarroja FTIR se espera observar las bandas de amina I, II y III las cuales, según lo reportado por (Subia et al., 2014) luego de la funcionalización presentan corrimiento, además de la ausencia de amina libre en la fibroína de seda funcionalizada, lo que sugiere que los grupos amino ($-NH_2$) se convierten en enlaces amida después de la conjugación con los ácidos carboxílicos ($-COOH$) del FA, por último, observan un pico grande y ancho que confirma la presencia de grupos hidroxilo ($-OH$) provenientes del FA.

REFERENCIAS

- Abbas, Z., & Rehman, S. (2018). An Overview of Cancer Treatment Modalities. *Neoplasms*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76558>
- American Cancer Society, Inc., 250 Williams St., NW, Atlanta, GA 30303-1002, (404) 320-3333. (2007). Global Facts and Figures 2007 Rev2P. In *American Cancer Society, Inc.* (Issue 700).

- Anderson, R. G. W., Kamen, B. A., Rothberg, K. G., & Lacey, S. W. (1992). Potocytosis: Sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science*, 255(5043), 410–411. <https://doi.org/10.1126/science.1310359>
- Bart, J., Tiggelaar, R., Yang, M., Schlautmann, S., Zuilhof, H., & Gardeniers, H. (2009). Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 9(24), 3481–3488. <https://doi.org/10.1039/b914270c>
- Berne B, P. R. (2000). Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology and physics. *Dover Publications*, 430.
- Blair, B. Y. J. A., Johnson, I. T., & Matty, A. J. (1976). ASPECTS OF INTESTINAL FOLATE TRANSPORT IN THE RAT. *The Journal of Physiology*, 197–208.
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(5), 631–651. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00044-3)
- Carino, G. P., Jacob, J. S., & Mathiowitz, E. (2000). Nanosphere based oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, 65(1–2), 261–269. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00247-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00247-3)
- Chen, M., Shao, Z., & Chen, X. (2012). Paclitaxel-loaded silk fibroin nanospheres. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 100 A(1), 203–210. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33265>
- Chittur, K. K. (1998). FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, 19(4–5), 357–369. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00223-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00223-8)
- DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), 8643–8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>
- Din, F. ud, W, Aman, A., Ullah, I., Qureshi, O. S., Mustapha, O., Shafique, S., & Zeb, A. (2017). Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 7291–7309.

- Donnelly, J. G. (2001). Folic acid. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(3), 183–223. <https://doi.org/10.1080/20014091084209>
- Dorai, T., & Aggarwal, B. B. (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Letters*, 215(2), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.07.013>
- Estanqueiro, M., Amaral, M. H., Conceição, J., & Sousa Lobo, J. M. (2015). Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126(2015), 631–648. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.041>
- Fernández, M., Javaid, F., & Chudasama, V. (2018). Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. *Chemical Science*, 9(4), 790–810. <https://doi.org/10.1039/c7sc04004k>
- Foo, C. W. P., Bini, E., Hensman, J., Knight, D. P., Lewis, R. V., & Kaplan, D. L. (2006). Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 82(2), 223–233. <https://doi.org/10.1007/s00339-005-3426-7>
- HALL, J. B., DOBROVOLSKAIA, M. A., PATRI, A. K., & MCNEIL, S. E. (2007). Characterization of Nanoparticles for Therapeutics: Physicochemical Characterization. *Future Medicine*, 2, 789–803.
- Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., & Bao, G. (2016). The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine*, 11(6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nmm.16.5>
- Jin, H. J., Fridrikh, S. V., Rutledge, G. C., & Kaplan, D. L. (2002). Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*, 3(6), 1233–1239. <https://doi.org/10.1021/bm025581u>
- Kratz, F., & Beyer, U. (1998). Serum proteins as drug carriers of anticancer agents: A review. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 5(4), 281–299. <https://doi.org/10.3109/10717549809065759>
- Kumar, P., Raza, K., Kaushik, L., Malik, R., Arora, S., & Katare, O. (2016). Role of Colloidal

- Drug Delivery Carriers in Taxane-mediated Chemotherapy: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 22(33), 5127–5143. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160524144926>
- Kundu, J., Chung, Y. Il, Kim, Y. H., Tae, G., & Kundu, S. C. (2010). Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *International Journal of Pharmaceutics*, 388(1–2), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.12.052>
- Kundu, J., Dewan, M., Ghoshal, S., & Kundu, S. C. (2008). Mulberry non-engineered silk gland protein vis-à-vis silk cocoon protein engineered by silkworms as biomaterial matrices. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(7), 2679–2689. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3398-1>
- Lammel, A. S., Hu, X., Park, S. H., Kaplan, D. L., & Scheibel, T. R. (2010). Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*, 31(16), 4583–4591. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.024>
- Li, H., Tian, J., Wu, A., Wang, J., Ge, C., & Sun, Z. (2016). Self-assembled silk fibroin nanoparticles loaded with binary drugs in the treatment of breast carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4373–4380. <https://doi.org/10.2147/IJN.S108633>
- Li, M., Tao, W., Lu, S., & Zhao, C. (2008). Porous 3-D scaffolds from regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin. *Polymers for Advanced Technologies*, 19(3), 207–212. <https://doi.org/10.1002/pat.998>
- Li, M. Y., Zhao, Y., Tong, T., Hou, X. H., Fang, B. S., Wu, S. Q., Shen, X. Y., & Tong, H. (2013). Study of the degradation mechanism of Chinese historic silk (*Bombyx mori*) for the purpose of conservation. *Polymer Degradation and Stability*, 98(3), 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.12.021>
- Linder, C., & Markus, A. (2005). *Advances in the Technology for Controlled-Release Pesticide Formulations*. 55–77. <https://doi.org/10.1201/9781420027990.ch2>
- Malatack, J. J., Moran, M. M., & Moughan, B. (1999). *Isolated Congenital Malabsorption of Folic Acid in a Male Infant: Insights Into Treatment and Mechanism of Defect*. 104, 749–754.

- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(3), 585–594. <https://doi.org/10.1189/jlb.0205074>
- Meinel, L., & Kaplan, D. L. (2012). Silk constructs for delivery of musculoskeletal therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(12), 1111–1122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.03.016>
- Ministerio de Salud. (2020). *33 mil personas al año mueren de Cáncer en Colombia*. 49(2), 193. <https://doi.org/10.15036/arerugi.49.193>
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134–179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- Murphy, A. R., & Kaplan, D. L. (2009). Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *Journal of Materials Chemistry*, 19(36), 6443–6450. <https://doi.org/10.1039/b905802h>
- Narmani, A., Rezvani, M., Farhood, B., Darkhor, P., Mohammadnejad, J., Amini, B., Refahi, S., & Abdi Goushbolagh, N. (2019). Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug Development Research*, 80(4), 404–424. <https://doi.org/10.1002/ddr.21545>
- National Cancer Institute. (2020). *Types of Cancer Treatment*. 1–2.
- Nguyen, T. P., Nguyen, Q. V., Nguyen, V., Le, T., & Le, Q. Van. (2019). Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical. *Polymers*, 11(12), 1–25.
- Pham, D. T., & Tiyaboonchai, W. (2020). Fibroin nanoparticles: a promising drug delivery system. In *Drug Delivery* (Vol. 27, Issue 1, pp. 431–448). <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1736208>
- Qu, J., Liu, Y., Yu, Y., Li, J., Luo, J., & Li, M. (2014). Silk fibroin nanoparticles prepared by electrospray as controlled release carriers of cisplatin. *Materials Science and Engineering C*, 44, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.034>

- Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nature Protocols*, *6*(10), 1612–1631. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>
- Selvamuthukumar, S., & Velmurugan, R. (2012). Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids in Health and Disease*, *11*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-159>
- Seyoum, E., & Selhub, J. (1998). Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *Journal of Nutrition*, *128*(11), 1956–1960. <https://doi.org/10.1093/jn/128.11.1956>
- Shane, B. (1989). Folylpolyglutamate Synthesis and Role in the Regulation of One-Carbon Metabolism. *Vitamins and Hormones*, *45*(C), 263–335. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60397-0](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60397-0)
- Sidorin, I. I., Fridlyander, I. N., Silaeva, V. I., & Kuznetsova, E. A. (1963). Structure and properties of SAP-1. *Metal Science and Heat Treatment*, *5*(12), 711–713. <https://doi.org/10.1007/BF00673590>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, *458*(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
- Subia, B., Chandra, S., Talukdar, S., & Kundu, S. C. (2014). Folate conjugated silk fibroin nanocarriers for targeted drug delivery. *Integrative Biology (United Kingdom)*, *6*(2), 203–214. <https://doi.org/10.1039/c3ib40184g>
- Sun, N., Lei, R., Xu, J., Kundu, S. C., Cai, Y., Yao, J., & Ni, Q. (2019). Fabricated porous silk fibroin particles for pH-responsive drug delivery and targeting of tumor cells. *Journal of Materials Science*, *54*(4), 3319–3330. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-3022-9>
- Tsai, E. H. R., Bentz, B. Z., Chelvam, V., Gaiind, V., Webb, K. J., & Low, P. S. (2014). In vivo mouse fluorescence imaging for folate-targeted delivery and release kinetics. *Biomedical Optics Express*, *5*(8), 2662. <https://doi.org/10.1364/boe.5.002662>

- Ulrich, H. (2007). Chemistry and Technology of Carbodiimides. In *Chemistry and Technology of Carbodiimides*. <https://doi.org/10.1002/9780470516683>
- Vasir, J. K., & Labhasetwar, V. (2005). Targeted drug delivery in cancer therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 4(4), 363–374. <https://doi.org/10.1177/153303460500400405>
- Wang, X., Wenk, E., Matsumoto, A., Meinel, L., Li, C., & Kaplan, D. L. (2007). Silk microspheres for encapsulation and controlled release. *Journal of Controlled Release*, 117(3), 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.11.021>
- Xia, W., & Low, P. S. (2010). Folate-targeted therapies for cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(19), 6811–6824. <https://doi.org/10.1021/jm100509v>
- Yang, J., Chen, H., Vlahov, I. R., Cheng, J. X., & Low, P. S. (2006). Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), 13872–13877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601455103>
- Zhao, Z., Li, Y., & Xie, M. Bin. (2015). Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4880–4903. <https://doi.org/10.3390/ijms16034880>

Capítulo 2

FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA DE ADECUADA ESTABILIDAD

2.1 Introducción

La eficacia de los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento del cáncer se ve alterada por la falta de distribución específica a las células y por la resistencia a los fármacos, también algunos fármacos se ven limitados por su tiempo corto de distribución dentro de la circulación sanguínea y que estos son metabolizados rápidamente (Tian et al., 2014). Para superar estas limitaciones, se han desarrollado nanoportadores los cuales fueron reportados por primera vez alrededor de la década de 1970 por (Birrenbach & Speiser, 1976). Inicialmente eran sistemas de partículas coloidales con tamaños que iban desde 1 nm hasta 1000 nm, demostrando características únicas debido a su tamaño, estos sistemas son de gran interés por su capacidad para usarse como un vehículo para promover la eficacia de los fármacos, mejorando la distribución de medicamentos a ubicaciones específicas, además, tienen ventajas como la capacidad de focalización, reducción de resistencia al fármaco gracias a la administración intracelular, liberación controlada y sostenida que mejora la biodisponibilidad, el tiempo de retención y reducción de los riesgos de toxicidad (Zhao et al., 2015).

Durante las últimas décadas, se han desarrollado muchos sistemas eficaces de administración de fármacos por nanopartículas, éstas generalmente se pueden preparar utilizando varios tipos de materiales, como cerámica, carbono, metal, polímeros, micelas y dendrímeros (Arshady, 1990), así como también proteínas, que tienen un interés creciente en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos de nanopartículas debido a sus funcionalidades únicas, estos vehículos basados en proteínas son biodegradables, no antigénicos y poseen una excelente biocompatibilidad, además, las proteínas exhiben varios grupos funcionales y pueden desencadenar una respuesta biológica a las células (Lammel et al., 2010), una de las proteínas más usadas es la fibroína de seda, que es una biomacromolécula que se ha utilizado ampliamente en los campos biomédicos para fabricar películas, andamios tridimensionales (scaffolds), hidrogeles, fibras electrohiladas, microesferas e incluso nanopartículas. Su biodegradabilidad, excelente

biocompatibilidad, mejora de la adhesión y proliferación celular, potencial de modificación química y posibilidad de reticulación hacen de las nanopartículas basadas en fibroína un sistema prometedor de administración de fármacos (Zhao et al., 2015).

Existen varios métodos disponibles para la fabricación de nanopartículas de fibroína, como precipitación salina, congelación, desolvatación, trituración mecánica, electropulverización, etc. En este capítulo se desarrollan dos técnicas para la obtención de nanopartículas, la primera es la precipitación salina, la cual utiliza el aumento de la concentración de sal para atraer algunas moléculas de agua a los iones de sal, lo que resulta en la eliminación de la barrera de agua entre las moléculas de proteína y en el aumento de las interacciones proteína-proteína, por lo tanto, las moléculas de fibroína se agregan formando interacciones hidrofóbicas entre sí y precipitando de la solución (Zhao et al., 2015); el segundo método es la congelación, el cual es un proceso sencillo y económico que utiliza etanol como aditivo para la formación de nanopartículas (Chen et al., 2012).

2.2 Metodología

A continuación, se describen las actividades realizadas durante el desarrollo de este objetivo:

2.2.1 Extracción y solubilización de fibroína a partir de capullos de gusano de seda *Bombix Mory*.

Para la extracción de fibroína a partir del capullo del gusano de seda, se siguió el protocolo desarrollado por el Grupo de Investigación en Biomateriales (BioMat). Para lo cual, primero se cortaron y pesaron los capullos en pequeños fragmentos de aproximadamente 0.5 cm, luego se preparó una solución de carbonato de sodio en relación 2/5 del peso de los capullos, y esta solución fue llevada a 80°C, posteriormente se agregan los fragmentos de capullo manteniendo la temperatura en agitación constante durante 4.5 horas, al terminar este tiempo la fibroína obtenida se secó a 30°C durante 24 horas.

Para solubilizar la fibroína extraída, ésta se llevó a una solución ternaria de cloruro de calcio:etanol:agua (CaCl₂:EtOH:H₂O) en relación molar (1:2:8) bajo agitación constante a 60°C, por último, para eliminar el exceso de sales se realizó diálisis contra agua destilada por un tiempo de tres días. Todos los reactivos usados fueron de grado analítico.

2.2.2 Fabricación de las nanopartículas de fibroína.

Se planteó un diseño experimental basado en los protocolos de fabricación planteados por (Lammel et al., 2010) y (Chen et al., 2012) con modificaciones, los niveles de dicho diseño experimental se seleccionaron de acuerdo con las necesidades propias del proyecto.

2.2.2.1 Técnica de Precipitación salina.

En esta técnica se utilizó fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4) como electrolito para inducir la separación de fases entre la fibroína y el agua, para ello se prepararon 100ml de KH_2PO_4 1.25 M a pH 8, esta solución se mezcló con fibroína en solución variando las proporciones volumétricas desde 1:1 hasta 1:5; posteriormente, las partículas resultantes se almacenaron en el refrigerador durante 2 horas (3°C); seguido de esto, se llevaron a centrifugación a 2000 rpm por 15 minutos, finalmente se llevaron a diálisis contra agua destilada para eliminar el exceso de sales. El procedimiento se realizó para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml.

2.2.2.2 Técnica de Congelación.

Bajo esta técnica, se adicionó etanol a la solución de fibroína en relaciones 8:20 (v/v) y 4:20 (v/v) y se llevaron a agitación constante durante 2 minutos, seguido de esto, la mezcla se llevó a congelación a -15°C y -80°C durante 24 horas, posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente y las nanopartículas se recolectaron por centrifugación a 5000 rpm por 30 minutos. Para este método se utilizaron concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml, 1.5 mg/ml y 9 mg/ml.

2.2.3 Caracterización de las nanopartículas fabricadas

La primera caracterización constó de la evaluación de distribución de tamaño de partícula, la cual se llevó a cabo mediante dispersión de luz dinámica (DLS), obteniendo como variables de respuesta de interés la media de la población predominante y el índice de polidispersidad que describe la cantidad de material que hay presente en las distribuciones de diferentes tamaños, para esto se utilizó el equipo Zetasizer Lab seleccionando un índice de refracción de 1.45 para la

fibroína y de 1.33 para el dispersante, cada medida se realizó por triplicado, y el resultado se expresó como el promedio de dichas replicas junto a su desviación estándar.

Para observar la morfología de las nanopartículas se utilizó un equipo de microscopía electrónica de barrido SEM JEOL JSM-6490LV y se tomaron 2 micrografías de cada muestra a 8000X, 10000X, 15000X, 20000X y 40000X para las muestras preparadas por precipitación salina con relación SF/KH₂PO₄ 1:3, a concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml.

2.3 Resultados y Discusión

La formación de nanopartículas de fibroína con fosfato di ácido de potasio 1,25 M a pH 8, reveló partículas con tamaños entre 132 nm y 302 nm para concentración de fibroína de 0.15 mg/ml, y entre 214 nm y 407 nm para concentración de 1.5 mg/ml como se muestra en la **Figura 2. 1**. Estos resultados de tamaño de partícula obtenida son menores a los reportados por (Lammel et al., 2010) donde obtuvieron para el mismo método tamaños entre 486 nm y 1200 nm. En cuanto al índice de polidispersidad que se puede observar en la **Figura 2. 2**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, las muestras con concentración de 0.15mg/ml y relación Fibroína/KH₂PO₄ de 1:4 y 1:5 muestran valores por debajo de 0.4, es decir, una polidispersidad moderada, para las demás muestras este valor es superior a 0.4 por lo tanto la polidispersidad se considera amplia (Nobbmann, 2014), esto indica que presentan una mayor cantidad de poblaciones.

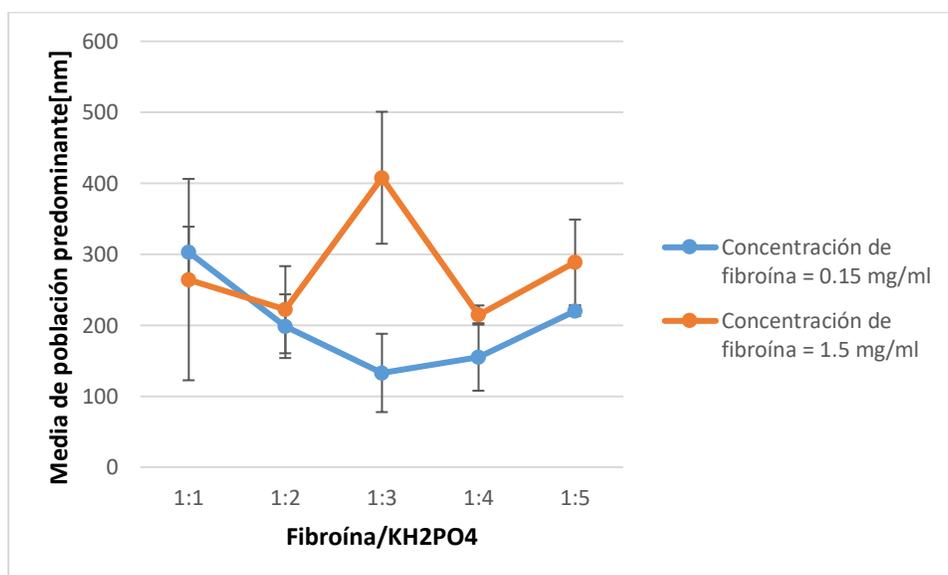


Figura 2. 1. Gráfica de Media de población predominante vs relación SF/KH₂PO₄ para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml, obtenida por el método de precipitación salina.

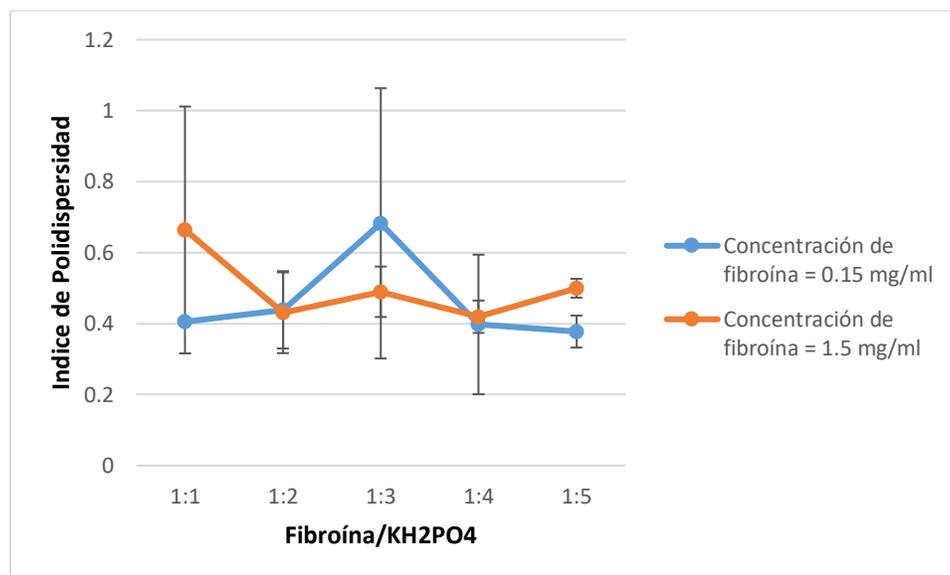


Figura 2. 2. Gráfica de índice de polidispersidad vs relación SF/KH₂PO₄ para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml, obtenida por el método de precipitación salina.

Para el método de congelación, los resultados mostrados en la **Figura 2. 3** presentan los tamaños de partícula obtenidos, donde éstos varían desde 262 nm hasta 611 nm para concentración de fibroína de 0.15 mg/ml, mientras que, para 1.5 mg/ml los tamaños varían desde 442 nm hasta 846 nm, por último, para 9 mg/ml se tiene un rango más amplio de tamaño, desde 72 nm hasta 2041 nm, con este último se logra observar un efecto contundente en la temperatura, esto debido a que para temperaturas de -15°C se tiene un rango tamaño más estrecho al variar la relación EtOH/Fibroína, entre 72 y 101 nm, siendo los más pequeños para este método, pero por otro lado, al disminuir la temperatura a -80°C se observa un efecto en el cambio de la relación EtOH/Fibroína con tamaños para la relación 8:20 de 2041 nm y de 592 nm para la relación 4:20.

En cuanto al índice de polidispersidad mostrado en la **Figura 2. 4**, para concentraciones altas de fibroína (9 mg/ml) se tienen valores más elevados y con polidispersidad amplia, al igual que 2 muestras obtenidas a -80°C, una con concentración de 0.15 mg/ml y relación EtOH 8:20 y la otra con concentración 1.5 mg/ml y relación EtOH 4:20, para el resto de las muestras este índice muestra una polidispersidad moderada al ser menores a 0.4, valores que se encuentran dentro de los rangos obtenidos por (Cao et al., 2007) donde reportaron valores que van desde 0.1 hasta 0.9.

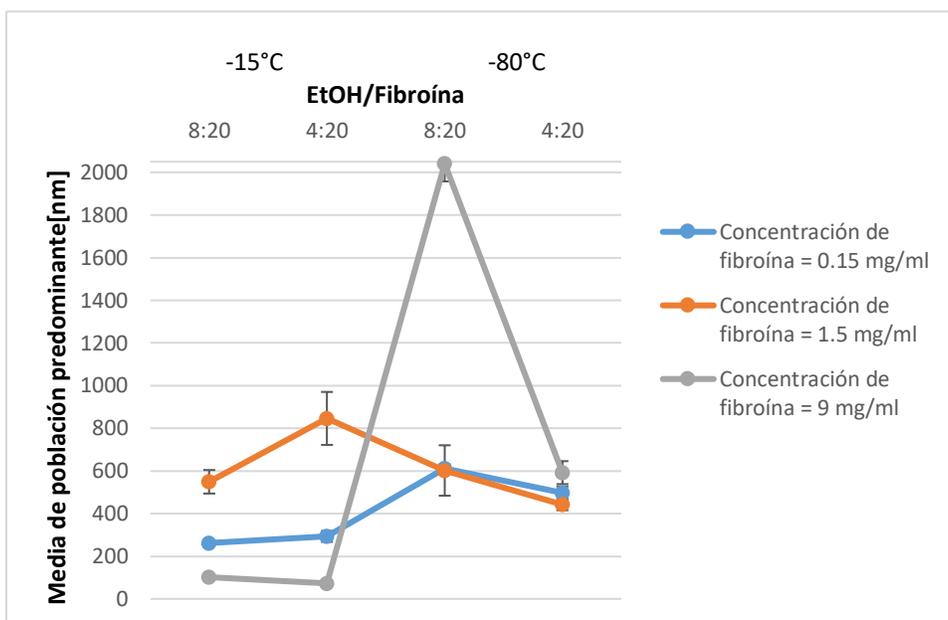


Figura 2. 3. Gráfica de Media de población predominante vs relación EtOH/SF para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml y temperaturas de -15°C y -80°C, obtenida por el método de congelación.

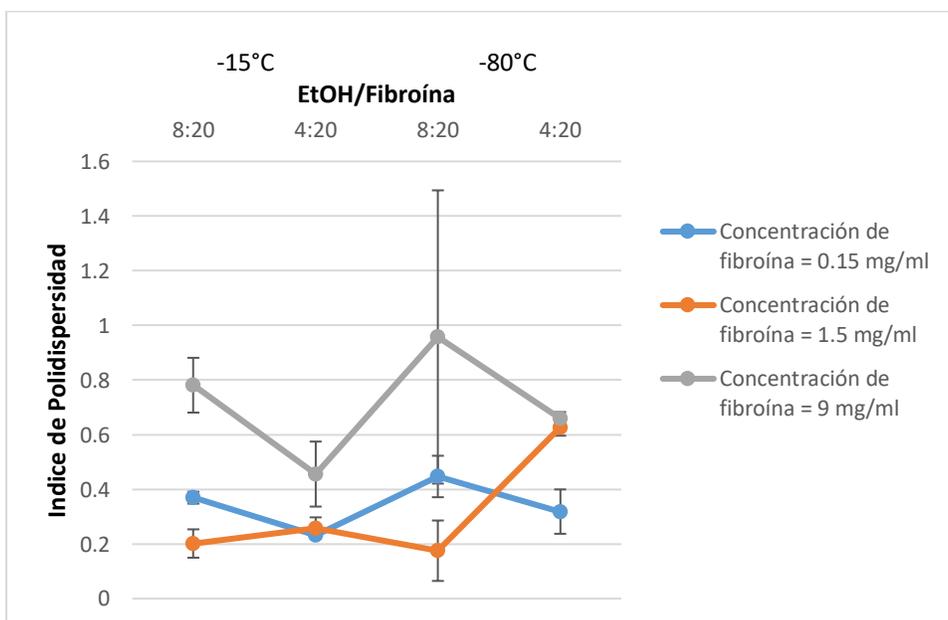


Figura 2. 4. Gráfica de índice de polidispersidad vs relación EtOH/SF para concentraciones de fibroína de 0.15 mg/ml y 1.5 mg/ml y temperaturas de -15°C y -80°C, obtenida por el método de congelación.

Para las partículas formadas por precipitación salina se observa una tendencia a tamaños más pequeños con concentraciones más pequeñas, esta variedad de tamaños se puede dar debido a que la diferencia de concentraciones es alta y esto puede conducir a la formación de aglomeraciones para concentraciones mayores, lo que el equipo toma como una partícula más grande, esta formación de partículas se basa en el efecto de sales kosmotrópicas como el fosfato de potasio. En un primer paso, las cadenas de proteínas forman estructuras similares a micelas debido al aumento de las interacciones hidrofóbicas y dependiendo de la conformación estructural de la fibroína de seda predeterminada por el pH se forman diferentes estructuras micelares con diferentes densidades de empaquetamiento, en un segundo paso, las micelas forman glóbulos particulados por interacciones hidrófobas adicionales, tal como lo ha reportado (Lammel et al., 2010).

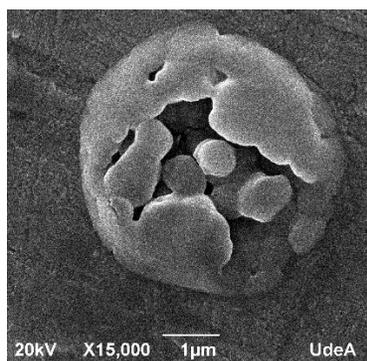
Las micelas formadas a pH 8 tienen un empaquetamiento menos denso que las producidas a pH ácido esto se da porque todas las cadenas laterales de aminoácidos cargados, excepto el extremo C-terminal, están cargadas negativamente, lo que da como resultado una conformación molecular bastante alargada en solución debido a las interacciones carga-carga repulsivas a lo largo de la cadena principal del biopolímero, por lo tanto, es posible un empaquetamiento más apretado de las micelas en las partículas debido a interacciones hidrófobas adicionales, que podrían conducir a la mayor estabilidad química, como lo ha reportado (Terry et al., 2004).

Las nanopartículas obtenidas por congelación presentan un comportamiento similar al descrito anteriormente en precipitación salina para las concentraciones de 1.5 mg/ml y 0.15 mg/ml, pero para mayores concentraciones (9 mg/ml) hay un comportamiento diferente para aquellas formadas a -15°C donde las partículas presentaron un tamaño aún más pequeño, esto puede darse porque al terminar el proceso de congelación la mayor parte de la proteína formó coágulos, los cuales se descartaron luego de centrifugación, quedando menor cantidad de proteína en suspensión y pudo inducir a una menor aglomeración de partículas, lo que se vio reflejado en tamaños más pequeños.

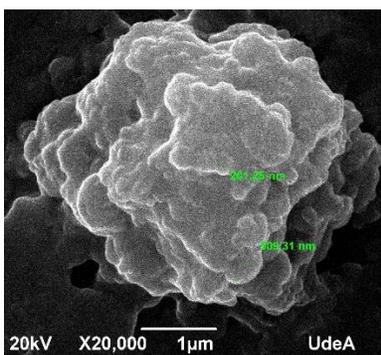
La formación de partículas por este método se da gracias a que en la solución de fibroína los segmentos hidrófobos y los segmentos hidrófilos se dispersan al azar, por lo tanto, las moléculas de fibroína son fáciles de agregar por estímulos físicos o químicos, como vibración, agitación y adición de disolventes orgánicos. Teniendo en cuenta lo anterior, es bien sabido que el etanol es miscible con agua en cualquier proporción, pero es un mal solvente para la fibroína, por esta razón

al agregar etanol a la solución de fibroína, las cadenas moleculares de fibroína pueden interactuar entre sí, formando eventualmente un gel físicamente reticulado y cuando se congela la solución, las partículas en gel se comprimen hasta formar un sólido y se evita una mayor agregación, por lo tanto, el tamaño de las microesferas se atribuye a la cinética de la cristalización de la fibroína, tal como lo reporta (Cao et al., 2007).

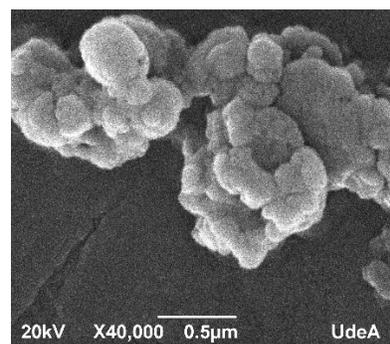
La figura **Figura 2. 5** muestra las fotografías SEM de nanopartículas de fibroína obtenidas por precipitación salina con relación SF/KH₂PO₄ 1:3, donde se puede observar que estas poseen mayoritariamente geometría esférica como se ha reportado previamente en otros estudios (Cao et al., 2007; Sun et al., 2019), también la **Figura 2. 5 (A)** y **(D)** muestra que para ambas concentraciones de fibroína se logran formar microencapsulados de aproximadamente 4.5 μ m con partículas entre 650nm y 700nm respectivamente, por otro lado, la **Figura 2. 5 (B)**, **(C)**, **(E)** y **(F)** muestra aglomeraciones conformadas por partículas de 200nm, 250nm, 800nm y 900nm respectivamente, donde se observa que a concentraciones más altas se obtienen partículas de tamaños más grandes, en cuanto a las aglomeraciones presentadas estas pueden ser causadas porque al secar las partículas estas pierden la estabilidad dada por la propiedad anfifílica de la fibroína en ambientes acuosos (Cao et al., 2007).



(A)



(B)



(C)

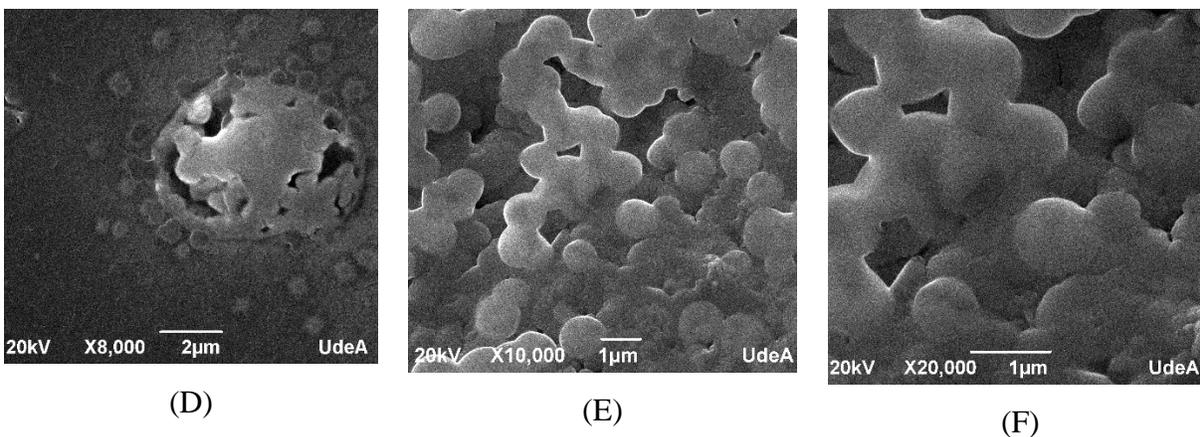


Figura 2. 5. Imágenes SEM de nanopartículas de fibroína fabricadas por el método de precipitación salina con relación SF/KH₂PO₄ 1:3, a diferentes concentraciones: 0.15 mg/ml (A, B y C) y 1.5 mg/ml (D, E y F).

2.4 Conclusiones

El proceso de obtención de nanopartículas de fibroína por los dos métodos propuestos se logró con éxito, obteniendo nanopartículas dentro de los valores reportados por la literatura que van desde 1 nm hasta 1000nm (Pham & Tiyaboonchai, 2020), para este capítulo se logran realizar las siguientes conclusiones:

- Al tener mayor concentración de fibroína se puede inducir a mayor cantidad de aglomeraciones lo que se ve reflejado en tamaños de partícula más grandes.
- Teniendo en cuenta el proceso de formación de partículas para ambos métodos, precipitación salina sería el método con el cual se obtienen partículas de mejor estabilidad, esto debido a que a pH 8 se obtienen partículas cargadas negativamente en su superficie y mayor empaquetamiento.
- En cuanto al tamaño de partícula, a pesar de obtener tamaños aparentemente más pequeños para congelación a concentración de 9 mg/ml, este proceso también induce a una pérdida más grande de proteína debido a la coagulación de la proteína.
- Las partículas obtenidas por precipitación salina con una relación SF/KH₂PO₄ de 1:3 y concentración de fibroína de 0.15 mg/ml, con tamaños inferiores a 200nm, son las ideales

para prolongar su duración en circulación sanguínea tal como lo reporta (Pham & Tiyaboonchai, 2020).

- El índice de polidispersidad para la muestra escogida se puede mejorar mediante filtraciones que ayuden a obtener tamaños de partícula monodispersos o con polidispersidad moderada.

REFERENCIAS

- Arshady, R. (1990). Review : Biodegradable Microcapsular Drug Delivery Systems: Manufacturing Methodology, Release Control and Targeting Prospects. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 5(3), 315–342.
<https://doi.org/10.1177/088391159000500308>
- Birrenbach, G., & Speiser, P. P. (1976). Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(12), 1763–1766.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600651217>
- Cao, Z., Chen, X., Yao, J., Huang, L., & Shao, Z. (2007). The preparation of regenerated silk fibroin microspheres. *Soft Matter*, 3(7), 910–915. <https://doi.org/10.1039/b703139d>
- Chen, M., Shao, Z., & Chen, X. (2012). Paclitaxel-loaded silk fibroin nanospheres. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 100 A(1), 203–210.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.33265>
- Lammel, A. S., Hu, X., Park, S. H., Kaplan, D. L., & Scheibel, T. R. (2010). Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*, 31(16), 4583–4591.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.024>
- Nobbmann, U. (2014). *Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography?* Malvern Instruments. <http://www.materials-talks.com/blog/2014/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/>
- Pham, D. T., & Tiyaboonchai, W. (2020). Fibroin nanoparticles: a promising drug delivery system. In *Drug Delivery* (Vol. 27, Issue 1, pp. 431–448).

<https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1736208>

- Sun, N., Lei, R., Xu, J., Kundu, S. C., Cai, Y., Yao, J., & Ni, Q. (2019). Fabricated porous silk fibroin particles for pH-responsive drug delivery and targeting of tumor cells. *Journal of Materials Science*, 54(4), 3319–3330. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-3022-9>
- Terry, A. E., Knight, D. P., Porter, D., & Vollrath, F. (2004). pH induced changes in the rheology of silk fibroin solution from the middle division of *Bombyx mori* silkworm. *Biomacromolecules*, 5(3), 768–772. <https://doi.org/10.1021/bm034381v>
- Tian, Y., Jiang, X., Chen, X., Shao, Z., & Yang, W. (2014). Doxorubicin-loaded magnetic silk fibroin nanoparticles for targeted therapy of multidrug-resistant cancer. *Advanced Materials*, 26(43), 7393–7398. <https://doi.org/10.1002/adma.201403562>
- Zhao, Z., Li, Y., & Xie, M. Bin. (2015). Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4880–4903. <https://doi.org/10.3390/ijms16034880>

Capítulo 3

INMOVILIZACIÓN DE FOLATO SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA

3.1 Introducción

La selección del tratamiento utilizado para combatir las células tumorales depende del tipo de cáncer, su ubicación y etapa de progresión. La cirugía, la radiación, la quimioterapia y la radioterapia son algunos de los métodos de tratamiento tradicionales más utilizados, en el caso de la Quimioterapia, esta puede eliminar de manera eficaz las células cancerosas, sin embargo, algunos medicamentos se degradan e inactivan dentro del organismo, por esto para mantener una concentración eficaz del fármaco en el cuerpo se han diseñado transportadores como las nanopartículas tratadas en el capítulo anterior, ayudando a que el fármaco pueda existir de manera estable en el entorno sanguíneo (Min et al., 2008). Aunque estos vehículos mejoran la estabilidad de los fármacos in vivo, también enfrentan dificultades para poder ingresar de manera efectiva en las células tumorales, lo que trae efectos secundarios graves debido a la quimioterapia, para esto se utiliza la vectorización de los portadores de fármacos. La ventaja de los sistemas de administración con diana es su capacidad de administrar el fármaco al sitio del tumor con una concentración de medicamento óptima al alcanzar las células tumorales, reduciendo así el efecto citotóxico sobre las células normales (Sun et al., 2019).

La sobreexpresión del receptor de folato en la superficie de las células cancerosas permite que los portadores cuya superficie tiene ácido fólico se unan al receptor de folato mediante endocitosis mediada por receptores, esto permite que el portador del fármaco entre en la célula cancerosa (Xu et al., 2013).

Para obtener ácido fólico en la superficie del portador de fármacos es necesaria la modificación química del material, en el caso de la fibroína una de las técnicas más utilizadas es la modificación por medio de la reacción de acople de carbodiimida, el cual es un método estándar utilizado para hacer reaccionar aminas primarias con ácidos carboxílicos, lo que da como resultado la formación de un enlace diimida. Esta reacción tiene un amplio uso en la química de las proteínas, ya que muchas contienen estos grupos funcionales en sus cadenas laterales de aminoácidos o en los

extremos N y C terminales; en el caso de la fibroína, ésta contiene un buen número de ácidos aspártico y glutámico, así como una pequeña cantidad de residuos de lisina que puede participar en esta reacción (Murphy & Kaplan, 2009).

En el desarrollo de este objetivo se realizó la funcionalización tanto de nanopartículas de fibroína como lo han tratado algunos autores anteriormente y se propuso para este estudio funcionalizar también la proteína en solución, ambas por el método de carbodiimida, donde se corroboró el éxito de dicha reacción mediante la técnica de Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR).

3.2 Metodología

3.2.1 Funcionalización de folato sobre las nanopartículas de fibroína.

Para funcionalizar las nanopartículas de fibroína se planteó la ruta de la carbodiimida, la cual ha sido probada con éxito para la inmovilización de diferentes moléculas bioactivas sobre proteínas a través de sus aminas terminales (Murphy & Kaplan, 2009), (Raghunath et al., 1983), para el cumplimiento de este objetivo se propusieron dos métodos de funcionalización, donde se partió del protocolo propuesto por (Yao et al., 2017), primero, se agregó el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y la N-hidroxisuccinimida (NHS) al ácido fólico (FA) en solución en relación molar 1.2:1.2:1, esta reacción se dejó actuar por 2 horas para activar los grupos carboxílicos del ácido fólico, una vez terminada la activación, el ácido fólico activo se puso en reacción con las nanopartículas de fibroína en relación 3:40 m:m durante un tiempo aproximado de 17 horas, una vez terminado este proceso, las nanopartículas funcionalizadas se llevaron a diálisis contra agua destilada durante tres días para eliminar todo exceso de sales, finalmente las nanopartículas se recuperaron con liofilización.

El segundo método se realizó siguiendo los mismos pasos del anterior, en el cual se aprovecha los ácidos carboxílicos del ácido fólico según el esquema mostrado en la **Figura 3. 1**, pero en lugar de funcionalizar las nanopartículas se propuso funcionalizar la fibroína en solución, esto para aprovechar la estructura extendida de la fibroína y así tener mas puntos reactivos en su cadena, luego con la fibroína funcionalizada se fabricaron las nanopartículas con el protocolo optimizado

del capítulo anterior, para obtener parte del ácido fólico al interior de las partículas, así, cuando estas se degraden habrá ácido fólico disponible.

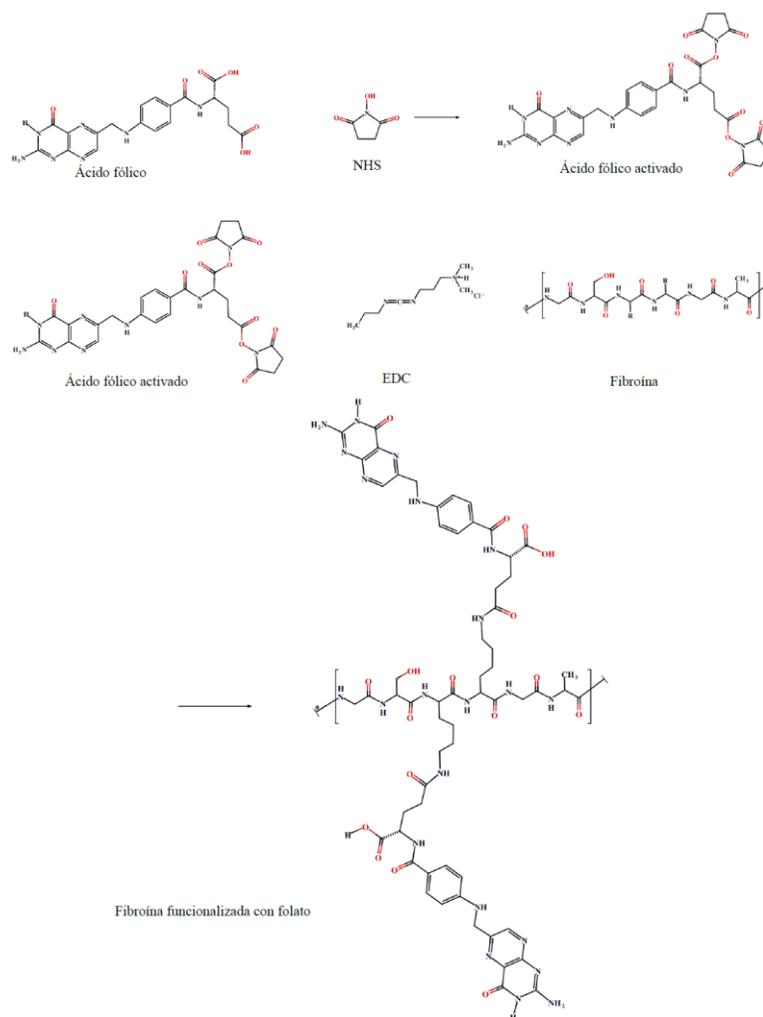


Figura 3. 1. Inmovilización de ácido fólico sobre fibroína en solución (Esquema propio).

3.2.2 Caracterización de la solución funcionalizada.

Para analizar la configuración estructural de la proteína y para la verificación de la funcionalización siguiendo la formación de enlaces amida se utilizó Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) utilizando un equipo SHIMATZU IR-TRACER 100, para este propósito, se barrió el rango espectral entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} durante 24 ciclos.

3.3 Resultados y Discusión

Los espectros FTIR del ácido fólico, la fibroína y la fibroína funcionalizada se muestran en la **Figura 3. 2**, para el caso de la fibroína se ilustra la presencia de una banda de amida A (3275.1 cm^{-1}) junto con las bandas de amida I, II y III (1616.3 , 1508.3 , 1226.7 cm^{-1}), además se muestra el espectro correspondiente al ácido fólico el cual muestra un pico en 3283 cm^{-1} , relacionados con los movimientos en fase y desfase de los grupos $-\text{NH}$ y extensión de los grupos $-\text{OH}$, también se observa un pico a 1631 cm^{-1} para los grupos de ácido carboxílico (Jalilian et al., 2011), por último, se tiene el espectro de la fibroína funcionalizada que revelan la formación de enlaces amida en presencia de EDC-NHS que actúa como agente de acoplamiento. Las bandas de amida I, II y III en la fibroína funcionalizada se registran a 1624 , 1515 y 1236 cm^{-1} , respectivamente, estos corrimientos sugieren la posible formación de nuevos enlaces amida como los reportados por (Subia et al., 2014), finalmente, un pico más agudo a 3273 cm^{-1} , posiblemente debido a que la fuerza del enlace $-\text{OH}$ cambió, este cambio en el ancho se dan como consecuencia del debilitamiento de la constante de fuerza en el enlace covalente en el que participa el H donador, generando la transformación de este.

Por otro lado, la absorción a 924 cm^{-1} para la fibroína funcionalizada en comparación con la fibroína podría atribuirse a la reacción entre los ácidos carboxílicos ($-\text{COOH}$) y las aminas terminales ($-\text{NH}_2$), también la banda de absorción de amida V a 669 cm^{-1} de la fibroína cambió a un número de onda menor, 544 cm^{-1} en la fibroína funcionalizada, lo que sugiere que el entorno químico de los enlaces amida que se formaron por la reacción de acople entre los grupos $-\text{COOH}$ y los grupos $-\text{NH}_2$ fue significativamente diferente de la de los enlaces peptídicos en las principales cadenas de la fibroína (Yu et al., 2016). Estos resultados muestran que si existe una modificación en la estructura del material.

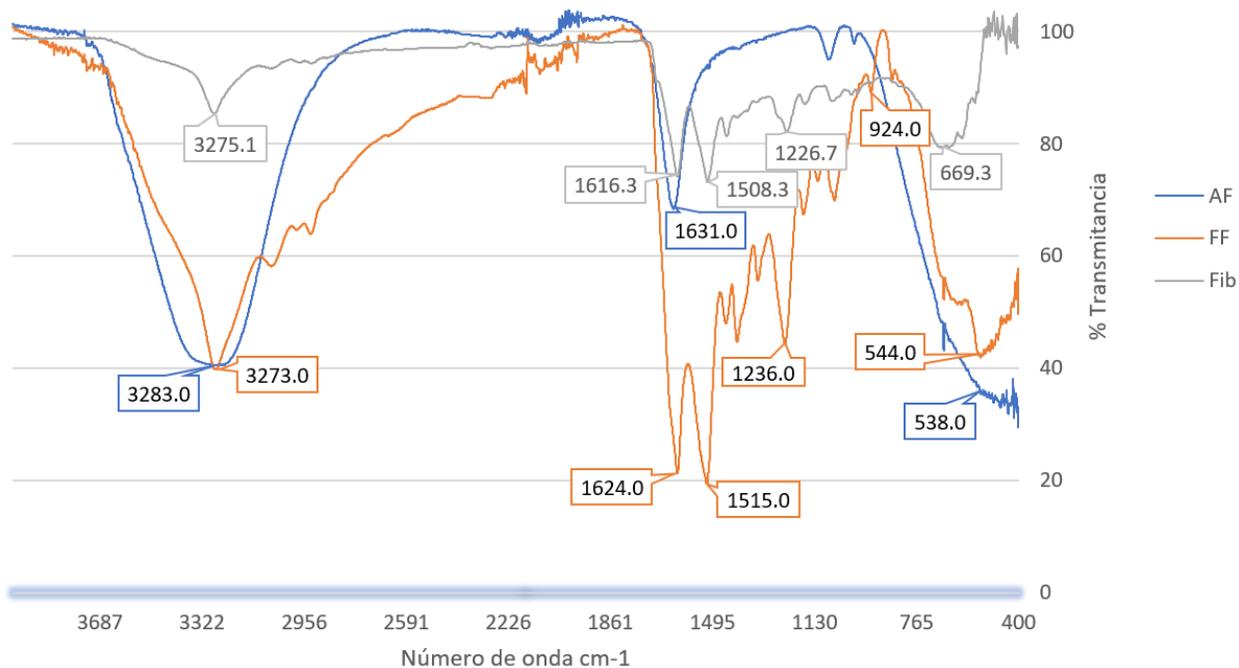


Figura 3. 2. Espectros FTIR de AF: ácido fólico, FF: fibroína funcionalizada y Fib: fibroína.

3.4 Conclusiones

Según los resultados obtenidos para la funcionalización de la fibroína se plantean las siguientes conclusiones:

- La funcionalización de la fibroína con el ácido fólico fue exitosa esto debido al análisis por FTIR, el cual indicó que si se dio la reacción entre $-NH_2$ y $-COOH$ en presencia de EDC-NHS.
- Funcionalizar la fibroína en solución presenta ventajas frente a la funcionalización de las nanopartículas, debido a que este último solo garantiza el acople con ácido fólico en la superficie de las nanopartículas, mientras que, para el caso de la fibroína en solución el acople se hace en todo el material.

REFERENCIAS

Jalilian, A. R., Hosseini-Salekdeh, S. L., Mahmoudi, M., Yousefnia, H., Majdabadi, A., &

- Pouladian, M. (2011). Preparation and biological evaluation of radiolabeled-folate embedded superparamagnetic nanoparticles in wild-type rats. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 287(1), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s10967-010-0661-y>
- Min, K. H., Park, K., Kim, Y. S., Bae, S. M., Lee, S., Jo, H. G., Park, R. W., Kim, I. S., Jeong, S. Y., Kim, K., & Kwon, I. C. (2008). Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 127(3), 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.01.013>
- Murphy, A. R., & Kaplan, D. L. (2009). Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *Journal of Materials Chemistry*, 19(36), 6443–6450. <https://doi.org/10.1039/b905802h>
- Raghunath, K., Biswas, G., Rao, K. P., Joseph, K. T., & Chvapil, M. (1983). Some characteristics of collagen-heparin complex. *Journal of Biomedical Materials Research*, 17(4), 613–621. <https://doi.org/10.1002/jbm.820170406>
- Subia, B., Chandra, S., Talukdar, S., & Kundu, S. C. (2014). Folate conjugated silk fibroin nanocarriers for targeted drug delivery. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 6(2), 203–214. <https://doi.org/10.1039/c3ib40184g>
- Sun, N., Lei, R., Xu, J., Kundu, S. C., Cai, Y., Yao, J., & Ni, Q. (2019). Fabricated porous silk fibroin particles for pH-responsive drug delivery and targeting of tumor cells. *Journal of Materials Science*, 54(4), 3319–3330. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-3022-9>
- Xu, S., Olenyuk, B. Z., Okamoto, C. T., & Hamm-Alvarez, S. F. (2013). Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: Rationale and advances. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.041>
- Yao, W., Zha, Q., Cheng, X., Wang, X., Wang, J., & Tang, R. (2017). Folic acid-conjugated soybean protein-based nanoparticles mediate efficient antitumor ability in vitro. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(6), 832–843. <https://doi.org/10.1177/0885328216679571>
- Yu, Y., Hu, Y., Li, X., Liu, Y., Li, M., Yang, J., & Sheng, W. (2016). Spermine-modified

Antheraea pernyi silk fibroin as a gene delivery carrier. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 1013–1023. <https://doi.org/10.2147/IJN.S82023>

Capítulo 4

EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL FOLATO INMOVILIZADO.

4.1 Introducción

Como se ha mencionado en capítulos anteriores la nanotecnología se ha utilizado en la mejora de la quimioterapia convencional para el tratamiento del cáncer, esto debido a que las partículas a nano escala llegan al sitio objetivo con una concentración adecuada para destruir las células enfermas mientras se minimiza el daño a las células normales, también se ha hablado de las nanopartículas fabricadas a partir de la fibroína de seda, una proteína natural que tiene varios grupos amino terminales activos que ayudan a la conjugación del fármaco y otras macromoléculas, el recubrimiento o conjugación con moléculas de direccionamiento como el ácido fólico a la fibroína de seda supera las principales deficiencias de las nanopartículas aumentando la especificidad de éstas para la unión a la superficie celular por medio de los receptores de folato.

Por otro lado, el ácido fólico se conjuga con la fibroína para aumentar aún más la especificidad y la entrega dirigida de las nanopartículas, ya que éste juega un papel fundamental para la síntesis de nucleótidos, lo que promueven la rápida proliferación de células y tejidos, esto incluye etapas avanzadas del cáncer y también es fundamental para la "vía de 1 carbono", un paso clave en la síntesis de precursores de nucleótidos como bloques de construcción para la síntesis de ADN en la fase S del ciclo celular (Garcia-Bennett et al., 2011), por esto el ácido fólico a menudo se selecciona como una diana molecular para la administración dirigida de medicamentos a las células cancerosas, las cuales tienen la propiedad inherente de sobreexpresar los receptores de folato debido a sus enormes requerimientos de esta sustancia (Yang et al., 2010), por lo que el direccionamiento selectivo del tumor se logra combinando conjugados de ácido fólico con las nanopartículas para mejorar su captación y vectorización. Recientemente se ha propuesto que la administración mediada por el receptor de folato puede mejorar la captación celular, la liberación sostenida del fármaco y promover una citotoxicidad eficaz hacia las células cancerosas tanto in vitro como in vivo (Zhao et al., 2010).

Cuando las nanopartículas funcionalizadas se suspenden en un medio de liberación que contiene iones de sodio, el conjunto de folato se interrumpe mediante el intercambio de un exceso de iones

de sodio con los iones multivalentes de reticulación en las nanopartículas, esto conduce a la ruptura de las partículas y la liberación de ácido fólico (y cualquier molécula hospedante encapsulada) de manera controlada (Misra et al., 2014).

Este capítulo se centró en la evaluación de la cinética de liberación del folato de las nanopartículas funcionalizadas por los dos métodos descritos en el capítulo anterior, sumergidas en solución PBS a pH 4.5 y 7.4 durante 48 horas.

4.2 Metodología

4.2.1 Evaluación de la cinética de liberación del folato.

La cinética de liberación se evaluó con el método propuesto por (Misra et al., 2014) a diferentes pH. Un primer pH de 4.5, que es comparable al pH lisosómico de las células cancerosas y un pH de 7.4, que sería el pH extracelular de las células normales.

Para ambos casos se realizó la misma experimentación, primero se tomaron 0,1162 g de nanopartículas liofilizadas y se suspendieron en 30 ml de una solución amortiguadora de fosfato (PBS) con el pH a evaluar, esta suspensión se llevó a la incubadora de CO₂ por 48 horas a 37°C. Los sobrenadantes se recogieron a diferentes tiempos después de centrifugar el medio a 3000 rpm durante 5 min, seguido de esto, para medir la absorbancia del ácido fólico liberado se utilizó espectroscopía ultravioleta y se midió a 281,5 nm, por último, la concentración de ácido fólico en el medio se calculó usando una curva de calibración de ácido fólico en el medio de liberación correspondiente a varias concentraciones.

4.2 Resultados y Discusión

La **Figura 4. 1** muestra el espectro UV realizado al ácido fólico para determinar el pico de absorbancia máximo para la posterior cinética de liberación, dicho valor fue de 281.5nm.

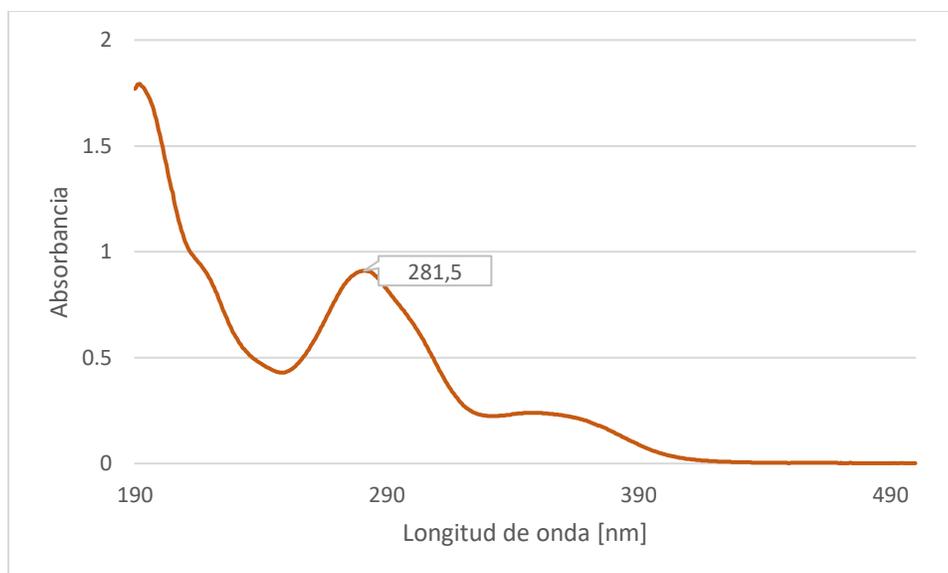


Figura 4. 1. Espectro UV para el ácido fólico a concentración de 15 µg/ml.

La **Figura 4. 2** muestra la curva que relaciona la cantidad de FA liberado por nanopartículas de fibroína funcionalizadas por dos métodos, sumergidas en PBS con diferentes valores de pH a lo largo del tiempo.

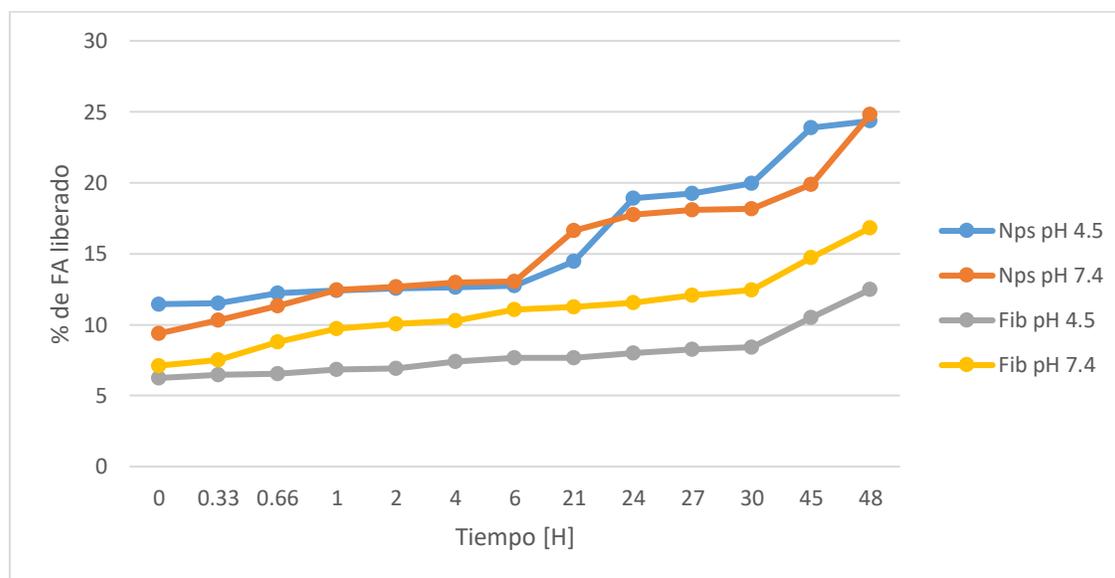


Figura 4. 2. Perfiles de liberación de FA in vitro en nanopartículas funcionalizadas por dos métodos tras la incubación en PBS con diferentes valores de pH: 7.4 y 4.5.

En la figura, se logra observar que para el método en el cual se funcionalizan las nanopartículas directamente (Nps) el porcentaje de liberación no difiere en gran medida a los cambios de pH y presenta un porcentaje de liberación más alto al terminar las 48 horas (25% aproximadamente),

mientras que, para el método en el que se funcionalizó primero la solución de fibroína (Fib) si se logra observar diferencias al cambiar el pH del medio y comparando con el primer método, el porcentaje de liberación de FA es menor, esto muestra que las nanopartículas no alcanzan a liberar la totalidad del FA antes de llegar a las células tumorales lo que les permitiría ingresar a éstas por medio de los receptores de folato.

La diferencia de liberación de FA difiere significativamente en ambos métodos, esto se puede dar porque en el método de Nps únicamente se logra modificar la superficie de las nanopartículas, por lo que al momento de liberarlas al medio todo el FA queda expuesto, mientras que, para el método de Fib al funcionalizar toda la solución de fibroína y luego preparar las nanopartículas, estas quedan cargadas tanto en su interior como en su exterior de la molécula diana, lo que permite que la liberación de FA sea menor y estaría ligada directamente a la degradación de la fibroína.

El pH del medio de liberación se rige por los iones presentes y estos juegan un papel importante en la liberación del ácido fólico a partir de las nanopartículas, para el caso de las nanopartículas fabricadas con la solución de fibroína funcionalizada (Fib) se observó que a medida que el medio de liberación se vuelve ácido, la liberación de ácido fólico disminuye, esto concuerda con los resultados reportados por (Misra et al., 2014), esta liberación de ácido fólico a una velocidad menor en un entorno más ácido sugiere que el fármaco al encapsularse quizás permanezca protegido en dicho entorno, lo que indica que las nanopartículas podrían potencialmente servir como una plataforma de administración de fármacos lisosomotrópicos (Seib et al., 2013).

4.3 Conclusiones

Luego de obtener los resultados de la liberación de ácido fólico presente en las nanopartículas funcionalizadas se plantean las siguientes conclusiones:

- Al funcionalizar la solución de fibroína primero se logra una liberación menor de ácido fólico en el medio, esto debido a que se encuentra disponible tanto dentro como fuera de la nanopartícula, lo que sugiere que estas nanopartículas pueden llegar a las células tumorales con una carga de ácido fólico óptima para ingresar a éstas.

- La respuesta del pH en la liberación sugiere que la plataforma de administración de fármacos lisosomotrópicos sería la más adecuada, ya que a pH 4.5 la liberación es menor, es decir, el fármaco estaría mejor protegido en este medio.

REFERENCIAS

- Garcia-Bennett, A. E., Xiao, C., Zhou, C., Castle, T., Miyasaka, K., & Terasaki, O. (2011). Bicontinuous cubic mesoporous materials with biphasic structures. *Chemistry - A European Journal*, 17(48), 13510–13516. <https://doi.org/10.1002/chem.201101831>
- Misra, R., Katyal, H., & Mohanty, S. (2014). Controlled release of folic acid through liquid-crystalline folate nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 44, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.025>
- Seib, F. P., Jones, G. T., Rnjak-Kovacina, J., Lin, Y., & Kaplan, D. L. (2013). pH-Dependent Anticancer Drug Release from Silk Nanoparticles. *Advanced Healthcare Materials*, 2(12), 1606–1611. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300034>
- Yang, S. J., Lin, F. H., Tsai, K. C., Wei, M. F., Tsai, H. M., Wong, J. M., & Shieh, M. J. (2010). Folic acid-conjugated chitosan nanoparticles enhanced protoporphyrin IX accumulation in colorectal cancer cells. *Bioconjugate Chemistry*, 21(4), 679–689. <https://doi.org/10.1021/bc9004798>
- Zhao, D., Zhao, X., Zu, Y., Li, J., Zhang, Y., Jiang, R., & Zhang, Z. (2010). Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), 669–677. <https://doi.org/10.2147/IJN.S12918>

Capítulo 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

Durante el desarrollo del proyecto se llevó a cabo la fabricación de nanopartículas de fibroína mediante dos protocolos, variando para cada uno condiciones que afectan su formación, luego se procedió a obtener nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico con dos métodos que varían en el material base, por último, se observó la liberación del ácido fólico en PBS a dos valores de pH, por lo tanto, según los objetivos planteados se concluye que:

- Las variables estudiadas para ambos métodos de fabricación de nanopartículas influyen en el tamaño obtenido de éstas, así mismo, con el método de precipitación salina con relación SF/KH₂PO₄ de 1:3 y concentración de fibroína menor (0.15 mg/ml) se obtienen partículas del tamaño deseado (menores a 200nm) esto con el fin de prolongar su tiempo en circulación sanguínea.
- La funcionalización de la proteína con ácido fólico, se logró observar por medio de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier que el ácido fólico se logró acoplar exitosamente a la fibroína, lo que indica que las nanopartículas obtenidas podrían funcionar como vector para transportar medicamentos a las células tumorales disminuyendo así los efectos sobre las células sanas.
- La cinética de liberación del ácido fólico en PBS mostró que el método mas adecuado para la funcionalización es hacerlo partiendo de la fibroína en solución, esto debido a que así se asegura una menor liberación de ácido fólico en el medio permitiendo la entrada de las nanopartículas en las células tumorales.

Basado en los puntos anteriores, se concluye que se cumplió con éxito el objetivo general del proyecto, así como los objetivos específicos, obteniendo nanopartículas vectorizadas con ácido fólico de tamaño adecuado, que podrían ser potencialmente útiles para el transporte de medicamentos contra el cáncer.

5.2 Perspectivas

Partiendo de los resultados obtenidos, se tiene que este proyecto deja un precedente en cuanto a la fabricación y funcionalización de nanopartículas de fibroína, por lo que las perspectivas se enfocan primero en caracterizaciones para confirmar el éxito de la reacción de acople del ácido fólico con la fibroína, para esto se puede utilizar el análisis termogravimétrico (TGA) el cual puede mostrar la formación de compuestos más estables térmicamente como consecuencia de la formación de enlaces diimida, también se enfoca en encapsular medicamentos específicos utilizados para tratamientos contra el cáncer y realizar ensayos *in-vitro* con células específicas para confirmar el efecto de las nanopartículas sobre estas.