

Preparación y Caracterización de Nanopartículas de Quitosano Modificado para La
Encapsulación de Polifenoles con Potencial Aplicación en el Tratamiento de
Leucemia

Trabajo de grado para optar al título de químico

ORLANDO JOSÉ JIMÉNEZ JARAVA



ASESORA

Juliana Palacio Betancur



CO-ASESORA

Yuliana Monsalve Carmona

Grupo de Investigación Ciencia de los Materiales

Instituto de química

Facultad de ciencias exactas y naturales

Universidad de Antioquia

2019

Agradecimientos

Agradezco a las profesoras Juliana Palacio Betancur y Yuliana Monsalve Carmona por la confianza depositada en mí y la paciencia que tuvieron durante el desarrollo de este trabajo de grado el cual aproveche para llenarme de conocimientos importantes para mi vida profesional.

A la profesora Betty Lucy López por haberme permitido hacer parte del grupo Ciencias de los Materiales y su acompañamiento, colaboración, tiempo y ayuda durante el desarrollo de este trabajo

A la Profesora Ligia Sierra por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros que estuvieron a mi lado apoyándome en este largo camino de aprendizaje y que tanta motivación me dieron para poder cumplir mi sueño de terminar la carrera no importando las dificultades enfrentadas.

A los compañeros del grupo Ciencia de Los Materiales (CIENMATE) que siempre me apoyaron y contribuyeron de alguna forma en mi acompañamiento y motivación para investigar.

A mi familia que siempre me apoyo y estuvo presente para que así enfrentara mis miedos y afrontara las dificultades presentadas durante mi vida académica.

A todos aquellos profesores que gracias a su enseñanza hicieron de mi un futuro profesional íntegro y con bases sólidas que desempeñara su oficio con la mayor seriedad posible

Tabla de contenido

1	RESUMEN	1
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3	MARCO TEORICO	1
3.1	<i>Leucemia</i>	1
3.1.1	Tipos de Leucemia	1
3.1.2	Tratamientos.....	2
3.2	<i>Polifenoles</i>	2
3.2.1	Taninos.....	3
3.2.2	Flavonoides	3
3.2.3	Ligninas	4
3.3	<i>Polímeros</i>	4
3.3.1	Polímeros Sintéticos	5
3.3.2	Polímeros Naturales	5
3.4	<i>Modificaciones del quitosano</i>	7
3.4.1	Polietilenglicol (PEG)	8
3.4.2	Ácido Desoxicólico (DCA).....	8
3.4.3	Ácido Fólico (AF)	9
3.5	<i>Nanotransportadores</i>	10
3.5.1	Micelas	10
3.5.2	Polimersomas o vesículas	11
3.5.3	Dendrímeros	12
3.5.4	Nanopartículas.....	12
3.5.5	Encapsulación de principios activos en nanopartículas poliméricas.....	13
4	Objetivos	14
4.1	<i>Objetivo General</i>	14
4.2	<i>Objetivos Específicos</i>	14
5	Metodología	15
5.1	<i>Preparación de derivados de quitosano</i>	15
5.1.1	Quitosano-ácido fólico (Qs-AF).....	15
5.1.2	Quitosano-ácido desoxicólico (Qs-DCA)	15
5.1.3	Quitosano-poli(etilen glicol) (Qs-mPEG).....	16

5.2	<i>Caracterización de los derivados</i>	16
5.3	<i>Preparación de nanopartículas (NPs) a partir de mezclas de Qs-PEG/Qs-DCA/Qs-AF</i>	17
5.3.1	Autoensamble.....	17
5.3.2	Gelación Ionotropica.....	17
5.4	<i>Caracterización de nanopartículas a partir de mezclas de Qs-PEG/Qs-DCA/Qs-AF</i>	18
5.5	<i>Estabilidad coloidal de las nanopartículas</i>	19
5.6	<i>Encapsulación de los polifenoles</i>	19
5.7	<i>Cuantificación del porcentaje de encapsulación (%EE) de los polifenoles en nanopartículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF</i>	19
6	Resultados	20
6.1	<i>Preparación de derivados de quitosano</i>	20
6.1.1	Quitosano-ácido fólico (Qs-AF).....	20
6.1.2	Quitosano-ácido desoxicólico Qs-DCA.....	23
6.1.3	Modificación del Qs-mPEG.....	25
6.2	<i>Preparación de nanopartículas de Qs-PEG/Qs-DCA/Qs-AF</i>	28
6.2.1	Método de autoensamble	28
6.2.2	Método de Gelación Ionotropica.....	29
6.3	<i>Estabilidad Coloidal</i>	34
6.4	<i>Encapsulación de polifenoles</i>	36
7	Conclusiones.....	1
8	Perspectivas.....	1
9	Referencias Bibliográficas.....	1

Índice De Figuras

Figura 1. Estructura del ácido gálico (AG), propil galato (PG) y epigallocatequina-3-galato (EGCG).....	4
Figura 2. Esquema de la estructura del quitosano (Qs)	6
Figura 3. Esquema de la estructura del Polietilenglicol	8
Figura 4. Esquema de la estructura del ácido desoxicólico.....	9
Figura 5. Esquema de la estructura del Ácido Fólico	9
Figura 6. Clasificación de sistemas nanotransportadores de principios activos	10
Figura 7. Sistema de nanotransportadores para el transporte de principios activos y sus características.....	11
Figura 8. Esquema de Estructura de un Dendrimer	12
Figura 9. Esquema de modificación del Qs con AF.....	20
Figura 10. Espectro infrarrojo para el Qs y el Qs-AF.....	21
Figura 11. Espectro de ¹ H-NMR para el Qs-AF en D ₂ O/ CH ₃ COOD (1%).....	22
Figura 12. Curva de calibración para el ácido fólico.....	23
Figura 13. Esquema de modificación del Qs con DCA.....	23
Figura 14. Espectro infrarrojo para el Qs y el Qs-DCA.....	24
Figura 15. Espectro de ¹ H-NMR para el Qs-DCA en D ₂ O/ CH ₃ COOD (1%)	25
Figura 16. Esquema de modificación Del Qs con mPEG	26
Figura 17. Espectro infrarrojo para el Qs y el Qs-DCA.....	27
Figura 18. Espectro ¹ H-RMN del Qs-mPEG en D ₂ O/DOOCCH ₃ (1%).....	28
Figura 19. Tamaño de partículas para partículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF preparadas por autoensamble.....	29
Figura 20. Efecto del pH y la composición en el tamaño de partícula pre-ultrafiltración.....	31
Figura 21. Efecto del pH y la composición en el tamaño de partícula post-ultrafiltración	32
Figura 22. Tamaño de partícula vs relación en masa Qs:TPP	33

Figura 23. Tamaños de partícula medidos a diferentes intervalos de tiempo para los sistemas de nanopartículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF almacenados a 25°C 35

Figura 24. Potencial z medidos a diferentes intervalos de tiempo para los sistemas de nanopartículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF almacenados a 25°C 36

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación Polímeros Naturales.....	5
Tabla 2. Variables usadas para la preparación de las nanopartículas a partir de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF usando una relación en peso Qs:TPP 3:1 y una concentración de polímero de 1mg/mL.	18
Tabla 3. Relaciones en masa Qs:TPP en las cuales se lograron los menores tamaños de partícula.....	34
Tabla 4. Tamaño de partícula, PDI, potencial Z y eficiencia de encapsulación para las partículas Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF 80:10:10, con polifenol encapsulado, antes y después del proceso de ultrafiltración.....	37

1 RESUMEN

La Leucemia es un cáncer en el cual se afectan las células de la médula ósea (leucocitos) y en la mayoría de los casos puede ser mortal, cobrando así la vida de millones de niños y adultos a nivel mundial. Los tratamientos de este tipo de enfermedad varían según el tipo de leucemia (mielítica o linfoblástica) y tiempo de detección de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos se caracterizan por ser poco selectivos, altamente tóxicos y con efectos secundarios nocivos. Una alternativa a los tratamientos tradicionales, son los polifenoles, debido a sus características prooxidantes y a su fácil extracción de medios naturales. Sin embargo, los polifenoles como el ácido gálico (AG), propil galato (PG) y epigallocatequina-3-galato (EGCG), presentan desventajas debido a alta solubilidad en agua, su sensibilidad a la luz y a cambios de pH. Presentan una alta hidrofilia lo cual hace que sea de alta difusión impidiendo que sean usados como principios activos ya que presentarían bajas concentraciones *in vivo*. Como una alternativa para solucionar esta problemática se propone usar nanopartículas poliméricas funcionalizadas, en las cuales se pueden encapsular los polifenoles y que presenten una alta selectividad hacia células cancerígenas. Uno de los polímeros más estudiados para la encapsulación de principios activos, es el quitosano (Qs) debido a su biocompatibilidad y su biodegradación.

En este trabajo se realizaron diferentes modificaciones del quitosano (Qs), con el objetivo de preparar nano partículas en las cuales se puedan encapsular polifenoles como ácido gálico (AG), propil galato (PG) y epigallocatequina-3-galato (EGCG). Para esto, el quitosano fue modificado químicamente con polietilenglicol (PEG), ácido desoxicólico (DCA) y ácido fólico (AF). La primera modificación se realizó para proporcionarle estabilidad estérica a los sistemas y adicionalmente, evitar que las nanopartículas una vez en el organismo sean detectadas y eliminadas por los macrófagos. La segunda se llevó a cabo con el fin de modificar el índice hidrofílico/hidrofóbico y generar un posible autoensamble de las partículas. La última modificación, se hizo con el fin de vectorizar las partículas

hacia las células enfermas, ya que estas células sobre-expresan receptores folato en la membrana celular.

Para la obtención de las nanopartículas, se estudió el efecto de algunas variables de preparación sobre las propiedades fisicoquímicas de las partículas, obtenidas por el método de gelación ionotrópica y a partir de mezclas de los diferentes derivados. Se lograron sistemas con tamaños de partícula menores a 200 nm, a los cuales se les evaluó la estabilidad coloidal mediante mediciones de tamaño de partícula y potencial z por un periodo de 20 días, donde se pudo determinar que los sistemas con mayor contenido de mPEG presentaron una menor variabilidad en el tamaño de partícula. El sistema Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF 80-10-10 se seleccionó para la encapsulación de los polifenoles, debido a que presentó tanto el menor tamaño de partícula, como la menor polidispersidad. Las eficiencias de encapsulación para el ácido gálico, propil galato y epigallocatequina-3-galato fueron de 41.7%, 83.5% y 43.6%, respectivamente. Con los resultados obtenidos se plantea que el sistema de nanopartículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF con polifenoles puede ser potencialmente usado en el tratamiento de leucemia.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leucemia es un tipo de cáncer de alto impacto que cobra millones de vidas a nivel mundial, tanto en niños como en adultos. Los tratamientos convencionales poseen una baja selectividad a la hora de atacar las células afectadas o poseen efectos adversos en los pacientes. La decisión de que ruta tomar a la hora de seleccionar el tratamiento más adecuado, depende netamente del tiempo de propagación que lleva la enfermedad en el cuerpo. Los polifenoles se presentan como un tratamiento alternativo, debido a que a ciertas concentraciones pueden generar apoptosis en las células por su capacidad antioxidante. Esto ha dado ideas a la industria farmacológica sobre su utilización selectiva en ciertos tipos de enfermedades terminales que poseen tratamientos agresivos en el paciente, sin

embargo, debido a que se debe garantizar una concentración al momento de atacar las células cancerígenas, su transporte por el organismo se presenta como uno de los mayores desafíos a afrontar. Así mismo, se debe garantizar que las propiedades químicas durante su recorrido en el torrente sanguíneo, no se modifiquen. Polifenoles como el ácido gálico, propil galato y epigallocatequina-3-galato han demostrado una alta capacidad antioxidante, sin embargo, debido a que este tipo de sustancias son altamente hidrofílicas su transporte por el cuerpo no es selectivo en el tratamiento de enfermedades como la leucemia. En la actualidad el área de la biomedicina ha tomado gran fuerza y se han realizado múltiples estudios sobre los nanotransportadores poliméricos como alternativa para mejorar la biodisponibilidad de principios activos en múltiples tratamientos, en los que los medicamentos actuales no son tan eficientes. Uno de los polímeros más usados en este tipo de aplicaciones es el quitosano (Qs), debido a que es biocompatible, biodegradable y presenta grupos funcionales que pueden ser fácilmente modificables. Derivatizaciones del Qs con metilpolietilenglicol (mPEG), ácido desoxicólico (DCA) y ácido fólico (AF) han demostrado ser una alternativa, muy atractiva para la preparación de nanotransportadores. Al modificar el Qs con el mPEG se evita que el nanotransportador sea rápidamente eliminado del organismo debido al marcaje de macrófagos. El ácido desoxicólico modifica el índice hidrofílico/hidrofóbico permitiendo el autoensamble de moléculas hidrofílicas como el Qs. El ácido fólico cumple la función como agente vectorizante hacia células cancerígenas, las cuales presentan una sobreexpresión de receptores de folato, dando como resultado un nanotransportador específico y con una probabilidad alta de cumplir su función en la protección y transporte del principio activo a través del sistema circulatorio.

3 MARCO TEORICO

3.1 Leucemia

La leucemia es un tipo de cáncer de la médula ósea que genera un incremento en el número de leucocitos de manera descontrolada, aunque también puede afectar a todas las células de la médula ósea. Es el cáncer más común, siendo el 75-80% de los casos reportados en niños [1]. El incremento de células cancerígenas impide la producción de otras células sanas, tales como glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos, lo cual puede llevar a la muerte de los pacientes debido a que las células cancerígenas pueden propagarse a través del torrente sanguíneo hacia los ganglios linfáticos [2].

La leucemia se puede clasificar de dos formas, ya sea según la gravedad o de acuerdo a la célula afectada [3].

3.1.1 Tipos de Leucemia

- Leucemia Aguda

En la leucemia aguda se da un aumento de células sanguíneas inmaduras y como consecuencia no realizan completas sus funciones. A medida que pasa el tiempo estas células inmaduras reemplazan a las sanas dando lugar a una propagación u otros órganos, por lo cual el tratamiento temprano es fundamental. Este tipo de leucemia es la más común en niños [4][5].

- Leucemia crónica

En la leucemia crónica se producen glóbulos blancos anormales. Es de progresión lenta y puede desarrollarse durante meses o años y es muy común en personas mayores [6][7].

3.1.2 Tratamientos

Debido a que la leucemia es una enfermedad compleja, el tipo de tratamiento depende de diversos factores como la edad del paciente, célula afectada y grado de propagación [8][9].

- Leucemia aguda

El 70% de los pacientes son remitidos a quimioterapia, este tipo de tratamiento se recomienda para pacientes con cáncer menos avanzado y detectado a tiempo. Los pacientes son sometidos a 3 ó 4 ciclos de quimioterapia, donde se suministran altas dosis de citarabina, logrando que el 50% de los pacientes sean curados [10]. Pacientes en estados más avanzados de la enfermedad son sometidos a trasplantes. Sin embargo, existe el riesgo de generar rechazo de la medula trasplantada, empeorando la enfermedad.

- Leucemia Crónica

Los pacientes con este tipo de leucemia son tratados en su mayoría con imatinib, un tratamiento con una duración entre 8 a 10 años, el cual induce una respuesta citogenética y hematológica completa [11]. Este tratamiento tiene una tasa de supervivencia del 93% de los pacientes. Si el tratamiento resulta inefectivo y se torna agresiva la enfermedad. Una alternativa es el uso de células madre lo cual puede ser efectiva en muchos casos [12].

3.2 Polifenoles

Los polifenoles son moléculas comúnmente derivadas de plantas, que poseen más de un grupo fenólico en su estructura y heteroátomos, tales como hidroxilos, éteres, esterres o ácidos carboxílicos [13]. Además, presentan características antioxidantes muy interesantes que pueden conducir a la apoptosis de células cancerígenas, por lo cual estos compuestos pueden ser usados como una alternativa en el tratamiento del cáncer [14]. Los polifenoles son subdivididos en 3 grandes grupos que son los taninos, flavonoides y ligninas [15].

3.2.1 Taninos

Los taninos son biomoléculas polifenólicas grandes con grupos hidroxilos o carboxílicos que permiten su asociación con macromoléculas para la generación de complejos. Poseen pesos moleculares entre 500 – 3000 Da, pudiéndose también encontrar taninos de tamaño hasta de 20000 Da [16].

Un ejemplo de los taninos es el ácido gálico, el cual puede encontrarse en las agallas, hojas de té, la corteza de roble, entre otras. En su estructura (Figura 1) posee un grupo ácido carboxílico y varios grupos hidroxilo, lo que le confiere un carácter hidrofílico.

Un éster del ácido gálico conocido como propil galato (Figura 1) presenta actividad antioxidante muy marcada, debido a que pequeñas modificaciones en su estructura permiten una mayor actividad biológica por el cambio en su geometría [17].

3.2.2 Flavonoides

Son metabolitos secundarios de las plantas con una estructura básica tipo C6-C3-C6. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 moléculas de malonil-CoA a través de una ruta biosintética, generando una ciclación mediada por la enzima isomerasa [18].

Un ejemplo de flavonoides es la epigalocatequina-3-galato (Figura 1), la cual está presente entre un 50 a 80% en las catequinas (Familia de los flavonoides) del té verde. Es de gran interés científico debido a su gran actividad biológica entre las que se encuentran antiinflamatorio, antioxidante, desinfectante, anticancerígeno, antiangiogénico y quimiopreventivo [19].

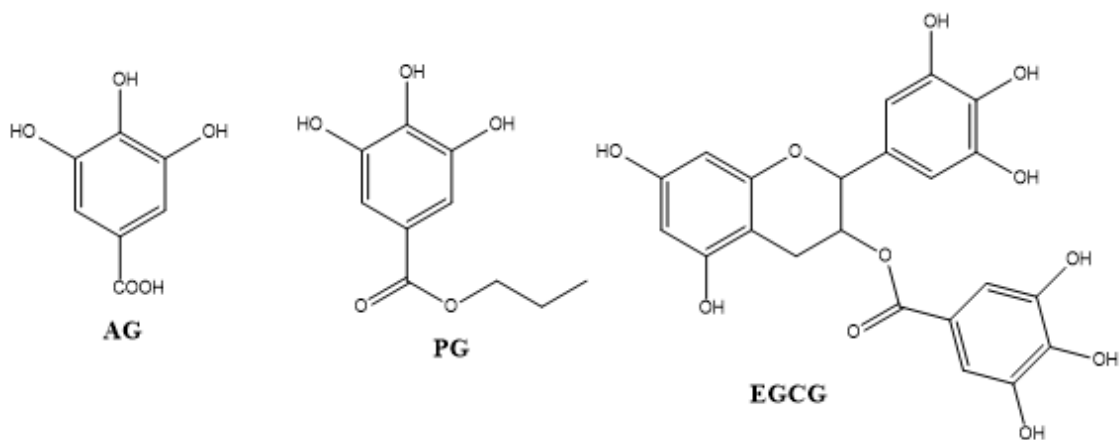


Figura 1. Estructura del ácido gálico (AG), propil galato (PG) y epigallocatequina-3-galato (EGCG)

3.2.3 Ligninas

Las ligninas son una clase de polímeros orgánicos que forman parte de la materia que se componen los tejidos de soporte de las plantas vasculares y algunas algas, siendo su principal función la formación de la pared celular. Presentan en su estructura química fenoles que adoptan formas reticulares [20]. No presentan carbohidratos en esta estructura y son de alto peso molecular derivado de la unión de varios ácidos y alcoholes [21].

3.3 Polímeros

Los polímeros son macromoléculas formadas por unidades repetitivas conocidas como monómeros. Se clasifican según su estructura en polímeros ramificados, injerto y lineales; según su composición en homopolímeros (un monómero como unidad repetitiva) y copolímeros (dos o más monómeros como unidad repetitiva) y/o según su origen en polímeros de origen natural (biopolímeros) o sintéticos [22].

3.3.1 Polímeros Sintéticos

Son polímeros obtenidos a partir de síntesis usando reacciones químicas. Su gran mayoría son obtenidos de monómeros orgánicos provenientes del proceso de refinación del petróleo [23].

3.3.2 Polímeros Naturales

Son aquellos obtenidos por medios biológicos, de ahí su nombre de biopolímeros. Como se observa en la tabla 1, se clasifican en 3 grandes grupos tales como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos [24].

Tabla 1. Clasificación Polímeros Naturales

Polímero	Ejemplos
Polisacáridos	Almidón, celulosa, quitina
Proteínas	Hemoglobina, colágeno, hormonas, enzimas
Ácidos nucleicos	ADN, ARN

Dentro de los polímeros naturales y sintéticos, se pueden encontrar polímeros biodegradables, los cuales pueden descomponerse mediante microorganismos o enzimas, pasando de macromoléculas complejas a unidades más simples. Posteriormente sufren un proceso de mineralización, incorporándose finalmente a ciclos biogeoquímicos de azufre, agua y/o nitrógeno. También pueden ser degradados mediante rutas que no involucren organismos vivos (rutas abióticas), sino reacciones químicas o procesos físicos como hidrólisis, fotodegradación, degradación térmica o reacciones de oxidación [25].

Estos polímeros son de interés debido a que sus estructuras químicas permiten una gran variedad de aplicaciones y es común que este tipo de polímeros sean biocompatibles, lo cual lo convierten en un buen material de partida para una

potencial aplicación en campos como la medicina y agricultura para reemplazar materiales tóxicos y de difícil degradación [26].

3.3.2.1 Quitosano

El quitosano es un biopolímero obtenido a partir de la quitina, el cual se encuentra mayormente en la naturaleza en el exoesqueleto de los artrópodos, algas marinas y las paredes celulares de algunos hongos. Está compuesto por unidades de β -(1-4)-D-glucosamida y N-Acetil-D-glucosamida (Figura 2) distribuidas de manera aleatoria [27].

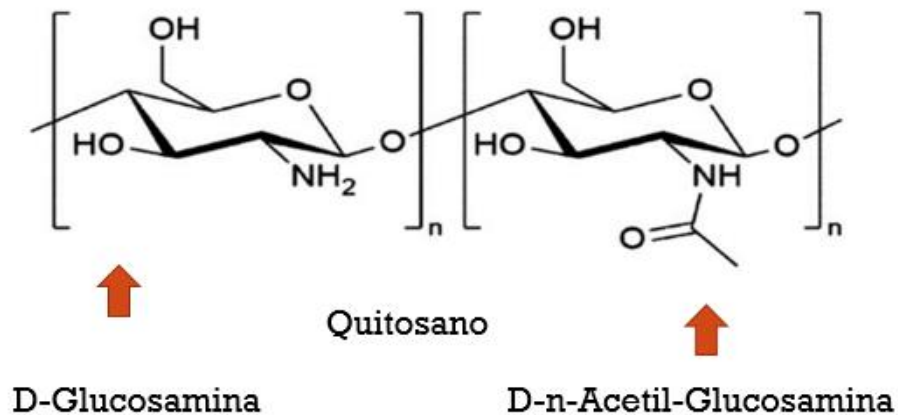


Figura 2. Esquema de la estructura del quitosano (Qs)

El proceso de producción involucra a la industria pesquera, ya que los caparazones de camarón (residuos de esta industria) son tratados mediante el uso de bases fuertes comúnmente de sodio, potasio o carbonatos, para generar la desacetilación de la quitina y obtener un quitosano [28]. El quitosano presenta propiedades bioquímicas y fisicoquímicas interesantes para su aplicación en el área farmacéutica, ya que es un polímero versátil, de fácil modificación por la presencia de los grupos funcionales NH_2 y OH para dar lugar a derivados con propiedades mejoradas y de baja toxicidad [29].

Los dos parámetros estructurales más importantes que afectan las propiedades del quitosano son el grado de desacetilación (Dd) [30] y el peso molecular (M_w) [31]. Estos dos factores determinan las propiedades físicas, químicas y biológicas del biopolímero.

- **Grado De Desacetilación (Dd)**

El grado de desacetilación es un parámetro importante, el cual muestra la distribución de los monosacáridos β -(1-4)-D-glucosamida y N-Acetil-D-glucosamida en la estructura del quitosano. La variación en el Dd (o número de grupos amino protonables), determina fundamentalmente las propiedades del polímero incluyendo solubilidad, hidrofobicidad y la capacidad de interactuar electrostáticamente con polianiones. El grado de Dd puede ser determinado a través de algunas técnicas analíticas como infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) [32], espectroscopia UV-Vis [33], resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN), resonancia magnética nuclear de carbono (^{13}C -RMN) [34], titulación potenciométrica [35], adsorción en equilibrio de colorantes [36], análisis elemental [37], degradación ácida [38], cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) [39] y análisis termogravimétrico (TGA) [40].

- **Peso Molecular (M_w)**

El peso molecular tiene una gran influencia en la actividad fisiológica y propiedades funcionales del quitosano [41]. Este parámetro puede ser determinado por diversas técnicas como análisis de dispersión de luz dinámica (DLS), cromatografía de permeación de gel [42] o por viscosimetría [43].

3.4 Modificaciones del quitosano

Debido a la presencia de grupos funcionales en la estructura del quitosano, este puede ser modificado químicamente con diversas moléculas, con el fin de mejorar

sus propiedades. Algunas de estas son el polietilenglicol, el ácido desoxicólico y el ácido fólico.

3.4.1 Polietilenglicol (PEG)

El polietilenglicol (Figura 3) es un poliéter formado por monómeros de $C_2H_2O_2$. Este polímero es usado en diversos campos de investigación, tales como medicina, química, biología, entre otras. Generalmente su síntesis reporta pesos moleculares entre 200 y 40000Da. Es biocompatible, lo cual lo convierte en un buen modificante del quitosano en la preparación de nanotransportadores.

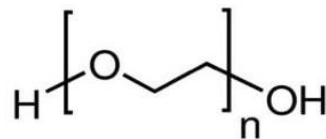


Figura 3. Esquema de la estructura del Polietilenglicol

El PEG es bastante hidrofílico y sus grupos OH terminales son susceptibles a modificaciones químicas para obtener grupos terminales mucho más reactivos [44]. Nanotransportadores con PEG en su estructura presentan una protección contra el marcaje de macrófagos, evitando así la respuesta inmune a cuerpos extraños, siendo así, un material interesante en el campo del transporte de fármacos [45].

3.4.2 Ácido Desoxicólico (DCA)

El ácido desoxicólico (Figura 4) es uno de los principales componentes de los ácidos biliares, presenta características anfífilas, pero es bastante hidrofóbico debido a la presencia de ciclos de carbono en su estructura.

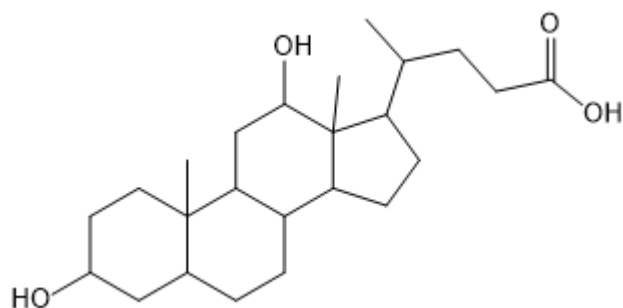


Figura 4. Esquema de la estructura del ácido desoxicólico

En agua el ácido desoxicólico forma micelas debido a su carácter anfifílico por lo que permite la emulsificación, solubilización y absorción de colesterol, vitaminas, etc. en el organismo [46]. Este ácido es usado para modificar el quitosano, dándole un carácter anfifílico, lo que permite preparar nanotransportadores por autoensamble [47].

3.4.3 Ácido Fólico (AF)

El ácido fólico (Figura 5) conocido como vitamina B9 es un ácido usado como suplemento dietario y convertido en folato en el cuerpo humano. Es bastante hidrofílico y fotosensible [48].

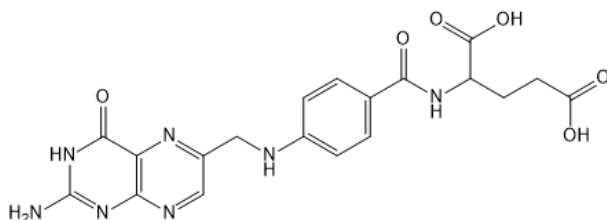


Figura 5. Esquema de la estructura del Ácido Fólico

El ácido fólico es un buen ligando para la vectorización de nanotransportadores hacia células cancerígenas, debido a que en este tipo de células se sobreexpresan los receptores folato, dando así una especificidad novedosa e interesante a sistemas para el tratamiento de esta enfermedad [49].

3.5 Nanotransportadores

En los últimos años, con la llegada de la nanomedicina, los dispositivos con tamaño en el rango nanométrico se han convertido en una herramienta potencialmente capaz de resolver los problemas relacionados con el transporte de principios activos hacia células cancerígenas [50]. Los tipos de nanotransportadores más empleados en esta aplicación se representan en la Figura 6 y a continuación se realiza una pequeña descripción de cada uno de ellos.

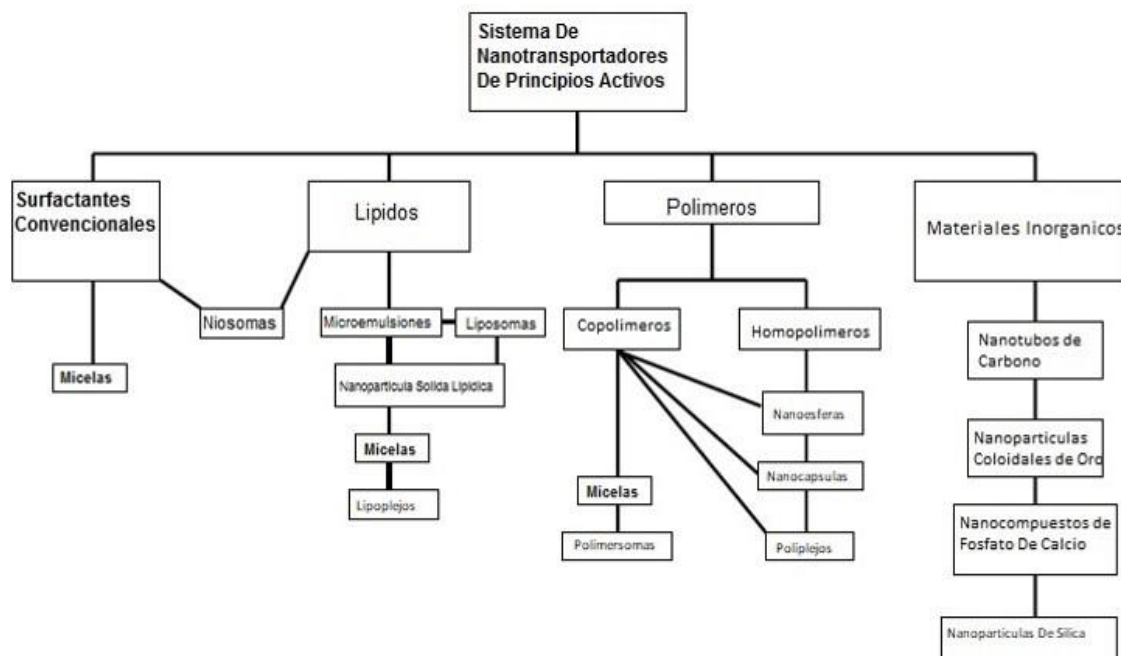


Figura 6. Clasificación de sistemas nanotransportadores de principios activos

3.5.1 Micelas

Debido a la estructura única de las moléculas anfifílicas, en solución acuosa, a una determinada concentración, estas moléculas pueden autoensamblarse de manera que los bloques hidrofóbicos alcancen un estado de mínima energía, dejando el bloque hidrofílico expuesto hacia medio acuoso, disminuyendo la entropía en el sistema [51]. En un pequeño rango de concentraciones de moléculas anfifílicas (concentración crítica micelar), las moléculas anfifílicas se autoensamblan en partículas de tamaño coloidal llamadas micelas, las cuales son estructuras

dinámicas [52]. Si la concentración de moléculas anfifílicas permanece por encima de la concentración crítica micelar, las micelas serán termodinámicamente estables, mientras que, si la concentración de las moléculas anfifílicas es menor, se pierde el ensamble. Las micelas típicamente tienen diámetros entre 10 y 100 nm (Figura 7) [53].

3.5.2 Polimersomas o vesículas

Los polimersomas (Figura 7) presentan una estructura formada por una o varias capas alrededor de un núcleo acuoso. Estas vesículas son muy útiles en la encapsulación y transporte de principios activos solubles en agua, que pueden ser almacenados en el núcleo acuoso [54].

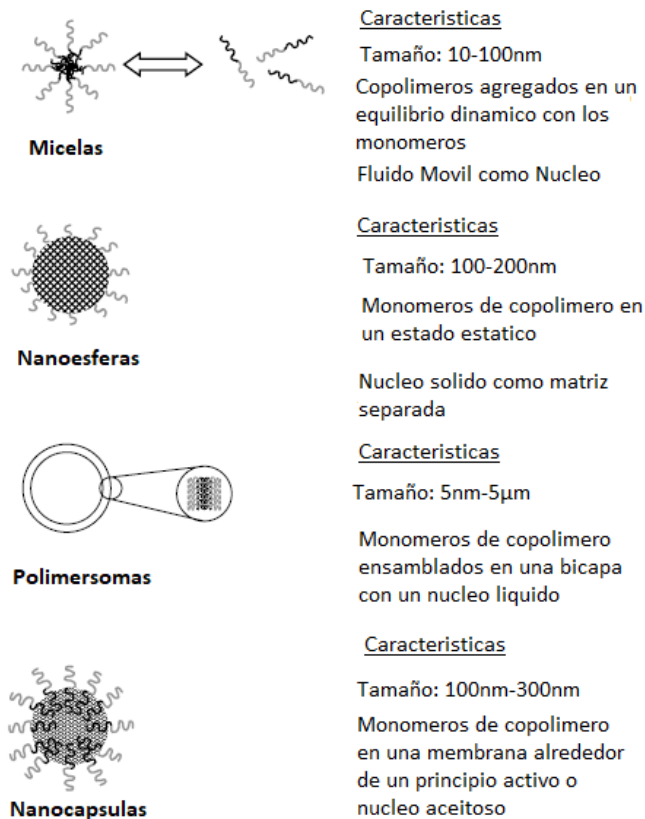


Figura 7. Sistema de nanotransportadores para el transporte de principios activos y sus características

3.5.3 Dendrimeros

Los dendrimeros son macromoléculas globulares que presentan una estructura altamente simétrica e hiper-ramificada ordenada alrededor de un núcleo central, los cuales presentan tamaños entre 2-10 nm (Figura 8). Estos sistemas son sintetizados mediante una serie de reacciones de adición o condensación controlada sobre un núcleo polifuncional [55]. Se puede controlar el peso molecular final deseado y el tamaño de partícula a partir de las condiciones de síntesis. Los dendrimeros de tamaño intermedio tienen una estructura semirrígida, que los hace capaces de retener principios activos y les confiere un gran interés farmacéutico [56].

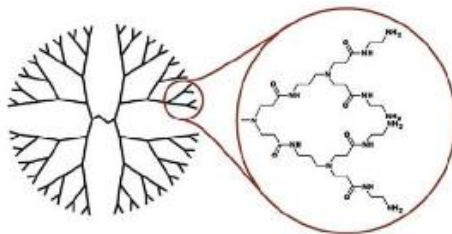


Figura 8. Esquema de Estructura de un dendrímtero

3.5.4 Nanopartículas

Las nanopartículas son sistemas coloidales que poseen diámetros entre 1 y 1000 nm. Estos sistemas son usados para el transporte de principios activos hacia sitios específicos del organismo, donde el principio activo puede ser encapsulado, adsorbido o dispersado en la nanopartícula. Las nanopartículas pueden ser preparadas a partir de una amplia variedad de materiales tales como lípidos, polímeros y materiales inorgánicos, lo cual le otorga un amplio rango de propiedades fisicoquímicas que las convierte en sistemas adecuados para el transporte y liberación controlada de principios activos [57].

Específicamente, cuando se habla de nanopartículas poliméricas se refiere a un nombre colectivo para las nanoesferas y las nanocápsulas (Figura 7). Las nanoesferas son estructuras tipo matriz polimérica y las nanocápsulas consisten

en un interior líquido o polimérico rodeado por una membrana polimérica. A diferencia de las micelas las cuales presentan una estructura dinámica, las nanopartículas se caracterizan por poseer una estructura estable y estática [58].

3.5.4.1 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas

El método de preparación de nanopartículas está muy ligado a la naturaleza química del polímero. Para el quitosano y el quitosano modificado se han reportado varios métodos de los cuales se describe a continuación los más usados [59].

- Autoensamble

Cuando se tienen polímeros anfífilicos, en medio acuoso se generan nanopartículas del tipo core-shell de manera espontánea. Para este método se requiere tener un balance hidrofílico/hidrofóbico adecuado, que lleve al autoensamble, en medio acuoso de las cadenas poliméricas.

- Gelación Ionotrópica

Cuando el quitosano se encuentra solubilizado en medio ácido, los grupos amino se encuentran protonados, convirtiendo al quitosano en un polímero catiónico. Esta naturaleza catiónica puede aprovecharse para la formación de nanopartículas poliméricas. El método de gelación ionotrópica consiste en el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas catiónicas con un poli anión, generalmente tripolifosfato de sodio (TPP), netamente por interacciones electrostáticas entre los grupos amino protonados del Qs con los grupos fosfato del TPP, llevando a la formación de las partículas [60].

3.5.5 Encapsulación de principios activos en nanopartículas poliméricas

Para que el proceso de encapsulación del principio activo sea exitoso, se debe garantizar afinidad entre la matriz polimérica y el principio activo de interés. La

encapsulación se puede dar por dos métodos: i) incorporación del principio activo al mismo tiempo en el que se prepara las nanopartículas y ii) adsorción del principio activo después de formada la dispersión coloidal.

La eficiencia en el proceso de encapsulación depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, del método de preparación y del uso de aditivos, así como de la naturaleza, peso molecular del polímero y de la interacción polímero-principio activo.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

-Desarrollar nanopartículas poliméricas basados en quitosano (Qs) modificado con ácido deoxicólico (DCA), polietilenglicol (PEG) y ácido fólico (AF) para la encapsulación de polifenoles con potencial aplicación en el tratamiento de leucemia.

4.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar derivados del Qs con polietilenglicol (Qs-mPEG), ácido desoxicólico (Qs-DCA) y ácido fólico (Qs-AF) que lleven a la formación de nanopartículas.
- Determinar las condiciones de pH y relación en peso Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF que permitan obtener partículas en el rango nanométrico.
- Establecer las condiciones experimentales bajo las cuales las nanopartículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF permiten encapsular ácido gálico, propil galato y epigallocatequina-3-galato.
- Examinar la estabilidad en el tiempo de los sistemas de nanopartículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF.

6 Metodología

6.1 Preparación de derivados de quitosano

6.1.1 Quitosano-ácido fólico (Qs-AF)

En un balón de fondo redondo se adicionan 200 mg de Qs con grado de desacetilación del 76% y 50 mL de ácido acético 1% (v/v) y se deja en agitación por 24 horas, bajo atmosfera de nitrógeno. A la solución de Qs se le ajusta el pH a 4.7 con NaOH 3 M. Se cubre el balón con papel aluminio y se tapa con una septa para purgar el sistema con nitrógeno por 15 minutos. En un recipiente ámbar se pesan 11 mg de AF, se tapa con una septa y se purga con nitrógeno por 15 minutos. Se le agrega 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se deja en agitación por 45 minutos. En dos recipientes ámbar se pesan respectivamente 6 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 10 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) se tapan con septas y se purgan con nitrógeno por 15 minutos. Se le agrega 1 mL de DMSO a cada recipiente y se dejan en agitación por 45 minutos. A la solución de Qs se le agrega lentamente la solución de AF y la de NHS, esta se deja en agitación por 30 minutos. Posteriormente, se agrega gota a gota la solución de EDC y la mezcla de reacción se deja en agitación por 24 horas. Finalmente, el producto de reacción se precipita con NaOH 5M y se purifica a través de diálisis usando una membrana de celulosa (6 KDa), se dializa en agua Milli-Q por 3 días y se liofiliza para obtener un material sólido [48].

6.1.2 Quitosano-ácido desoxicólico (Qs-DCA)

Para esta modificación se preparan dos soluciones por separado a 38°C. La primera solución, se prepara disolviendo 200 mg de Qs con un grado de desacetilación de 76% en 25 mL de ácido acético 1%(v/v). La segunda solución se prepara disolviendo 110 mg de DCA en 53 ml de etanol. Posteriormente, se pesan 80 mg de EDC y 48 mg de NHS y se adicionan respectivamente a la solución de DCA, -esto con la finalidad de activar los ácidos carboxílicos del DCA en la solución. Posteriormente, se gotea lentamente la solución de DCA a la solución de

Qs y se deja en agitación por 22 horas. A la solución resultante se le ajusta el pH a 8 con NaOH 5 M. Seguidamente, el material resultante es purificado por precipitación con etanol (20 mL) y separado por centrifugación. Se realizan lavados sucesivos con una solución etanol-agua (40:60). Finalmente, el polímero precipitado se dializa por 3 días usando una membrana de celulosa (6KDa) y agua Milli-Q como dializante. Por último, se liofiliza este material para obtener un sólido [46].

6.1.3 Quitosano-poli(etilen glicol) (Qs-mPEG)

El Qs-mPEG se prepara siguiendo la metodología reportada por Monsalve y colaboradores [61]. Para esta modificación se pesan 100 mg de Qs con un grado de desacetilación del 76% y se disuelve en 25 mL de HCl 0,1 M, esta solución se somete a liofilización por 2 días para obtener el clorhidrato de quitosano (Qs-HCl). El Qs-HCl se solubiliza en 17 mL de agua Milli-Q y se deja en agitación por 1 hora. Se procede a pesar 26 mg mPEG-COOH y 3 mg NHS, los cuales se agregan a la solución de Qs-HCl y se deja en agitación por 10 minutos. Posteriormente, a esta solución se le adicionan 5 mg de EDC y se deja en agitación por 22 horas. Finalmente, el material resultante se somete a diálisis por 3 días usando una membrana de celulosa (6KDa), con agua Milli-Q como dializante y se liofiliza para obtener un material sólido.

Para la liofilización de las muestras, estas son congeladas a -196°C e inmediatamente liofilizadas en un liofilizador de cámara de cascada de 6 L (Labconco) a -80°C (temperatura del colector) y 0.014 mBar.

6.2 Caracterización de los derivados

- El FTIR fue usado con el fin de identificar los grupos funcionales presentes en los diferentes derivados obtenidos. Las muestras fueron analizadas en forma de

pastillas preparadas con KBr y el espectro fue obtenido en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum One entre 4000-450 cm^{-1} a temperatura ambiente.

- La Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H -RMN) es usada para confirmar la formación de los enlaces entre el Qs-AF, Qs-DCA y Qs-PEG. Para el análisis, el polímero fue solubilizado en 1% de $\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOD}$. Los espectros fueron obtenidos en un espectrómetro Ascend 600MHZ Bruker Biospin.

6.3 Preparación de nanopartículas (NPs) a partir de mezclas de Qs-PEG/Qs-DCA/Qs-AF

Las nanopartículas fueron preparadas por dos métodos diferentes: Autoensamble y gelación ionotrópica.

6.3.1 Autoensamble

Las NPs fueron preparadas a partir de la mezcla de los polímeros modificados (Qs-mPEG, Qs-DCA, Qs-AF). Para esto, los polímeros modificados son disueltos en ácido acético al 1% v/v a una concentración de 1mg/mL y posteriormente mezclados a una relación en peso Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF: 80/10/10 y posteriormente mezclados y mantenidos en agitación por 1 hora, a temperatura ambiente.

6.3.2 Gelación Ionotrópica

Las NPs fueron preparadas por el método de gelación ionotrópica con tripolifosfato de sodio (TPP) como agente entrecruzante [62]. Para esto, los polímeros modificados (Qs-mPEG, Qs-DCA y Qs-AF) son disueltos en ácido acético al 1% (v/v) a una concentración de 1 mg/mL. Posteriormente, fueron mezclados variando la relación en peso entre los diferentes materiales y el pH de la solución resultante, tal como se muestra en la Tabla 2. Por otra parte, se prepara una solución de TPP a una concentración de 1 mg/mL y el pH de esta solución se ajusta a 9,0. Luego, la solución de TPP es adicionada gota a gota a la mezcla Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-

AF bajo agitación magnética constante (500 rpm) y a temperatura ambiente, manteniendo la agitación durante 1 hora. La relación en peso Qs:TPP fue variada, con el objetivo de poder determinar la relación a la cual se da la formación de las partículas. Finalmente, las NPs obtenidas son purificadas por ultrafiltración con una membrana de celulosa (1 kDa) y finalmente re-suspendidas en agua Milli-Q.

Tabla 2. Variables usadas para la preparación de las nanopartículas a partir de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF usando una relación en peso Qs:TPP 3:1 y una concentración de polímero de 1mg/mL.

Qs-mPEG (%)	Qs-DCA (%)	Qs-AF (%)	pH
50	25	25	4-5-6
70	15	15	4-5-6
80	10	10	4-5-6
60	10	30	4-5-6

6.4 Caracterización de nanopartículas a partir de mezclas de Qs-PEG/Qs-DCA/Qs-AF

- La dispersión de luz dinámica (DLS) es usada para medir el tamaño y la distribución de tamaño de partícula en los sistemas preparados. Las medidas se realizan a 25 °C en un DLS HORIBA LB 550. Cada experimento es realizado por triplicado y el resultado es reportado como el diámetro medio \pm la desviación estándar. Adicionalmente, se calcula el índice de polidispersidad (PDI) de las distribuciones de tamaño de partícula, el cual es un indicativo de la dispersidad de los sistemas.
- La medición del potencial zeta de los sistemas preparados fue realizada a 25 °C en un ZetasizerNano ZS (Malvern Instrument), diluyendo las dispersiones

con agua Milli-Q. Las mediciones se hicieron por triplicado y el resultado es reportado como el valor medio \pm la desviación estándar.

6.5 Estabilidad coloidal de las nanopartículas

El tamaño de partícula y el potencial z se usan como indicadores para evaluar la estabilidad coloidal de las dispersiones, para ésto, las partículas se mantienen almacenadas en dispersión a 25 °C y a determinados intervalos de tiempo se tomaron las medidas de tamaño de partícula y potencial z.

6.6 Encapsulación de los polifenoles

Para la encapsulación de los polifenoles se selecciona el sistema de nanopartículas que presente el menor tamaño y distribución monodispersa. Los polifenoles encapsulados son ácido gálico (AG), propil galato (PG) y epigallocatequina-3-galato (EGCG). Para llevar a cabo la encapsulación, se sigue la metodología descrita anteriormente para la preparación de las partículas por el método de gelación ionotrópica, con la adición de 1mg del polifenol a la solución de polímero en medio ácido. La solución de polifenol y polímero se mantiene en agitación (500 rpm) por 1 hora y luego se adiciona la solución de TPP, manteniendo la agitación por 1 hora más. Para retirar el polifenol no encapsulado las dispersiones son purificadas por ultrafiltración con una membrana de celulosa (1 kDa) y finalmente re-suspendidas en agua Milli-Q.

6.7 Cuantificación del porcentaje de encapsulación (%EE) de los polifenoles en nanopartículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF

La cuantificación de los polifenoles fue llevada a cabo en el sobrenadante, después de realizada la purificación de las partículas, por espectroscopia UV-visible en un equipo Perkin Elmer Lambda 35 UV/vis spectrophotometer, UV Winlab software, a partir de una curva de calibración del principio activo en etanol,

a 273 nm. Se calculó el porcentaje de encapsulación de acuerdo con la ecuación 1.

$$EE(\%) = \frac{\text{peso del polifenol en las Nps}}{\text{peso inicial del polifenol usado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

7 Resultados

7.1 Preparación de derivados de quitosano

7.1.1 Quitosano-ácido fólico (Qs-AF)

La modificación del Qs con el ácido fólico es llevada a cabo a través de la reacción de los grupos amino del Qs con los grupos ácidos carboxílicos del AF, previamente activados con EDC y NHS, tal como se muestra en la Figura 9.

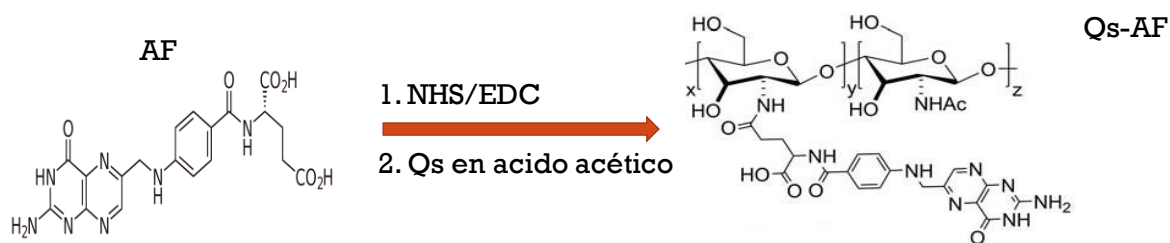


Figura 9. Esquema de modificación del Qs con AF

Inicialmente se realizó una caracterización por FTIR, con el objetivo de identificar que los grupos funcionales del Qs y del AF estén presentes en el material obtenido. En la Figura 10 se presenta el espectro infrarrojo del Qs y Qs-AF, donde se observan en ambos espectros las bandas de 3478 cm^{-1} correspondiente a extensión (C-O) solapada con la extensión (N-H) de amina y la banda 1635 cm^{-1} asignada a la extensión de carbonilo de amida (C=O, amida I) desplazada por la presencia de un heteroátomo electronegativo. Tanto en el Qs como en el Qs-AF se ve la banda debida a extensión (C-OH) de alcoholes primarios alrededor de

1050 cm^{-1} y la banda de 1422 cm^{-1} corresponde a la vibración $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ y la señal a 1378 cm^{-1} asignada a la vibración de estiramiento C-N del grupo acetamido (banda de amida III). La aparición en el espectro de Qs-FA de la banda en 1550 cm^{-1} que no se observa en el espectro del Qs nos indica una modificación en los grupos NH_2 del quitosano para la formación de la amida resultante, después de la modificación [63].

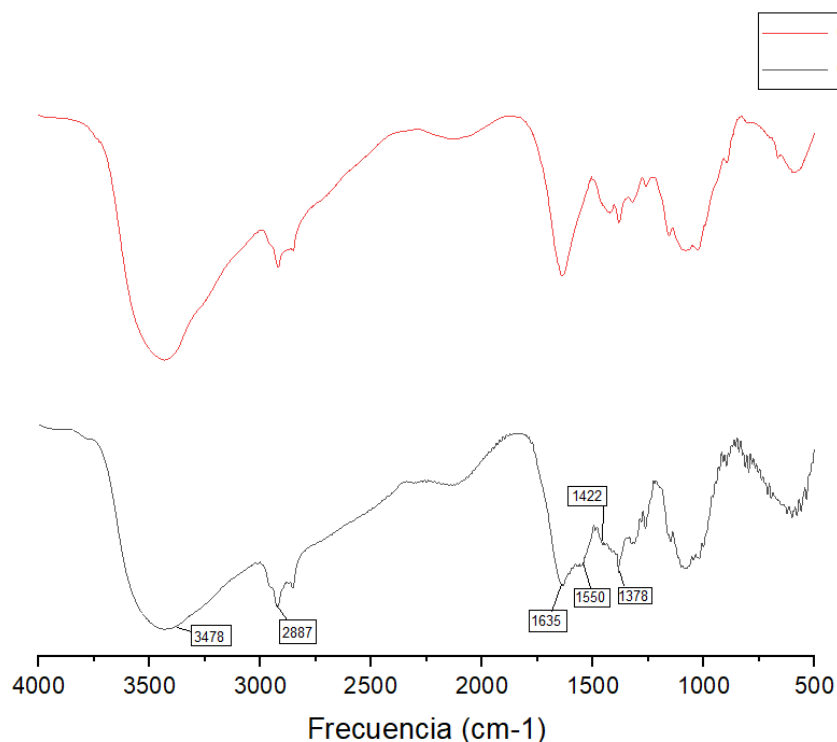


Figura 10. Espectro infrarrojo para el Qs y el Qs-AF

Posteriormente, la estructura del Qs-AF fue determinada por ^1H -RMN en $\text{CH}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$ al 1%. En la figura 11 se muestra el espectro obtenido junto con la estructura de este polímero. Las señales de baja intensidad a 7.7, 6.9 y 8.7 ppm corresponden a los protones aromáticos del ácido fólico marcados como H1, H2 y H3 [64]. La señal entre 3.5 y 4.1 ppm corresponde a los protones del anillo de la N-acetil glucosamina y de la glucosamina y una señal en 3.2 para el protón del CH unido al NH_2 del Qs. Las señales correspondientes al AF son de baja intensidad, además se presenta tautomerismo del carbonilo (marcado como a en la

estructura), lo cual se traduce en la aparición de varios picos en el espectro en la región aromática que nos indica la presencia de las dos especies ceto y enólica.

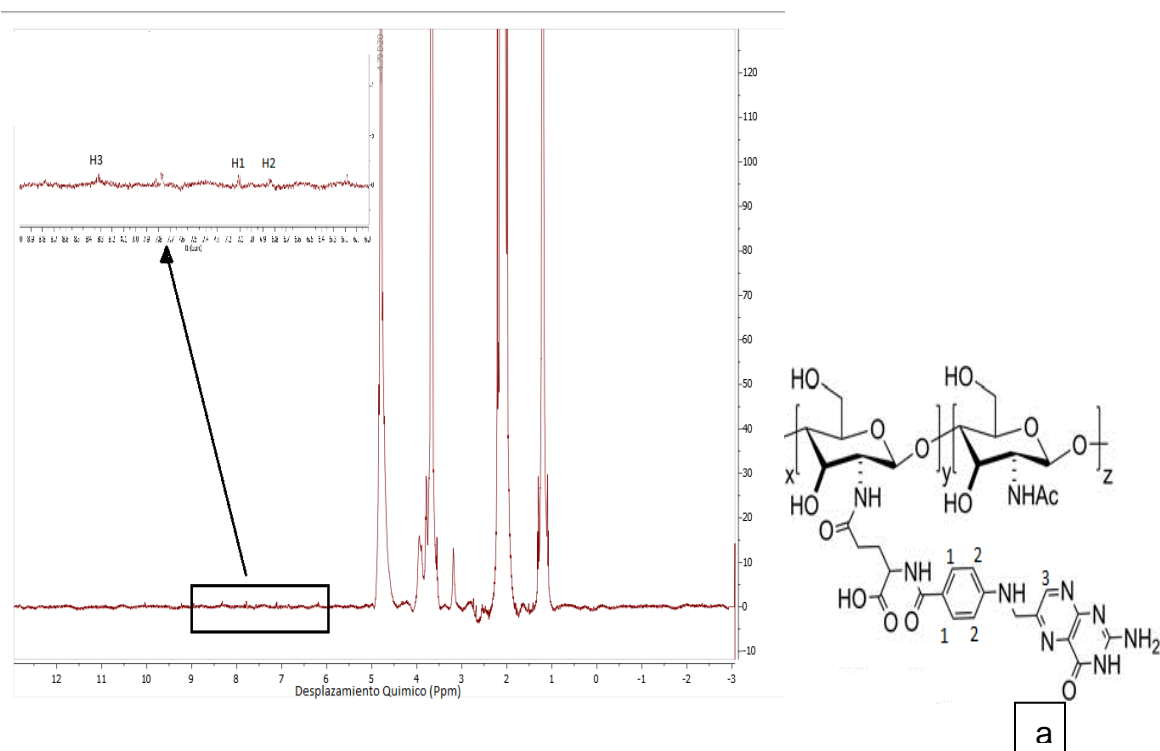


Figura 11. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ para el Qs-AF en $\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOD}$ (1%)

Por lo tanto, no es posible calcular por esta técnica el grado de modificación. Se procede a realizar otro análisis para calcular el grado de modificación (%GM) mediante uso de espectroscopia UV-vis a una longitud de onda de 285 nm, correspondiente al pico de máxima absorción del AF. Para esto, se prepara una solución madre de AF en ácido acético 1%v/v y se realizan diluciones sucesivas para construir la curva de calibración, tal como se muestra en la Figura 12, obteniéndose un índice de correlación de 0.998. A partir de la ecuación 2 se obtiene un %GM de 2.12%.

$$\%GM = \frac{\text{mmol AF}}{\text{mmol Qs}} * 100$$

Ecuación 2

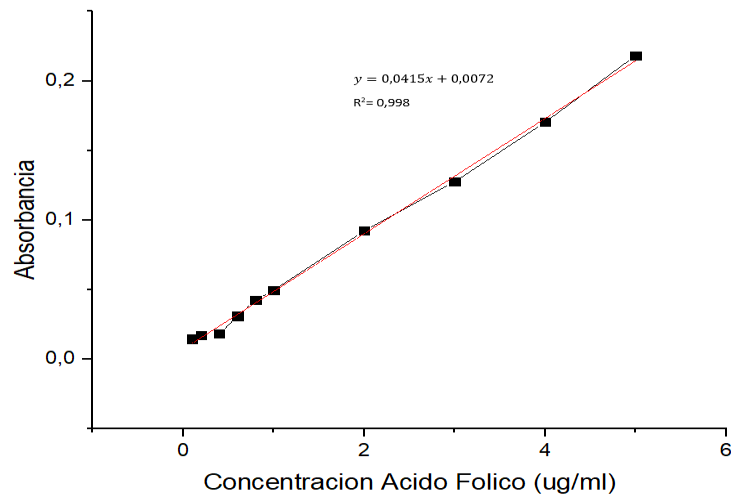


Figura 12. Curva de calibración para el ácido fólico

7.1.2 Quitosano-ácido desoxicólico Qs-DCA

La modificación del Qs con DCA se realiza a través de la reacción de la carbodiimida entre los grupos ácido carboxílico del DCA con los grupos amino de Qs, tal como se muestra en la Figura 13.

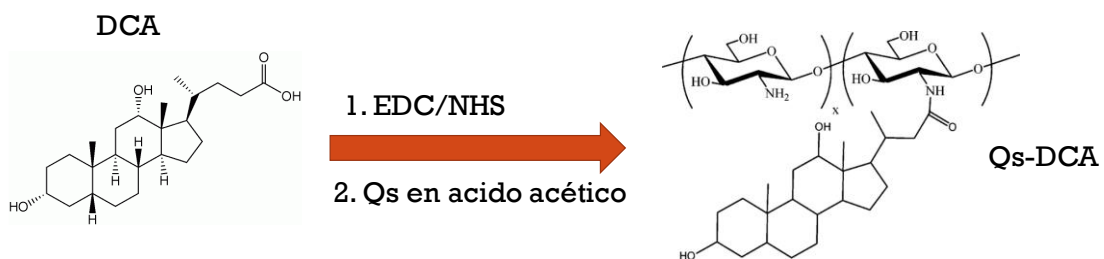


Figura 13. Esquema de modificación del Qs con DCA

Para confirmar la modificación de las cadenas de Qs con DCA se realiza la caracterización de este material por FTIR. Se puede observar en la Figura 14 un ensanchamiento de la banda 2887 cm^{-1} correspondiente a la extensión C-H de los

grupos $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ presentes tanto en el Qs como en el DCA. La banda en 3478 cm^{-1} corresponde al solapamiento de dos señales, extensión $-\text{O}-\text{H}$ y $-\text{NH}_2$. Además, se observa una banda en 1549 cm^{-1} correspondiente a la extensión $\text{C}-\text{N}$ de la amida I y II. La banda a 1631 cm^{-1} es asignada a la extensión $(\text{C}=\text{O})$ de carbonilo del Qs y las bandas de 1422 y 1378 cm^{-1} corresponden a tensiones $(\text{C}-\text{O})$ de carbonilos de amidas y la banda de 1050 cm^{-1} asignadas a la extensión $(\text{C}-\text{O})$ de alcoholes primarios. La aparición de la banda de 1549 cm^{-1} que no aparece en el espectro del Qs indica una modificación en los grupos NH_2 del quitosano por la formación de la amida resultante después de la modificación [65].

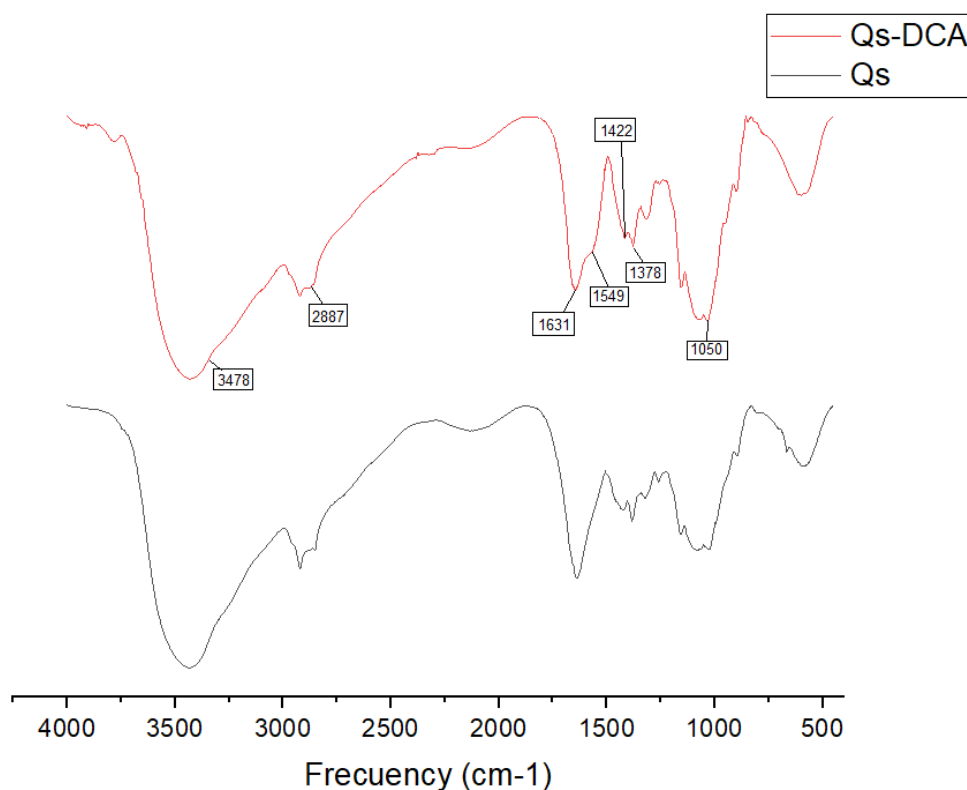


Figura 14. Espectro infrarrojo para el Qs y el Qs-DCA

La Figura 15 muestra el espectro de $^1\text{H}-\text{NMR}$ para el Qs-DCA, junto con la estructura del polímero resultante. En la ampliación del espectro para la región de 0 a 1 ppm es posible observar dos señales a 0.74 y 0.94 ppm que corresponden a

los protones de los metilos presentes en el DCA, marcados en la estructura como H18 y H19 respectivamente. A partir de los valores de integración de las señales a 0,77 y 2,9 ppm correspondientes a los metilos del DCA y al protón vecino al NH₂ en la estructura el quitosano, se determina mediante la ecuación 3 que el GM es de 14,50%.

Ecuación 3:

$$GM(\%) = \frac{I_{0,77\text{ppm}}}{3 \cdot I_{2,90\text{ppm}} + I_{0,77\text{ppm}}} * 100$$

$$GM(\%) = 14.50\%$$

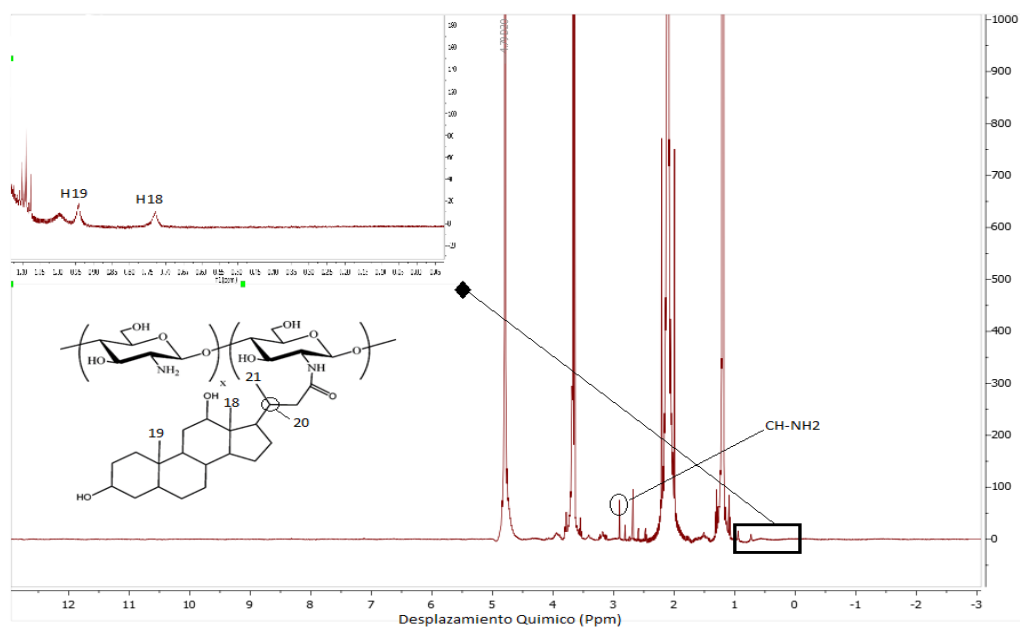


Figura 15. Espectro de 1H-NMR para el Qs-DCA en D2O/ CH3COOD (1%)

7.1.3 Modificación del Qs-mPEG

El quitosano pegilado es obtenido a través de la ruta de la carbodiimida, en la cual los grupos ácidos carboxílicos del mPEG-COOH son activados con EDC y posteriormente reaccionan con los grupos amino del quitosano, tal como se muestra en la Figura 16.

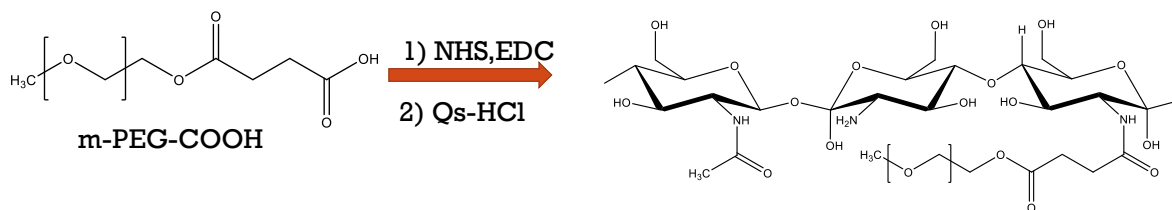


Figura 16. Esquema de modificación Del Qs con mPEG

En la Figura 17, se muestran los espectros IR del Qs y del Qs-mPEG. En ambos espectros se observa una banda en 3480cm^{-1} correspondiente al solapamiento de la señal de extensión $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$. En el espectro del Qs-mPEG se observa un aumento de la señal en 2887cm^{-1} respecto a la del Qs, la cual corresponde a la extensión CH de los grupos $-\text{CH}_2$, CH_3 del quitosano y $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ del mPEG. Adicionalmente, en este espectro puede verse, las bandas a 1649 y 1550cm^{-1} , correspondientes a los grupos amida I y II (estiramiento $-\text{C}=\text{O}$ y $-\text{C}-\text{N}$, respectivamente) ambas presentando desplazamientos a la derecha debido a la presencia de los grupos carbonilos, comprobándose la formación del enlace entre el ácido carboxílico del mPEG y el grupo amina del Qs.

En el espectro de ^1H -RMN del copolímero Qs-mPEG (Figura 18) se observan señales a 2.66, y 3.70 correspondientes a los protones marcados como b y c del mPEG. Adicionalmente, pueden observarse las señales características del Qs a 3.15 ppm y señales entre 3.45-4.20 ppm correspondientes a los protones etílicos de la glucosamina y N-acetil glucosamina

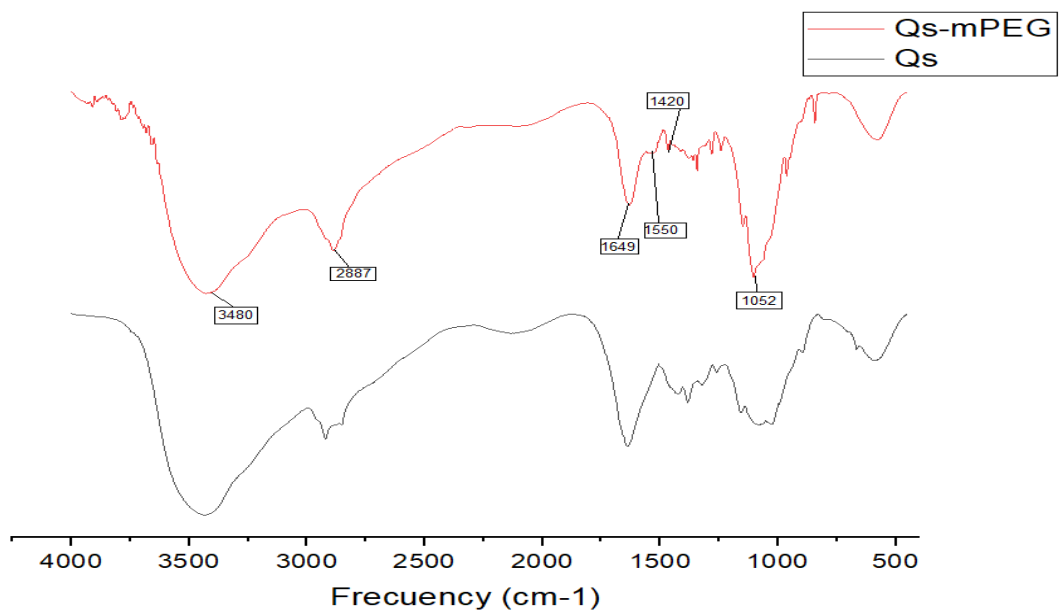


Figura 17. Espectro infrarrojo para el Qs y el Qs-DCA

La integración de los protones b de la molécula de mPEG y los protones H2 a 3.15 ppm del Qs, mediante la ecuación 4, arroja un GM de 3,1%.

Ecuación 4:

$$GM(\%) = \frac{I_b}{4 * I_{H_2} + I_b} * 100$$

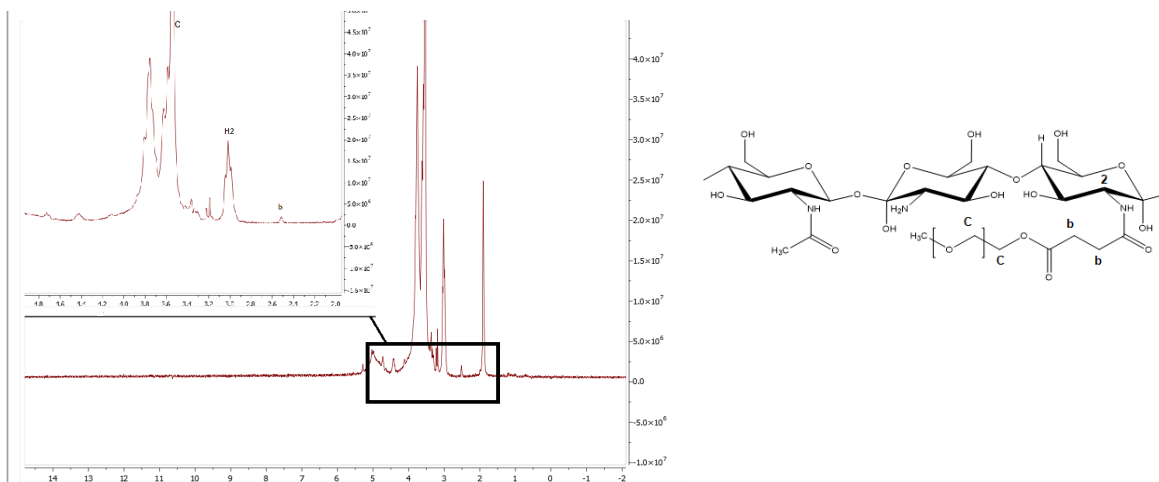


Figura 18. Espectro 1HRMN del Qs-mPEG en D2O/DOOCCH3 (1%)

7.2 Preparación de nanopartículas de Qs-PEG/Qs-DCA/Qs-AF

7.2.1 Método de autoensamble

En la Figura 19 se observa la presencia de dos poblaciones de partículas, con tamaños alrededor de 1200 y 4000 nm, lo cual puede ser debido a que el balance hidrofílico/hidrofóbico no es el adecuado para que se logre el autoensamble de las cadenas de Qs, de tal manera que lleve la formación de nanopartículas monodispersas. Sin embargo, incrementar el porcentaje de modificación del DCA en las cadenas de Qs, no es conveniente, debido a que los principios activos que se desean encapsular son de carácter hidrofílico y por lo tanto se requiere que las partículas presenten un carácter más hidrofílico que hidrofóbico. Por tanto, se preparan las partículas por el método de gelación ionotrópica, en la cual se usa un agente entrecruzante.

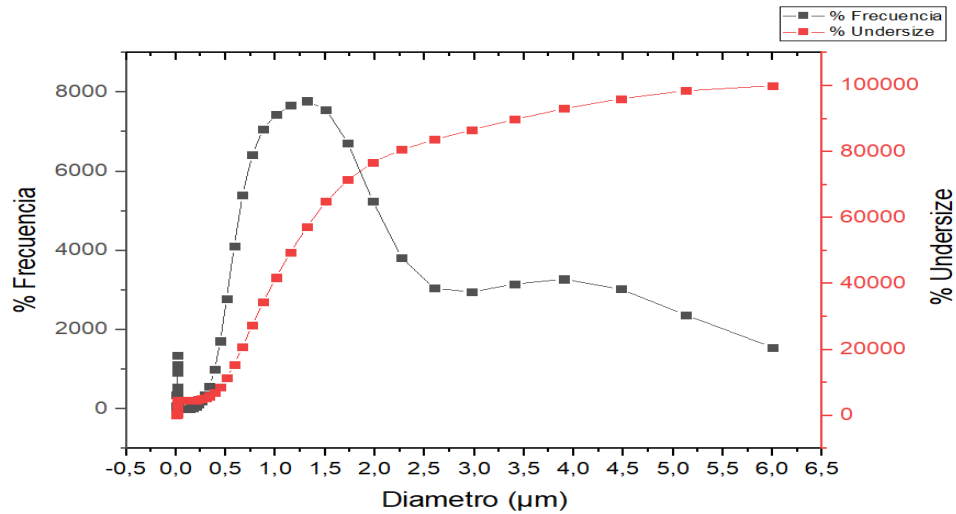


Figura 19. Tamaño de partículas para partículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF preparadas por autoensamble

7.2.2 Método de Gelación Ionotrópica

El método de gelación ionotrópica es usado para la formación de las nanopartículas de Qs-PEG/Qs-DCA/Qs-AF aprovechando la naturaleza catiónica del quitosano. Con el objetivo de determinar el efecto de algunas variables de preparación, sobre las propiedades finales de las nanopartículas, tales como tamaño de partícula, PDI y potencial z, se preparan mezclas a diferente % en peso de los derivados del Qs (Qs-PEG/Qs-DCA/Qs-AF), variando el pH de formación y la relación polímero-agente entrecruzante. Debido al gran número de variables que pueden afectar las propiedades finales de las nanopartículas, se deja fija la concentración del polímero en 1mg/mL, tal como fue previamente reportado en la literatura [61].

7.2.2.1 Efecto del pH de formación y la composición de los polímeros sobre el tamaño de partícula.

El pH de la solución de Qs tiene un gran efecto en la preparación de nanopartículas de este polímero por el método de gelación ionotrópica, debido a que este parámetro determina el grado de protonación de los grupos amino, que llevarán al entrecruzamiento con el TPP. Como se observa en la Figura 20 cuando las partículas son preparadas a pH 5 se obtienen los menores tamaños de partícula, mientras que a pH 6 se generan partículas de gran tamaño. Este comportamiento puede ser debido a que a pH 6 el grado de protonación de los grupos amino decrece, lo cual lleva a una disminución en la carga superficial de las nanopartículas formadas y por lo tanto se reduce las repulsiones electrostáticas inter-partículas, llevado a su agregación. Por su parte, a pH 4 se tiene un gran número de grupos amino protonados que no alcanzan a ser entrecruzados con la cantidad de TPP que se tiene en el medio, provocando que el entrecruzamiento no sea tan efectivo, como si ocurre a un pH de 5, donde se logran tamaños menores a 200 nm.

La composición de las partículas no presenta un efecto tan importante en el tamaño de partícula a pH bajos (4 y 5), como si lo tiene a pH 6. Para este pH puede verse que con la mayor cantidad de DCA en las partículas (50-25-25) se presenta el menor tamaño de partícula, lo cual puede ser debido a que las partículas se forman gracias a la combinación de dos fenómenos, es decir, procesos de entrecruzamiento por la presencia del TPP y autoensamble por las cadenas de DCA.

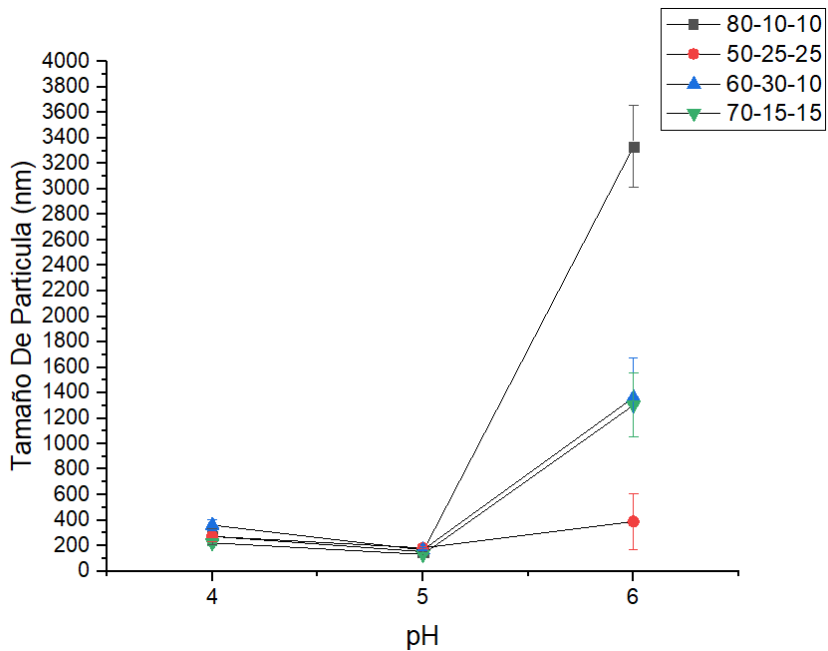


Figura 20. Efecto del pH y la composición en el tamaño de partícula pre-ultrafiltración.

7.2.2.2 Efecto del proceso de purificación en el tamaño de partícula.

En la Figura 21 se presentan los tamaños de partícula de los diferentes sistemas, después de la etapa de purificación. Al comparar estos valores de tamaño de partícula con los reportados en la Figura 20, puede verse que el proceso de purificación ocasiona un incremento en el tamaño de la partícula, debido a que al realizar lavados con agua se da un cambio en el pH del medio que favorece un hinchamiento de las partículas, provocado por la pérdida de sales.

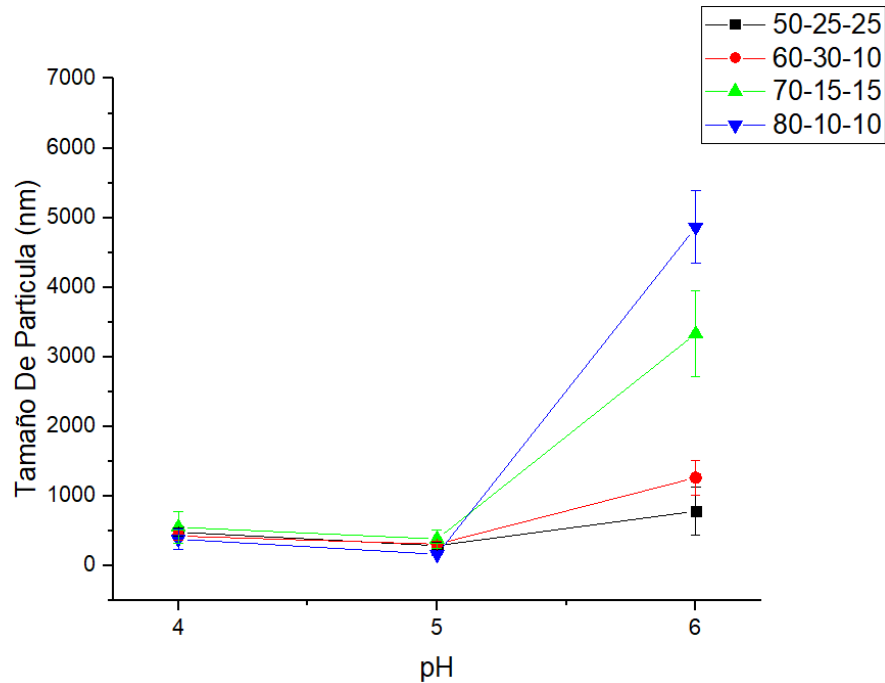


Figura 21. Efecto del pH y la composición en el tamaño de partícula post-ultrafiltración

7.2.2.3 Efecto de la relación Qs:TPP en el tamaño de partícula

En la preparación de nanopartículas una variable para tener en cuenta es la relación en masa entre el quitosano y el tripolifosfato de sodio (TPP). Para esto, se realiza una variación de la cantidad de TPP adicionado y se determina el tamaño de partícula para cada adición. De este modo, se selecciona la relación en masa que lleve a la formación de nanopartículas con el menor tamaño.

La Figura 22 presenta tres regiones, la primera correspondiente a las relaciones Qs:TPP 50:1 a 8:1, en donde se observa un decrecimiento del tamaño de partícula a medida que se adiciona el agente entrecruzante. Los grandes tamaños de partícula obtenidos para estos sistemas (mayores a 1000 nm) se deben a que la cantidad de agente entrecruzante no es suficiente para lograr un entrecruzamiento efectivo que lleve a la formación de nanopartículas. La segunda región,

comprendida para las relaciones Qs:TPP 6:1 a 2:1 presentan tamaños menores a 500 nm, lo cual indica que la cantidad de TPP presente es suficiente para propiciar la interacción de los grupos -NH_3^+ del quitosano y los grupos fosfato del TPP. En esta región los sistemas obtenidos son monomodales. Finalmente, cuando la relación Qs:TPP es 1:1, se obtienen tamaños de partícula alrededor de los 5000 nm, lo cual corresponde a grande agregados formados por el exceso de TPP que conduce al entrecruzamiento entre partículas.

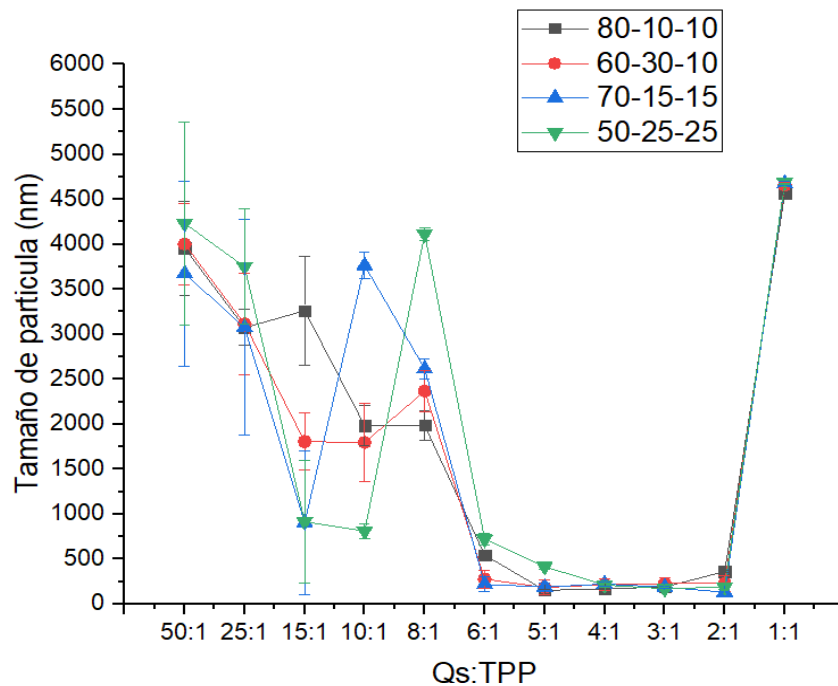


Figura 22. Tamaño de partícula vs relación en masa Qs:TPP

En la Tabla 3, se muestran las relaciones Qs:TPP que generan los menores tamaños de partícula, así como sus respectivos valores de PDI. Puede verse que, para cada sistema, la cantidad de TPP necesaria para obtener un sistema monomodal de nanopartículas con menor tamaño, es diferente. Lo anterior puede ser explicado teniendo en cuenta que en cada sistema se tiene diferente número de grupos amino disponibles para realizar el entrecruzamiento con el TPP, debido a las diferencias en las proporciones de las mezclas. Adicionalmente, es importante notar que en general se obtuvieron valores bajos (menores a 0,5) de

PDI, lo cual indica que los diferentes sistemas presentan distribuciones de tamaño relativamente estrecho.

Tabla 3. Relaciones en masa Qs:TPP en las cuales se lograron los menores tamaños de partícula.

Sistema de nanopartículas Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF	Relación Masa (Qs:TPP)	Tamaño de partícula (nm) \pm SD	PDI \pm SD
50-25-25	3:1	171,8 \pm 15,1	0,194 \pm 0,13
70-15-15	2:1	131,6 \pm 6,5	0.182 \pm 0,08
60-30-10	4:1	216,0 \pm 61,4	0.349 \pm 0,25
80-10-10	5:1	153,2 \pm 6,5	0,167 \pm 0,04

7.3 Estabilidad Coloidal

En esta etapa se realizó la evaluación de la estabilidad coloidal mediante mediciones de tamaño de partícula y potencial Z en el tiempo. Todos los sistemas fueron preparados de acuerdo a lo descrito en sección experimental por el método de gelación ionotrópica, empleando una concentración de polímero de 1,0 mg/mL, un pH de formación igual a 5 y una relación Qs:TPP (5:1). En la Figura 23 se observa el tamaño de partícula para los sistemas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF almacenadas a 25°C, durante un periodo de 20 días.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 23 se evidencia que la población de nanopartículas empieza a desestabilizarse después del día 5, presentando en algunos sistemas poblaciones de nanopartículas entre 500 nm y 1000 nm. En el día 20 la desestabilización de las nanopartículas es total, llegando a la precipitación de estas, debido a la formación de agregados de partículas.

Se observa, además, que el sistema de nanopartículas con menor variabilidad en el tamaño de partícula con respecto al tiempo es aquel donde se tiene mayor cantidad de mPEG (80-10-10). Lo cual puede ser debido a que las cadenas móviles de mPEG le confiere una mayor estabilización estérica al sistema, comparado con aquellos con una menor cantidad de este polímero.

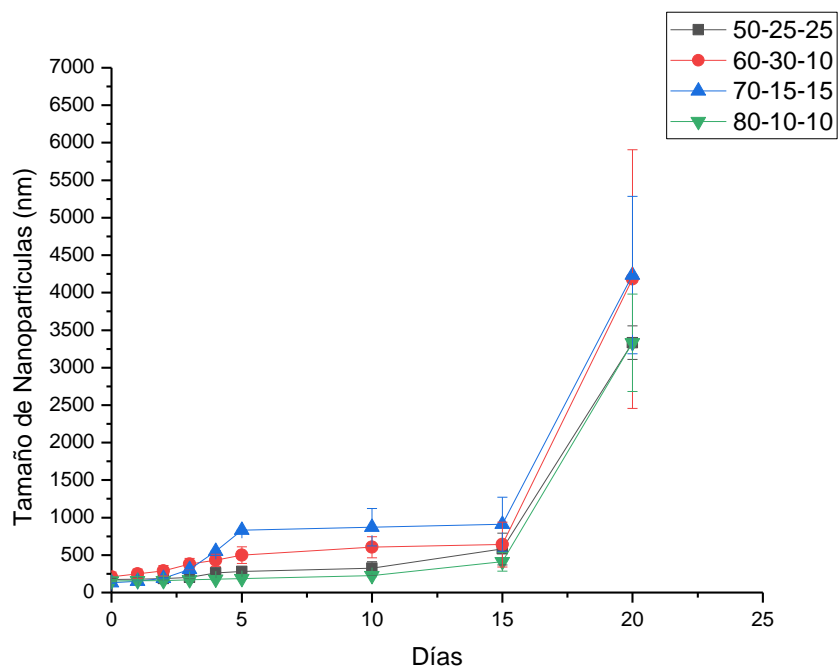


Figura 23. Tamaños de partícula medidos a diferentes intervalos de tiempo para los sistemas de nanopartículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF almacenados a 25°C

De acuerdo con la Figura 24, puede verse que a medida que se tiene mayor cantidad de mPEG en los sistemas se tiene un valor menor de potencial z, es decir más cercano a cero, lo que indica un mayor cubrimiento de las cadenas de PEG en la superficie de las partículas, lo cual puede proporcionar una mayor estabilización a las partículas. Esto se ve reflejado en un comportamiento más constante en el valor de potencial z con el tiempo para los dos sistemas con mayor contenido de mPEG (80-10-10 y 70-15-15).

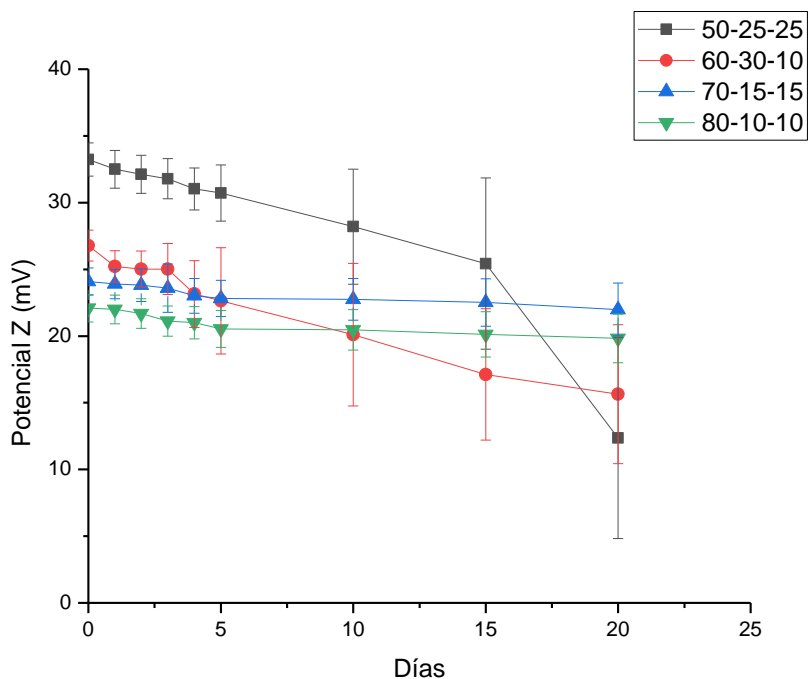


Figura 24. Potencial z medidos a diferentes intervalos de tiempo para los sistemas de nanopartículas de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF almacenados a 25°C

7.4 Encapsulación de polifenoles

Para la encapsulación de los polifenoles se selecciona el sistema de Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF 80-10-10, un pH de 5 y una relación de masa Qs:TPP 5:1, debido a que con este sistema se obtiene el tamaño más pequeño, con una distribución de tamaño monodispersa (PDI = 0.167).

En la tabla 4 se presentan los tamaños de partícula, el PDI y el potencial z antes y después del proceso de purificación, luego de llevar a cabo la encapsulación. Puede verse que el tamaño de partícula aumenta después del proceso purificación, lo cual fue analizado en la sección anterior. Por su parte, el proceso de encapsulación no presenta un efecto importante en el tamaño de partícula para los sistemas con AG y PG, mientras que se ve una disminución en este parámetro para el sistema con EGCG. Lo anterior puede ser debido a que la EGCG puede formar mayor número de interacciones por puentes de hidrogeno con el quitosano

lo que puede ocasionar la compactación de las cadenas del polímero. Con respecto a la encapsulación puede observarse que el mayor %EE se obtiene para el PG, lo cual puede ser debido a que los grupos alquílicos del PG pueden formar interacciones con las cadenas hidrofóbicas del DCA.

Tabla 4. Tamaño de partícula, PDI, potencial Z y eficiencia de encapsulación para las partículas Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF 80:10:10, con polifenol encapsulado, antes y después del proceso de ultrafiltración.

Polifenol	Antes ultrafiltrar			Después ultrafiltrar			% EE
	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	
AG	157,2±5.8	0.20 ± 0.03	24,5±4.6	162,5 ± 10,4	0,24±0,05	42,3±8.1	41,7 ± 8,3
PG	159,6±7.3	0.25 ± 0.05	23,7±5.1	183,3 ± 15,8	0,66±0,08	40,5±12.5	83, 5 ± 6,0
EGCG	135,7±3.1	0.12 ± 0.03	27,3±2.5	142,7 ± 4,4	0,13±0,03	44,8±6.9	43,6 ± 6,8

8 Conclusiones

- Se lograron sintetizar los 3 polímeros derivados del quitosano (Qs-mPEG, Qs-DCA y Qs-AF), los cuales fueron caracterizados por FTIR y ¹H-RMN. Los grados de modificación para el Qs-mPEG, Qs-DCA y Qs-AF son 3.1, 14.5 y 2.12% respectivamente.
- Las variables de preparación de las nanopartículas que permitieron obtener sistemas inferiores a 200 nm y monodispersos con una concentración de polímero de 1mg/ml, pH de la solución del polímero de 5 y una relación de masa de Qs:TPP 5:1.
- El sistema con mayor contenido de mPEG (80-10-10), presentó mejor estabilidad coloidal en el tiempo, lo cual demuestra el efecto estabilizante de este polímero hidrofílico.
- El sistema Qs-mPEG/Qs-DCA/Qs-AF 80-10-10 fue seleccionado para llevar a cabo el proceso de encapsulación de los polifenoles, debido a que presentó las mejores propiedades fisicoquímicas. En estos sistemas el mayor %EE fue logrado para el PG.
- Por tanto, el sistema con EGCG se plantea como un sistema promisorio, debido a que presentó un tamaño de partícula menor a 200 nm con un bajo valor de PDI (0,13) y una encapsulación alrededor del 40%.

9 Perspectivas

- Evaluar los perfiles de liberación de los polifenoles encapsulados
- Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas preparadas en células de la sangre y de la médula ósea
- Hacer pruebas *in vitro* e *in vivo* con el sistema de nanopartículas sobre su capacidad anticancerígena.
- Hacer de este tipo de tratamiento una posible alternativa económicamente viable en el campo farmacéutico.

10 Referencias Bibliográficas

- [1] J. J. Hutter, "Childhood leukemia," *Pediatr. Rev.*, vol. 31, no. 6, pp. 234–241, 2010.
- [2] "Leucemia: MedlinePlus enciclopedia médica." [Online]. Available: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001299.htm>. [Accessed: 14-Feb-2020].
- [3] "Leukemia—Health Professional Version - National Cancer Institute." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp>. [Accessed: 14-Feb-2020].
- [4] "Acute Myeloid Leukemia (AML) - Hematology and Oncology - MSD Manual Professional Edition." [Online]. Available: <https://www.msdmanuals.com/en-pt/professional/hematology-and-oncology/leukemias/acute-myeloid-leukemia-aml>. [Accessed: 14-Feb-2020].
- [5] "Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) - Hematology and Oncology - MSD Manual Professional Edition." [Online]. Available: <https://www.msdmanuals.com/en-pt/professional/hematology-and-oncology/leukemias/acute-lymphoblastic-leukemia-all>. [Accessed: 14-Feb-2020].
- [6] "Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) - Hematology and Oncology - MSD Manual Professional Edition." [Online]. Available: <https://www.msdmanuals.com/en-pt/professional/hematology-and-oncology/leukemias/chronic-lymphocytic-leukemia-ctl>. [Accessed: 14-Feb-2020].
- [7] "Chronic Myeloid Leukemia (CML) - Hematology and Oncology - MSD Manual Professional Edition." [Online]. Available: <https://www.msdmanuals.com/en-pt/professional/hematology-and-oncology/leukemias/chronic-myeloid-leukemia-cml>. [Accessed: 14-Feb-2020].
- [8] "Leukemia: Diagnosis, Tests, Treatment, Medication." [Online]. Available: <https://www.webmd.com/cancer/lymphoma/understanding-leukemia->

treatment#1. [Accessed: 15-Feb-2020].

- [9] "Leukemia: Diagnosis, Tests, Treatment, Medication." [Online]. Available: <https://www.webmd.com/cancer/lymphoma/understanding-leukemia-treatment#2>. [Accessed: 15-Feb-2020].
- [10] "Cytarabine Monograph for Professionals - Drugs.com." [Online]. Available: <https://www.drugs.com/monograph/cytarabine.html>. [Accessed: 15-Feb-2020].
- [11] "Imatinib Uses, Side Effects & Warnings - Drugs.com." [Online]. Available: <https://www.drugs.com/mtm/imatinib.html>. [Accessed: 15-Feb-2020].
- [12] J. R. Egner, *Abeloff's Clinical Oncology*, vol. 303, no. 11. 2010.
- [13] E. Haslam and Y. Cai, "Plant polyphenols (Vegetable tannins): Gallic acid metabolism," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 11, pp. 41–66, 1994.
- [14] N. Khan and H. Mukhtar, "Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols," *Cancer Lett.*, vol. 269, no. 2, pp. 269–280, 2008.
- [15] H. El Gharras, "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 12, pp. 2512–2518, 2009.
- [16] K. Khanbabaee and T. van Ree, "Tannins: Classification and definition," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 18, no. 6, pp. 641–649, 2001.
- [17] S. M. Fiuza *et al.*, "Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties - A structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 12, no. 13, pp. 3581–3589, 2004.
- [18] P. G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants," *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 7, pp. 1035–1042, 2000.
- [19] S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras, and M. J. Tuñón, "Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes," *Nutr. Hosp.*, vol. 17, no. 6, pp. 271–278, 2002.
- [20] S. Laurichesse and L. Avérous, "Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, no. 7, pp. 1266–1290, 2014.
- [21] T. J. Lebo, S. E., Gargulak, J. D., & McNally, "Lignin 1," *Encycl. Chem.*

Technol., no. 15, pp. 1–32, 2001.

- [22] R. J. Young, *Introduction to Polymers*. 2011.
- [23] “Polymer chemistry: introduction to an indispensable science,” *Choice Rev. Online*, 2004.
- [24] “Polímeros Naturales - Química | Química Inorgánica.” [Online]. Available: <https://www.fullquímica.com/2013/01/polimeros-naturales.html>. [Accessed: 03-Jan-2020].
- [25] A. K. Mohanty, M. Misra, and G. Hinrichsen, “Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 276–277, pp. 1–24, 2000.
- [26] R. Chandra and R. Rustgi, “Pergamon BIODEGRADABLE POLYMERS,” *Science (80-.)*, vol. 23, no. 97, pp. 1273–1335, 1998.
- [27] T. Candy and C. P. Sharma, “CHITOSAN - AS A BIOMATERIAL Thomas,” *Biohat., Art. Cells, Art. Org.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–24, 1990.
- [28] G. J. Tsai and W. H. Su, “Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*,” *J. Food Prot.*, vol. 62, no. 3, pp. 239–243, 1999.
- [29] N. R. Sudarshan, D. G. Hoover, and D. Knorr, “Antibacterial Action of Chitosan,” *Food Biotechnol.*, vol. 6, no. 3, pp. 257–272, 1992.
- [30] P. R. Sivashankari and M. Prabakaran, *Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan*, vol. 1. Elsevier, 2017.
- [31] A. Vila *et al.*, “Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 57, no. 1, pp. 123–131, 2004.
- [32] T. Sannan, K. Kurita, and Y. Iwakura, “Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility,” *Die Makromol. Chemie*, vol. 177, no. 12, pp. 3589–3600, 1976.
- [33] S. C. Tan, E. Khor, T. K. Tan, and S. M. Wong, “The degree of deacetylation of chitosan: Advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination,” *Talanta*, vol. 45, no. 4, pp. 713–719, 1998.
- [34] A. Hirai, H. Odani, and A. Nakajima, “Determination of degree of

deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy," *Polym. Bull.*, vol. 26, no. 1, pp. 87–94, 1991.

- [35] H. Terayama, "Method of colloid titration (a new titration between polymer ions)," *J. Polym. Sci.*, vol. 8, no. 2, pp. 243–253, 1952.
- [36] S. Mima, M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yoshikawa, "Highly deacetylated chitosan and its properties," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 28, no. 6, pp. 1909–1917, 1983.
- [37] Z. M. dos Santos, A. L. P. F. Caroni, M. R. Pereira, D. R. da Silva, and J. L. C. Fonseca, "Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis," *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 18, pp. 2591–2595, 2009.
- [38] J. C. Cabrera and P. Van Cutsem, "Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan," *Biochem. Eng. J.*, vol. 25, no. 2, pp. 165–172, 2005.
- [39] Z. Han, Y. Zeng, H. Lu, and L. Zhang, "Determination of the degree of acetylation and the distribution of acetyl groups in chitosan by HPLC analysis of nitrous acid degraded and PMP labeled products," *Carbohydr. Res.*, vol. 413, pp. 75–84, 2015.
- [40] Y. S. Nam, W. H. Park, D. Ihm, and S. M. Hudson, "Effect of the degree of deacetylation on the thermal decomposition of chitin and chitosan nanofibers," *Carbohydr. Polym.*, vol. 80, no. 1, pp. 291–295, 2010.
- [41] M. H. Struszczyk, "Chitin and Chitosan: Part I. Properties and production," *Polimery/Polymers*, vol. 47, no. 5, pp. 316–325, 2002.
- [42] C. Yomota, T. Miyazaki, and S. Okada, "Determination of the viscometric constants for chitosan and the application of universal calibration procedure in its gel permeation chromatography," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 271, no. 1, pp. 76–82, 1993.
- [43] D. Raafat and H. G. Sahl, "Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey," *Microb. Biotechnol.*, vol. 2, no. 2 SPEC. ISS., pp. 186–201, 2009.

- [44] F. Kreppel and S. Kochanek, "Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: A scientific review and technical guide," *Mol. Ther.*, vol. 16, no. 1, pp. 16–29, 2008.
- [45] S. Parveen and S. K. Sahoo, "Nanomedicine: Clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 45, no. 10, pp. 965–988, 2006.
- [46] Z. Shi *et al.*, "Nanoparticles of deoxycholic acid, polyethylene glycol and folic acid-modified chitosan for targeted delivery of doxorubicin," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 3, pp. 723–731, 2014.
- [47] K. Y. Lee, J. H. Kim, I. C. Kwon, and S. Y. Jeong, "Self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan as a novel carrier of adriamycin," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 278, no. 12, pp. 1216–1219, 2000.
- [48] S. Yang, F. Lin, K. Tsai, M. Wei, H. Tsai, and J. Wong, "Folic Acid-Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells," pp. 679–689, 2010.
- [49] B. Stella *et al.*, "Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting," *J. Pharm. Sci.*, vol. 89, no. 11, pp. 1452–1464, 2000.
- [50] M. Ferrari, "Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 161–171, 2005.
- [51] C. Allen, D. Maysinger, and A. Eisenberg, "Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 16, no. 1–4, pp. 3–27, 1999.
- [52] G. S. Kwon and T. Okano, "Polymeric micelles as new drug carriers," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 21, no. 2, pp. 107–116, 1996.
- [53] M. C. Jones and J. C. Leroux, "Polymeric micelles - A new generation of colloidal drug carriers," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 48, no. 2, pp. 101–111, 1999.
- [54] K. Letchford and H. Burt, "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures : micelles , nanospheres , nanocapsules and polymersomes," vol. 65, pp. 259–269,

2007.

- [55] D. Astruc, E. Boisselier, and C. Ornelas, "Dendrimers designed for functions: From physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 4, pp. 1857–1959, 2010.
- [56] B. K. Nanjwade, H. M. Behra, G. K. Derkar, F. V. Manvi, and V. K. Nanjwade, "Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 38, no. 3, pp. 185–196, 2009.
- [57] V. J. Mohanraj and Y. Chen, "Nanoparticles - A review," *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 561–573, 2007.
- [58] S. Bhatia, *Natural polymer drug delivery systems: Nanoparticles, plants, and algae*. 2016.
- [59] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, and F. Veiga, "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 2, no. 1, pp. 8–21, 2006.
- [60] H. Peniche and C. Peniche, "Chitosan nanoparticles: A contribution to nanomedicine," *Polym. Int.*, vol. 60, no. 6, pp. 883–889, 2011.
- [61] Y. Monsalve *et al.*, "PEG-g-chitosan nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26 for brain drug targeting," *Nanomedicine*, vol. 10, no. 11, pp. 1735–1750, 2015.
- [62] P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 63, no. 1, pp. 125–132, 1997.
- [63] L. Cheng *et al.*, "Synthesis of folate-chitosan nanoparticles loaded with ligustrazine to target folate receptor positive cancer cells," *Mol. Med. Rep.*, vol. 16, no. 2, pp. 1101–1108, 2017.
- [64] A. Tiwari *et al.*, "Multifunctional Magneto-Fluorescent Nanocarriers for Dual Mode Imaging and Targeted Drug Delivery," *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 2, no. 5, pp. 3060–3072, 2019.
- [65] F. Wang *et al.*, "Preparation and characterizations of a novel deoxycholic

acid-O-carboxymethylated chitosan-folic acid conjugates and self-aggregates," *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, no. 3, pp. 1192–1200, 2011.