



**CENTRO DE INVESTIGACION
EN QUIMICA APLICADA**

Título:

Diseño y desarrollo de nanodispositivos basados en quitosano modificado con ácido fólico empleando líquidos iónicos como agentes tensoactivos para la administración dirigida de fármacos anticancerígenos y el uso de estos líquidos iónicos, en polimerización

Presentado por:

M.C. Lluvia Azhalea Guerrero Hernández

Para obtener el grado:

Doctora en Tecnología de Polímeros.

Asesor:

Dr. René D. Peralta Rodríguez.

Co- Asesor:

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz.

2024

Saltillo, Coahuila



Saltillo, Coahuila a 22 de octubre de 2024

Programa de Doctorado en Tecnología de Polímeros

Coordinación de Posgrado

PRESENTE

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **LLUVIA AZHALEA GUERRERO HERNÁNDEZ** titulado “Diseño y desarrollo de nanodispositivos basados en quitosano modificado con ácido fólico empleando líquidos iónicos como agentes tensoactivos para la administración dirigida de fármacos anticancerígenos, y el uso de estos líquidos iónicos en polimerización” el cual fue presentado el día 18 de octubre de 2024, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

SINODALES



Dr. Enrique Saldívar Guerra
Presidente



Dr. Claude St. Thomas
Secretario



Dr. Enrique Javier Jiménez Regalado
Primer Vocal



Dr. Fidel Martínez Gutiérrez
Segundo Vocal

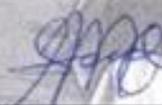


Dr. Luis Felipe Padilla Vaca
Tercer Vocal

Vo. Bo. de los Asesores



Dr. René Darío Peralta Rodríguez
Asesor



Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz
Co-asesor

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: DOCTORADO EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: LLUVIA AZHALEA GUERRERO HERNÁNDEZ FIRMA



TITULO: Diseño y desarrollo de nanodispositivos basados en quitosano modificado con ácido fólico empleando líquidos iónicos como agentes tensoactivos para la administración dirigida de fármacos anticancerígenos, y el uso de estos líquidos iónicos en polimerización.

ASESORES: Dr. René Darío Peralta Rodríguez

FIRMA 

Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

FIRMA 

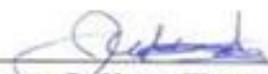
El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 18 de octubre de 2024

Sello de la Institución




Dra. Julieta Torres González
Directora General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Doctorado en Tecnología de Polímeros

TESIS

Diseño y desarrollo de nanodispositivos basados en quitosano modificado con ácido fólico empleando líquidos iónicos como agentes tensoactivos para la administración dirigida de fármacos anticancerígenos, y el uso de estos líquidos iónicos en polimerización

Presentada por:

LLUVIA AZHALEA GUERRERO HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de:

Doctor en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. René Darío Peralta Rodríguez
Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz

Octubre, 2024

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Doctorado en Tecnología de Polímeros

TESIS

Diseño y desarrollo de nanodispositivos basados en quitosano modificado con ácido fólico empleando líquidos iónicos como agentes tensoactivos para la administración dirigida de fármacos anticancerígenos, y el uso de estos líquidos iónicos en polimerización

Presentada por:

LLUVIA AZHALEA GUERRERO HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de:

Doctor en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

**Dr. René Dario Peralta Rodríguez
Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz**

SINODALES



**Dr. Enrique Saldivar Guerra
Presidente**



**Dr. Claude St. Thomas
Secretario**



**Dr. Enrique Javier Jiménez Regalado
Primer Vocal**



**Dr. Fidel Martínez Gutiérrez
Segundo Vocal**



**Dr. Luis Eclipe Padilla Vaca
Tercer Vocal**

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el periodo que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 18 de Octubre de 2024



LLUVIA AZHALEA GUERRERO HERNÁNDEZ

Nombre y Firma

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se lo dedico a la mujer más importante en mi vida, mi abuela Evangelina Hernández Jiménez, que a pesar de que, él día de hoy no se encuentra físicamente a mi lado, ella fue, es y siempre será mi motor para continuar superándome día a día.

Gracias infinitas por guiarme a lo largo de mi vida, por confiar en mis capacidades e impulsarme a lograr todas las cosas que mi mente imaginara. Gracias por tú amor incondicional que ha dejado huella en mi alma sin importar el tiempo ni la distancia.

Te amo inmensamente abuelita.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a Dios, por brindarme sabiduría, paciencia y fuerza en los momentos que parecían ser interminables para permitirme concluir este proyecto de vida.

A mi hijo Omar y mi abuelo Andrés por su amor, sostén y paciencia, por permitirme trabajar intentando no presionarme demasiado. A mi padrino MC. Juan Antonio Guerrero Hernández por ser mi mayor ejemplo para seguir desde que era una niña. A mamá Silvia y mi hermanito Brandon por su cariño y apoyo, a mi tía Rosa y mis primos Jonathan, Andrés y Crisstal por motivarme e impulsarme a continuar a pesar de cualquier circunstancia presentada en estos años y por apoyarme incondicionalmente con mi hijo.

A La Dra. Leticia Larios López infinitas gracias por su ayuda durante el proceso de admisión al doctorado. Al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por la oportunidad de estudiar mi doctorado en esta institución, al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

En especial, gracias a mis padres académicos el Dr. René Darío Peralta Rodríguez y el Dr. Héctor Iván Meléndez Ortiz por su valiosa ayuda a lo largo de estos años, gracias por compartir su conocimiento conmigo y contribuir en el desarrollo de mi proyecto y en mi formación académica como investigadora.

A mis sinodales el Dr. Enrique Saldívar Guerra, Dr. Claude St. Thomas, Dr. Enrique Javier Jiménez Regalado, Dr. Luis Felipe Padilla Vaca y al Dr. Fidel Martínez Gutiérrez por el tiempo invertido en la revisión de mi trabajo para brindarme una retroalimentación y comentarios de alto valor para el enriquecimiento de mi trabajo.

A la MC. Gladis Yakeline Cortez Mazatán por su apoyo constante durante mi estancia en laboratorio, por capacitarme, apoyarme y guiarme con sus consejos para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

A MC. Erick Alfonso Sánchez por su valiosa asesoría respecto a los cálculos teóricos de este trabajo y por brindarme su cariño incondicional, paciencia y ayuda todo momento.

A MC. Ricardo Sebastián Mirón Velázquez por siempre ser un gran amigo.

Al Dr. Gleb Turlakov por su valiosa contribución en la elaboración de los scripts utilizados para realizar los cálculos teóricos de este documento.

A la Dra. Cynthia Lizeth Barrera Martínez por su ayuda y asesoría.

Al personal de CIQA que me apoyaron en la caracterización de mis materiales:

A el Dr. Roberto Espinosa Neira y la Dra. Rebeca Betancourt Galindo por su ayuda para las pruebas de viabilidad celular de mis materiales, Lic. Maricela García Zamora y al Dr. José Román Torres Lubián por su apoyo en las caracterizaciones por RMN, a la Q.F.B Bertha Puente Urbina por su ayuda para la obtención de los DRX. A la Dra. Geraldina Rodríguez Riojas por su ayuda con Maldi-TOF. A la Dra. Griselda Castruita de León por permitirme trabajar en su laboratorio y con sus equipos y al Dr. Germán Alvarado por su apoyo. MC. Lourdes Guillen Cisneros por su capacitación en el uso del FTIR y consejos para elegir las técnicas de análisis más adecuadas para mis compuestos. A la MC. Hened Saade Caballero y MC. Fabiola Yaneth Castellanos Padilla por su capacitación para el uso del dispersor de luz. A la I.Q. Beatriz Elvira Reyes Vielma por su capacitación y préstamo de algunos equipos. Al Dr. Enrique Barriga Castro apoyarme con las caracterizaciones de mis materiales por TEM, a la L.C.Q. Guadalupe Méndez Padilla, M.C. Myrna Salinas Hernández, MC. Israel Sifuentes por las caracterizaciones por DSC, TGA y DMA y a el Q.F.B. Jesús Cepeda Garza y la Dra. Esmeralda Saucedo Salazar por su tiempo y ayuda para la obtención de mis caracterizaciones por SEM, a MC. María Teresa Rodríguez por su ayuda en mis análisis de GPC.

A la Dra. Ivana Moggio por su seguimiento como mi tutora, a la MC. Aída Esmeralda García Valdez y MC. Gladys Villarreal por su valioso apoyo para proporcionarme las condiciones necesarias para avanzar en la escritura de mi tesis, a Nancy Guadalupe Espinosa Pinales y Elvia Guadalupe González González por su ayuda constante.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	VII
AGRADECIMIENTOS.....	VIII
CONTENIDO.....	X
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABLAS	XIX
SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	XX
RESUMEN.....	XXVI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Biopolímeros.....	3
2.2 Quitosano (CS)	4
2.3 Viabilidad celular.....	5
2.4 El quitosano y su potencial para la administración de fármacos anticancerígenos	7
2.5 Conjugación del quitosano con ácido fólico (CS-FA) para liberación de fármacos anticancerígenos.....	11
2.6 Microemulsiones (ME).....	12
2.6.1 Componente hidrofílico y co-tensoactivo	14
2.6.2 Componente anfifílico.....	14
2.6.3 Componente hidrófobo.....	21
2.6.4 Métodos de formulación de microemulsiones	22
2.6.5 Determinación de la región de microemulsión	23
2.7 Microemulsiones con aceites esenciales para liberación de fármacos anticancerígenos.....	23

2.8	Nanodispositivos poliméricos núcleo - coraza acarreadores de fármacos anticancerígenos.....	26
2.9	Polimerización por radicales libres	28
2.9.1	Antecedentes sobre polimerizaciones por radicales libres utilizando líquidos iónicos	29
2.10	Polimerización en microemulsión	30
2.10.1	Componentes de las polimerizaciones en microemulsión propuestas en este trabajo.....	31
2.10.2	Estado del arte de polimerizaciones en microemulsión de estireno y acetato de vinilo.....	33
3.	JUSTIFICACIÓN.....	36
4.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
4.1	Hipótesis.....	37
4.2	Objetivos.....	37
4.2.1	Objetivo general.....	37
4.2.2	Objetivos específicos	37
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	39
5.1	Modificación del quitosano (CS) con el ácido fólico (FA) (CS-FA) y caracterizaciones de CS y CS-FA	39
5.1.1	Análisis estructural mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	40
5.1.2	Determinación del grado de acetilación (GA) y de desacetilación (GD) del quitosano	40
5.1.3	Análisis mediante difracción de rayos X (XRD)	41
5.1.4	Determinación del grado de injerto (GI) del quitosano modificado con ácido fólico	41

5.1.5 Comportamiento reológico y determinación del peso molecular promedio viscoso (M_v) del quitosano	42
5.2 Síntesis y caracterización de tensoactivos bicéfalos dianiónicos derivados de ácidos grasos saturados e insaturados	43
5.2.1 Análisis estructural mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	44
5.2.2 Análisis estructural mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMN 1H) y carbono (RMN ^{13}C).....	45
5.2.3 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) mediante las técnicas de conductividad eléctrica y tensiometría	45
5.2.4 Determinación del número de agregación (N_{agg}) y parámetro crítico de empaquetamiento (P_e)	45
5.2.5 Ensayo de viabilidad celular <i>in vitro</i> de los tensoactivos bicéfalos	48
5.3 Formulación de sistemas con los tensoactivos sintetizados, pruebas preliminares para la formación de microemulsiones con los tensoactivos sintetizados y sus caracterizaciones mediante potenciometría, DLS y UV-VIS	49
5.4 Formulación de microemulsiones (ME) utilizando líquidos iónicos (IL) comerciales como tensoactivos bicéfalos catiónicos	50
5.4.1 Determinación de la región de microemulsión mediante la construcción de diagramas de fases ternarios.....	50
5.4.2 Determinación de la solubilidad de los principios activos anticancerígenos en el aceite esencial de menta (AcM)	50
5.4.3 Formulación de microemulsiones (ME) aceite en agua (o/w) con el líquido iónico (IL) C1EG® y aceite esencial de menta (AcM). Determinación de las condiciones óptimas la formación de la coraza de quitosano y su caracterización.....	51
5.4.4 Formación y caracterización de nanodispositivos poliméricos (NDP) cargados con paclitaxel.....	52

5.5 Perfiles de liberación de los nanodispositivos poliméricos (NDP) a pH de 5.8, 6.5 y 7.4 y ajuste a los modelos matemáticos de liberación	53
5.6 Evaluación de viabilidad celular <i>in vitro</i> de los nanodispositivos poliméricos en las líneas celulares de fibroblastos (1132SK), cáncer de pulmón (A549) y cáncer de mama (MDA-MB-231).....	54
5.7 Polimerizaciones en microemulsión de estireno (St) y acetato de vinilo (VAc)	55
5.7.1 Determinación de la región de microemulsión mediante la construcción de diagramas de fases ternarios.....	55
5.7.2 Polimerizaciones en microemulsión de estireno y acetato de vinilo	55
5.7.2.1 Caracterización de los látex	56
5.7.2.2 Caracterización de los polímeros.....	57
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	59
6.1 Modificación del quitosano (CS) con el ácido fólico (FA) (CS-FA)	59
6.1.1 Análisis estructural mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	59
6.1.2 Determinación del grado de acetilación (GA) y de desacetilación (GD) del quitosano.	60
6.1.3 Análisis mediante difracción de rayos X (XRD)	61
6.1.4 Determinación del grado de injerto (GI) del quitosano modificado con ácido fólico	62
6.1.5 Comportamiento reológico y determinación del peso molecular promedio viscoso (M_v) del quitosano.....	63
6.2 Síntesis y caracterización de tensoactivos bicéfalos dianiónicos (BS) derivados de ácidos grasos saturados e insaturados.....	65
6.2.1 Análisis estructural mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	65

6.2.2	Análisis estructural mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹ H) y carbono (RMN ¹³ C).....	67
6.2.3	Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) mediante la técnica de conductividad y tensión superficial	72
6.2.4	Determinación del número de agregación (N _{agg}) y parámetro crítico de empaquetamiento	74
6.2.5	Ensayo de viabilidad celular <i>in vitro</i> de los tensoactivos bicéfalos	78
6.3	Formulación de sistemas con los tensoactivos sintetizados, pruebas preliminares para la formación de microemulsiones con los tensoactivos sintetizados y su caracterización mediante potenciometría, DLS y UV-VIS	79
6.4	Formulación de microemulsiones utilizando líquidos iónicos (IL) comerciales como tensoactivos bicéfalos catiónicos	83
6.4.1	Determinación de la región de microemulsión mediante la construcción de diagramas de fases ternarios.....	83
6.4.2	Determinación de la solubilidad de los principios activos anticancerígenos en el aceite esencial de menta (AcM)	86
6.4.3	Formulación de ME aceite en agua (o/w) empleando C1EG® y aceite esencial de menta (AcM) y determinación de las condiciones óptimas para la formación de la coraza polimérica	86
6.4.4	Formación y caracterización de nanodispositivos poliméricos (NDP)	90
6.5	Perfiles de liberación de los nanodispositivos poliméricos (NDP) a pH de 5.8, 6.5 y 7.4 y ajuste a los modelos matemáticos de liberación	93
6.6	Ensayo de viabilidad celular <i>in vitro</i> de los NPD.....	95
6.7	Polimerizaciones en microemulsión de estireno (St) y acetato de vinilo (VAc)	97
6.7.1	Determinación de la región de microemulsión mediante la construcción de diagramas de fases ternarios.....	97
6.7.2	Polimerizaciones en microemulsión de estireno y acetato de vinilo	99

6.7.2.1 Caracterización de los látex.....	99
6.7.2.2 Caracterización de los polímeros	104
7. CONCLUSIONES.....	115
REFERENCIAS	117
MATERIAL SUPLEMENTARIO	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los polímeros y ejemplos.....	3
Figura 2. Proceso de desacetilación de la quitina a quitosano	4
Figura 3. Clasificación de los sistemas Winsor: I (o/w), II (w/o), III (bicontinua) y IV(monofásica).	13
Figura 4. Clasificación de los tensoactivos según la naturaleza de su cabeza: a) aniónico, b) catiónico, c) no iónico, d) zwitteriónicos, e) bolaformes simétricos o asimétricos, f a) gemini dicatiónicos, dianiónico o zwitteriónicos con espaciador en las colas, f b) gemini dicatiónicos, dianiónico o zwitteriónicos con espaciador en las cabezas, g) BS dianiónicos, dicatiónicos o cargas mixtas y h) multicabeza.....	15
Figura 5. Diagrama parcial de fases ternario para los tres tipos de microemulsiones.....	23
Figura 6. Mecanismo de una polimerización en microemulsión.....	31
Figura 7. Componentes de las polimerizaciones en microemulsión	33
Figura 8. Reacción de amidación para la modificación del CS con FA.....	39
Figura 9. Ruta de síntesis de tensoactivos BS derivados de ácidos grasos	43
Figura 10. Delimitación del radio micelar en el BS.	46
Figura 11. Parámetros para el cálculo de P_e	47
Figura 12. Espectros de FTIR de a) quitosano, b) ácido fólico y c) quitosano modificado con ácido fólico (modo ATR, 25 escaneos, resolución de 4 cm^{-1}).....	60
Figura 13. Difractogramas de rayos X de a) quitosano y b) quitosano modificado con ácido fólico.....	61
Figura 14. Espectro de RMN ^1H del CS-FA. Muestra: 15 mg de CS-FA en 1 mL de solución al 1% p/p de HCl/ D_2O , con un capilar de vidrio a $25\text{ }^\circ\text{C}$, 400 MHz.....	62
Figura 15. Regresión lineal realizada con los valores de η_{red} y η_{inh}	64
Figura 16. Espectros de FTIR de la síntesis de a) producto 3 b) 5AO, c) 5AL y d) 5 AM (sección 5.2 etapa II)(modo ATR ,25 “escaneos”, resolución de 4 cm^{-1}) con sus respectivos rendimientos de reacción (%R)	66
Figura 17. Espectros de FTIR de la síntesis de tensoactivos dianiónicos a) 6AO, b) 6AL y c) 6AM (modo ATR, 25 escaneos, resolución de 4 cm^{-1}) con sus %R y estabilidad térmica..	67

Figura 18. Espectros de RMN ¹ H de a) producto 3 (N, N'-di-(terc-butiloxicarboniletil)aminopropanol), b) 5AO, c) 5AL y d) 5AM. Muestra de 30 mg en 1 mL de CDCl ₃ a 25 °C, 400 MHz	68
Figura 19. Espectros de RMN ¹ H de a) 6AO, b) 6AL y c) 6AM. Muestra de 30 mg en 1 mL de D ₂ O a 25 °C, 400 MHz	69
Figura 20. Espectros de RMN ¹³ C de a) producto 3, b) 5AO, c) 5AL y d) 5AM. Muestra de 30 mg en 1 mL de CDCl ₃ a 25 °C, 400 MHz	71
Figura 21. Espectros de RMN ¹³ C de a) 6AO, b) 6AL y c) 6AM. Muestra de 30 mg en 1 mL de D ₂ O a 25 °C, 400 MHz	72
Figura 22. Determinación de los valores de CMC a 25 °C en agua, mediante conductividad eléctrica de los BS ■6AO ●6AL ▲6AM.	73
Figura 23. Estructuras optimizadas mediante DFT de los BS a) 6AO, b) 6AL, c) 6AM y d) C1EG®, el gris representa el carbono, el azul representa el nitrógeno, el rojo representa el oxígeno, el blanco representa el hidrógeno, el morado representa el sodio y el amarillo el azufre	74
Figura 24. Estructuras moleculares mediante el visor de moléculas Jmol de los BS a) 6AO, b) 6AL, c) 6AM y d) C1EG®.....	76
Figura 25. Tipos de empaquetamiento micelar	77
Figura 26. Ensayo de viabilidad celular de los BS en las líneas celulares a) MDA-MB-231 y b) A549■6AL●6AO▲6AM.....	78
Figura 27. Diagrama parcial de fases de los sistemas con a) C1EG® y b) T2EG®	84
Figura 28. Micrografías y distribuciones determinadas mediante TEM a) ME2, b) ME2CS1 y c) M2CS4.....	89
Figura 29. Micrografías y distribuciones mediante TEM para a) NDP1, b) NDP2, c) NDP3, d) NDP4, e) NDP5 y f) NDP6	92
Figura 30. Perfiles de liberación de AcM de los ■NDP3 (CS-PTX), ●NDP 5 (CS-FA- PTX), ▲ NDP 6 (ME-PTX) a pH 5.8, 6.5 y 7.4	93
Figura 31. Viabilidad celular (%) de los NDP en líneas celulares a) cáncer de pulmón (A549), b) cáncer de mamá (MDA-MB-231) y c) fibroblastos (1132SK).....	96
Figura 32. Diagrama parcial de fases ternario para microemulsiones a 25 °C a) St y b) VAc y a 60 °C c) St y d) VAc.....	98

Figura 33. Diámetros promedio de partícula y porcentaje de conversión a través del tiempo, obtenidos durante las polimerizaciones en microemulsión a) ▲%C y D_p ▲ de C4St a 50 °C y ■%C y D_p ■ de C7St a 60 °C; b) ▲%C y D_p ▲ de C3VAc a 60 °C y ■%C y D_p ■ de C6VAc a 70 °C	101
Figura 34. Micrografías de los látex obtenidas mediante TEM a) C4St, b) C7St, c) C3VAc y d) C6VAc.....	103
Figura 35. Micrografías de los látex obtenidas mediante SEM a) C4St 100,000X, b) C7St 100,000X, c) C3VAc 50,000X y d) C6VAc 30,000X.....	104
Figura 36. Espectros de FTIR de a) C7St, b) C4St, c) C6VAc y d) C3VAc (modo ATR ,25 escaneos, resolución de 4 cm^{-1})	105
Figura 37. Espectros de RMN ^1H de a) C6VAc, b) C3VAc, c) C4St y d) C7St. Muestra de 30 mg en 1 mL de CDCl_3 a 25 °C, 400 MHz	106
Figura 38. Espectros de RMN ^{13}C de a) C4St, b) C7St, c) C6VAc y d) C3VAc. Muestra de 30 mg en 1 mL de CDCl_3 a 25 °C, 400 MHz	107
Figura 39. Cromatogramas de GPC ($\log M_w$ vs dwt/d ($\log M$) a) C4St y C7St y b) C3VAc y C6VAc	108
Figura 40. Curvas de TGA a) C3VAc, b)C6VAc, c) C4St y d) C7St.....	111
Figura 41. Termogramas de DSC a) C3VAc, b) C6VAc, c) C7St y d) C4St.....	112
Figura 42. Curvas de DMA de relación entre el E' módulo de pérdida y E'' módulo de almacenamiento a) C3VAc, b) C6VAc, c) C7St y d) C4St.....	113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones quimioterapéuticas con CS.	8
Tabla 2. Modificación del CS-FA para aplicaciones quimioterapéuticas.	12
Tabla 3. Reportes sobre la síntesis de BS	18
Tabla 4. Aceites vegetales y esenciales con propiedades anticancerígenas	21
Tabla 5. Reportes sobre ME conteniendo aceites vegetales y esenciales con propiedades anticancerígenas como fase oleosa	24
Tabla 6. Composición de los nanodispositivos poliméricos preparados.	52
Tabla 7. Diseño experimental de las polimerizaciones en ME de St y VAc	55
Tabla 8. Valores de viscosidad de soluciones a diferentes concentraciones de CS a 25 °C en ácido acético 0.2 M y acetato de amonio 0.15 M.....	63
Tabla 9. Constantes K y α obtenidas por Czechowska-Biskup 2018	64
Tabla 10. Parámetros requeridos para el cálculo teórico del N_{agg}	75
Tabla 11. Parámetros requeridos y valores para el cálculo teórico del P_e (Ec. 21)	77
Tabla 12. Porcentajes de aceite incorporados a los sistemas formulados.....	80
Tabla 13. Valores obtenidos de la caracterización de sistemas formulados con diferentes BS y con cinco aceites mediante potenciometría, UV-VIS y DLS	80
Tabla 14. Valores obtenidos de la caracterización de los sistemas con y sin co-tensioactivo mediante DLS y UV-VIS	82
Tabla 15. Concentraciones de los componentes de la ME para la construcción del diagrama de fases	83
Tabla 16. Composición de los sistemas obtenidos usando IL como tensioactivos y sus caracterizaciones por potenciometría, UV-VIS y DLS	84
Tabla 17. Solubilidades de los API en el AcM.....	86
Tabla 18. Propiedades de las microemulsiones sin y con coraza de quitosano.....	87
Tabla 19. Valores obtenidos mediante potenciometría, DLS, conductimetría y potencial Z para los NDP.....	90
Tabla 20. Resultados del análisis de la cinética de liberación mediante el ajuste a cuatro modelos matemáticos	94

SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

% r	Porcentaje de rendimiento
1132SK	Línea celular de fibroblastos
5AL	Di-terc-butilo 3,3'-((3-(((7E,10E)-octadeca-7,10-dienoiloxi)propil)azanediil)dipropionato
5AM	Di-terc-butilo 3,3'-((3-(tetradecanoiloxi)propil)azanediil)dipropionato
5AO	Di-terc-butilo 3,3'-((3-(oleoiloxi)propil)azanediil)dipropionato
6AL	Tensoactivo bicéfalo a partir del ácido linoleico
6AM	Tensoactivo bicéfalo a partir del ácido mirístico
6AO	Tensoactivo bicéfalo a partir del ácido oleico
A•	Radical que reiniciará la polimerización
a₀	Área de la superficie de la cabeza polar de un tensoactivo (Å ²)
A549	Línea celular de cáncer de pulmón
AcA	Aceite de aguacate
AcC	Aceite de canela
AcCl	Cloruro de acilo
AcJ	Aceite de jojoba
AcM	Aceite de menta
AcO	Aceite de oliva
AL	Ácido linoleico
Al	Alginato

AM	Ácido mirístico
AO	Ácido oleico
API	Principio activo
BS	Tensoactivo bicéfalo
C1EG® y T2EG®	Líquidos iónicos catiónicos
CMC	Concentración micelar crítica (mmol/L)
CMeC	Carboximetilcelulosa
CS	Quitosano
CS-FA	Quitosano modificado con ácido fólico
Cu	curcumina
D	Distancia entre las cabezas polares de un tensoactivo bicéfalo (Å)
Da	Dalton
DCM	Diclorometano
DFT	Teoría de funcionales de densidad
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMA	Análisis dinámico mecánico
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
D_p	Diámetro de partícula hidrodinámico (nm)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido

EDAC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
FA	Ácido fólico
FBS	Suero bovino fetal
Fkd	Tasa de descomposición del iniciador
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GA	Grado de acetilación (%)
GD	Grado de desacetilación (%)
GI	Grado de injerto (%)
GPC	Cromatografía de permeación en gel
I	Iniciador
IC50	Concentración inhibitoria media ($\mu\text{g/mL}$)
IL	Líquido iónico
IR	Índice de refracción
K₀	Constante de liberación de orden cero (mg)
K₁	Constante de tasa de reacción de primer orden (h^{-1})
K_a	Constante de tasa de reiniciación ($\text{L/mol}\cdot\text{s}$)
K_H	Constante de liberación de Higuchi ($\text{h}^{-0.5}$)
k_i	Constante de tasa de iniciación ($\text{L/mol}\cdot\text{s}$)
k_{kp}	Constante de liberación de Korsmeyer-Peppas
k_p	Constante de tasa de propagación ($\text{L/mol}\cdot\text{s}$)
k_{tc}	Constante de tasa de terminación por combinación ($\text{L/mol}\cdot\text{s}$)
k_{td}	Constante de tasa de terminación por descomposición($\text{L/mol}\cdot\text{s}$)

k_{tr}	Constante de tasa de transferencia en cadena (L/mol·s)
l_0	Longitud de la cadena hidrófoba (Å)
M	Monómero
M^+	Masa molar experimental
M_1^\bullet	Radical monomérico
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama
ME	Microemulsión
MeOH	Metanol
M_n	Peso molecular medio numérico (Da)
M_p	Peso molecular máximo (Da)
M_v	Peso molecular promedio viscoso (Da)
M_w	Peso molecular (Da)
M_w/M_n	Polidispersidad por GPC
M_z	Peso molecular promedio Z (Da)
n	Coefficiente de difusión en el modelo Korsmeyer-Peppas
<i>n</i>	Grado de polimerización
η	Viscosidad intrínseca (dm ³ /g)
N_{agg}	Número de agregación
NaOH	Hidróxido de sodio
NC	Nanocompuestos
ND	Nanodispositivo
NDP	Nanodispositivos poliméricos

NHS	N-hidroxisuccinimida
η_i	Viscosidad de las soluciones del polímero (g/dm ³)
η_{inh}	Viscosidad inherente (g/dm ³)
η_o	Viscosidad del disolvente (g/dm ³)
N_p	Número de partículas (mL ⁻¹)
NP	Nanopartículas
η_r	Viscosidad relativa (g/dm ³)
η_{red}	Viscosidad reducida (g/dm ³)
η_{sp}	Viscosidad específica (g/dm ³)
O/W	Aceite en agua
PBS	Buffer de fosfatos
PDI	Polidispersidad
P_e	Parámetro de empaquetamiento
PEG	Poli(etilenglicol)
Producto 3	3-N,N'-di-(terc-butiloxycarboniletil)aminopropanol
PSt	Poliestireno
PTX	Paclitaxel
PVAc	Poliacetato de vinilo
R	Radio micelar (Å)
R•	Radical primario
R²	Coefficiente de determinación
R_a	Radio efectivo de la cabeza de un tensoactivo bicéfalo (Å)

R_B	Radio teórico de Bohr para el átomo de las cabezas polares (Å)
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
R_{Ssa}	Radio teórico del disolvente (Å)
R_t	Temperatura ambiente (°C)
S_{as}	Proporciones de la cabeza y esfera de solvatación del tensoactivo
SDS	Docecilsulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
St	Estireno
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
UV-VIS	Espectroscopia por UV-VIS (nm)
V₀	Volumen de la cadena hidrófoba (Å ³)
V-50	2,2'-azobis-2-metilpropionamida
VAc	Acetato de vinilo
V_{dw}	Volumen de Van Der Waals (Å ³)
V_{mol iso}	Volumen molecular de isosuperficie (Å ³)
V_s	Visual
XA	Átomo transferido
XRD	Espectroscopia de difracción de rayos X
ζ	Potencial Z (mV)

RESUMEN

En la presente investigación, se obtuvieron nanodispositivos poliméricos (NDP, de tamaños de 27 a 40 nm) recubiertos con una coraza biopolimérica de quitosano (CS) y/o quitosano modificado con ácido fólico (CS-FA) como sistemas de administración dirigida de fármacos anticancerígenos. Inicialmente se trabajó en la síntesis de novedosos tensoactivos bicéfalos (BS) dianiónicos partiendo de ácidos grasos saturados e insaturados (mirístico, linoleico y oleico). Estos fueron caracterizados mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Por otra parte, se les determinó la concentración micelar crítica (CMC) mediante conductividad, número de agregación y parámetro de empaquetamiento (mediante cálculos teóricos aplicando la teoría de funcionales de la densidad), ensayos de viabilidad celular en las líneas celulares tumorales de cáncer de pulmón (A549) y mama (MDA-MB-231) y evaluación como agentes micro emulsionantes utilizando aceites esenciales de menta (AcM), canela, jожoba y vegetales (oliva y aguacate). Los resultados obtenidos de estas formulaciones demostraron que, no es posible el uso de estos BS para la formación de microemulsiones (ME).

Se sustituyó el uso de estos BS por los líquidos iónicos (IL) Io-li-tec C1EG® y T2EG® (considerados BS comerciales), como alternativa para la formación de ME. Inicialmente se determinó la región de ME mediante la construcción de diagramas parciales de fases ternarios y los resultados derivados indicaron que el BS C1EG® permite la obtención de ME estables, traslúcidas y con mayor porcentaje de AcM. Posteriormente, las ME fueron tratadas con CS-FA para recubrir las gotitas de la ME y formar NDP los cuales demostraron ser sistemas termodinámicamente estables. Enseguida, se determinaron los perfiles de liberación de los compuestos bioactivos de los NDP conteniendo el aceite esencial de menta y el fármaco anticancerígeno paclitaxel. Los datos obtenidos de los perfiles de liberación de los compuestos bioactivos se ajustaron a cuatro modelos matemáticos de mecanismo de liberación, siendo el modelo de Korsmeyer-Peppas el que permitió obtener mejor ajuste en los sistemas poliméricos. La evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de cristal violeta, como ensayo preliminar (existen otras técnicas más sensibles, como la de formazán), indicó que estos NDP no producen un efecto citotóxico en células

sanas, sin embargo, si presentan una mayor citotoxicidad en las líneas de cáncer MDA-MB-231 (mama) y A549 (pulmón).

Para investigar el comportamiento del IL C1EG® en polimerizaciones mediante radicales libres, se llevaron a cabo polimerizaciones en ME de estireno (St) y acetato de vinilo (VAc) por radicales libres empleando el tensoactivo C1EG® variando las concentraciones de monómero, e iniciador y temperatura. Los polímeros obtenidos fueron caracterizados mediante FTIR, RMN, cromatografía en permeación de gel (GPC), análisis termogravimétrico TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis mecánico dinámico (DMA).

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se ha incrementado el interés respecto a la obtención y/o modificación de polímeros naturales y/o sintéticos, debido a que desempeñan un papel crucial en diversas industrias como la papelera, alimenticia, electrónica, cosmética, automotriz, aeronáutica, farmacéutica, biomédica, entre otras, destacando su relevancia en el diseño y desarrollo de sistemas de administración de fármacos anticancerígenos [1]. El quitosano (CS) es un polímero natural biodegradable, no tóxico, pH responsivo [2] y altamente reactivo por sus grupos funcionales que permiten la modificación de su superficie al unirse con otros receptores y así lograr la administración de terapias dirigidas [3].

Por otro lado, el cáncer es una de las enfermedades con mayor mortalidad en el mundo que consiste en el crecimiento descontrolado de células tumorales malignas. Actualmente, estas enfermedades son tratadas, entre otras opciones, mediante terapias convencionales, no selectivas, con baja biodisponibilidad y altamente tóxicas que provocan efectos secundarios indeseables en los pacientes[4]. Por estas razones, se requiere el diseño de quimioterapias dirigidas que permitan la administración de los fármacos anticancerígenos de manera eficiente, reduciendo sus efectos laterales y la toxicidad.

Las microemulsiones (ME) son sistemas coloidales termodinámicamente estables e isotrópicos transparentes y con gotitas (o partículas) de tamaños nanométricos, que han sido empleadas como forma farmacéutica para liberación de fármacos quimioterapéuticos [5]. Estos sistemas son formados por al menos un componente hidrofílico (que suele ser agua), uno hidrofóbico (que podría ser un aceite esencial) [6] y un componente anfifílico, como los tensoactivos bicéfalos (BS) los cuales tienen dos cabezas polares y una cola hidrófoba [7]. Además, las gotitas de estas ME pueden ser recubiertas con biopolímeros para la formación de nanodispositivos poliméricos (NDP), los cuales en los últimos años han atraído mucho la atención debido a que permiten proteger el principio activo (API por sus siglas en inglés: active pharmaceutical ingredient, (sustancia que produce el efecto farmacológico en una formulación farmacéutica) dentro de un núcleo, recubriéndolo con una coraza funcionalizada que permite desarrollar terapias dirigidas mejorando la solubilidad, biodisponibilidad, farmacocinética y farmacodinamia del API, reduciendo los efectos secundarios producidos por terapias no selectivas [8].

Por otro lado, el empleo de líquidos iónicos (IL) como estabilizadores para polimerizaciones en ME representan una opción atractiva, pues podrían reducir la cantidad de tensoactivo en la formulación. Además, desde un punto de vista académico, existen pocos reportes sobre esta aplicación, aunque los IL

se han utilizado como disolventes y no como agentes anfifílicos. Por otra parte, podría ser una oportunidad para la disminución de la contaminación ambiental y de los riesgos a la salud ocasionados en las polimerizaciones convencionales en las que se usa un tensoactivo.

En este trabajo de investigación se reportan los resultados de la obtención de ME recubiertas con los biopolímeros de CS y/o quitosano modificado con ácido fólico (CS-FA), como sistemas nano acarreadores de fármacos anticancerígenos para terapias dirigidas. Se presentan las caracterizaciones fisicoquímicas del CS, CS-FA y de los BS sintéticos y/o comerciales para la formulación de ME con aceites esenciales y vegetales con el fármaco anticancerígeno paclitaxel. Posteriormente, Las partículas de estas se ME recubrieron con una coraza biopolimérica (CS o CS-FA) y se llevó a cabo la evaluación de liberación de los componentes bioactivos y los ensayos de viabilidad celular *in vitro*. Finalmente, se presentan los resultados de las caracterizaciones de los látex y los polímeros obtenidos de las polimerizaciones en ME del estireno (St) y el acetato de vinilo (VAc) utilizando IL como tensoactivo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Biopolímeros

Los polímeros son macromoléculas compuestas de un gran número de unidades repetitivas (monómeros) unidas covalentemente y se clasifican según su origen, naturaleza y/o estructura. Los biopolímeros son aquellos que se obtienen a partir de organismos vivos; algunos ejemplos de estos, son de crustáceos, camarones, langostinos, langostas, conchas, entre otros [9], [10]. Otros tipos se obtienen sintéticamente [11]. En la Figura 1 se presenta un esquema de la clasificación de estos materiales y algunos ejemplos de ellos.

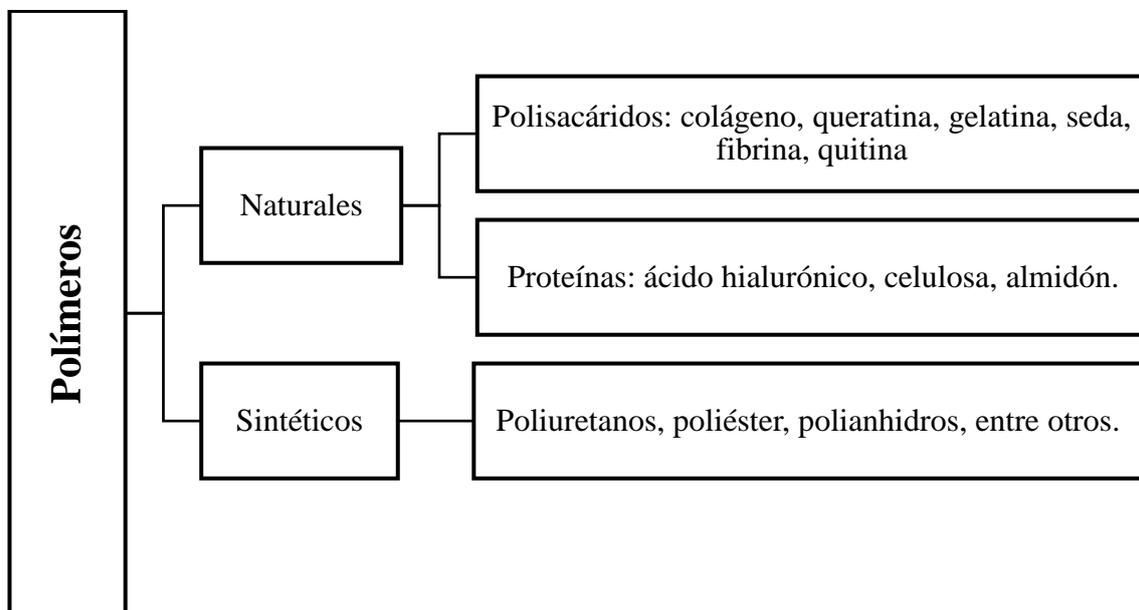


Figura 1. Clasificación de los polímeros y ejemplos

Debido a la diversidad y versatilidad de los biopolímeros, en los últimos años se ha presentado un auge en sus estudios, atribuido a las interesantes propiedades biomédicas que poseen estos materiales entre las cuales destacan su buena biocompatibilidad que está relacionada con su nula o baja citotoxicidad, motivo por el cual el uso del quitosano ha sido aceptado oficialmente por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) [12].

Entre las aplicaciones de los biopolímeros se pueden destacar su uso para la fabricación de dispositivos ortopédicos, cardiovasculares, dentales y oftálmicos [13], en suturas quirúrgicas [9], ingeniería de tejidos [14], medicina regenerativa [15], vacunas y formulaciones farmacéuticas, permitiendo liberar un fármaco

directamente en el sitio de acción, debido a que algunos biopolímeros pueden ser sensibles a estímulos externos como al pH y/o temperatura [16].

El uso de biopolímeros como tecnología emergente en sistemas de administraciones de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos representan una alternativa atractiva y novedosa de tercera generación. Esta tiene como finalidad reducir las limitantes de los fármacos de primera generación (donde la liberación del fármaco es dependiente del tipo de sistema de administración) y de segunda generación (donde la farmacocinética es dependiente de la farmacodinamia y absorción del fármaco en el sitio de acción) mientras que los sistemas de tercera generación permiten la liberación del fármaco de manera eficiente en el sitio de acción y reducen los efectos colaterales [17].

2.2 Quitosano (CS)

El quitosano (CS) es un biopolímero de origen natural que pertenece a la clasificación de polisacáridos catiónicos [18], el cual se obtiene mediante la desacetilación del segundo biopolímero más abundante en la Tierra, que es la quitina, [19], [20] por medio de una reacción hidrólisis alcalina de los grupos amino y acetilo [21]–[23]; al término de la hidrólisis es necesario la determinación del grado de desacetilación, el cual debe encontrarse dentro de un intervalo de 70 al 95% para asegurar la transformación exitosa de la quitina a quitosano [24].

En la Figura 2 se representa el proceso de desacetilación, donde se puede apreciar el cambio de estructura química de la quitina a CS, siendo este último, un copolímero de N- acetil-D-glucosamina con un grupo amino y dos grupos hidroxilos con unidades repetitivas de glucosa modificada [10].

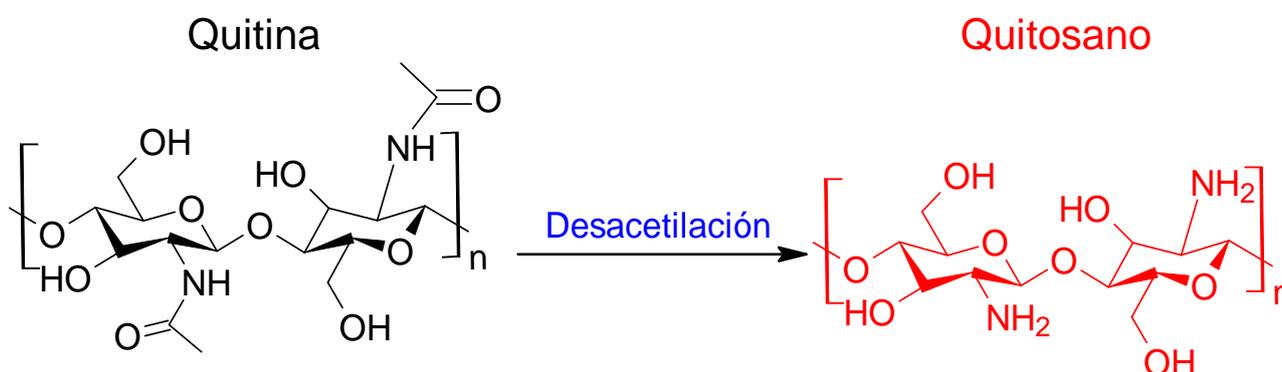


Figura 2. Proceso de desacetilación de la quitina a quitosano

Debido a los grupos amino e hidroxilo que posee el CS en su estructura, estos actúan como sitios activos proporcionándole una elevada reactividad a este compuesto, ampliando su panorama de aplicaciones [25]

en hidrogeles, fibras, películas, andamios, nanopartículas [26], tabletas, perlas [27], recubrimientos [18], vacunas, implantes, en ingeniería de tejidos [11], fabricación de membranas para el tratamiento de aguas, alimentos, cosmética [28], biosensores y biomedicina [10].

El CS es un biopolímero aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de USA [18], [29] para su uso en la administración de fármacos por *vía* parenteral, nasal, transdérmica, y oral entre otras. Algunas de las características más destacables del CS son su bioseguridad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, sensibilidad al pH y adhesividad que favorecen la aplicación en un medicamento incrementando su biodisponibilidad [26]. Este biopolímero es ideal para formulaciones farmacéuticas con principios activos (API) de clasificación biofarmacéutica II (alta permeabilidad y baja solubilidad) y IV (baja solubilidad y permeabilidad) como lo son la mayoría de los fármacos anticancerígenos.

2.3 Viabilidad celular

El término de viabilidad celular se define como la capacidad que tienen las células para mantenerse vivas desarrollando sus funciones específicas. La determinación de la viabilidad celular es crucial para determinar el porcentaje de células vivas de una población celular antes y después de ser expuestas a un agente, lo que tiene implicaciones significativas en la industria farmacéutica. Específicamente, el conocimiento de la viabilidad celular es fundamental para la evaluación de materiales y/o sistemas enfocados en el desarrollo de terapias, incluyendo formulaciones para aplicaciones anticancerígenas.

La determinación de la viabilidad celular se puede realizar mediante una variedad de ensayos, los cuales se seleccionan considerando factores como los costos, tiempos, equipos empleados y sensibilidades de los métodos. El objetivo de estos es obtener resultados de manera confiable que permitan determinar la capacidad de las células para sobrevivir y proliferar ante diferentes estímulos, lo que es esencial para evaluar la seguridad y eficacia de nuevos fármacos y terapias. Los ensayos de viabilidad celular son clasificados en [30]:

- Exclusión de colorantes

Es un ensayo sencillo para estimar y evaluar la proporción de células viables debido a que, únicamente las células vivas excluyen el colorante. Entre los colorantes mayormente utilizados se encuentran el rojo congo, eosina, eritrosina B y azul tripán. La ventaja más resaltante de estos métodos es su capacidad para realizar pruebas de quimio sensibilidad. Sin embargo, estos presentan algunas limitaciones como que estos son exclusivos para células en suspensión, son ensayos lentos, las células pueden continuar proliferando

y algunas de las células dañadas no se tiñen; estos últimos factores pueden promover la obtención de falsos positivos en los porcentajes de viabilidad determinados [30].

- Luminométricos

Los ensayos luminométricos son rápidos y sencillos para determinar la viabilidad celular, se obtienen resultados con alta precisión y sensibilidad, sin embargo, se requiere el uso de kits especiales. La característica más importante de estos es la emisión de una señal brillante y constante posterior a la adición del reactivo, este atributo permite generar los valores de viabilidad celular y citotoxicidad. Entre estos ensayos se encuentra ATP (trifosfato de adenosina) y ensayos de viabilidad en tiempo real [31].

- Fluorométricos

Estos ensayos ofrecen una alternativa altamente sensible para evaluar la viabilidad y toxicidad de las células suspendidas y/o adherentes, sin embargo, estos requieren de kits y del uso de equipos adicionales como un lector de microplacas o un microscopio de fluorescencia, citómetro de flujo y/o fluorómetro. Los métodos utilizados son alamarblue (resazurina), viabilidad en proteasas GF-AFC (glicilfenilalanilaminofluorocumarina) y/o CFDAAM(diacetato de 5-carboxifluoresceína, éster acetoxi-metílico) [31].

- Colorimétricos

Los ensayos colorimétricos se basan en la medición de un marcador bioquímico para evaluar la actividad metabólica de las células. Estos utilizan reactivos que desarrollan un color en respuesta a la viabilidad de las células, lo que permite la medición de la viabilidad celular mediante un espectrofotómetro.

Entre las ventajas generales más destacables de estos métodos, es que son aplicables tanto para células suspendidas y/o adherentes, son técnicas en su mayoría económicas o que no requieren de reactivos, materiales y/o equipos costosos. Los ensayos colorimétricos más utilizados son cristal violeta, MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), XTT (2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-(2H)-tetrazolio-5-carboxanilida), SRB (sulforodamina B), MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfenil)-2H-tetrazolio), WST1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzensulfonato), WST8 (2-(2-Metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonilfenil)-2H-tetrazolio, monosódico), entre otros. A continuación, se describen las ventajas y desventajas de los ensayos nombrados anteriormente:

MTT: por su bajo costo es ampliamente utilizado, fácil de realizar, seguro y reproducible. Su desventaja es con el tiempo de incubación prolongado puede ser citotóxico, requiere de disolventes orgánicos para la eliminación del formazán del medio y la eliminación de este puede generar errores de manipulación.

XTT: ensayo sensible, preciso, rápido, seguro, pero más costoso si se comparan con los costos de MTT y cristal violeta. Producen un colorante soluble en agua por lo que el error de manipulación se disminuye.

WST-1, WST-8: son ensayos sensibles, altamente reproducibles, no requieren largos tiempos de incubación ni solventes adicionales. Son más costosos debido a que utilizan un kit comercial.

SBR: ensayo sensible, rápido, con alta reproducibilidad y linealidad, como desventaja es necesario mantener una solución homogénea [31].

Finalmente, a continuación, se describe a mayor detalle el ensayo colorimétrico seleccionado para usarse en este trabajo como un primer acercamiento a conocer la viabilidad celular de los sistemas que se desarrollaron.

Cristal violeta: El ensayo de violeta de cristal es un método de adherencia celular, el cual consiste en que el colorante se une a las proteínas y al ADN de las células viables, permitiendo detectar la adherencia de las células. La pérdida de esta adherencia debido a la muerte celular, reduce la coloración de la muestra; entre sus ventajas destacables se encuentra su bajo costo, rapidez, fácil manejo y que no requiere tiempos prolongados de incubación; entre sus desventajas se encuentra que es el ensayo colorimétrico menos sensible, no es apropiado para estudios en compuestos que afectan el metabolismo celular y puede producir toxicidad a las células en concentraciones elevadas [31].

2.4 El quitosano y su potencial para la administración de fármacos anticancerígenos

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial [32]; la Organización Mundial de la Salud en 2012 reportó 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de defunciones anuales. Posteriormente, en 2018 se presentó un incremento a 18 millones de nuevos casos y 9.6 millones de defunciones y en 2020 las defunciones anuales se incrementarán a 10 millones. Se prevé que para el 2030 las incidencias sobrepasen los 23.6 millones de nuevos casos al año siendo los cánceres más comunes el de colón, estómago, mama, próstata, pulmón y riñón [33].

Algunos de los fármacos anticancerígenos más utilizados son el docetaxel para el tratamiento de cáncer de mama y ovario [34] mientras que el 5-fluorouracilo, capecitabina y tegafur combaten el cáncer colorrectal, gastrointestinal o de mama y gemcitabina para cáncer de pulmón, páncreas y vejiga. Por otro lado, se encuentra la tiotepa para cáncer de mama, vejiga y ovario, mitoxantrona para cáncer de mama metafásico, actinomicina para cánceres pediátricos, metotrexato para cáncer de mama, estomago, esófago y leucemia linfoblásticas infantiles [35]. Por último, el paclitaxel es ampliamente utilizado como un agente antineoplásico mediante administración intravenosa, el cual actúa como estabilizante de los microtúbulos que estimulan la polimerización de la tubulina, deteniendo la mitosis y provocando la muerte de las células tumorales. Este fármaco es utilizado para cáncer de mama, ovario, páncreas, de cuello uterino, colon, entre otros [36].

La desventaja principal de estos tratamientos radica principalmente en las características hidrofóbicas de estos API [37], que impactan directamente sobre su solubilidad y biodisponibilidad, por lo cual se requiere el uso de disolventes orgánicos altamente tóxicos, además de que estas formulaciones farmacéuticas causan daño indistintamente a células sanas y cancerosas.

El CS es un polímero catiónico que posee mayor afinidad a las células cancerosas debido a que estas tienen una carga negativa en su membrana celular, por lo cual el CS se puede asociar a las células cancerosas y actuar al pH del microambiente tumoral (5.8 a 6.5) mejorando la eficiencia de la administración de fármacos anticancerígenos selectivamente.

En la Tabla 1 se describen algunos trabajos de formulaciones quimioterapéuticas utilizando hidrogeles, nanopartículas (NP), nanodispositivos (ND), nanoemulsiones y nanofibras de CS para la mejora de los tratamientos.

Tabla 1. Formulaciones quimioterapéuticas con CS.

Investigadores	Sistemas biopolímeros de CS	Aportación
Ruel- Garrépy y col. 2004	Hidrogel de CS neutralizado con β -glicerofosfato cargado con el API paclitaxel (PTX).	La combinación de estos agentes administrados intratumoralmente por <i>vía</i> subcutánea optimizaron la liberación del PTX, inhibiendo el crecimiento de los carcinomas de mama EMT-6 y potencializaron su eficacia antitumoral [38].

Jain y col. 2008	Nanopartículas de CS acopladas con ácido hialurónico y con 5-fluorouracilo.	Se demostró que al recubrir el medicamento 5-fluorouracilo con NP de CS acopladas con ácido hialurónico incrementaba la absorción de este fármaco 7.9 veces, comparado con la biodisponibilidad del fármaco en su estado puro. Además, se comprobó que este recubrimiento incrementa 2.6 veces la citotoxicidad en la línea de adenocarcinomas de colon HT-29 dando lugar a una formulación más eficaz [39].
Jain y col. 2010	NP de CS acopladas con ácido hialurónico para encapsular el API oxaliplatino y recubriéndolo con Eudragit S100.	Este sistema se administró oralmente y logró una concentración elevada de fármaco en un periodo de 12 h, demostrando una mejora en la eficacia antitumoral para el tratamiento del cáncer de colon [40].
Li y col. 2011	Nanocoloides con camptotecina encapsulada con quitosano y fosfato de sodio básico.	Este sistema transportador de camptotecina mejoró la solubilidad del API, dando lugar a una liberación sostenida del 70% durante dieciocho días. Adicionalmente, este demostró ser citotóxico en la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 [41].
Arias y col. 2012	Nanodispositivo recubierto de Fe ₃ O ₄ y CS para encapsular gemcitabina.	El recubrimiento de Fe ₃ O ₄ -CS mejoró la selectividad del medicamento y logró su liberación a pH ácido en el sitio de acción de células tumorales de leucemia LI210. Esto favoreció a la disminución de la toxicidad y efectos secundarios indeseables del fármaco [42].
Bano y col. 2016	ND recubierto con CS conjugado con ácido fólico (FA), albúmina y carboximetilcelulosa para nanoencapsular paclitaxel.	El ND fue probado para el tratamiento de cáncer de mama en la línea celular MCF-7. Se obtuvo una inhibición tumoral adecuada, considerándolos como sistemas biocompatibles y estables [43].
Khdar y col. 2016	NP de triacetato y diacetato de CS para nanoencapsulamiento de diversos APIs anticancerígenos.	Los sistemas nanoencapsulados con doxorubicina demostraron que, a través de la <i>vía</i> de administración oral e intravenosa, se favorece a una liberación controlada y al incremento de la biodisponibilidad del API [44].

Cheng y col. 2019	NP de carboximetilcelulosa (CMeC) con CS con un injerto de imidazol	Se modificó la superficie de estas NP con grupos flúor para dirigir la doxorubicina por selectividad de pH. Los resultados demostraron que se mejoró la absorción del fármaco y su eficacia requiriendo menor concentración para producir el mismo efecto. Adicionalmente, se demostró que estas NP lograron mayor eliminación del tumor si se compara con los sistemas sin NP en las líneas celulares de cáncer de hígado (Hep-G2), de mama (MCF-7), pulmón (A549) y huesos (SH-SY5Y) [45].
Balan y col. 2020	Nanofibras de policaprolactama recubiertas con NP CS para administración de los API reverastol y ácido ferúlico.	Se probó su efectividad contra la línea celular de cáncer epitelial A431 y se demostró que estos agentes en conjunto disminuyen la viabilidad celular de 30 a 50% y permiten la focalización de los tratamientos en tumores específicos [46].
Giacone y col. 2020	Nanoemulsiones (NE) modificadas con CS para el transporte de piplartina.	Las NE modificadas con el polisacárido mejoraron la penetración del API en piel alrededor de 1.9 veces, y al adicionarle el ácido oleico a la formulación de NE con CS se aumentó la penetración transdérmica del API [47].
Miao y col. 2021	Liposomas modificados con un oligosacárido de CS (OCS) para la administración de PTX	El sistema propuesto administrado por <i>vía</i> intravenosa obtuvo una tasa de inhibición antitumoral del 86.4% en líneas de cáncer de pulmón A549 [48].
Sun y col. 2022	Estudio de tipo de muerte celular utilizando una modificación de CS con selenio.	Se estudió el tipo de apoptosis inducida por la modificación del CS-selenio en la línea celular de cáncer de hígado (Hep G2) , la cual fue mediante apoptosis mitocondrial, consideración relevante para futuras aplicaciones farmacéuticas [49].
Zlonikov y col. 2023	Micelas poliméricas de CS con ácidos grasos para administración de doxorubicina (DOX).	Se realizó la conjugación del CS con cuatro ácidos grasos el ácido oleico, esteárico, lipoico y 11-mercaptoundecoico para posteriormente adicionar el fármaco DOX con eugenol (componente principal del aceite de clavo) para la determinación de su liberación. Los resultados indicaron que se aceleró la liberación del API en un 80 %

		en un tiempo de 40 h a un pH de 5.5, lo que causó mayor muerte celular en la línea de cáncer de pulmón (A549) [50].
Sunder y col. 2024	Modificación del CS con óxido de grafeno para administración de DOX para el tratamiento de glioblastomas.	La administración de esta suspensión se llevó a cabo por <i>vía</i> intravenosa a ratones con tumores en el cerebro. Los resultados indicaron que este tratamiento favoreció a la disminución de estos tumores cerebrales [51].

2.5 Conjugación del quitosano con ácido fólico (CS-FA) para liberación de fármacos anticancerígenos

Como se ha descrito anteriormente, el CS es un biopolímero natural muy atractivo para su uso en la industria farmacéutica, debido a sus propiedades de biodegradabilidad, baja o nula toxicidad y pH responsivo [2]. Además, es altamente reactivo por los grupos funcionales que posee estructuralmente que permiten su conjugación con otros receptores para mejorar algunas propiedades [5]. Estas características le permiten su uso como agente de modificación de la superficie que potencializan la hidrofiliidad y estabilidad en un entorno biológico [43]; por otro lado, el ácido fólico (FA) es un compuesto y/o vitamina indispensable para el desarrollo humano [52], altamente estable [53] que puede usarse como un ligando dirigido [54].

El CS puede modificarse con el FA (CS-FA) por medio de reacciones de amidación, para facilitar la unión con el receptor folato, que se encuentra sobre expresado únicamente en las células cancerosas [55], [56]. De esta manera este conjugado se convierte en un agente selectivo para las células cancerosas, dando lugar a una terapia dirigida y focalizada para administración e internalización del API en el sitio de acción por endocitosis [8], que elimina y/o reduce los efectos secundarios indeseables en tejidos sanos [57] y mejora la penetración del fármaco en los tejidos tumorales [55].

La eficacia de la conjugación del CS-FA se encuentra relacionada con el grado de injerto del FA en el CS. Por ejemplo, si se injerta en mayor porcentaje se disminuye su solubilidad, causando una administración inadecuada del API, liberando inexactamente el API en el sitio tumoral, disminuyendo la expresión de los receptores folato y como consecuencia afectando la eficacia antitumoral [54].

En la Tabla 2, se muestran algunos trabajos de investigación sobre nanopartículas, nanocompuestos y micelas utilizando el CS-FA para administración de fármacos quimioterapéuticos

Tabla 2. Modificación del CS-FA para aplicaciones quimioterapéuticas.

Investigadores	Sistemas conjugados CS-FA	Aportación
Bano y col. 2016	NP magnéticos de albumina sérica bovina con conjugados de CS-FA y CS-FA-CMeC cargadas con PTX.	Los sistemas con el conjugado de CS-FA demostraron mejor potencial para optimizar la liberación del PTX e incrementar la tasa de inhibición tumoral debido a la focalización atribuida al receptor folato, que permitió la dirección del API al sitio de acción en la línea celular de cáncer de mama (MCF7) [43].
Amiryaghoubi y col. 2022	Nanocompuestos (NC) con magnetita funcionalizados con CS-FA y cargadas de DOX.	Los NC incrementaron la liberación de DOX en pH ácido, y demostraron que la funcionalización con el FA permitió la internalización de la DOX en mayor cantidad en las células de osteosarcoma humano (MG-63) que en la línea de cáncer de pulmón (A549), esto debido a la internalización de estos sistemas por la sobreexpresión del receptor folato [53].
San y col. 2022	NC de alginato (AL) con CS cargadas de cúrcuma (Cu) con injertos de FA.	Las NC con AL-CS-FA-Cu permitieron una liberación sostenida y mayor citotoxicidad del API contra las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-B-231 y MCF-7) [8].
Zhao y col. 2024	Micelas funcionalizadas con CS-FA para administración de DOX.	Estos sistemas optimizaron la liberación de la DOX y mejoraron la internalización del fármaco en el tumor sólido de cáncer de pulmón en la línea celular M109, dando como resultado, la acumulación de la DOX en el tejido celular potencializando su eficacia [54].

2.6 Microemulsiones (ME)

En 1943 los investigadores Hoar y Schulman descubrieron las ME, sin embargo, su nombre fue asignado hasta años después, por Jack Schulman [58], [59]. Las ME son sistemas coloidales termodinámicamente estables e isotrópicos, transparentes y translúcidos [60]–[62], homogéneos a nivel macroscópico y micro heterogéneos de dos fluidos inmiscibles estabilizados mediante un tensoactivo con diámetros de partícula inferiores a 400 nm [63].

Existen diferentes tipos de ME, el primero se denomina aceite en agua (o/w) o ME normal (Winsor I) cuya fase dispersa es aceite y la fase continua agua. El segundo tipo son ME inversas o agua en aceite (w/o)

(Winsor II) y tienen como fase continua aceite y dispersa agua, mientras que el tercero representa una ME bicontinua (Winsor III) con dos fases continuas debido al equilibrio entre los excesos de agua y aceite. Finalmente, el sistema Winsor IV corresponde a una ME monofásica macroscópicamente, formada por la concentración adecuada de tensoactivo. En la Figura 3 se representan los sistemas Winsor [61].

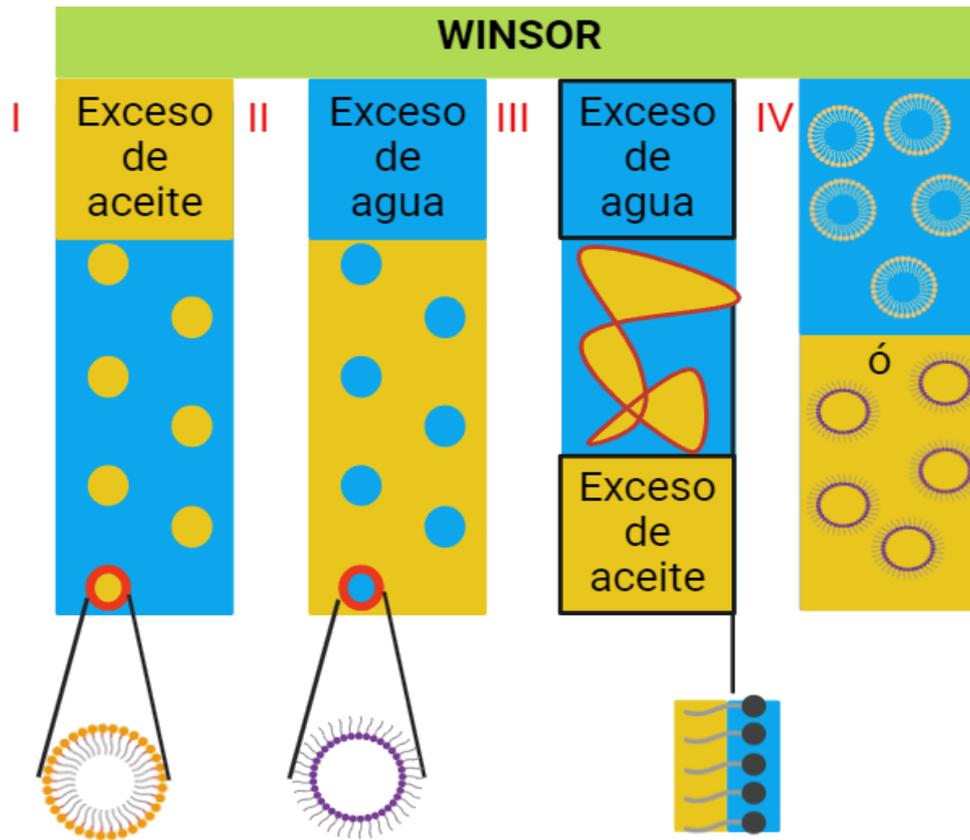


Figura 3. Clasificación de los sistemas Winsor: I (o/w), II (w/o), III (bicontinua) y IV(monofásica).

Es un gran desafío la búsqueda constante de sistemas de administración de fármacos seguros y eficaces que permitan la dosificación terapéutica adecuada, debido a la limitante de las formas farmacéuticas convencionales que poseen solubilidad limitada, estabilidad deficiente y biodisponibilidad insuficiente. En los últimos años, investigadores de todo el mundo han mostrado un profundo interés en las ME para su uso en formulaciones farmacéuticas, debido a que estas funcionan como un vehículo de API [64] y su tamaño nanométrico favorece la penetración de los compuestos bioactivos por diferentes vías de administración (ocular, nasal, oral, tópica, intravenosa y parenteral). Las ME han demostrado que aumentan la solubilidad de API con clasificación biofarmacéutica clase II (baja solubilidad y alta permeabilidad) y clase IV (baja solubilidad y permeabilidad).

Las ME están formadas por al menos un componente anfifílico, hidrofóbico e hidrofílico y en algunas ocasiones, se requiere la adición de un co-tensoactivo [65], a continuación se describe cada uno de ellos.

2.6.1 Componente hidrofílico y co-tensoactivo

El componente hidrofílico regularmente es agua o una solución salina [66] y los co-tensoactivos se agregan, en caso de ser necesario, para coadyuvar al tensioactivo a disminuir la tensión interfacial e incrementar la fluidez en la interfaz de la ME; estos regularmente son alcoholes de cadena corta o media de tres a ocho carbonos [65]. Algunos de los ejemplos más utilizados son el etanol, butanol, entre otros.

2.6.2 Componente anfifílico

Este componente se refiere a los tensioactivos, los cuales son moléculas anfifílicas que tienen propiedades hidrofílicas en su cabeza e hidrofóbicas en su cola. La función de ellos consiste en la reducción de la tensión superficial entre dos fases inmiscibles (componente hidrofóbico e hidrofílico) para generar una dispersión espontánea. Por lo general, la cola hidrófoba es una cadena relativamente larga de hidrocarbonada, fluoro carbono o siloxano, mientras que la parte hidrófila podría ser un ion (catión o anión) [67]. Este tipo de compuestos se pueden obtener de origen natural a través de fuentes vegetales o animales, sin embargo son procesos altamente costosos por lo que se opta por sintetizarlos [68] . En la Figura 4, se esquematizan los tipos de tensioactivos convencionales y no convencionales de nueva generación, los cuales se clasifican según la naturaleza de las cabezas y las colas.

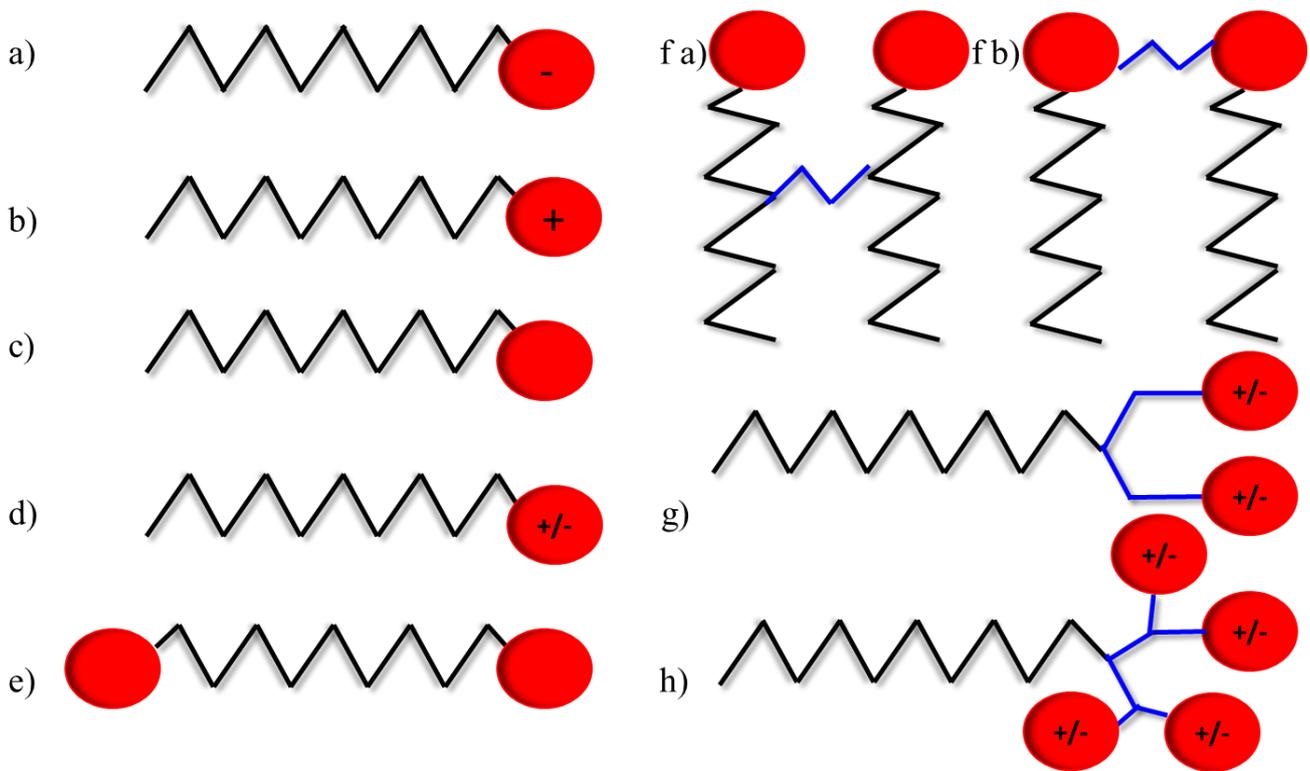


Figura 4. Clasificación de los tensoactivos según la naturaleza de su cabeza: a) aniónico, b) catiónico, c) no iónico, d) zwitteriónicos, e) bolaformes simétricos o asimétricos, f a) gemini dicatiónicos, dianiónico o zwitteriónicos con espaciador en las colas, f b) gemini dicatiónicos, dianiónico o zwitteriónicos con espaciador en las cabezas, g) BS dianiónicos, dicatiónicos o cargas mixtas y h) multicabeza

-Tensoactivos convencionales

Una de las desventajas relevantes de una ME es que requieren altos porcentajes de tensoactivos convencionales (8-25%), ya sean aniónicos, catiónicos, no iónicos o zwitteriónicos, para lograr una ME estable [65], lo que influye en el incremento de la toxicidad de la formulación [69]

a) Tensoactivos aniónicos: son compuestos químicos cargados negativamente en su cabeza polar, que, al solubilizarse en agua, se disocian en aniones con carga negativa. Estos han demostrado mejorar la solubilidad de otros compuestos, regularmente contienen grupos sulfato (RO-SO_3^-), sulfonatos (RSO_3^-) y carboxilato (RCOO^-) [67], un ejemplo de este tipo de tensoactivos son el laurato de potasio [53] .

b) Tensoactivos catiónicos: estos tienen carga positiva en su cabeza y al disociarse forman cationes [11]. Una de las ventajas de los tensoactivos catiónicos es la diversidad de sus grupos principales, lo que permite

su modificación química; algunos ejemplos son el cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio y bromuro de cetiltrimetilamonio[67].

c) Tensoactivos no iónicos: su cabeza no tiene carga eléctrica, poseen buenas biocompatibilidades por lo cual son recomendados para aplicaciones biomédicas [70] como por ejemplo Tween 20, 60 y 80, Triton X-100, polietilenglicol y poli(propilenglicol) [67].

d) Tensoactivos zwitteriónicos: este tipo de tensoactivo tiene carga positiva (aminas o amonios cuaternarios) y negativa (un grupo funcional como ácido sulfúrico, fosfórico o carboxílico) con carga neta neutra[71]. Algunos ejemplos son sulfobetana 10, cocamidopropilbetaina, óxido de lauril dimetil amina [67].

-Tensoactivos no convencionales de nueva generación Debido a que se requieren altos porcentajes de tensoactivos convencionales para lograr la estabilidad de las ME, se ha trabajado en la obtención de tensoactivos multi cabezas de nueva generación que permitan obtener la misma estabilidad en la ME, pero a una concentración de tensoactivo inferior[72].

La disposición estructural de los tensoactivos multi cabeza (bolaformes, gemini y BS) con la presencia de múltiples grupos polares en las cabezas incrementan la interacción con el agua, lo que impacta en una mejora de la solubilidad [73]. Esto favorece a una rápida saturación de la superficie, debido al incremento en la repulsión electrostática que reduce la tensión interfacial entre el agua y aceite para la formación de las micelas. Esto a su vez provoca una disminución en la concentración micelar crítica (comparada con tensoactivos convencionales) y proporciona la misma estabilidad cinética con reducida toxicidad del sistema [74], [75].

e) Tensoactivos bolaformes: son novedosos anfifílicos de dos cabezas hidrófilas iónicas o no iónicas, iguales (simétricos) o diferentes (asimétricos) unidos por una cola hidrófoba de cadenas alquílicas de hidrocarburos, esteroides o porfirinas [76].

Palhano y col. en 2021 sintetizaron los tensoactivos bolaformes bis(6-((dietoxi(dihidroxi)-15-fosfaneil)oxi)hexil)tereftalato y bis(2-((trietoxi(hidroxi)-15-fosfaneil)oxi)etil)tereftalato con rendimientos del 58 y 73% respectivamente, a partir del uso de residuos de poli(tereftalato de etileno). Estos tensoactivos demostraron poseer propiedades de auto ensamblaje deseadas para aplicaciones en nanotecnología, electrónica y administración de fármacos. Lo más destacable es que esta síntesis

contribuye a una economía circular, en la que se reúsan los residuos de PET para convertirlos en otro producto completamente funcional [77].

En 2023 Adil El Yadini y col. llevaron a cabo la síntesis del tensoactivo bolaforme ácido 1,7-lactobionamidoheptanoico a partir de derivados de azúcares y fue caracterizado fisicoquímicamente para demostrar su obtención. Posteriormente, se determinaron sus capacidades anticorrosivas, demostrando que es un excelente inhibidor de la corrosión [78].

f) Tensoactivos geminis: son estructuras diméricas conformados por un par de cabezas hidrofílicas y dos colas hidrófobas de igual tamaño de cadena unidas por un espaciador que reduce la repulsión entre las cabezas de este compuesto y el cual puede estar unido a ambas cabezas o ambas colas. El uso de este tipo de tensoactivos ha permitido obtener bajas concentraciones micelares críticas (CMC) (concentración de tensoactivo mínima requerida para la formación de micelas) debido a su capacidad de reducir la tensión superficial del agua e interfacial entre los componentes inmiscibles [67], [79], un ejemplo de estos tensoactivos son los derivados de la D-glucosa [80].

Valsieva y su grupo de trabajo en 2023, sintetizaron tensoactivos di catiónicos geminis con fragmentos de carbamato de diferentes longitudes de cadenas alquílicas. Posteriormente, determinaron los valores de CMC mediante tensión superficial y conductividad eléctrica, obteniendo valores entre 0.13 a 1 mM; subsiguientemente estos tensoactivos se utilizaron para la formulación de liposomas catiónicos con α -tocoferol para liberación *in vivo* de clorhidrato de donepezilo para el tratamiento del Alzheimer. Se demostró que existe una mejora en la memoria de los ratones al administrarse este sistema por 21 días y que el mecanismo de liberación fue por difusión de Fick [81].

Ese mismo año Liao y col. sintetizaron cuatro tensoactivos no iónicos utilizando como precursor el 1-aminoglicerol variando la longitud de las cadenas hidrófobas y de los espaciadores con rendimientos de ~90 %. Posteriormente, se determinaron los valores de CMC mediante tensión superficial, dando valores de 1.41 a 5.25 mmol/L, así como valores de HLB de ~6. Adicionalmente, se determinó la estabilidad a diferentes valores de pH y se concluyó que estos presentan potencial para ser usados en sistemas sensibles a pH básico siendo la longitud de la cadena y del espaciador parámetros críticos en las propiedades fisicoquímicas de estos tensoactivos. Finalmente, se determinó la capacidad antibacteriana de estos tensoactivos, los cuales demostraron su efectividad contra *S.aureus* y *E. coli* en un intervalo de concentración de 25 a 50 mg/mL [82].

Un año después Deyab y col. trabajaron en la obtención de tensoactivos geminis no iónicos (polietenoxi di-dodecanoato, el polietenoxi di-hexadecanoato y dioctadecenoato de polietenoxi) con diferente longitud en la cadena de la cola hidrófoba. Estos tensoactivos fueron caracterizados mediante técnicas espectrofotométricas y los valores de CMC fueron determinados mediante tensión superficial, encontrándose en un intervalo de 0.0381 a 0.0912 x10⁻³ M. Entre los resultados más destacables se resalta que al incrementar la longitud de la cadena (cola) se aumenta el carácter hidrofóbico del tensoactivo dando lugar a una disminución en los valores de CMC. Finalmente, estos tensoactivos fueron evaluados para determinar su capacidad como inhibidores de la corrosión y se demostró que la eficiencia anticorrosiva también se encuentra relacionada con la longitud de la cadena de la cola, siendo más efectivo el tensoactivo con cola más larga [83].

g) Tensoactivos bicéfalos (BS): su estructura consta de dos cabezas hidrofílicas (catiónicas, aniónicas o mixtas), una cola hidrófoba con longitudes de cadena variables, saturada o insaturada, con un espaciador que evita la repulsión. Algunos de estos tensoactivos son derivados de ácidos grasos como el ácido oleico (AO) y han demostrado que pueden reducir la CMC si se comparan con los tensoactivos convencionales [7], [84]–[86]. A continuación, en la Tabla 3, se presentan algunos antecedentes de trabajos de síntesis de BS.

Tabla 3. Reportes sobre la síntesis de BS

Referencia	Tipo de tensoactivo	Aportación
Kalhapure y col. 2013 y 2015	Sintetizaron un BS a partir del AO.	La síntesis se llevó a cabo por reacción de Michael 1,4. El BS obtenido presentó una CMC de 1.6 mmol/L y logró disminuir la CMC a menos del 50% comparado con la CMC del oleato de sodio. El BS se utilizó para la preparación de NP lipídicas sólidas con el API ketoconazol. Los estudios de viabilidad celular en la línea de cáncer de cérvix (HeLa) demostraron que es un tensoactivo bioseguro en concentraciones inferiores a los 80 µg/mL en esta línea celular [7], [84].
Ojewole y col. 2014	Formulación de gel bucal utilizando el BS derivado de AO.	Sintetizaron el mismo BS Kalhapure en 2013 y lo utilizaron para la formulación de un gel bucal con didanosina. Los resultados indicaron que el uso de este BS potencializa e incrementa al doble la permeación del API administrado bucalmente, si se compara con la

		permeación obtenida únicamente con el ácido oleico a la misma concentración de 2% en peso [85].
Chaudhari y col. 2019	Sintetizaron un BS a partir de un derivado éster de ácido erúxico.	Prepararon ME con el fármaco efavirenz indicado para tratamiento de VIH. Los resultados indicaron que se logró mejorar la solubilidad y la liberación del fármaco, la cual fue superior al 95% en una hora. Además, se incrementó la biodisponibilidad de este medicamento seis veces comparándola con la formulación sin BS [87].
Makhathini y col. 2020	Síntesis de un BS dendrítico basado en AO.	Sintetizaron el BS con una CMC de 0.0056 mmol/L para posteriormente formar micelas sensibles al pH para administrar vancomicina. Se demostró que se logra una liberación sostenida del antibiótico [86].

h) Tensoactivos multicabeza: estos constan de múltiples cabezas hidrofílicas (1-4) con una por cada cola hidrófoba. Estos se han estudiado para determinar el efecto del incremento de los grupos cabeza en un tensoactivo sobre la agregación micelar, así como el efecto de estas cabezas en la repulsión electrostática [73].

-Líquidos iónicos(IL):

Algunos líquidos iónicos (IL) pueden ser clasificados como tensoactivos bicéfalos debido sus características estructurales y sus propiedades de autoensamblaje [88]. Los IL son compuestos orgánicos (sales) con aniones y/o cationes inorgánicos o/y orgánicos considerados “disolventes de diseño”, debido a que sus propiedades fisicoquímicas pueden ser controladas y modificadas fácilmente al cambiar los cationes o aniones de la molécula y las longitudes de su cadena alquílica [89]; por otro lado, también son llamados “disolventes verdes” debido a que poseen puntos de fusión inferiores a los 100 °C, biodegradabilidad, estabilidad térmica, alta actividad superficial, con valores de presión de vapor casi insignificantes, lo que reduce la posibilidad de la emisión de vapores, convirtiéndolos en agentes amigables con el medio ambiente. Algunos IL han sido aprobados por la FDA para su uso en formulaciones farmacéuticas pasando por un proceso de aprobación regulatoria, debido a que se conocen pocos estudios sobre la toxicidad de cada IL. Algunos estudios han revelado que la toxicidad se encuentra influenciada tanto por la longitud de sus cadenas y el tipo de aniones o cationes presentes. Estos se han

utilizado en el área de polímeros, materiales, síntesis, biotecnología, alimenticia, petrolera, cosmética, y biofarmacéutica entre otras; enfatizando en esta última área, los IL son considerados compuestos de tercera generación para la administración y liberación de fármacos y actúan como agentes solubilizantes y potencializadores de la permeabilidad, debido a que la interacción entre los iones y los fármacos incrementa la liberación del API, dando lugar a la reducción de la frecuencia de administración manteniendo la concentración del API dentro del intervalo terapéutico y biodisponible en el sitio de acción[90].

En el área de ciencia y tecnología de polímeros, los IL se han considerado como compuestos prometedores, debido a que estos disminuyen el riesgo ambiental y hacia la salud, comparado con otros componentes altamente tóxicos; estos han sido utilizados mayormente como iniciadores, disolventes o agentes tensoactivos en polimerizaciones [17].

A continuación, se presentan algunos antecedentes del uso de IL en la formulación de ME para liberación de fármacos, donde se destaca que en todos los reportes utilizan los IL como disolvente de los API y no como tensoactivos.

Goindi y col. sintetizaron el IL BMIMBr basado en el 1-butil-3-bromuro de metilimidazolio, el cual fue utilizado posteriormente como agente solubilizante del fármaco anticancerígeno 5-Fluorouracilo, con una solubilidad de 31.19 ± 1.43 mg/mL. A partir de esta información se prepararon ME utilizando Tween 80 y Span 20 como tensoactivos y miristato de isopropilo. Estas ME presentaron tamaños de partícula de ~10 nm y fueron estables termodinámicamente ante ciclos de calentamiento y enfriamiento, así como pruebas de almacenamiento. Las ME fueron sometidas a un estudio *in vivo* de permeación del fármaco en ratones para tratamiento de queratosis o carcinomas por un intervalo de 24 h. El resultado de este ensayo indicó que se logra el aumento en la penetración cutánea al menos 2.5 veces comparada con la penetración lograda en cuatro semanas del fármaco en forma farmacéutica en crema y/o ungüentos [91].

En 2020, Zhang y col. formularon una ME con el IL cloruro de 1-hidroxietil-3-metilimidazolio como fase acuosa al 45 %, con la misma proporción de una mezcla de tensoactivos y co-tensoactivos (Tween 80, Span 20 y etanol) y con el 10 % de fase oleosa miristato de isopropilo con el fármaco artemisia, lidocaína e ibuprofeno. Los resultados obtenidos indicaron que la administración de los fármacos mediante una ME con aplicación transdérmica, incrementa la permeabilidad del fármaco tres veces comparada con un sistema convencional [92].

Un año después Lu y col. sintetizaron un IL basado en L- carnitina y ácido maleico, el cual fue usado como fase acuosa de una ME, con Tween 80 y Span 20 como tensoactivo y co-tensoactivo respectivamente y como fase oleosa miristato de isopropilo con insulina. Los estudios de viabilidad celular de la ME *in vitro* en células epiteliales de colon humano indicaron que esta ME tiene una viabilidad celular del 97 % demostrando su bioseguridad y biocompatibilidad. Adicionalmente, las pruebas de permeabilidad mostraron que se incrementa la permeación de la insulina 3.55 veces comparada con otras formulaciones[93].

2.6.3 Componente hidrófobo

Este componente puede ser un compuesto hidrocarbonado (por ejemplo, un monómero) un aceite de origen vegetal o algún aceite esencial, los cuales son una mezcla de compuestos orgánicos o metabolitos extraídos de plantas, ya sea de la flor, hojas o tallos por medio de maceración, extracción en algún disolvente o procesos de destilación [36], [94]. Estos aceites pueden presentar características bioactivas por sí solos y en una formulación coadyuvan para potencializar la solubilidad del API y disminuyen la toxicidad de los sistemas al ser productos de origen natural [47].

En la actualidad se han incrementado las investigaciones sobre los aceites esenciales debido a que han mostrado numerosas aplicaciones en la industria alimenticia, cosmética, de limpieza y farmacéutica [94], por sus propiedades antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas y anticancerígenas [32], [94], [95]. Esta última es una de las propiedades bioactivas más atractivas para su estudio debido a que el cáncer es una enfermedad que causa millones de muertes anuales a nivel mundial [32] y el uso de aceites esenciales podrían ser una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad en la medicina moderna [36], [96]. En la Tabla 4, se presentan algunos aceites vegetales y esenciales que presentan propiedades anticancerígenas.

Tabla 4. Aceites vegetales y esenciales con propiedades anticancerígenas

Aceite	Propiedades anticancerígenas
Aguacate (AcA)	Este aceite ha demostrado su potencial como agente anticancerígeno en las líneas celulares de cáncer de colon , pulmón, próstata [97] y mama (MCF-7) debido a que produce efectos genotóxicos y citotóxicos, parámetros dependientes de la concentración y tiempo de exposición <i>in-vitro</i> [98].
Oliva (AcO)	Estudios han demostrado, que el incremento del consumo de aceite de oliva en la dieta diaria disminuye el riesgo de contraer cáncer de mama y gastrointestinal [99].

Jojoba (AcJ)	<p>El AcJ incrementó la absorción del API conocido como imiquimod administrándolo mediante una nanoemulsión y potencializando su efecto antineoplásico contra células de cáncer de piel [100]. Este mismo fue utilizado para la formulación de ME con 0.3 mg/mL de PTX y se logró una liberación del 90 % en 48 h [6].</p>
Canela (AcC)	<p>Se ha demostrado que el uso del aceite de canela en concentraciones de 0.02 a 0.08 mg/mL producen la apoptosis de las células de cáncer de vejiga y cuello uterino. Además, a una concentración de 40 µM causan apoptosis de las células de leucemia promielocítica humana, a 37 µg/mL inhiben el crecimiento de las células de cáncer de mama, a 10 µM suprimen el crecimiento de la línea celular de cáncer de colon, a 2 mg/mL inhiben el desarrollo de cáncer de estómago y a 9.76 micromolar del cinamaldehído tiene una acción anti proliferativa similar al medicamento anticancerígeno 5-fluoruracilo [101].</p>
Menta (AcM)	<p>El mentol es el componente principal del aceite de menta, el cual ha demostrado poseer actividad antineoplásica en la línea celular de cáncer de vejiga (T24) y próstata (DU145). Este aceite causa muerte celular en la línea de cáncer de piel (A431) además de que inhibe el crecimiento proliferativo en las células de leucemia (HL-60) [102] y de cáncer colorrectal [103]. Adicionalmente, mediante espectroscopia de masas se determinaron los componentes principales del AcM: 40.7 % de mentol, un 23.4% de mentona, 5.8% de 1,8-cineol, 4.3% de acetato de mentilo, 3.7 % de iso-menton, 3.7 % mentofurano, 3.2 % neomentol, 2.6 % de limoneno, 1.9 % de pulegone, 1.7 % b cariofileno y otros componentes en porcentajes inferiores al 1 % [104].</p>

2.6.4 Métodos de formulación de microemulsiones

-Inversión de fase de transición por temperatura: este método se lleva a cabo mediante la agregación del exceso de la fase dispersa como respuesta a la temperatura (baja o elevada), provocando una alteración o cambios físicos en la microemulsión, como su tamaño de partícula y pH que, a la vez, podría afectar la estabilidad del sistema. Esta transición ocurre al realizar un cambio en la concentración del agua en la formulación [105].

-Emulsificación espontánea: este método consiste en la titulación de una de las fases o componentes de la microemulsión (tensoactivo, co-tensoactivo, fase oleosa o acuosa) sobre una combinación binaria entre los componentes restantes de la formulación, con la finalidad de construir un diagrama parcial de fases ternario que permita delimitar la región de microemulsión; el goteo de la fase elegida se realiza bajo condiciones de agitación continua a una temperatura definida, observando los cambios del sistema de manera visual, siendo el límite de la región el cambio de sistema monofásico a bifásico [105].

2.6.5 Determinación de la región de microemulsión

La región de ME es determinada mediante la construcción de un diagrama de fases ternario (agua, aceite y tensoactivo) y/o pseudo ternario (agua, aceite y tensoactivo/ co-tensoactivo) el cual se obtiene mediante mezclas en diferentes proporciones de los componentes. En el diagrama, los componentes de la formulación se sitúan en los vértices del triángulo donde la fracción equivale a un 100% del componente y al irse alejando del vértice del triángulo, se va disminuyendo la fracción del componente en la formulación; la suma de las fracciones de todos los componentes debe ser 100%. Estos diagramas tienen como objetivo la obtención de la región limitada la formación de ME estables [66]. En la Figura 5 se presenta la esquematización general de un diagrama de fases ternario de una ME.

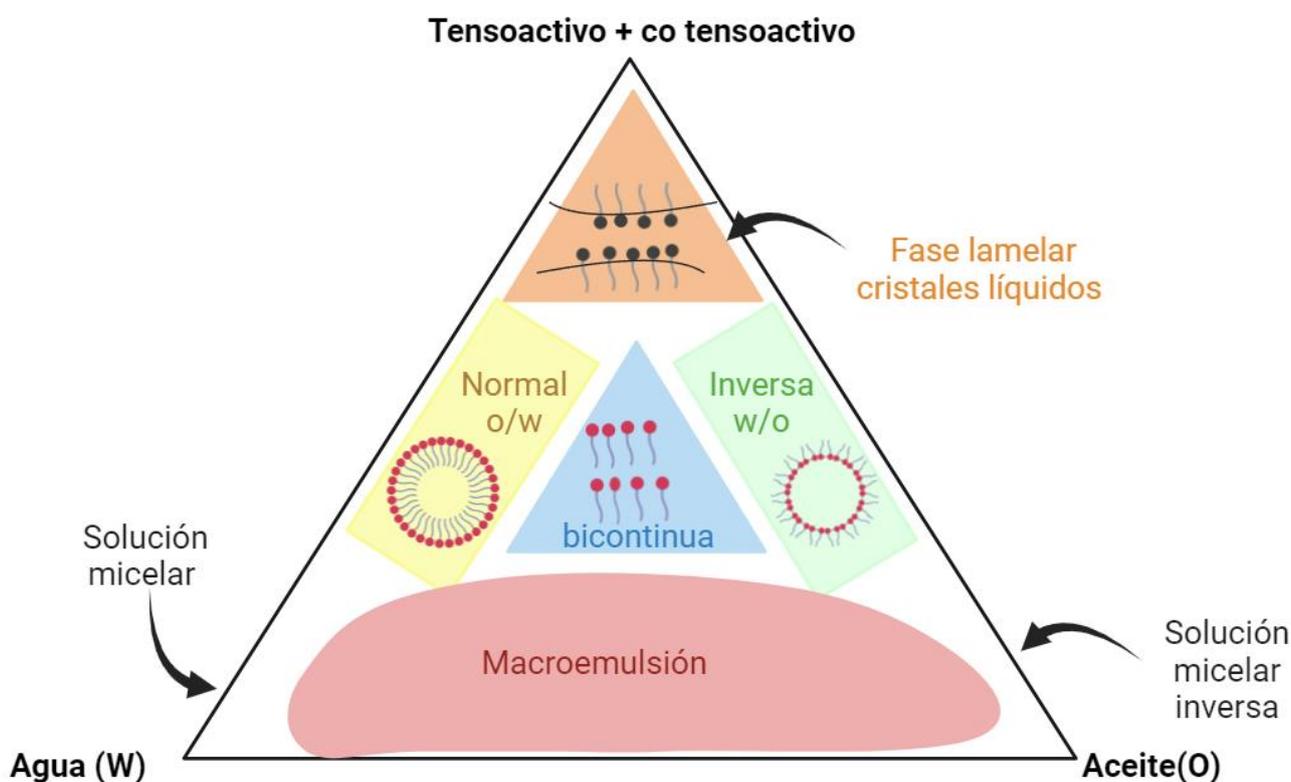


Figura 5. Diagrama parcial de fases ternario para los tres tipos de microemulsiones

2.7 Microemulsiones con aceites esenciales para liberación de fármacos anticancerígenos

En la actualidad los tratamientos convencionales para terapias anticancerígenas comienzan desde una cirugía para la extracción del tumor, hasta el uso de radioterapias, quimioterapias e inmunoterapias [32],

[36] las cuales, debido a que no son terapias selectivas, causan daño indistintamente a las células malignas y células sanas [36]. Esto ocasiona efectos colaterales perjudiciales e indeseables, por esta razón, existe una constante búsqueda de nuevas formulaciones farmacéuticas que permitan el tratamiento de enfermedades de manera selectiva.

A partir del año 1995, la FDA aprobó el uso de formulaciones farmacéuticas en escala micro y nanométrica para transporte y liberación de fármacos, sin embargo, actualmente, existen pocas formulaciones comerciales de este tipo, debido a la complejidad del proceso del desarrollo farmacéutico [106].

La mayoría de los fármacos anticancerígenos son de naturaleza hidrófoba, razón por la cual, la solubilización de estos API representa un reto. Las ME figuran como una alternativa prometedora para este tipo de activos, debido a que en el aceite esencial se facilita su solubilidad y biodisponibilidad. Además, algunos de estos aceites presentan actividades antineoplásicas que potencializan el efecto anticancerígeno de la formulación con el API [64], [107].

Las gotitas de estas ME, pueden ser recubiertas por un biopolímero inteligente como el CS, sensible y selectivo a un pH el cual protege al API que se encuentra encapsulado para evitar procesos de fagocitosis y/o degradaciones oxidativas en su paso por el organismo hasta su llegada al sitio de acción, en donde el API se libera por un estímulo pH selectivo en el tejido canceroso[72].

A continuación, en la Tabla 5 se muestra una revisión de trabajos en los que se han realizado ME con aceites esenciales de menta, jojoba, semilla de coix, entre otros con el empleo de tensoactivos convencionales para el tratamiento quimioterapéutico.

Tabla 5. Reportes sobre ME conteniendo aceites vegetales y esenciales con propiedades anticancerígenas como fase oleosa

Investigadores	Aportación
Flores y col. 2019	Formularon ME normales (o/w) con AcM y AcJ cargadas con PTX y estabilizadas con el tensoactivo comercial TPGS-1000 e isobutanol como co-tensoactivo. Los ensayos de viabilidad celular fueron realizados en la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa). Los resultados indicaron que estas ME permiten una liberación sostenida del 90 % de API en 48 h y redujeron las viabilidades celulares en un intervalo de 70 a 90% entre 24 a 48 h [6].
Guo y col. 2019	Realizaron ME con transferrina, aceite esencial de semilla de coix y tripteína como tratamiento anticancerígeno. Las pruebas fueron realizadas en un modelo tumoral de xenoinjerto para la

línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa). Los resultados indicaron que existe un efecto anti proliferativo sinérgico entre el aceite esencial y la tripteína, los cuales favorecieron la localización del tumor e incrementaron la penetración del API reduciendo el crecimiento tumoral (tumor de ~0.3 g), si se compara con los tumores con tratamiento de agua salina (tumor de ~1.8 g) [108].

Díaz y col. 2022

Prepararon ME normales con aceite esencial de clavo, cargadas con curcumina, recubiertas con una coraza de CS, utilizando los tensoactivos comerciales Tween 20 y Tween 80. Los resultados obtenidos indicaron que el recubrimiento con el biopolímero permitió la liberación de la curcumina a un pH ácido de 5.8, el cual corresponde al pH de ambiente tumoral, donde se obtuvo un 58% de liberación del API siguiendo un el mecanismo de transporte Fickiano bajo el modelo de Korsmeyer-Pepas [60].

Filza y col. 2024

Formularon ME con aceite esencial de geranio, Tween 80 como tensoactivo y con propilenglicol como co-tensoactivo cargadas con curcumina. Los estudios demostraron que, el aceite de geranio incrementa la solubilidad y biodisponibilidad del fármaco. Los resultados de viabilidad celular indican que la ME es más citotóxica en concentraciones inferiores a 50 µg/mL, si se compara con el API y la ME sin API. Sin embargo, en concentraciones de 50 a 200 µg/mL los efectos citotóxicos entre las ME con y sin carga de curcumina son indistintos; para los tres sistemas a la mayor concentración se obtiene una viabilidad celular del 8 % [109].

Panyajai y col. 2022

Se determinó la viabilidad celular del aceite de ottensi en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), pulmón (A549), cuello uterino (HeLa) y leucemia mielógena (K-562) dando como resultado una concentración inhibitoria media (IC-50) de 9.77, 43.37, 23.25 y 60.42 µg/mL respectivamente. Enseguida, se prepararon nanoemulsiones, ME, nanogeles y microgeles con este aceite. Estas formulaciones fueron sometidas a ensayos de viabilidad celular y los resultados de la IC-50 indicaron que son más agresivas en la línea celular de MCF-7 con viabilidades entre 0.74 a 6.45 µg/mL, destacando por su agresividad las formulaciones en nanoemulsión y ME [110].

Panyajai y col. 2024

Obtuvieron aceite esencial de cúrcuma a partir de rizomas frescos, y determinaron que la citotoxicidad de este aceite en la línea celular de leucemia mielógena (K-562) y cáncer de mama (MCF-7) fue de 13.43 y 20.18 µg/mL, respectivamente. Posteriormente, se formularon nanoemulsiones y ME las cuales presentaron viabilidades celulares de 45.30 y 41.98 µg/mL respectivamente en la línea K-562 en concentraciones inferiores a los 30 µg/mL, demostrando que estos sistemas poseen potencial como formulaciones anticancerígenas [111].

2.8 Nanodispositivos poliméricos núcleo - coraza acarreadores de fármacos anticancerígenos

La palabra nanotecnología viene del griego cuyo significado se traduce como “tecnología enana”[112]; definiéndola de una manera más clara, esta consiste en el estudio de los materiales o mecanismos a una escala nanométrica [4], [113].

El desarrollo de nanomateriales mediante nanotecnología, enfocados para liberación de fármacos, requieren un tamaño de partícula dentro del intervalo de 1 a 500 nm [114], el cual permite la administración del API en el organismo penetrando las células [4].

Un nanodispositivo polimérico (NDP) núcleo-coraza es un sistema que permite la encapsulación de un material en estado semisólido o líquido con características hidrófobas en el núcleo, que posteriormente, se recubre con una coraza polimérica biocompatible e hidrofílica (estas propiedades podrían invertirse según el sistema, material y aplicación deseada) [115]. Estos NDP permiten controlar la liberación del API en el microambiente adecuado y mejorar la farmacocinética [22], biodisponibilidad, reducir la toxicidad del API, y por consiguiente, disminuir los efectos secundarios indeseables provocados por algunos API y/o excipientes administrados de manera tradicional, con lo cual, se disminuye su concentración para alcanzar el mismo efecto terapéutico, esto si se compara con otras formulaciones farmacéuticas tradicionales [116].

Los NDP se pueden obtener a partir de la formulación de una ME donde cada gotita de ME con aceite tensoactivo y API representa un nano reactor (núcleo), los cuales se recubren con un polímero (coraza) con la finalidad de proteger y propiciar la administración dirigida de API en su sitio de acción para mejorar su absorción. Este tipo de sistemas representan una alternativa innovadora para tratamiento de enfermedades severas como el cáncer, [4] debido a que permiten el transporte del API dirigido selectivamente a las células y tejidos cancerosos, por medio de NDP sensibles a un estímulo (temperatura y/o pH) que mejoran la liberación de API y evitan los efectos secundarios indeseables [114].

Al-Kinani y col. (2020) obtuvieron un NDP núcleo-coraza, compuesto de una ME inversa para encapsular curcumina (núcleo) y una coraza de CS. Estos NDP presentaron una morfología esférica con tamaños de gota de 206.5 nm percibidos en su análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Posteriormente, evaluaron la viabilidad celular de este NDP *in vitro* en células normales (WI-38) y cáncer de pulmón (A549) a concentraciones de 10 a 60 μ M después de 24 y 48 h de exposición. Los resultados

mostraron que en células normales no existe un efecto citotóxico, sin embargo, sí es citotóxico en la línea celular A549, dando como resultado una concentración inhibitoria media (IC 50) de 25.2 y 13 μM a 24 y 48 h de exposición respectivamente, la cual evita su proliferación [117].

Un año después, Asgari y col. formularon una ME inversa utilizando como componentes, el tensoactivo CTAB, 1-butanol como co-tensoactivo y ciclohexano como fase oleosa, con NP de magnetita (Fe_3O_4) para la administración de 5-fluorouracilo, recubriéndolo con una coraza intermedia de sílice meso porosa y una coraza externa del copolímero ácido poli(*N*- isopropil acrilamida-co-acrílico) sensible a la temperatura. Se determinaron los perfiles de liberación del fármaco a una temperatura de 37 y 45 °C, y los datos obtenidos fueron ajustados a cuatro modelos matemáticos, siendo el modelo de Korsmeyer-Peppas el que presentó mejor coeficiente de correlación [118].

Ese mismo año, Al-Musawi y col. formularon un NDP con una ME normal cargada con DOX y recubierta con un conjugado de CS-FA y oro con un tamaño de 102.6 nm. Posteriormente, se determinaron los porcentajes de liberación del API en un intervalo de 0 a 96 h a dos pH diferentes. Los resultados indicaron que a 48 h se liberó un 70 y 48% a valores de pH de 5.4 y 7.4 respectivamente, mientras que a 96 h a pH de 5.4 se liberó un 90% y solo un 58% a 7.4. Finalmente, se determinó la viabilidad celular de los NDP núcleo-coraza a concentraciones de 10 a 60 μM por 24 y 48 h de exposición en las líneas de células epiteliales sanas (MCF-10A) y cancerosas (SKBR3). La viabilidad celular en las células MCF-10A fue del 90 % a 24 h y 85% a 48 h a una concentración de 60 μM , lo cual demostró que estos NDP son biocompatibles con células sanas. Sin embargo, las viabilidades en células cancerosas SKBR3 fueron de 29.11 y 14.68 % a 24 y 48 h respectivamente [119].

En 2023 Obaidy y col. prepararon ME inversas con PTX recubiertas con CS-FA-polietilenglicol (PEG). Entre los resultados se reportan los porcentajes de hemólisis del PTX (62 %) y NDP (8 %) los cuales indicaron que el uso del NDP en formulaciones farmacéuticas es seguro. Adicionalmente, se determinó la viabilidad celular del NDP en la línea celular de fibrosarcoma de ratón (WEHI-164) y fibroblastos de ratón (MEF-1) en un intervalo de concentración de 5 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados demostraron que el NDP no es citotóxico a ninguna de estas concentraciones en MEF-1 presentando viabilidades celulares superiores al 90%. Sin embargo, en WEHI-164 se presenta una viabilidad celular alrededor del 20 % a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de los 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con lo que se concluyó que el NDP desarrollado es selectivo únicamente para células cancerosas[120].

2.9 Polimerización por radicales libres

La polimerización es una reacción química que permite la unión de los monómeros para la formación de polímeros los cuales se pueden obtener a través de dos tipos de mecanismos; el primero es por etapas y el segundo es por reacción en cadena.

La polimerización por etapas ocurre entre los grupos funcionales reactivos presentes en el monómero y el incremento de las cadenas del polímero es lento y gradual, mientras que, en la polimerización por reacción en cadena, el monómero presente requiere de un iniciador que propague el centro activo y permita el crecimiento de la cadena. En este último tipo de polimerizaciones en un intervalo menor de tiempo de reacción, en comparación con la polimerización en etapas se obtienen altos pesos moleculares del polímero. En este trabajo se pretendió trabajar con polimerizaciones en ME por radicales libres mediante el mecanismo en cadena, con el empleo del IL C1EG® como BS; a continuación, se describen a más detalle las tres etapas en las que consiste este mecanismo:

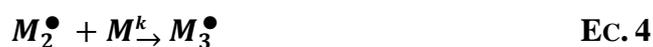
-Iniciación: esta etapa consiste en la generación de radicales libres primarios (R^\bullet), los cuales se pueden obtener sin presencia de iniciador o adicionando iniciador (I), siendo esta última la más común; el iniciador se puede descomponer por reacciones óxido-reducción, por luz y/o térmicamente, siendo esta la más usada. El mecanismo de reacción de esta etapa se explica con las siguientes ecuaciones:



f_{kd} : tasa de descomposición del iniciador, k_i : constante de tasa de iniciación.

1 el iniciador (I) se disocia en radicales libres primarios (R^\bullet), que posteriormente en la EC. 2 se combinan con el monómero (M) y forman nuevos radicales (M_1^\bullet).

-Propagación: en esta etapa cada unidad monomérica tiene un centro radical activo que puede reaccionar con otra molécula de monómero con adiciones sucesivas que ocasionan el crecimiento de la cadena polimérica. El mecanismo se representa con las EC. 3-5.

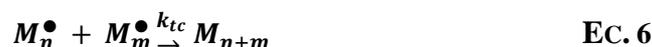




k_p : constante de tasa de propagación

-Terminación: esta consiste en la terminación del crecimiento de las cadenas propagantes y puede surgir al consumirse todo el monómero o mediante dos tipos de mecanismos que se describen a continuación:

Combinación: sucede cuando dos cadenas se unen y forman una cadena de mayor tamaño y se representa con la 6.



k_{tc} : constante de tasa de terminación por combinación

Desproporción: esta terminación consiste en la unión entre dos cadenas en crecimiento, generando una cadena con un doble enlace terminal y la otra una cadena saturada, sigue la 7



k_{td} : constante de tasa de terminación por descomposición

Reacciones de transferencia: puede ser al disolvente, iniciador, monómero o polímero (XA). Consiste en un proceso de terminación prematura debido a que se trasfiere un átomo o protón al sistema radical que estaba en crecimiento, por lo cual la propagación termina y conduce a la obtención de ramificaciones que afectan el peso molecular del polímero. Esta etapa se representa con las 8-9 [121], [122].



XA: átomo transferido, A^\bullet : radical que reiniciará la polimerización, k_{tr} : constante de tasa de transferencia en cadena, k_a : constante de tasa de reiniciación.

2.9.1 Antecedentes sobre polimerizaciones por radicales libres utilizando líquidos iónicos

Barth y col. realizaron un estudio de la cinética de terminación mediante resonancia paramagnética electrónica de polimerizaciones por radicales libres de sistemas formulados con el monómero de metacrilato de metilo y como disolventes los IL bis(trifluorometilsulfonil)-imida de 1-etil-3-metilimidazolio y tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio. Los resultados obtenidos demostraron que el uso de los IL disminuye la velocidad de terminación si se compara con polimerizaciones de este monómero en masa [123].

Por su parte, Stanzione y su grupo de trabajo efectuaron una copolimerización por radicales libres de 2-acrilamido-2-metil-1-propanoácidosulfónico y *N, N'* metilbis(acrilamida) utilizando el IL etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio como medio. El polímero obtenido demostró poseer propiedades mecánicas mejoradas para la producción de hidrogeles iónicos para separación y transporte, así como para la formación de membranas para pruebas de balística [124].

En 2014 Polenz y col. llevaron a cabo copolimerizaciones con los monómeros de metacrilato de metilo y metacrilonitrilo iniciadas mediante bases de imina/acrilato (IBA), utilizando los IL [P₄₄₄₁][Ntf₂], [Py₆][Ntf₂], [C₁₀mim]DCA, [Bmim][Ntf₂] y [C₁₀mim]NO₃ como disolventes, obteniendo rendimientos en un intervalo de 25 a 99 % a temperaturas entre 65- 95 °C. Los resultados indicaron que el empleo del IL causa la aceleración de la tasa de polimerización lo que influye en el consumo de monómero [125]; en ese mismo año, Dietlin y col. polimerizaron dimetacrilato de polietilenglicol empleando cuatro foto iniciadores (DMPA, Irg 184, 119 y 907) con tres IL ([EMIm][BF₄], [BMIm][BF₄] y [EMIm][OTf]) para determinar el efecto de estos elementos en una polimerización en solución. Los resultados obtenidos sugieren que existe una influencia del IL sobre la eficiencia del foto iniciador que afecta su reactividad relativa [126]. Cabe mencionar que en todos los trabajos anteriormente descritos emplean los IL como disolventes y no como tensoactivos.

2.10 Polimerización en microemulsión

Las polimerizaciones en ME producen látex con partículas esféricas y diámetros de partícula inferiores a los 100 nm, que permiten obtener polímeros con altos pesos moleculares [127]. Una de las desventajas más importantes de este tipo de sistemas, es que requieren elevadas concentraciones de tensoactivo (alrededor del 15% en peso) para lograr la estabilización del área interfacial interna. Este tipo de polimerizaciones se puede llevar a cabo mediante técnicas fotoquímicas, químicas y/o de radiación de alta energía, con un porcentaje máximo de monómero de 10% en peso; el principal reto de estos sistemas es que exista compatibilidad entre los componentes del sistema para mantener su estabilidad [128].

En la Figura 6 se presenta el mecanismo de las polimerizaciones en microemulsión, el cual consiste primeramente **1)** en micelas hinchadas con monómero, **2)** posteriormente el iniciador disuelto en la fase acuosa reacciona con el monómero disuelto y forma un radical el cual penetra en las micelas e inicia la polimerización del monómero, **3)** la propagación continúa y ocasiona el crecimiento de las partículas con el uso del monómero disuelto y el tensoactivo de las micelas no iniciadas, subsiguientemente **4)** se agotan

el monómero y se termina el crecimiento de las cadenas , finalmente 5) se obtiene el látex final, con algunas micelas vacías y partículas del polímero[127].

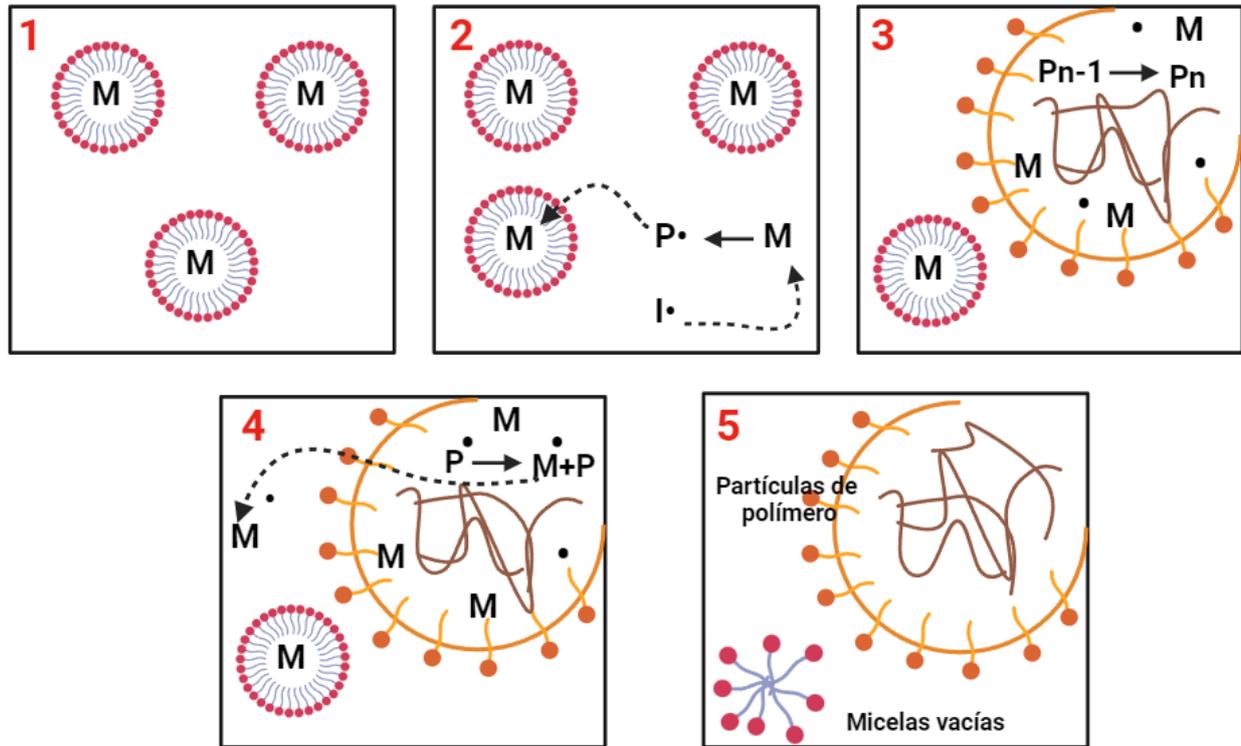


Figura 6. Mecanismo de una polimerización en microemulsión

2.10.1 Componentes de las polimerizaciones en microemulsión propuestas en este trabajo

-Iniciador 2,2'-azobis-2-metilpropionamidina (V-50)

La función principal del iniciador es generar los radicales libres para iniciar con el proceso de propagación; estos pueden activarse mediante un estímulo fotoquímico, redox y/o térmicamente, siendo estos últimos los más económicos.

Los iniciadores azo se descomponen a bajas temperaturas generando partículas estables. El iniciador 2,2'-azobis-2-metilpropionamidina, fue el primer iniciador catiónico azo sintetizado soluble en agua, cuya eficiencia permitió iniciar reacciones de polimerización a temperaturas de 56 °C (temperatura de descomposición de este iniciador), con una vida media de 10 h, dando lugar a la obtención de polímeros de alto peso molecular [129].

-Tensoactivo (IoLiLcyte C1EG®)

El tensoactivo es el encargado de reducir la tensión interfacial entre dos fases inmiscibles, permite estabilizar el monómero y las partículas de polímero en el agua. En una polimerización en ME se pueden utilizar cualesquiera de los componentes anfífilos descritos anteriormente en el apartado 2.5.2. Sin embargo, en este trabajo se eligió el IL IoLiLcyte C1EG® (anteriormente llamado AMMOENG 100, ILK5MS o TEGO) para su uso como BS; este es agente tensoactivo acíclico catiónico que contiene una sal de amonio con un oligo (etilenglicol), con punto de fusión inferior a los 100 °C, estable térmicamente y con potencial uso como solubilizante. Se han reportado pocos trabajos de su uso como tensoactivo, sin embargo, se ha demostrado que presentan comportamientos similares a los tensoactivos convencionales, razón por la que es interesante su uso en polimerizaciones en medios dispersos [130].

-Monómeros (estireno (St) y acetato de vinilo (VAc))

Estireno (St): es un compuesto orgánico, líquido e incoloro con ligero olor aromático, insoluble en agua (0.003g/100g a 20 °C), muy volátil y con alta toxicidad, tiene un peso molecular de 104.15 g/cm³ y un punto de fusión entre 145-146 °C; es obtenido por procesos de deshidrogenación y coproducción con óxido de propileno por medio de alquilación del etilbenceno (intermediario). Debido a la versatilidad de este monómero se ha utilizado para obtener poliestirenos y así fabricar plásticos para embalaje de alimentos, caucho, artículos de juguetería o deportivos entre otros [131], [132].

Acetato de vinilo (VAc): es un compuesto orgánico líquido e incoloro, parcialmente soluble en agua (2.50 g/100g a 20 °C) y se obtiene por reacciones de acetilación oxidativa del etileno [133]. Es un compuesto susceptible a la hidrólisis básica y ácida y se utiliza ampliamente en procesos industriales de resinas, pinturas, adhesivos, textiles, entre otros [134].

-Medio disperso (Agua)

Continuamente, se busca la reducción del uso de disolventes orgánicos en las polimerizaciones con la finalidad de obtener procesos más amigables ambientalmente; el uso del agua como disolvente de reacción para la obtención de polímeros representa una alternativa de la química verde, debido a que este es un compuesto inerte, de fácil obtención y a bajos costos; se sugiere el uso de agua desionizada con el objetivo de prevenir que algún anión o catión presente en el agua interfiera en el proceso de polimerización. La función principal del agua es ser el medio dispersante que permita descomponer el iniciador y generar los oligómeros, controlando la viscosidad y temperatura del sistema[135].

A continuación, en la Figura 7, se presentan gráficamente los componentes utilizados en estas polimerizaciones en microemulsión.

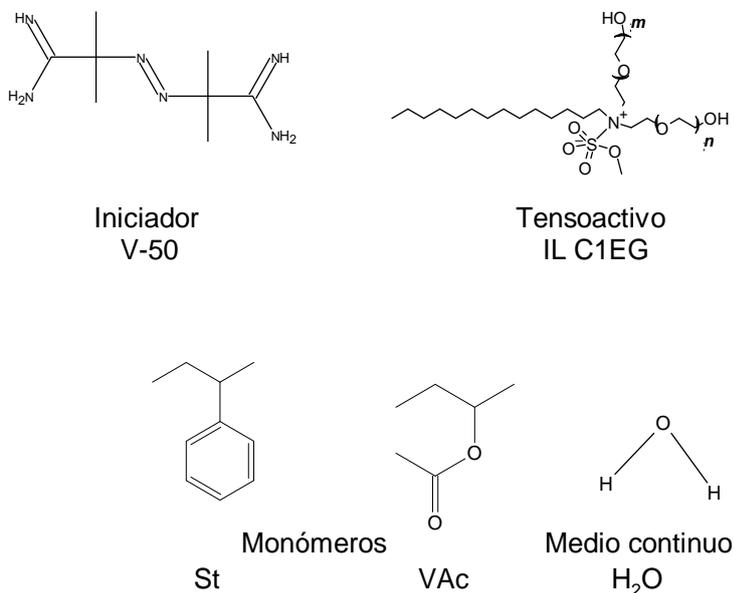


Figura 7. Componentes de las polimerizaciones en microemulsión

2.10.2 Estado del arte de polimerizaciones en microemulsión de estireno y acetato de vinilo

Tieke y col. 2005 realizaron polimerizaciones en ME de St utilizando una mezcla de tensoactivos catiónicos, bromuro de dociltrimetilamonio y/o decanodilio-10-bis(bromuro de dimetildodecilamonio) en diferentes proporciones. Ellos lograron obtener látex con tamaños promedios de partícula dentro del intervalo de 10 a 40 nm y concluyeron que la mezcla de tensoactivos catiónicos incrementan la estabilidad de las ME y que al ajustar los porcentajes de la mezcla de los tensoactivos se pueden obtener diferentes pesos moleculares [136].

Años después López y col. reportaron polimerizaciones en ME de St, donde realizaron variaciones en la temperatura (de 50 a 70 °C), para determinar el efecto de esta variable sobre el porcentaje de conversión y el diámetro de partícula. Los resultados indicaron que a mayor temperatura se obtienen tamaños de partícula menores y porcentajes de conversión mayores [137].

Finalmente, Sarov y col. en 2020 hicieron polimerizaciones en ME semicontinuas de St, utilizando 15 % de dodecil sulfato de sodio como tensoactivo. Los resultados indicaron que a 50 °C se obtienen

conversiones del 75 % mientras que a 60 °C se incrementan a un 90 % en un tiempo de reacción de 100 minutos [138].

Por otro lado, López y col. en el 2000 realizaron polimerizaciones en ME de VAc variando la cantidad de iniciador V-50 (0.1 %, 0-3% y 0.5%) y obtuvieron conversiones de 86.4 (55 min), 91.4 (30 min) y 93.8 % (38 min) respectivamente, lo que indica que, a mayores concentraciones de iniciador, la conversión y la tasa de reacción se incrementa. Finalmente, determinaron el efecto de la temperatura sobre la conversión alcanzada en 45 minutos de reacción y concluyeron que a mayor temperatura se acelera la reacción y alcanza mayor conversión en menor tiempo [139].

Un año después Sosa y col. hicieron polimerizaciones en ME de VAc usando el tensoactivo bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio e 0.01% iniciador persulfato de potasio a 60 °C. Se obtuvieron conversiones superiores al 90 % y látex con diámetros de partícula 30 a 60 nm [140].

Posteriormente, Gómez y col. en 2005 formularon ME con 4% de VAc y 0.3 % del iniciador V-50 a 60 °C, variando la concentración del tensoactivo bromuro de cetiltrimetilamino del 4 al 7.5%. Ellos concluyeron que al incrementar la concentración de tensoactivo en la formulación, se incrementa la conversión y disminuye la tasa de reacción [141].

Finalmente, Herrera y col. en 2015 polimerizaron VAc usando el co-tensoactivo n-butanol y el tensoactivo bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio en relación molar (1:1) con persulfato de potasio como iniciador. Ellos obtuvieron polímeros con tamaño de 32 a 40 nm , con masas molares medias en un intervalo de 270 000 a 750 000 g/mol y determinaron que al incrementar la concentración de iniciador, monómero o temperatura se incrementa la velocidad de polimerización [142].

Existen pocos reportes de polimerizaciones en ME con los monómeros de VAc y St empleando líquidos iónicos, a continuación, se describen algunos de ellos.

Yu y col. en 2008 polimerizaron en ME inversa St (47 % p/p) como fase continua, con 27 % p/p del tensoactivo bromuro de 1,(2-metilacrililoiloxiundecil)-3-metilimidazolio (MAUM-Br), 30 % p/p del IL tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio [B mim] [BF₄] como fase dispersa y con el iniciador AIBN a un temperatura de 60 °C; el grupo de trabajo logró la obtención de membranas poliméricas con propiedades de flexibilidad mejoradas, transparentes y con altas conductividades [143]. Años más tarde Shi y col. realizaron polimerizaciones en ME similares a las anteriores con St (50 % p/p), 30 % p/p del tensoactivo MAUM-Br, 20 % p/p del IL [B mim] [BF₄] y con el 0.5 % p/p del fotoiniciador benzoinizo-

butileter. El polímero obtenido permitió la formación de una red polimérica dando lugar a la formación de geles estables [144].

Yan y col. en 2009 utilizaron el tensoactivo MAUM-Br y IL derivados de imidazol para su uso en polimerizaciones en ME del copolímero de acetonitrilo-St. El copolímero obtenido fue utilizado para la formación de membranas conductoras de protones, las cuales demostraron que poseen buenas propiedades mecánicas con estabilidad química y termodinámica [145].

Finalmente, Guo-Xiang y su grupo de trabajo en 2013, realizaron una polimerización en ME utilizando como iniciador AIBN, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{SA}$ como catalizador, bromuro de hexadecil trimetilamonio como tensoactivo y el IL [B mim] [PF₆] para copolimerizar St/acetonitrilo a 65 °C. Los resultados obtenidos indicaron que la polimerización sigue una cinética de primer orden con aumentos graduales en sus conversiones y peso molecular. El diámetro de partícula se encontró dentro del intervalo de 10 a 30 nm y los sistemas con relación de 80:20 acetonitrilo-St fueron los que permitieron pesos moleculares superiores a ~32500 g/mol con conversiones de ~75 % [146].

Cabe resaltar que, en la revisión bibliográfica realizada, la mayoría de los reportes acerca de polimerizaciones en ME de St y VAc con IL, estos últimos han sido utilizados como disolvente y no como tensoactivo. Adicionalmente, no se han encontrado antecedentes de polimerizaciones en ME con VAc y St utilizando como tensoactivo el IL C1EG®. Sin embargo, se cuenta con un reporte previo del estudio de este IL como tensoactivo para polimerizaciones en emulsión de St, el cuál demostró que al utilizar concentraciones de 7.7-10.9 X CMC del IL C1EG® se obtienen conversiones alrededor del 90 % en 2 h, resultados similares y comparables a los resultados con los obtenidos mediante el uso del tensoactivo convencional DTAB a una concentración de 2 a 3 veces su CMC [130], razón por la cual se consideró su potencial para la formulación de ME.

3. JUSTIFICACIÓN

La formulación de NDP para liberación de fármacos anticancerígenos representa una alternativa para el tratamiento de estas enfermedades comparada con los métodos convencionales, los cuales se caracterizan por ser terapias no selectivas que afectan la biodisponibilidad del fármaco y producen efectos citotóxicos indistintamente en células sanas y cancerosas.

El presente trabajo de investigación se enfocó en la formulación de ME normales (aceite en agua), utilizando tensoactivos bicéfalos sintetizados y comerciales (específicamente IL C1EG®), que, debido a su estructura química con dos cabezas hidrofílicas, permite disminuir la concentración requerida para la formación de ME, impactando directamente en la disminución de la toxicidad del sistema. Como fase oleosa se propone el uso de aceites esenciales (menta) con la finalidad de incrementar la solubilidad del fármaco anticancerígeno (paclitaxel), protegiéndolo de degradación y potencializando su biodisponibilidad y efecto antineoplásico. Finalmente, las partículas de estas ME fueron recubiertas con una coraza de quitosano modificado con ácido fólico, con el objetivo de incrementar su afinidad a los receptores folato sobre expresados en las células cancerosas para obtener NDP poliméricos selectivos a estas células y disminuir los efectos colaterales causados en los tratamientos convencionales.

Diversas investigaciones han reportado ME normales con aceite de menta para liberación del fármaco anticancerígeno paclitaxel, utilizando tensoactivos convencionales y co-tensoactivos, sin embargo, existe nula información sobre ME con el tensoactivo IL C1EG®, aceite de menta y paclitaxel como núcleo, recubierto con una coraza de quitosano y/o quitosano modificado con ácido fólico.

Por otro lado, se investigó la factibilidad de utilizar tensoactivos bicéfalos en polimerizaciones en ME utilizando un monómero con baja solubilidad en agua (St) y otro con alta solubilidad en agua (VAc), debido a que las polimerizaciones en medios acuosos son un área en constante búsqueda de implementar mejoras en sus procesos, con la finalidad de hacerlos más eficientes y disminuir tiempos y/o costos. El tensoactivo IL C1EG® representa una opción para disminuir los porcentajes de este componente en polimerizaciones en ME de St y VAc, que, a pesar de ser monómeros con amplios reportes sobre su polimerización, existen nulos antecedentes de polimerizaciones en ME de estos monómeros utilizando este tensoactivo bicéfalo. En esta tesis se investigó la factibilidad de utilizar tensoactivos bicéfalos en polimerizaciones con la finalidad de conocer su desempeño.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

- Será posible la preparación de nanodispositivos poliméricos, formulando microemulsiones normales con el tensoactivo Io-li-tec C1EG®, recubriendo las gotitas de las ME con una coraza biopolimérica de quitosano modificado con ácido fólico, con respuesta al pH tumoral que permitirá la liberación prolongada del fármaco. Además, el aceite de menta actuará como vehículo del fármaco anticancerígeno en las microemulsiones para incrementar su solubilidad y tendrá un efecto sinérgico con el fármaco empleado contra líneas celulares de cáncer.
- Es posible polimerizar estireno y acetato de vinilo en microemulsiones, utilizando bajas concentraciones del tensoactivo Io-li-tec C1EG®.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo general

Desarrollar nanodispositivos poliméricos basados en microemulsiones aceite en agua (o/w) formuladas con aceites esenciales y tensoactivos bicéfalos, recubriendo las gotitas con una coraza polimérica para su uso como sistemas de liberación controlada de fármacos anticancerígenos. Además, investigar la factibilidad de polimerizar en ME monómeros con diferente solubilidad en agua (St y VAc) empleando tensoactivos bicéfalos.

4.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar y modificar quitosano con ácido fólico (FTIR, XRD, grado de acetilación y desacetilación, comportamiento reológico, peso molecular viscoso y grado de injerto).
- Sintetizar por medio de la reacción 1,4 de Michael, tres tensoactivos bicéfalos derivados de ácidos grasos de cadena larga (mirístico, oleico y linoleico) y caracterizarlos mediante FTIR, RMN ¹H, RMN ¹³C, CMC, número de agregación, parámetro de empaquetamiento, así como su evaluación de viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico de cristal violeta en las líneas celulares A549 y MDA-MB-231.
- Formular microemulsiones normales utilizando los tensoactivos dianiónicos bicéfalos sintetizados y líquidos iónicos comerciales (Io-li-tec C1EG®) con aceites esenciales de menta, canela y jojoba,

(además de aceites vegetales de oliva y aguacate) y caracterizarlas mediante DLS, potencial Z, potenciometría y UV-VIS.

- Formar nanodispositivos poliméricos recubriendo las gotitas de las microemulsiones normales con una coraza de quitosano y/o quitosano modificado con ácido fólico y caracterizarlos mediante diámetro de partícula, polidispersidad, potencial Z, pH, conductividad, estabilidad térmica, mecánica, de almacenamiento y TEM.
- Determinar los perfiles de liberación del agente bioactivo a partir de las microemulsiones y nanodispositivos poliméricos a pH 5.8, 6.5 y 7.4.
- Evaluar la viabilidad celular de los NDP y /o microemulsiones *in vitro* mediante el ensayo colorimétrico de cristal violeta en las líneas celulares 1132SK, A549 y MDA-MB-231 como una evaluación inicial.
- Investigar la factibilidad de utilizar tensoactivos bicéfalos en polimerizaciones en microemulsión y construir diagramas de fases ternarios para la determinación de la región de microemulsión normal utilizando el líquido iónico Io-li-tec C1EG® como tensoactivo bicéfalo, con los monómeros estireno (baja solubilidad en agua) y acetato de vinilo (alta solubilidad en agua).
- Polimerizar en microemulsión los monómeros estireno y acetato de vinilo variando la concentración de monómero, iniciador y temperatura.
- Caracterizar los látex obtenidos de las microemulsiones con mayor porcentaje de conversión mediante DLS, potencial Z, estabilidad mecánica, TEM y SEM.
- Caracterizar los polímeros obtenidos mediante FTIR, RMN ¹H, RMN ¹³C, TGA, DSC, GPC y DMA.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Modificación del quitosano (CS) con el ácido fólico (FA) (CS-FA) y caracterizaciones de CS y CS-FA

-Conjugación del quitosano con el ácido fólico

La conjugación entre el grupo amino del CS y el grupo carboxílico del FA se llevó a cabo mediante una reacción de amidación con el método de acoplamiento EDAC/NHS para la obtención de la amida utilizando como referencia las metodologías propuestas por Bano et al. [43] y Ullah et al. [147]. En la Figura 8, se muestra la reacción de conjugación del CS-FA. Esta metodología consiste en que el EDAC tiene la función de activador del grupo carboxílico del FA, creando un grupo saliente de éster el cual es inestable y propenso a sufrir una reacción de hidrólisis, razón por la cual, se adicionó el NHS como agente estabilizante, que permitió el acoplamiento eficiente entre el CS y FA/EDAC/NHS formando la amida deseada (CS-FA).

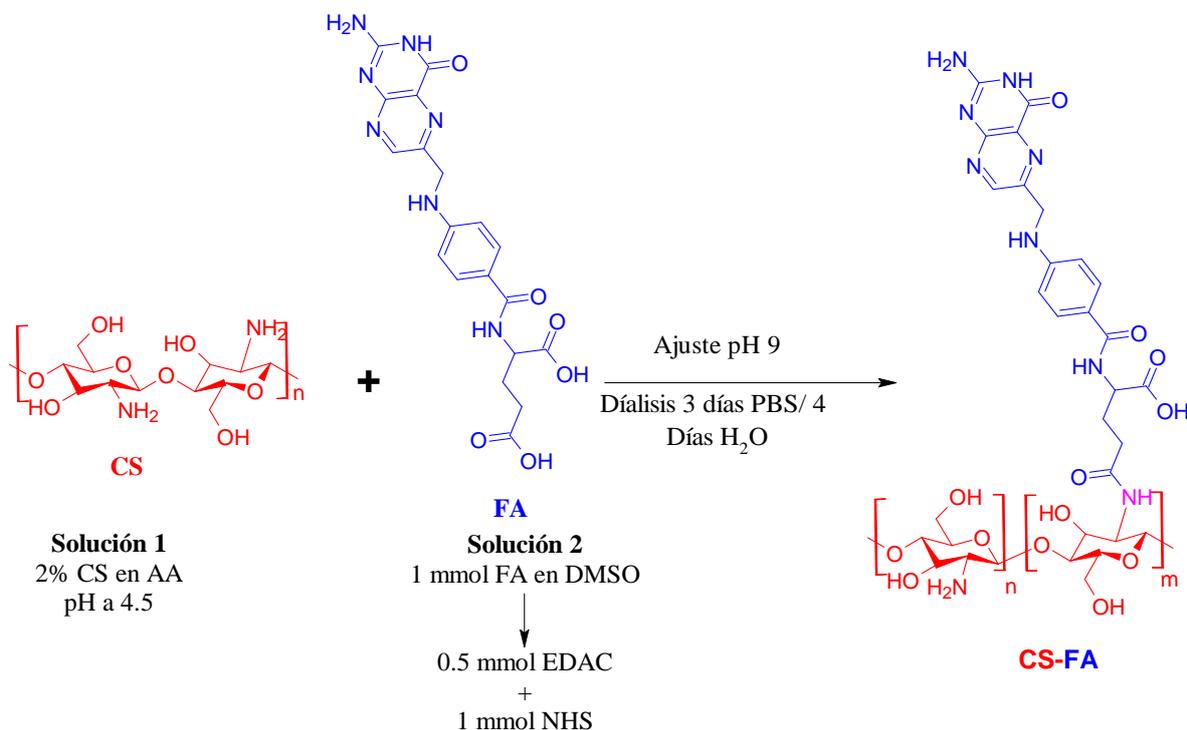


Figura 8. Reacción de amidación para la modificación del CS con FA

Inicialmente, se preparó una solución al 2% de CS (CS de bajo peso molecular promedio viscoso (M_v) de 50,000- 190,000 Da, Sigma Aldrich ®, 75-85 % grado de des acetilación) en una solución acuosa de ácido

acético al 1% (Reactivo, Fermont ®) y se agitó durante 24 h. Posteriormente, se ajustó el pH a 4.5 utilizando la cantidad necesaria de una solución de hidróxido de sodio 1M (NaOH) (Reactivo, Sigma Aldrich®).

Por otro lado, se preparó una segunda solución, donde se disolvió 1 mmol de FA en 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Reactivo, Sigma Aldrich®) y se sometió a un proceso de sonicación por 45 minutos. Enseguida, se realizó la activación del FA con la adición de 0.5 mmol de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDAC) (98%, Sigma Aldrich®) y 1 mmol N-succinimida (NHS) (98%, Sigma Aldrich®) y se colocó bajo agitación magnética a 700 rpm, utilizando un baño de calentamiento (Polyscience® Advanced Digital 8002) para mantener una temperatura de 30 °C por 30 minutos bajo atmósfera de argón y protegido de la luz.

Posteriormente, la solución activada de FA fue añadida lentamente a la solución de CS y se continuó la agitación magnética a 700 rpm, a 30 °C por 24 h, en obscuridad y con atmósfera de argón. Al término del tiempo de reacción, se ajustó el pH a 9 utilizando una solución de NaOH 1M.

El producto obtenido se centrifugó a 2500 rpm por 12 minutos y el precipitado obtenido fue sometido a un proceso de diálisis dentro de una membrana de celulosa (peso molecular 14000 Da) por tres días en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 con cambio del buffer diariamente y cuatro días en agua destilada con cambios de agua cada dos días. Finalmente, el producto fue congelado por un día y liofilizado durante tres días.

5.1.1 Análisis estructural mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El análisis estructural mediante FTIR del CS y CS-FA se obtuvo utilizando un espectrofotómetro infrarrojo con modo de uso ATR (Nicolet Is50, Thermo Scientific) realizando 25 escaneos y a una resolución de 4 cm⁻¹ en la región de 4000–500 cm⁻¹.

5.1.2 Determinación del grado de acetilación (GA) y de desacetilación (GD) del quitosano

Se utilizó el espectro de FTIR del CS para calcular su GA, tomando en cuenta la relación entre el área de glucosamina *N*-acetilada y el área de glucosamina, empleando la Ec.10 [148] :

$$GA (\%) = \frac{A_{1645}}{A_{3329}} \times 100 / 1.33 \quad \text{Ec. 10}$$

A_{1645} es el área del pico de los grupos acetilo y A_{3329} es el área del pico del anillo de piranosa;

Posteriormente se obtuvo el GD utilizando la Ec. 11:

$$GD (\%) = 100 - GA \quad \text{Ec. 11}$$

5.1.3 Análisis mediante difracción de rayos X (XRD)

La evaluación de la cristalinidad del CS y CS-FA fue obtenida mediante un análisis de difracción de rayos X (XRD) utilizando un difractómetro (Rigaku Ultima IV) con radiación $\text{CuK}\alpha$, operado a 40 kV y 44 mA, en un intervalo de $5-50^\circ$ de 2θ . Posteriormente, se empleó la Ec. 12 para calcular el porcentaje de cristalinidad de las muestras:

$$IC_{110}(\%) = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \times 100 \quad \text{Ec. 12}$$

Donde, I_{110} es la intensidad máxima de la señal de difracción e I_{am} es la intensidad mínima de la señal de difracción amorfa.

5.1.4 Determinación del grado de injerto (GI) del quitosano modificado con ácido fólico

Inicialmente, se disolvieron 15 mg de CS-FA en 1 mL de una solución al 1% HCl/D₂O (Sigma Aldrich®, 99.8%) (p/p) utilizando como anclaje un capilar de vidrio con D₂O dentro de un tubo de resonancia. Posteriormente, se obtuvo el espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) (Bruker HD 400N de 400 MHz) utilizando una sonda multinuclear de 5 mm con Z-grad a temperatura ambiente.

Finalmente se calculó el GI utilizando la Ec. 13:

$$GI(\%) = \frac{(I_{2HFA} * 100) * I_{1HCS}}{2} \quad \text{Ec. 13}$$

Donde, I_{2HFA} es la integración de 2H aromáticos del anillo benceno para-sustituido del AF, I_{1HCS} es la integración de 1H del anillo glucosamina del CS.

5.1.5 Comportamiento reológico y determinación del peso molecular promedio viscoso (M_v) del quitosano

La determinación del M_v del CS se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Czechowska-Biskup et al. [149] con algunas adecuaciones.

Inicialmente, se secó el CS (CS de bajo peso molecular, $M_v=50,000-190,000$ Da, Sigma Aldrich ®, 75-85 % grado de desacetilación) en una estufa de vacío a 40 °C, por el tiempo necesario, hasta obtener un peso constante.

Enseguida, se preparó una solución amortiguadora de ácido acético glacial al 0.2 M (Fermont ®, grado reactivo) - acetato de amonio al 0.15 M (Jalmek ®, grado reactivo) de pH 4.5 para preparar una solución madre del CS [20 g/dm³]. Posteriormente, se hicieron diluciones para obtener soluciones de CS a las siguientes concentraciones 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5, 4.25, 5.0, 7.0, 12.5 y 15.0 g/dm³.

La determinación del M_v del CS fue realizada por triplicado utilizando un reómetro Anton Paar Physica MCR 501 (Anton Paar®) con geometría de doble gap (DG26) a 25 °C y determinando 30 puntos con una velocidad de cizallamiento de 0.1 a 1000 s⁻¹.

A partir de los resultados obtenidos de viscosidad para el disolvente (η_0) y las diferentes soluciones de CS (η_i), se calcularon las viscosidades relativas (η_r), específicas (η_{sp}), reducidas (η_{red}) e inherentes (η_{inh}) (g/dm³).

Posteriormente, la viscosidad intrínseca (η) fue calculada gráficamente con los valores de η_{red} y η_{inh} al realizar una regresión lineal, el valor de la intersección de ambas rectas es η . Finalmente, el M_v del CS fue estimado utilizando las ecuaciones de Mark Houwink–Sakurada Ec. 14-16:

$$[\eta] = kM_v^\alpha \quad \text{EC. 14}$$

$$\frac{[\eta]}{K} = M_v^\alpha \quad \text{EC. 15}$$

$$\ln M_v = (\ln[\eta] - \ln k)/\alpha \quad \text{EC. 16}$$

K y α de las constantes reportadas para el CS de pesos moleculares de 2-90 kDa (K: 9.50×10^{-5} y α : 0.75), 20-100 kDa (K: 3.64×10^{-5} y α : 0.78) y 200-500 kDa (K: 4.28×10^{-5} y α : 0.773) [149].

5.2 Síntesis y caracterización de tensoactivos bicéfalos dianiónicos derivados de ácidos grasos saturados e insaturados

- Síntesis de tensoactivos dianiónicos bicéfalos.

La síntesis de los BS dianiónicos se llevó a cabo mediante una reacción de adición de 1,4-Michael siguiendo las metodologías de Kalhapure [150], Ojewole[85] y Makhathini [86] con algunas modificaciones. A continuación, en la Figura 9 se presenta la ruta de síntesis de BS utilizada en este trabajo.

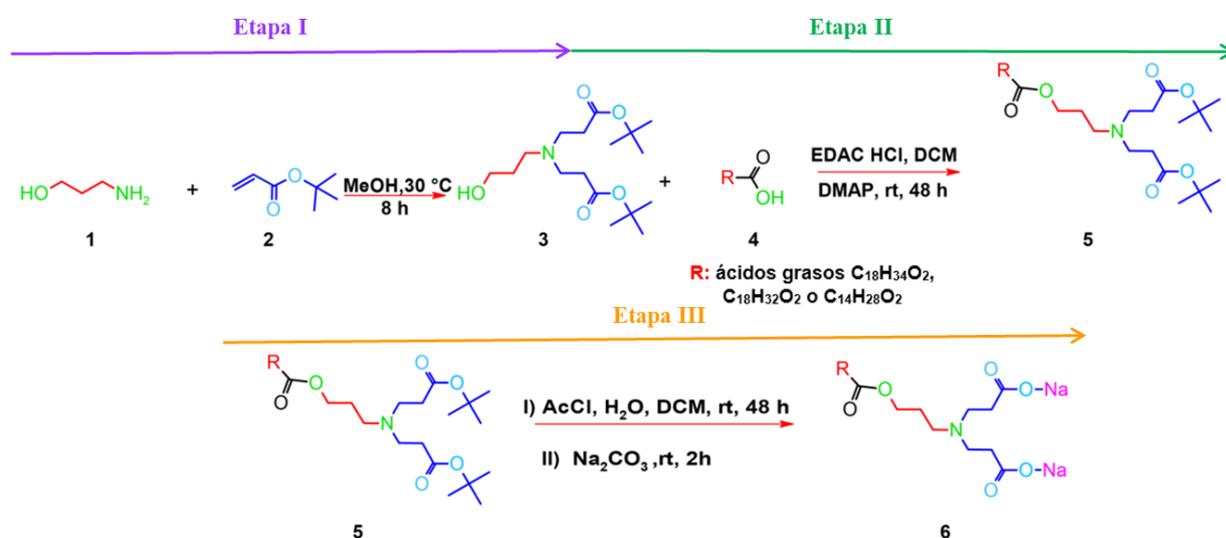


Figura 9. Ruta de síntesis de tensoactivos BS derivados de ácidos grasos

-Etapa I: Síntesis de 3-N,N'-di-(ter-butiloxycarboniletil)aminopropanol (3)

Inicialmente, se preparó una solución que contenía 0.5 moles de 3-amino-1-propanol (1) en 100 mL de metanol (MeOH) y, por otro lado, una solución con 1.5 moles de acrilato de terbutilo (2) en 200 mL de MeOH. Posteriormente, se añadió la solución del 3-amino-1-propanol a la solución del acrilato de terbutilo y se colocaron en agitación a 600 rpm durante 8 h en un baño de calentamiento (Polyscience® Advanced Digital 8002) a 30 °C. Al término del tiempo de reacción se rotaevaporó el disolvente adicional para la obtención del compuesto (3).

-Etapa II: Síntesis de los heterolípidos (5) a partir de ácidos oleico (5AO), linoleico (5AL) y mirístico (5AM)

Primeramente, se preparó la solución 1 que contenía 0.25 moles del ácido graso en 8.3 mL de diclorometano (DCM) (disolvente) y se agitó durante 20 min a 600 rpm a temperatura ambiente; por otro lado, se preparó la solución 2, con 0.3 moles de 3-N,N'-di-(terbutiloxycarboniletil)aminopropanol (**3**) y 0.19 moles de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (catalizador) en 8.3 mL de DCM y se agitó a 600 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. Trascurrido este tiempo, se añadieron 0.374 moles de hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) (catalizador) y se continuó la agitación bajo las mismas condiciones anteriores [85].

Posteriormente, se añadió gota a gota la solución 1 a la solución 2 y se agitó durante 24 h, a 25 °C a 600 rpm. Al finalizar la reacción, se eliminó el disolvente adicional por rota evaporación y se obtuvo el éster propílico (**5**), el cual fue purificado mediante cromatografía en columna usando 30 g de gel de sílice (malla 60, Sigma Aldrich®) y como fase móvil hexano (Reactivo, Sigma Aldrich®) y acetato de etilo (Reactivo, Sigma Aldrich®) (9:1 v/v).

-Etapa III: Hidrólisis ácida y básica del éster propílico (5) para la obtención de los tensoactivos bicéfalos dianiónicos a partir de los ácidos oleico (6AO), linoleico (6AL) y mirístico (6AM)

I) Hidrólisis ácida: se solubilizó 0.1 mmol del compuesto éster propílico correspondiente (**5**) y 0.4 mmol de cloruro de acilo (AcCl) en 10 mL de DCM y 0.72 mL de agua. Entonces, se agitó a 600 rpm durante 48 h a 25 °C. Posteriormente, el producto se lavó con agua desionizada dos veces, se congeló por 24 h y finalmente se liofilizó por 72 h.

II) Hidrólisis básica: Para la formación de la sal se preparó una solución de 2.24 mmol de carbonato de sodio en 1.5 mL de agua desionizada. Luego, se agregaron 1.08 mmol del producto correspondiente (previamente hidrolizado con ácido) y la solución se agitó a 800 rpm a 25 °C durante 2 h. Finalmente, la muestra fue liofilizada para obtener el correspondiente BS (**6**).

5.2.1 Análisis estructural mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El análisis estructural por FTIR de los productos intermedios y de los BS se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro infrarrojo con modo de uso ATR (Nicolet Is50, Thermo Scientific) realizando 25 escaneos y a una resolución de 4 cm⁻¹ en la región de 4000–500 cm⁻¹.

5.2.2 Análisis estructural mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y carbono (RMN ^{13}C)

Para la caracterización estructural mediante RMN ^1H y RMN ^{13}C de los productos intermedios (3) y (5) se disolvieron 30 mg del producto en 1 mL de cloroformo deuterado (CDCl_3) (Sigma Aldrich ®, 99.8%) mientras que para los BS (6) se disolvieron 30 mg de muestra en 1 mL de agua pesada (D_2O) (Sigma Aldrich ®, 99.8%). Posteriormente, se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear (Bruker HD 400N de 400 MHz) utilizando una sonda multi nuclear de 5 mm con Z-grad a una temperatura de 25 °C.

5.2.3 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) mediante las técnicas de conductividad eléctrica y tensiometría

Inicialmente, se preparó una solución madre de cada BS de 0.008 mmol/mL y a partir de esta, se obtuvieron disoluciones en un intervalo de concentración de 9.375×10^{-5} hasta 0.0008 mmol/mL. Los valores de conductividad eléctrica se obtuvieron con un conductímetro (Hanna Instruments H199300 EC/TDS Meter) y la tensión superficial con un tensiómetro automático de anillo (Du-Nouy Sigma 7⁰³). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado; cada concentración fue promediada para determinar la desviación estándar y los datos obtenidos fueron graficados para posteriormente trazar dos líneas rectas sobre los puntos obtenidos. Las ecuaciones de las rectas se resolvieron simultáneamente para la obtención de la intersección de estas líneas, la cual corresponde al valor de CMC.

5.2.4 Determinación del número de agregación (N_{agg}) y parámetro crítico de empaquetamiento (P_e)

Se emplearon cálculos teóricos para la determinación de los N_{agg} y P_e de los BS sintetizados y el BS C1EG® [151], [152], a continuación, se describen las etapas desarrolladas para calcular estos parámetros.

Etapas 1: Inicialmente se dibujaron las estructuras de los BS e IL C1EG® en el programa Gaussview 6.0 y posteriormente se realizó una pre-optimización de las moléculas mediante los programas xtb y CREST a partir de métodos semi empíricos, con la finalidad de obtener los posibles arreglos geométricos que puede adoptar cada molécula de acuerdo con sus grados de libertad. Entonces, se generó la lista de los conformeros y rotámeros con geometrías únicas en el umbral de energía más bajo.

Etapa 2: Mediante la teoría de funcionales de densidad (DFT) se realizó una optimización de las geometrías únicas obtenidas en la etapa anterior, donde se utilizó el funcional de correlación e intercambio BP86 (de aproximación de gradiente generalizado).

Etapa 3: La geometría obtenida mediante DFT fue sometida en el programa Orca, para la optimización del estado basal de las moléculas y se utilizó el funcional de correlación e intercambio GGA híbrido B3LYP (Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr) y la base doble zeta (SVP).

Etapa 4: Mediante el programa Chemcraft se realizó un análisis de frecuencias vibracionales de las moléculas optimizadas.

Etapa 5: Posteriormente, mediante el software Multiwavefunction (Multiwfn) se realizó un análisis de superficie sin función de mapeo, mediante integración por el método Monte Carlo, utilizando un contorno de densidad de 0.001 Bohr^3 para reducir los errores aleatorios para el cálculo del volumen molecular de una isosuperficie ($V_{\text{mol iso}}$). Una vez obtenido el $V_{\text{mol iso}}$, se realizó la medición del radio micelar (R) de la molécula a partir del grupo metilo terminal hasta el átomo de nitrógeno como se representa a continuación en la Figura 10.

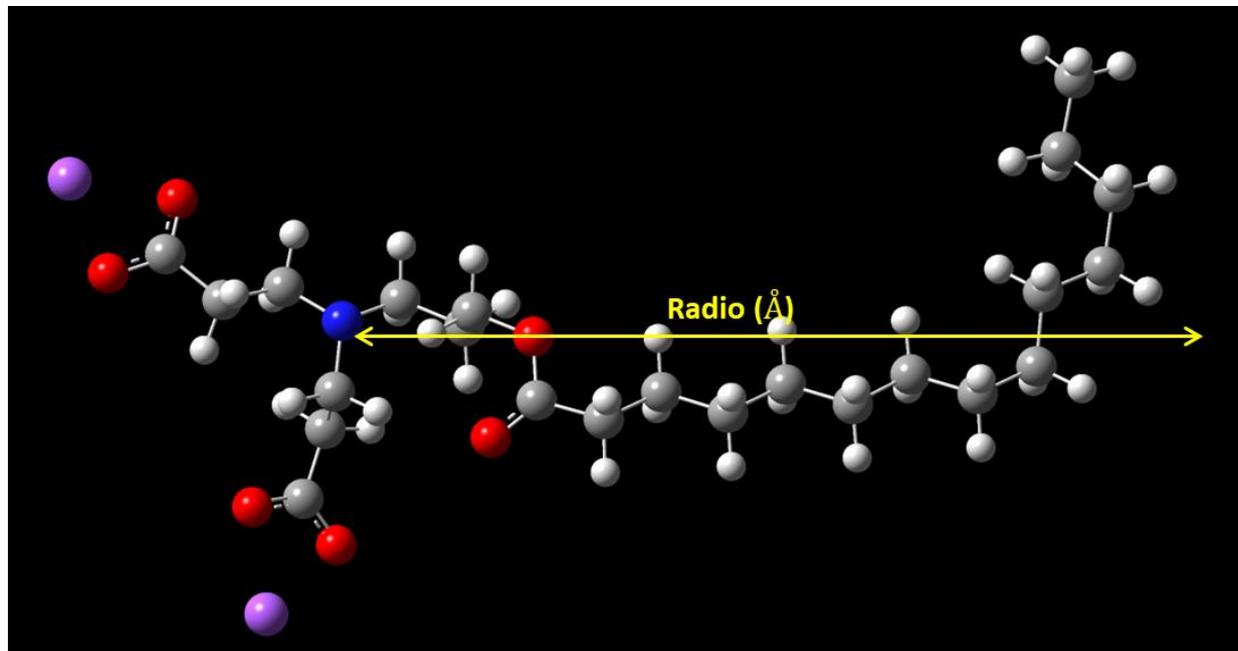


Figura 10. Delimitación del radio micelar en el BS.

El cálculo del volumen micelar (V_{mic}) se realizó mediante la Ec.17:

$$v_{mic} = \frac{4}{3}\pi(R^3) \quad \text{Ec. 17}$$

Y finalmente el N_{agg} fue calculado mediante la siguiente Ec. 18 [151]:

$$N_{agg} = \frac{v_{mic}}{v_{mol iso}} \quad \text{Ec. 18}$$

Etapa 6: Para el cálculo del P_e se requiere conocer la distancia entre los átomos de las cabezas polares (D), el radio efectivo de la cabeza (R_a), área de la superficie de la cabeza polar (a_0), el volumen de la cadena hidrofóbica (V_0) y la longitud de la cadena hidrofóbica (l_0). A continuación, en la Figura 11 se representa como fueron determinados los parámetros correspondientes a esta etapa.

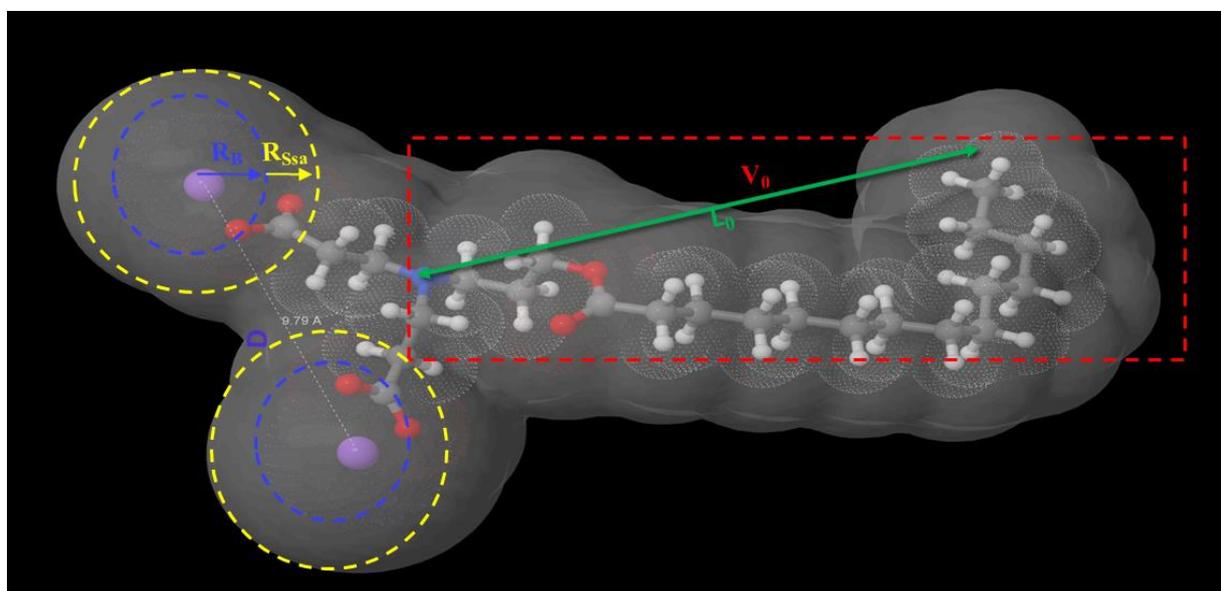


Figura 11. Parámetros para el cálculo de P_e .

Primeramente, para determinar los valores de V_0 y a_0 , se recortó la molécula manteniendo únicamente la cadena hidrofóbica y la estructura fue optimizada siguiendo la etapa 3 descrita anteriormente, utilizando el mismo nivel de teoría, posteriormente mediante Multiwfn se determinó el volumen molecular de Van Der Waals (V_{dw}) y mediante Chemcraft se obtuvieron las l_0 y D .

Se utilizó el programa Jmol para determinar la superficie accesible al disolvente (S_{as}) midiendo las proporciones de la cabeza y esfera de solvatación del tensoactivo, y se calculó el R_a mediante la siguiente Ec. 19:

$$R_a = 2(R_B) + 2(R_{Ssa}) + D \quad \text{Ec. 19}$$

R_B : Radio teórico de Bohr para el átomo de las cabezas polares, para hidrogeno (H:0.53 Å) o sodio (Na: 1.9 Å).

R_{Ssa} : Radio teórico del disolvente, Agua (H₂O:1.4 Å).

Para la obtención de a_0 se siguió la Ec. 20 [152]:

$$A_0 = \pi R_a^2 \quad \text{Ec. 20}$$

Finalmente, P_e se calculó con la siguiente Ec. 21:

$$P_e = \frac{v_0}{a_0 l_0} \quad \text{Ec. 21}$$

5.2.5 Ensayo de viabilidad celular *in vitro* de los tensoactivos bicéfalos

Estos ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Cultivo Celular del Departamento de Materiales Avanzados del Centro de Investigación en Química Aplicada de reciente creación, en el que trabaja personal capacitado bajo estándares de calidad y que actualmente se encuentra en proceso de formación el comité de bioética.

-Cultivo de células

Se cultivaron las líneas celulares de cáncer de pulmón (A549) y mama (MDA-MB-231) (adquiridas en The Global Bioresource Center ATCC) en medio DMEM-F12 suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y antibióticos en una atmósfera controlada con 5 % de CO₂ y 95 % de aire a 37 °C. Posteriormente, se sembraron las células por 24 h previas al tratamiento; al concluir, las células se lavaron dos veces con solución salina tampón fosfato (PBS) (Sigma Aldrich®).

- Ensayo de viabilidad celular

Se procedió a dar el tratamiento a las células cultivadas con los tensoactivos 6AO, 6AL y 6AM a concentraciones de 50, 250, 450, 650 y 850 µg/mL por 24 h a 37 °C; transcurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS, entonces las células se fijaron con una solución de para-formaldehído al 4 % y se tiñeron con una solución de violeta cristal al 0.25 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida de la tinción, las células se lavaron con agua para eliminar el tinte y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente, los cultivos celulares se atenuaron usando una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1 % y se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS

(Thermo Scientific®, Multiskan FC) a 570 nm de longitud de onda. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

5.3 Formulación de sistemas con los tensoactivos sintetizados, pruebas preliminares para la formación de microemulsiones con los tensoactivos sintetizados y sus caracterizaciones mediante potenciometría, DLS y UV-VIS

-Etapa I Sistemas ternarios

Se formularon sistemas con el propósito de obtener ME del tipo aceite en agua (o/w) empleando los BS 6AO y 6AL, sin embargo, debido a la poca solubilidad de estos, la solución micelar fue realizada en una proporción de 99.9:0.1 %p/p (agua:BS); los aceites esenciales utilizados como fase oleosa fueron aceite de canela (de corteza FCC, Sigma Aldrich®), menta (Natural, Sigma Aldrich®), jojoba (Activos Botánicos y Químicos para la Industria®), además de aceite de oliva extra virgen (Puro, Carbonell®) y de aguacate (Puro, Great Value®).

La solución micelar se colocó en un vial traslúcido dentro de un baño con temperatura controlada a 25 y 37 °C con agitación magnética constante de 1200 rpm. Posteriormente, se tituló la fase oleosa correspondiente, con un intervalo de 15 minutos entre gota y gota hasta llegar a la turbidez de la muestra. Esta información fue utilizada para la obtención de los diagramas de fases ternarios de los sistemas. Enseguida, a estas muestras se les determinaron los valores de pH (potenciómetro marca Hanna Instruments H12213 pH/ORP Meter), porcentajes de transmitancia (%T) (espectrofotómetro Jenway 7305 UV/VIS) a $\lambda = 211$ y 239 nm para 6AO y 6AL respectivamente, y diámetro de partícula hidrodinámico (D_p) (Zetasizer de Malvern Instruments modelo Nano-S90). Estas mediciones fueron hechas por triplicado a 25 °C, utilizando los índices de refracción (IR) de los aceites, canela (1.59), menta (1.46), jojoba (1.465), aguacate (1.468) y oliva (1.465) y los de los ácidos grasos oleico (AO) (1.459) y linoleico (AL) (1.47).

-Etapa II Sistemas pseudo ternarios

Debido a los resultados obtenidos en la etapa I, se formularon nuevos sistemas con proporciones de 99.78% agua, 0.1% tensoactivo (6AO o 6AL) y 0.12% de aceite de oliva (OO) como fase oleosa (debido a que fue uno de los aceites que permitió mayor porcentaje de adición evitando el uso de co-tensoactivo); y se formularon sistemas utilizando los co-tensoactivos etanol (EtOH) (Absoluto, reactivo, CTR®) o

polietilenglicol (PEG) (USP, Merck®) en los siguientes porcentajes: 49.78% agua, 0.1% tensoactivo 6AO o 6AL respectivamente, 50% co-tensoactivo (debido a que sería el porcentaje máximo que podría usar en una formulación farmacéutica) y 0.12% de OO. Todas las pruebas se realizaron por triplicado a 25 y 37 °C con agitación constante de 1200 rpm. Finalmente, se determinó el diámetro de partícula (D_p) mediante DLS utilizando el índice de refracción (IR) del aceite de oliva (OO) (1.465) y porcentajes de transmitancia (%T).

5.4 Formulación de microemulsiones (ME) utilizando líquidos iónicos (IL) comerciales como tensoactivos bicéfalos catiónicos

5.4.1 Determinación de la región de microemulsión mediante la construcción de diagramas de fases ternarios

Se propuso el uso de líquidos iónicos (IL) T2EG® (>95%, Io-li-tec®) y C1EG® (>95%, Io-li-tec®) como BS para la formulación de ME (o/w). Inicialmente, se trabajó en la construcción de los diagramas de fases ternarios con la intención de determinar la amplitud de la región de ME aceite en agua y mediante el diseño de varias SE ME seleccionó la concentración adecuada de los componentes. Para esto, se preparó una solución micelar de 60:40 (agua: C1EG®) y 70:30 (agua:T2EG®) y posteriormente se realizaron diluciones para obtener diferentes concentraciones hasta una relación de 98.75:1.25 (agua:IL). Enseguida, estas soluciones micelares se colocaron en un vial de vidrio transparente en agitación magnética a 200 rpm dentro de un baño de calentamiento (Polyscience® Advanced Digital 8002) a 37 °C y se dosificó gota a gota el aceite de AcM, con intervalos de 10 minutos entre gota hasta llegar a la turbidez del sistema. Las pruebas fueron realizadas por duplicado.

5.4.2 Determinación de la solubilidad de los principios activos anticancerígenos en el aceite esencial de menta (AcM)

Anteriormente, se seleccionó el AcM por su mayor potencial en la formación de ME y por tanto se procedió a determinar la solubilidad de diversos API anticancerígenos en este aceite, con la finalidad de elegir el API con mayor solubilidad. Los API probados fueron curcumina (>94%, Sigma Aldrich), metotrexato (98% HPLC, AK Scientific®) y paclitaxel (PTX) (>99%, Selleckchem®).

Las solubilidades se determinaron utilizando dos metodologías, la primera fue “shake flash” como reporta Zepeda y col. [60] con algunas modificaciones; esta consistió en colocar 0.5 g de AcM en un vial de vidrio, al cual se le añadieron poco a poco cantidades conocidas del API en condiciones de agitación a 600 rpm

a 25 °C, hasta llegar a la saturación. La segunda técnica fue mediante espectroscopía UV-VIS, la cual consistió en preparar soluciones a diferentes concentraciones de los API en etanol (Absoluto, reactivo, CTR®) en intervalos de concentración de 7 mg/mL a 1.95 µg/mL para PTX y curcumina y de 1 mg/mL a 1.95 µg/mL para metotrexato para la construcción de sus curvas de calibración. Finalmente, las soluciones obtenidas de la técnica shake flash, se centrifugaron (microcentrífuga Select Bio Products, Select 8Spin 17R) durante 10 minutos a 6000 rpm y el sobrenadante fue analizado mediante espectroscopía UV-VIS (espectrofotómetro de microplacas Epoch 2, Biotek®) a una longitud de onda, λ , de 215, 303 y 423 nm para PTX, metotrexato y curcumina respectivamente.

5.4.3 Formulación de microemulsiones (ME) aceite en agua (o/w) con el líquido iónico (IL) C1EG® y aceite esencial de menta (AcM). Determinación de las condiciones óptimas la formación de la coraza de quitosano y su caracterización

-Etapa I Formación de ME normales

Se preparó una solución micelar madre con una relación 30:70 (%p/p) del IL C1EG®:agua, a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener soluciones micelares con diferente proporción de estos componentes (3.25:96.75, 5:95, 10:90, 15:85, 20:80 y 30:70 %p/p). Estas soluciones, se colocaron dentro del baño de calentamiento a 37 °C bajo agitación magnética a 600 rpm. Posteriormente, las soluciones se titularon (con una jeringa Hamilton Gastigth®) con AcM y se continuó la agitación por un lapso de 24 h, con la finalidad de asegurar el equilibrio del sistema.

Las ME formuladas fueron caracterizadas mediante pH y conductividad eléctrica. Los valores de diámetro de partícula hidrodinámico (D_p) y potencial Z (ζ) se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) (Microtrac Nanotracs Wave II) con una dilución de la ME en una relación 1:20 (%v/v) ME: Agua Milli-Q a 25 °C.

-Etapa II Formación de coraza de CS

La formación de la coraza polimérica de CS sobre las gotitas de ME se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Kumari [61]. Inicialmente, se realizaron dos soluciones de CS con diferente concentración (0.1 y 0.4 %) en una solución de ácido acético al 1% (Reactivo, Fermont ®). Las soluciones preparadas fueron filtradas con un filtro de nylon de 45 µm y entonces a las ME o/w formuladas en la etapa anterior, se les adicionó por titulación la solución correspondiente de CS (1:1) y se mantuvieron en agitación magnética a 600 rpm por 5 h a 37 °C.

Las ME con coraza de CS fueron caracterizadas mediante y conductividad eléctrica, así como mediante UV-VIS a una longitud de onda de 242 nm. Adicionalmente, se determinó el diámetro de partícula hidrodinámico (D_p) y potencial Z (ζ) mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) (Zetasizer de Malvern Instruments modelo Nano-S90). Para estas determinaciones, las muestras fueron diluidas en una relación 1:20 (%v/v) ME: Agua Milli-Q para posteriormente realizar las mediciones a 25 °C.

La ME con coraza de CS que presentó D_p y ζ dentro del intervalo deseado para una ME con D_p inferiores a 400 nm y ζ mayores a 30 mV, fue elegida para determinar su morfología en el microscopio electrónico de transmisión (TEM, Titán 80-300 kV), colocando las muestras diluidas 1:20 (%v/v) sobre una rejilla de cobre recubierta con una película de “lacey carbon”. Entonces, una vez evaporado el disolvente, fueron teñidas con una solución de ácido fosfotúngstico al 1 %.

5.4.4 Formación y caracterización de nanodispositivos poliméricos (NDP) cargados con paclitaxel

Una vez determinadas las concentraciones adecuadas de C1EG®, AcM, PTX y CS en las etapas anteriores, se procedió a la formulación de seis NDP. En la Tabla 6 se presenta la composición de cada uno de ellos.

Tabla 6. Composición de los nanodispositivos poliméricos preparados.

NDP	% Agua	% C1EG®	% AcM	% PTX	% CS	% CS-FA
NDP1	93.02	4.98	2.0	---	---	---
NDP 2	95.26	2.54	2.0	----	0.2	---
NDP 3	95.19	2.55	2.0	0.06	0.2	---
NDP 4	95.31	2.49	2.0	---	---	0.2
NDP 5	95.24	2.50	2.0	0.06	---	0.2
NDP6	90.92	4.96	4.0	0.12	---	---

Inicialmente se disolvió la cantidad de PTX en el AcM bajo agitación magnética a 400 rpm a 25 °C. Posteriormente, para la formación de la ME se usó una solución micelar de C1EG®: Agua (5:95 p/p), y se le añadió la fase oleosa (con o sin PTX) por titulación con una jeringa Hamilton Gastigth® en agitación magnética a 600 rpm a 37 °C por 2 h. Una vez obtenidas las ME, se procedió a la formación de los NDP con coraza biopolimérica, mediante la adición de la solución de CS o CS-FA al 0.4 % en ácido acético al

1% a la ME, en una relación 1:1 (p/p) (ME:CS o CS-FA) y se continuó la agitación a 600 rpm por 5 h a 37 °C. Trascurrido este tiempo, se conservaron los NDP durante 24 h a 37 °C para asegurar su equilibrio.

Los NDP se caracterizaron mediante D_p , ζ y TEM bajo las mismas condiciones descritas en la etapa anterior. Adicionalmente, se realizaron pruebas de estabilidad mecánica (las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 30 minutos en la microcentrífuga) de almacenamiento (a temperatura ambiente) y térmica (por medio de ciclos de congelación/calentamiento por cuatro días a temperaturas de -30°C y 40°C).

5.5 Perfiles de liberación de los nanodispositivos poliméricos (NDP) a pH de 5.8, 6.5 y 7.4 y ajuste a los modelos matemáticos de liberación

Los perfiles de liberación se realizaron *in vitro* con la finalidad de determinar la cantidad del AcM liberada respecto al tiempo; esto se realizó mediante un proceso de diálisis en una membrana de celulosa (de peso molecular inferior a 14000 Da). En la membrana, se agregó 1 mL del NDP a evaluar y se selló de los extremos con un hilo de nylon. Posteriormente, esta membrana se colocó dentro de un frasco de vidrio de 50 mL y se agregaron 30 mL de un buffer de fosfatos al pH deseado 5.8, 6.5 y 7.4. Los perfiles de liberación se determinaron a una temperatura de 37 °C.

Se procedió a la toma de alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos y posteriormente se analizaron mediante UV-Vis a una λ de 242 nm para obtener las absorbancias y al término de la medición la alícuota fue reincorporada al medio para mantener un volumen constante. Los resultados obtenidos se compararon con la curva de calibración del AcM en etanol (R^2 : 0.9998).

-Modelado de la cinética de liberación de los nanodispositivos poliméricos

Se analizaron los resultados obtenidos en los ensayos de liberación mediante el ajuste de los datos a cuatro modelos matemáticos con la finalidad de describir el mecanismo de liberación a través de la membrana. La descripción de los mecanismos se muestra a continuación [60]:

Orden cero (Ec. 22): describe sistemas de liberación controlada, la liberación del API es independiente de la concentración inicial; primer orden (Ec. 23), la velocidad de liberación es dependiente de la concentración inicial del API; Higuchi (Ec. 24), describe la liberación del fármaco a través de una membrana por un proceso de difusión Fickiana; Korsmeyer-Peppas (Ec. 25), describe el mecanismo de liberación de un sistema polimérico.

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = k_0 t$$

EC. 22

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-k_1 t} \quad \text{EC. 23}$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t} \quad \text{EC. 24}$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_K t^n \quad \text{EC. 25}$$

M_t/M_∞ : corresponde a la fracción del API liberada en un tiempo $t(h)$, k_0 , k_1 , k_H y k_K son las constantes de orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas respectivamente, n : es el exponente de liberación del fármaco.

5.6 Evaluación de viabilidad celular *in vitro* de los nanodispositivos poliméricos en las líneas celulares de fibroblastos (1132SK), cáncer de pulmón (A549) y cáncer de mama (MDA-MB-231)

- Cultivo de células

El cultivo de las líneas celulares se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente en el apartado 5.2.6 de cultivo celular de las líneas celulares de fibroblastos (SK)(ATCC), cáncer de mama (MDA-MB-231) y pulmón (A549)

- Ensayo de viabilidad celular

Se procedió a dar el tratamiento a las células cultivadas con los NDP1-NDP6 (ver Tabla 6) a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h a 37 °C. Trascurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS, luego las células se fijaron con una solución de para-formaldehído al 4 % y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.25 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, las células se lavaron con agua para eliminar el tinte y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente, los cultivos celulares se atenuaron usando una solución de SDS al 0.1 % y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific®, Multiskan FC) a 570 nm. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

5.7 Polimerizaciones en microemulsión de estireno (St) y acetato de vinilo (VAc)

5.7.1 Determinación de la región de microemulsión mediante la construcción de diagramas de fases ternarios

Se llevó a cabo la construcción de diagramas de fases ternarios para la determinación de la región de ME. Inicialmente, se preparó una solución micelar madre 70:30 (Agua:C1EG®) (p/p) y se diluyó para la obtención de diferentes concentraciones hasta una relación agua:tensoactivo de 98.75:1.25 p/p. Las soluciones micelares se colocaron en un vial de vidrio transparente a 25 y 60 °C con agitación magnética a 200 rpm y se titularon gota a gota con el monómero correspondiente (estireno >99%, Sigma Aldrich®) y/o acetato de vinilo (>99%, Sigma Aldrich®) utilizando una micropipeta con intervalos de 5 min entre gota hasta llegar a la turbidez del sistema. Las pruebas se realizaron por duplicado.

5.7.2 Polimerizaciones en microemulsión de estireno y acetato de vinilo

El planteamiento de las reacciones fue basado en un diseño de experimentos factorial completo de tres factores: temperatura, iniciador di-hidrocloruro de 2,2'-azobis-2-metilpropionamidina (V-50) y monómeros estireno (St) y/o acetato de vinilo (VAc), con dos niveles (alto y bajo) con puntos intermedios de las condiciones, el diseño se muestra a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. Diseño experimental de las polimerizaciones en ME de St y VAc

Identificación	°C	[Iniciador]	[Monómero]	Identificación	°C	[Iniciador]	[Monómero]
C1St	50	0.035%	2%	C1VAc	50	0.035%	3%
C2St	50	0.070%	4%	C2VAc	60	0.070%	6%
C3St	60	0.035%	2%	C3VAc	60	0.035%	6%
C4St	50	0.035%	4%	C4VAc	70	0.035%	6%
C5St	60	0.070%	4%	C5VAc	70	0.070%	6%
C6St	50	0.070%	2%	C6VAc	70	0.070%	3%
C7St	60	0.035%	4%	C7VAc	60	0.035%	3%
C8St	60	0.070%	2%	C8VAc	60	0.070%	3%
C9St	55	0.050%	3%	C9VAc	65	0.050%	4.5%
				C10VAc	65	0.050%	4.5%

Las polimerizaciones fueron llevadas a cabo en un reactor enchaquetado de 100 mL con tapa de cuatro bocas: en la primera boca se adecuó una propela de cuatro paletas oblicuas, en la segunda se colocó el sistema de condensación de reflujo, en la tercera se colocó una manguera para mantener un burbujeo constante de argón para eliminar el oxígeno presente y finalmente, la cuarta se utilizó para realizar el muestreo a diferentes tiempos de reacción.

Inicialmente, en el reactor se colocó la cantidad de agua (Milli-Q), tensoactivo (C1EG®) e iniciador (V-50) a la temperatura indicados en el diseño experimental y se agitó a una velocidad de 300 rpm con burbujeo constante de argón por una hora para eliminar el oxígeno presente. Posteriormente, se incorporó el monómero (St o VAc) previamente destilado y desgasificado utilizando una jeringa hermética de 10 mL y se dejó transcurrir la reacción durante el período de tiempo establecido para el St de 180 min y VAc de 80 min.

5.7.2.1 Caracterización de los látex

-Determinación de la conversión

Durante el transcurso de la polimerización, se realizó el muestreo del látex tomando 1 mL de alícuota a diferentes tiempos de reacción vertiéndola dentro de un vial de vidrio con 0.5 g de una solución de hidroquinona al 0.4% y se le colocó un tapón de algodón. Posteriormente, las muestras fueron congeladas por al menos 6 h previas al proceso de liofilización de 24 h. Trascurrido este tiempo, las muestras fueron pesadas y finalmente se determinó el grado de conversión de monómero a polímero mediante un balance de masas.

-Número de partículas (N_p)

Se estimó el N_p en el látex utilizando la Ec. 26:

$$N_p = 6C_p / \pi \rho_p D_p^3 \quad \text{Ec. 26}$$

C_p : g de polímero en el látex, ρ_p , la densidad del polímero en g/cm^3 (1.05 y 0.934 g/cm^3 para St y VAc respectivamente) y D_p del látex fue el obtenido mediante DLS.

-Caracterización mediante DLS y potencial Z

Los látex obtenidos fueron diluidos al 0.10 % p/p con agua Milli-Q para su análisis mediante DLS para la determinación de su D_p , polidispersidad y potencial Z realizando las mediciones a 25 °C y por triplicado de los promedios Z.

-Estabilidad mecánica

Para las pruebas de estabilidad mecánica de los látex se tomó una alícuota de 1 mL de este y fue sometida a un proceso de centrifugación a 5000 rpm por 20 minutos. Finalizado este tiempo, se realizó una inspección visual de la muestra para describir su apariencia.

-Morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La preparación de las muestras consistió en realizar una dilución del látex al 0.10 % p/p en etanol, y posteriormente se colocó una gota de esta solución en una rejilla de cobre. Las muestras se dejaron secar y analizaron en el equipo TITAN 80- 300 FEI operado a 300 k. Las micrografías obtenidas fueron tratadas mediante el software Image J (Java ®) para el procesamiento de las imágenes y la medición de tamaños de partícula.

-Morfología por microscopía electrónica de barrido SEM

Las muestras se prepararon realizando diluciones del látex al 0.1 % p/p en agua y posteriormente, se colocó una gota de esta solución sobre una porta muestra de cobre-zinc hasta que se evaporó el disolvente. Enseguida, la muestra fue recubierta con oro-platino por medio de la técnica de “sputtering” y se analizó mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (JEOL JSM-7401F). Una vez obtenidas las micrografías se visualizaron mediante el software Image J (Java ®) para el procesamiento de las imágenes y la medición de tamaños promedios de partícula.

5.7.2.2 Caracterización de los polímeros

-Purificación de los polímeros

Se congeló una cantidad conocida del látex y posteriormente se liofilizó hasta su completo secado. El producto obtenido fue lavado tres veces con metanol y al término se secó en una estufa a 40 °C por 24 h. Transcurrido este tiempo, se realizaron lavados con agua destilada caliente a 80 °C hasta observar que la conductividad del agua obtenida de los lavados estuviera cercana a la conductividad del agua destilada (66 μ s/cm). Enseguida, las muestras obtenidas fueron congeladas y liofilizadas hasta que se obtuvo un peso

constante. Finalmente, el producto derivado fue disuelto en tetrahidrofurano (THF) y este fue goteado poco a poco en agua a 80 °C bajo agitación a 500 rpm y entonces la dispersión obtenida fue centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos para separar el precipitado de la fase acuosa. Este procedimiento fue repetido al menos tres veces y el polímero obtenido fue secado mediante liofilización por 48 h.

-Análisis estructural mediante FTIR, RMN ¹H y RMN ¹³C

Se llevó a cabo como se describe anteriormente en los apartados 5.2.1 y 5.2.2

-Peso molecular

El peso molecular de los polímeros fue determinado mediante la técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC modelo G7810A, equipado con una columna PLGEL MIXED-C de 5 µm, Agilent Technologies®). Se preparó una solución de 1 mg/mL del polímero en tetrahidrofurano y se filtró a través de un acrodisco de 0.45 micras con membrana de PTFE.

-Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica del polímero purificado se investigó en el equipo TGA (TA Instruments Q500) en atmósfera de N₂ a una tasa de calentamiento de 10 °C/min, calentando desde 25 °C hasta 700 °C.

-Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El comportamiento térmico de los PSt y PVAc fueron determinados en el equipo DSC-2920 utilizando una rampa de calentamiento de 10 °C por minuto en un intervalo de temperatura desde 0 a 200 °C, bajo atmósfera de nitrógeno.

-Análisis dinámico mecánico (DMA)

Se prepararon películas con 50 mg de PSt en 1 mL de THF y de 100 mg de PVAc en 1 mL de THF, se utilizó el equipo DMA Q800 en modo de tensión, con un calentamiento de 5 °C por minuto a 1 Hz, desde 30 hasta 140 °C en modo tensión para PVAc y PSt.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Modificación del quitosano (CS) con el ácido fólico (FA) (CS-FA)

6.1.1 Análisis estructural mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de infrarrojo de CS, FA y CS-FA se muestran en la Figura 12. Inicialmente, en el espectro del CS (Figura 12a) se observaron las vibraciones de los estiramientos del grupo hidroxilo (OH) en 3359 cm^{-1} , seguido de la vibración del estiramiento del grupo carbonilo de la amida primaria (C=O) en 1648 cm^{-1} , en 1573 cm^{-1} se presentó la vibración de flexión atribuida a la amina secundaria del N-acetil CS, en 1050 cm^{-1} las vibraciones de los estiramientos NH_2 , y finalmente en 660 cm^{-1} el estiramiento del anillo piranósido. Por otra parte, en el espectro del FA (Figura 12b) se muestra la banda de la vibración del grupo carbonilo (C=O) de la amida en 1689 cm^{-1} , el estiramiento C=C del anillo aromático en 1602 cm^{-1} y en 838 cm^{-1} el estiramiento del benceno *para* sustituido de la molécula. Finalmente, en el espectro del CS-FA (Figura 12c) se pudo apreciar que la banda correspondiente al estiramiento del grupo hidroxilo que aparece en 3296 cm^{-1} sufrió un ensanchamiento, atribuido a una mayor interacción intermolecular entre el CS y FA asociados a la contribución de los grupos hidroxilo y amino de estos compuestos. Adicionalmente, las bandas de 1573 y 1648 cm^{-1} del CS presentaron un desplazamiento a 1603 y 1691 cm^{-1} asignadas al enlace C=C del anillo aromático del FA y carbonilo de la amida, respectivamente, lo cual confirmó la conjugación del CS con FA [8], [57].

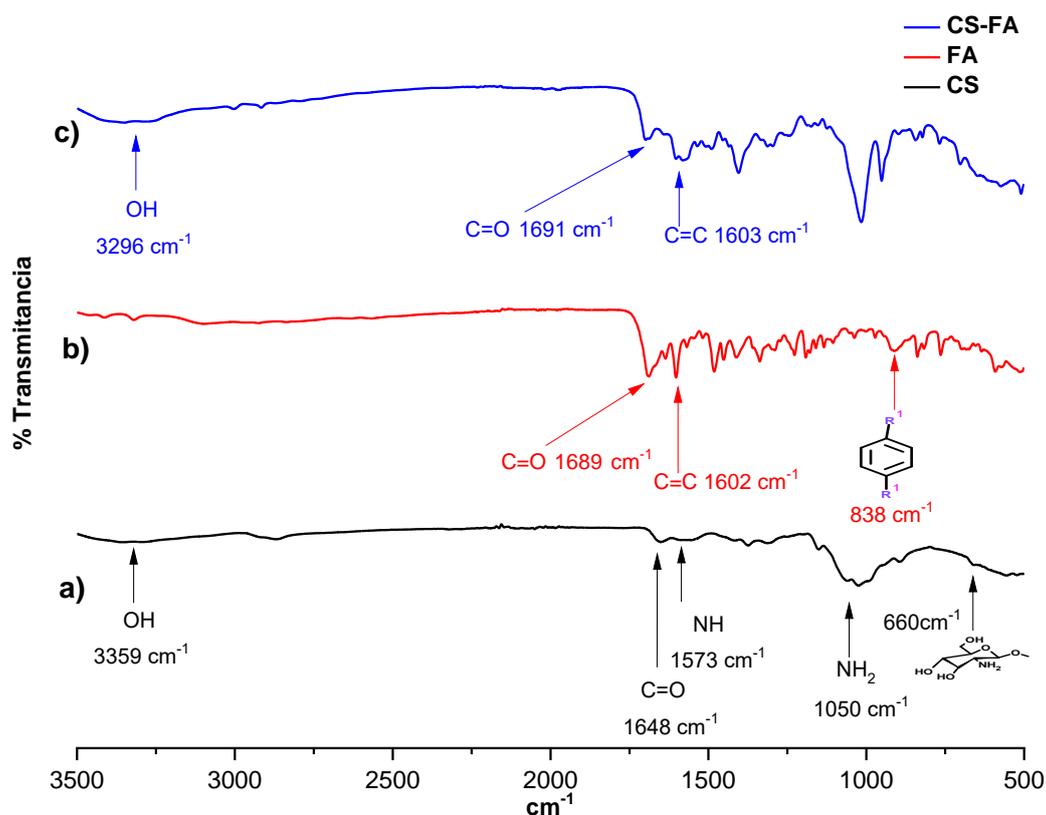


Figura 12. Espectros de FTIR de a) quitosano, b) ácido fólico y c) quitosano modificado con ácido fólico (modo ATR, 25 escaneos, resolución de 4 cm^{-1})

6.1.2 Determinación del grado de acetilación (GA) y de desacetilación (GD) del quitosano.

Mediante el espectro de FTIR del CS mostrado en la Figura 12, se determinó el GA del CS mediante la Ec.10 y el GD con la Ec.11 [148].

El GA experimental obtenido para el CS fue de 24.8 % y su GD de 75.2 %, lo cual se encontró dentro del intervalo indicado por el proveedor en su ficha técnica, en donde el GD debe encontrarse entre 75 a 85%.

El GA es un parámetro fundamental que proporciona información de las propiedades físicas y químicas del CS, que influye en sus posibles aplicaciones [153], [154]. Lo más destacable de la información obtenida, es que el CS posee un valor bajo de GA lo que lo hace apto para su uso en aplicaciones biomédicas, además de que este contribuye a la mejora de la solubilidad de API hidrófobos y a la liberación de fármacos [155].

6.1.3 Análisis mediante difracción de rayos X (XRD)

A continuación, se muestran los patrones de difracción de rayos X obtenidos para el CS (Figura 13a) y CS-FA (Figura 13b), mediante los cuales se evaluó la cristalinidad de estos compuestos.

En el difractograma correspondiente al CS, se presentó un pico principal en 2θ : 19.6° y un pico secundario en 2θ : 10.8° , mientras que en el difractograma de CS-FA, se observaron tres picos en valores de 2θ de 7.5 , 20.9 y 27.0° con menor intensidad y mayor anchura, lo que indicó que tiene una región amorfa superior y menor cristalinidad que el CS [156].

Se puede apreciar que el pico principal del CS (2θ : 10.8°) presentó un desplazamiento al modificarse con FA (2θ : 7.5°), lo cual demuestra que el CS modificado exitosamente al ser conjugado con el FA. Finalmente, los porcentajes de cristalinidad obtenidos para el CS y CS-FA fueron de 64.3 y 49.0 %, respectivamente. Esta cristalinidad está directamente relacionada con la disposición y acomodo de las cadenas de estos polímeros [157].

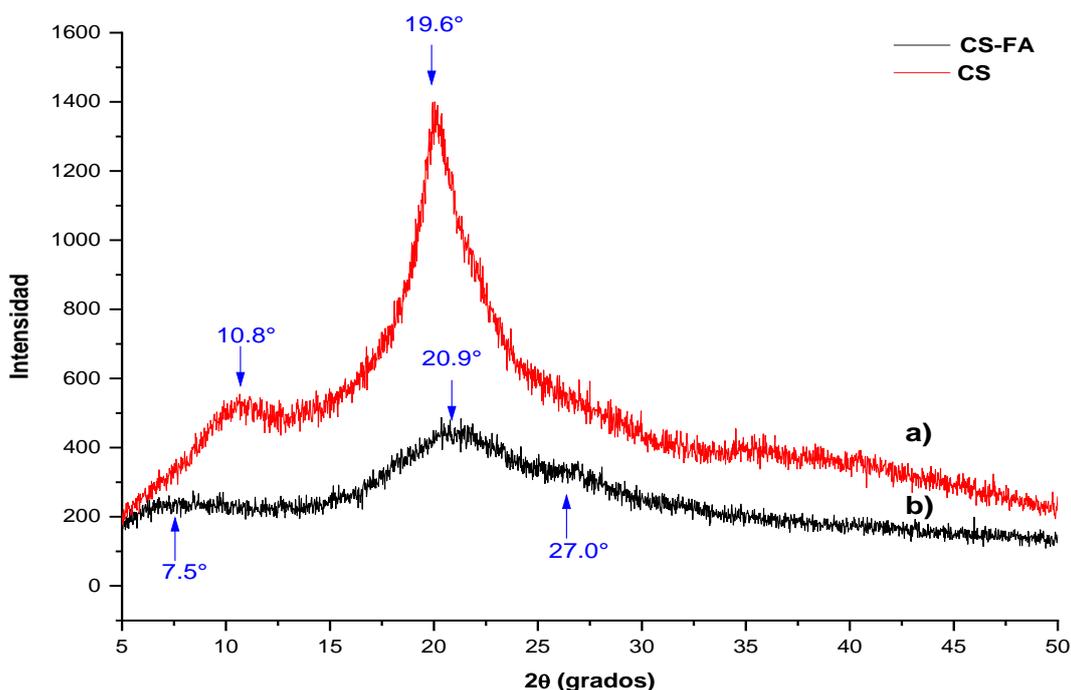


Figura 13. Difractogramas de rayos X de a) quitosano y b) quitosano modificado con ácido fólico

6.1.4 Determinación del grado de injerto (GI) del quitosano modificado con ácido fólico

Mediante el espectro de RMN de ^1H presentado en la Figura 14 se calculó el grado de injerto del FA en el CS, tomando como referencia la señal en 3.09 ppm correspondiente a la integración de 1H(a) del anillo glucosamina del CS, así como la señal en 7.68 ppm correspondiente a 2H (b, b') del anillo aromático de benceno adyacente al carbonilo de la amida del FA. El cálculo fue realizado siguiendo la Ec. 13.

El GI obtenido para el CS-FA fue de 9.0 %, resultado por debajo de lo reportado por San y col. en 2022, quienes obtuvieron un GI de 12.86 % obtenido por la técnica cuantitativa de espectrofotometría UV-VIS [8]. Los resultados obtenidos indicaron que el CS-FA conjugado en este trabajo presenta bajos GI, que favorecen al incremento de la solubilidad de los API anticancerígenos y a liberación selectiva de estos en las células con sobre expresión de los receptores folato [54].

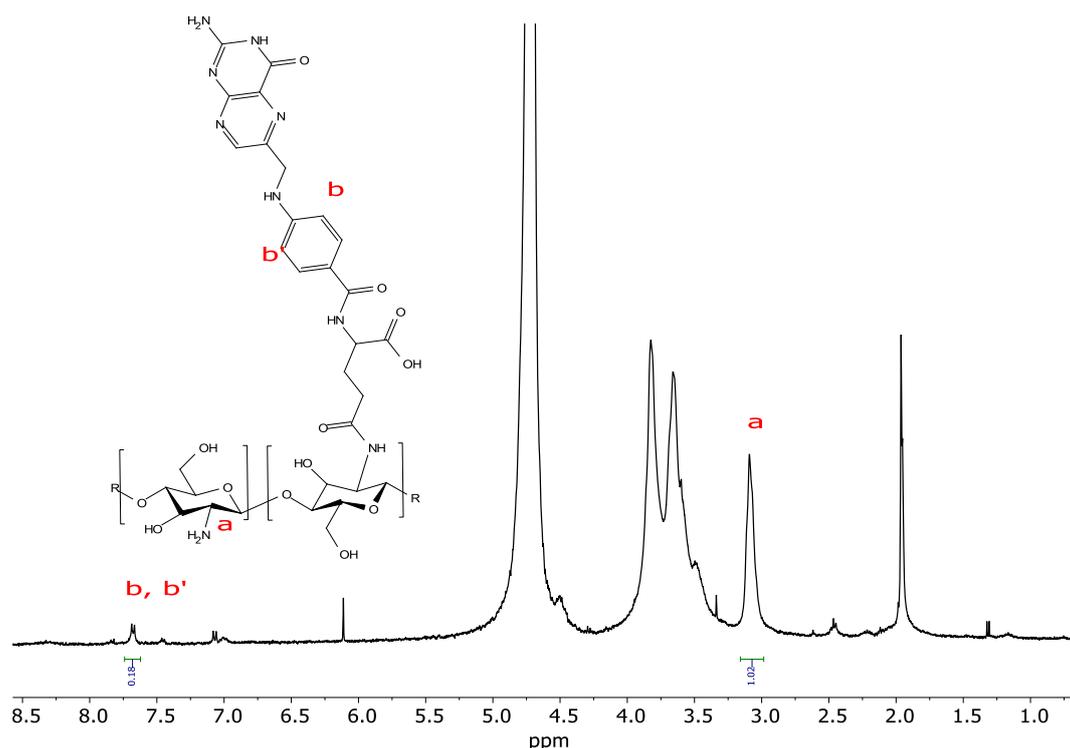


Figura 14. Espectro de RMN ^1H del CS-FA. Muestra: 15 mg de CS-FA en 1 mL de solución al 1% p/p de HCl/ D_2O , con un capilar de vidrio a 25 °C, 400 MHz

6.1.5 Comportamiento reológico y determinación del peso molecular promedio viscoso (M_v) del quitosano

Las aplicaciones o usos del CS no solo se encuentran relacionadas con el parámetro de GD, sino también con el peso molecular (M_w) del polímero. Reportes previos han indicado que el CS de bajo peso molecular posee mejores propiedades biomédicas, si se compara con uno de mayor M_w , por lo cual es importante conocer el valor de este parámetro. Sin embargo, la determinación del M_w del CS se encuentra limitada debido a que requiere de equipos costosos y/o accesorios exclusivos para su determinación. Por medio de viscosimetría convencional se puede obtener una estimación del M_v del CS; sin embargo, la mayoría de estos reportes se han enfocado en CS de medio y alto peso molecular [158], [159] y no, en CS de bajo peso molecular. En este trabajo se estimó el M_v de un CS de bajo M_w (50-190 kDa). Inicialmente, se determinó la viscosidad de la solución del polímero η_i y la viscosidad del disolvente η_0 y a partir de la relación entre estas viscosidades, se obtuvo la viscosidad relativa η_r del polímero CS. Posteriormente, se calculó la viscosidad específica η_{sp} restándole 1 a la η_r ; la viscosidad reducida η_{red} , es la relación entre la viscosidad específica y la concentración de la solución del polímero mientras que la viscosidad inherente η_{inh} es el logaritmo natural de la viscosidad reducida entre la concentración de la solución del polímero. A continuación, en la Tabla 8 se presentan las viscosidades obtenidas y calculadas.

Tabla 8. Valores de viscosidad de soluciones a diferentes concentraciones de CS a 25 °C en ácido acético 0.2 M y acetato de amonio 0.15 M

[CS] (g/ dm ³)	η_i Promedio (Pa.s)	Desviación estándar	$\eta_r = \frac{\eta_i}{\eta_0}$	$\eta_{sp} = \eta_r - 1$	$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$ (dm ³ /g)	$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_r}{c}$ (dm ³ /g)
2	0.003	0.000	2.616	1.616	0.808	0.481
3	0.005	0.000	4.393	3.393	1.131	0.493
3.5	0.006	0.000	5.080	4.080	1.166	0.464
4.25	0.007	0.002	6.247	5.247	1.235	0.431
5	0.009	0.000	8.170	7.170	1.434	0.420

Soluciones de CS (η_i), viscosidad disolvente (η_0) (de la solución de ácido acético 0.2 M – acetato de amonio 0.15 M a pH 4.5 a 25 °C = 0.00112±0.00001 Pa.s), viscosidad relativa (η_r), específica (η_{sp}), reducida (η_{red}) e inherente (η_{inh}).

Después del cálculo de estos parámetros, las η_{inh} y η_{red} se graficaron en función de la concentración del CS y posteriormente se realizó un ajuste por regresión lineal de cada conjunto de datos, para determinar el punto de corte de ambas rectas a concentración cero (Figura 15). Esta intersección corresponde a la viscosidad intrínseca η la cual fue de 0.511 g/dm³.

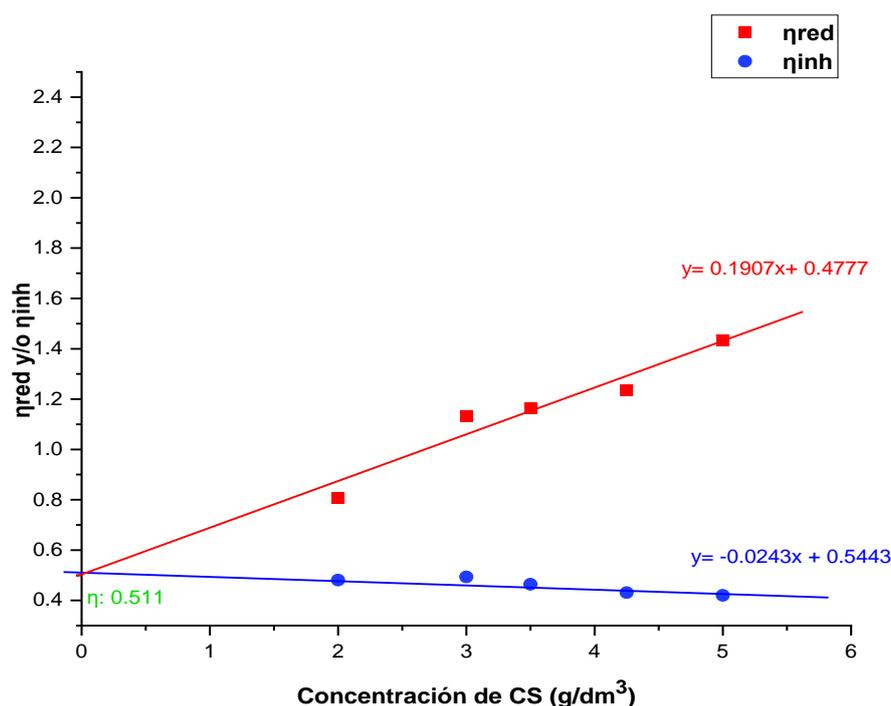


Figura 15. Regresión lineal realizada con los valores de η_{red} y η_{inh}

Para el cálculo del M_v del CS con la ecuación de Mark Houwink–Sakurada, se requirió contar con los valores de las constantes K y α , las cuales son dependientes del tipo de polímero, temperatura y tipo de disolvente. Sin embargo, no se encontraron reportes de estas constantes para el CS del peso molecular empleado, por lo cual se utilizó un promedio de las constantes reportadas [149] como se muestra a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9. Constantes K y α obtenidas por Czechowska-Biskup 2018

M_v CS (kDa)	K	α
2-90	9.50×10^{-5}	0.75
20-100	3.64×10^{-5}	0.78
200-500	4.28×10^{-5}	0.773
50- 190 (Promedio)	5.81×10^{-5}	0.7677

Finalmente, con los valores de K , α y η , se calculó el $\ln M_v$ y el M_v del CS mediante las Ec. 14-16 correspondientes a las fórmulas de Mark Houwink Sakurada. El resultado que se obtuvo fue de un M_v estimado de 137.5 kDa el cual se encontró dentro del intervalo reportado por el proveedor (de 50-190 kDa).

6.2 Síntesis y caracterización de tensoactivos bicéfalos dianiónicos (BS) derivados de ácidos grasos saturados e insaturados

Mediante la modificación de la síntesis de BS propuesta en este trabajo, se obtuvo una ruta de síntesis más amigable con el ambiente, esto debido a la eliminación de cloruro de tionilo en el proceso (compuesto altamente tóxico), así como la reducción de etapas de reacción y disolventes adicionales, comparado con la ruta de síntesis de referencia propuesta por Kalhapure y col. [84].

Con la finalidad de asegurar la obtención de cada producto intermediario de la síntesis (cabezas, espaciador y heterolípidos) así como de los BS, se realizaron monitoreos mediante caracterizaciones químicas de FTIR, RMN ^1H y RMN ^{13}C . Los resultados para el BS 6AO (con reportes previos), fueron comparados con las caracterizaciones del método original reportado en la literatura, y enseguida se presentan a detalle los resultados de estas caracterizaciones.

6.2.1 Análisis estructural mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 16 se presentan los espectros de FTIR correspondientes a los compuestos obtenidos durante la primera y segunda etapa de la síntesis. En la Figura 16a, se presenta el FTIR del producto (**3**) (N,N'-di-(terc-butiloxicarboniletil)aminopropanol) y se observa una banda en 3450 cm^{-1} debida al estiramiento de los grupos hidroxilo (OH) y una señal en 1728 cm^{-1} debida al estiramiento del grupo carbonilo (C=O) de los grupos éster, respectivamente. Además, se apreciaron los estiramientos C-H de los dos grupos terbutoxi en 1250 cm^{-1} , así como una banda en 1158 cm^{-1} debidas a la absorción de las vibraciones de estiramiento C-N de la amina terciaria. Posteriormente, en las Figuras 16b, 16c y 16d se presentan los espectros de FTIR de los heterolípidos (**5**) a partir de ácido oleico (5AO), linoleico (5AL) y mirístico (5AM). En estos se pudieron apreciar entre 2923 a 2930 cm^{-1} estiramientos correspondientes a los grupos metileno (CH_2), y entre 2953 a 2956 cm^{-1} los estiramientos de los grupos metilo (CH_3). Adicionalmente, se observó una señal alrededor de 1730 cm^{-1} atribuida al estiramiento C=O del grupo éster y en 1250 cm^{-1} los estiramientos C-O del grupo terbutoxi. Finalmente, entre 1153 a 1158 cm^{-1} se presentó la absorción de las vibraciones de estiramiento C-N de la amina terciaria.

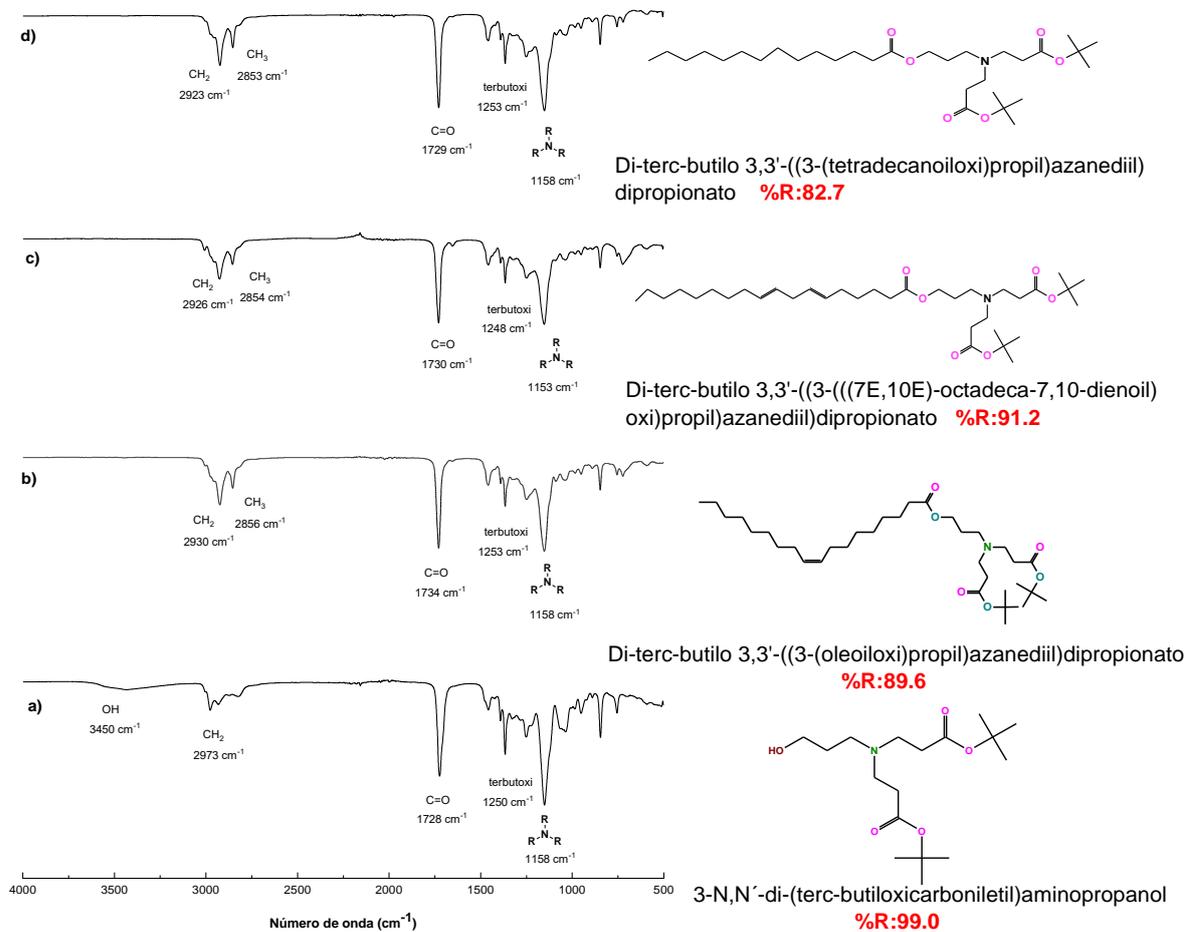


Figura 16. Espectros de FTIR de la síntesis de a) producto 3 b) 5AO, c) 5AL y d) 5 AM (sección 5.2 etapa II)(modo ATR ,25 “escaneos”, resolución de 4 cm⁻¹) con sus respectivos rendimientos de reacción (%R)

Por otro lado, en las Figuras 17a, 17b y 17c se pueden apreciar que desapareció la banda delgada alrededor de 1250 cm⁻¹ correspondiente a los grupos terbutoxi de los heterolípidos; además, se observó la aparición de una nueva banda entre 1558-1597 cm⁻¹ atribuida a la formación del carboxilato de sodio. Estos resultados son indicativos de la hidrólisis exitosa de los grupos éster de los heterolípidos, lo que confirmó la formación del BS (sal de sodio).

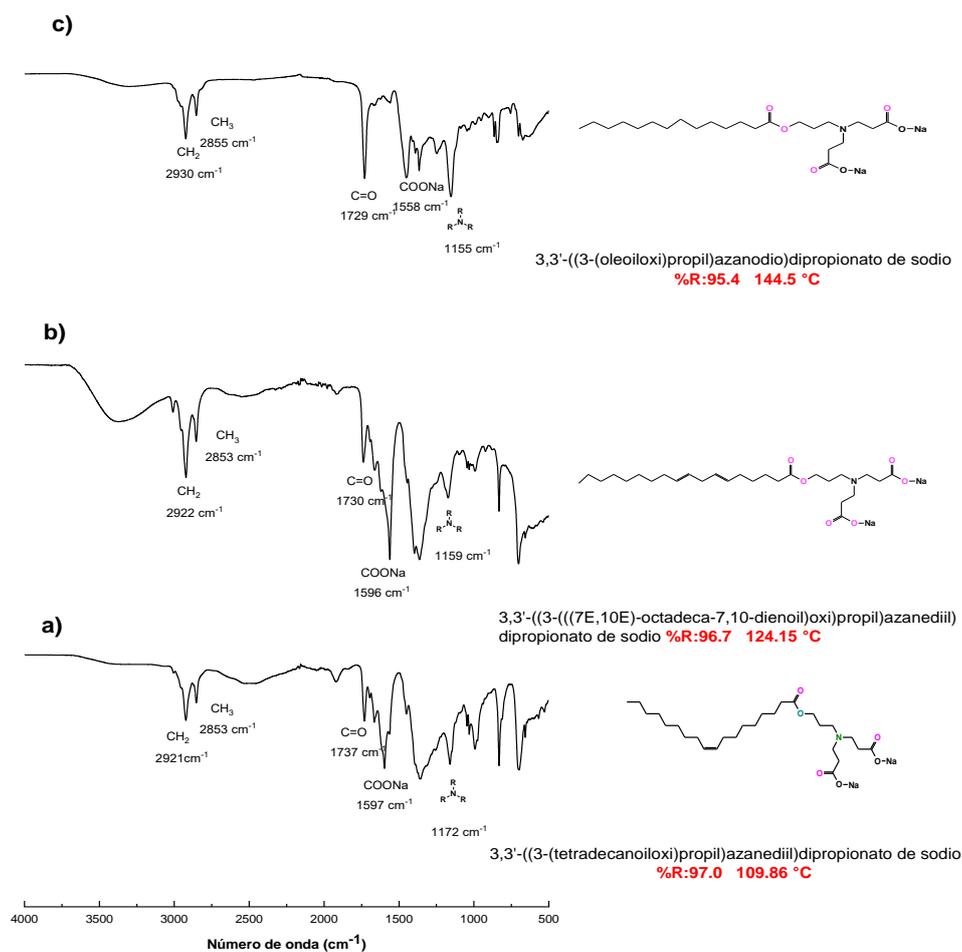


Figura 17. Espectros de FTIR de la síntesis de tensoactivos dianiónicos a) 6AO, b) 6AL y c) 6AM (modo ATR, 25 escaneos, resolución de 4 cm⁻¹) con sus %R y estabilidad térmica

6.2.2 Análisis estructural mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) y carbono (RMN ¹³C)

En la Figura 18a se muestra el espectro de RMN ¹H correspondiente al producto (3) (*N,N'*-di-(terc-butiloxicarboniletil)aminopropanol). En este se pudo visualizar una banda en 1.45 ppm, que integró para los 18 H de los grupos metilo del grupo terbutoxi. Por otra parte, las Figuras 18b, 18c y 18d corresponden a los espectros de los heterolípidos 5AO, 5AL y 5AM y en estos también se observó esta banda característica de los metilos del terbutoxi (~1.45 ppm), así como una señal en 4.1 ppm debida a los protones adyacentes al oxígeno del grupo éster correspondiente a la unión entre el producto 3 (cabezas) y el ácido graso (cola) por la reacción de esterificación. En las Figuras 18b y 18c las bandas en 5.36 ppm son atribuidas a los dobles enlaces de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos insaturados. A

continuación, se presentan las asignaciones completas de estos espectros que comprueban la obtención de estos productos.

RMN ^1H (CDCl_3) δ :

- a) 1.45 (s, 18 H), 1.67 (q, 2H), 2.38 (t, 4H), 2.59 (t, 2H), 2.73 (t, 4H), 3.71 ppm (t, 2H).
- b) 0.90 (t, 3 H), 1.30 (m, 20 H), 1.45 (m, 18 H), 1.62 (q, 2 H), 1.75 (m, 2 H), 2.02 (m, 4 H), 2.33 (m, 6 H), 2.49 (t, 2 H), 2.73 (m, 4 H), 4.10 (t, 2 H) y 5.36 ppm (m, 4 H).
- c) 0.90 (t, 3 H), 1.33 (m, 14 H), 1.45 (m, 18 H), 1.63 (q, 2 H), 1.75 (m, 2 H), 2.06 (m, 4 H), 2.30 (m, 2 H), 2.32 (m, 4 H), 2.49 (t, 2 H), 2.75 (t, 4 H), 3.68 (t, 2 H), 4.10 (t, 2 H) y 5.36 ppm (m, 4 H).
- d) 0.89 (t, 3 H), 1.28 (m, 20 H), 1.42 (m, 18 H), 1.61 (q, 2 H), 1.76 (m, 2 H), 2.32 (m, 6 H), 2.48 (m, 2 H), 2.72 (t, 4 H) y 4.09 ppm (t, 2 H).

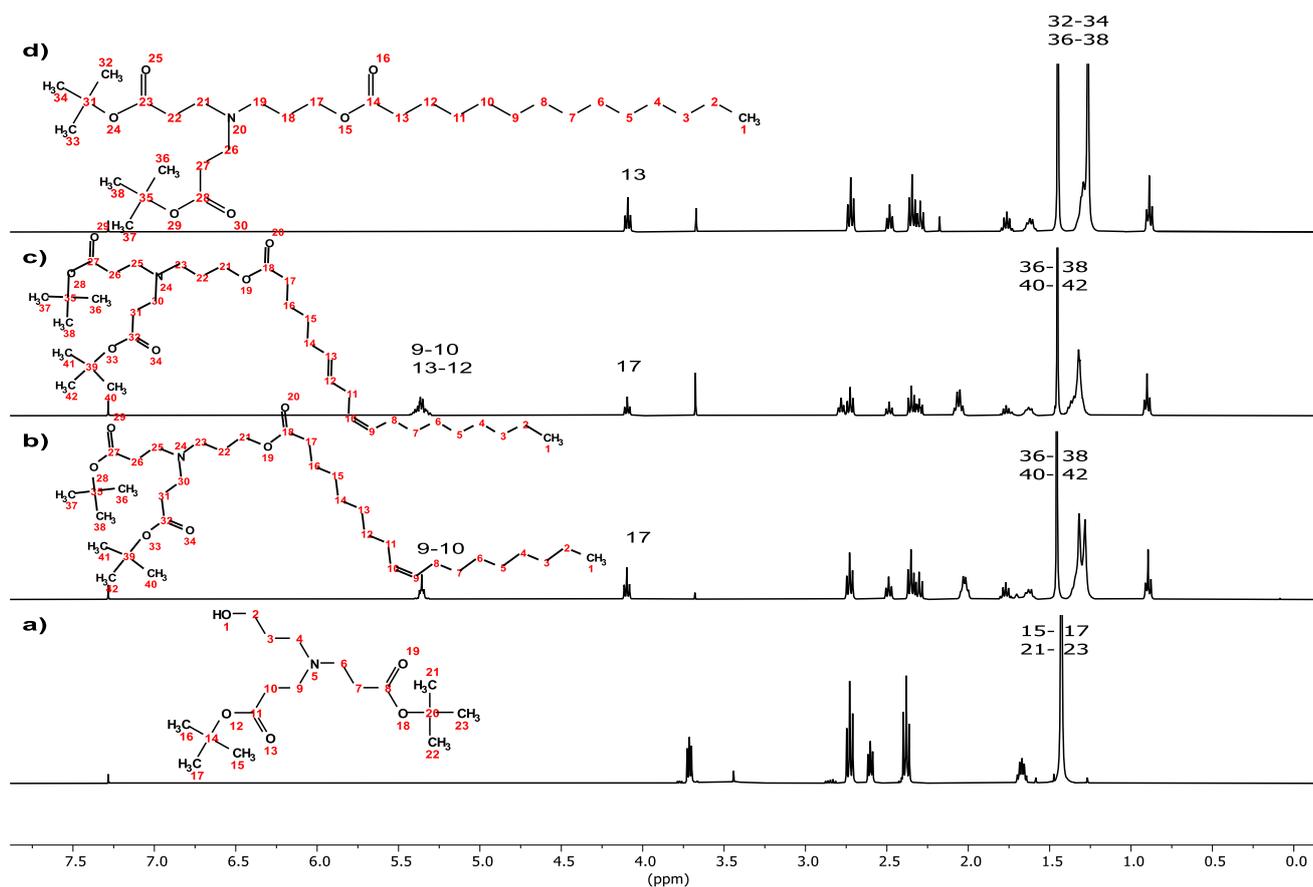


Figura 18. Espectros de RMN ^1H de a) producto 3 (*N, N'*-di-(terc-butiloxicarboniletil)aminopropanol), b) 5AO, c) 5AL y d) 5AM. Muestra de 30 mg en 1 mL de CDCl_3 a 25 $^\circ\text{C}$, 400 MHz

En las Figuras 19a, 19b y 19c se presentan los espectros de RMN ^1H correspondientes a los BS. En estos espectros se exhibe la eliminación del singulete en 1.45 ppm, atribuido a los protones del grupo terbutoxi presentes en los esteres de los heterolípidos (**5**). Esto sugiere que los grupos éster sufrieron un proceso de hidrolisis ácido-básico que produjo la formación de la sal carboxilato de sodio y un grupo alcohol libre obteniendo de esta forma los BS deseados. Adicionalmente, se presentan las asignaciones completas de estos espectros, que permitieron la comprobación de la obtención de estos BS.

RMN ^1H (D_2O) δ :

- a) 0.83 (t, 3 H), 1.24 (m, 20 H), 1.34 (m, 6 H), 1.54 (s, 2 H), 1.88 (m, 4 H), 2.21 (t, 2 H), 2.46 (m, 4 H), 2.74 (t, 2 H), 4.00 (t, 2 H), and 5.26 ppm (m, 4 H).
- b) 0.82 (t, 3 H), 1.31 (m, 16 H), 1.53 (m, 2 H), 1.88 (m, 6 H), 1.98 (m, 2 H), 2.28 (m, 4 H), 2.74 (m, 6 H), 3.70 (m, 2 H), and 5.26 ppm (m, 4 H).
- c) 0.83 (t, 3 H), 1.23 (m, 20 H), 1.35 (m, 4 H), 1.89 (m, 2 H), 1.89 (m, 2 H), 2.35 (t, 6 H), 2.75 (t, 4 H), and 4.20 ppm (t, 2 H).

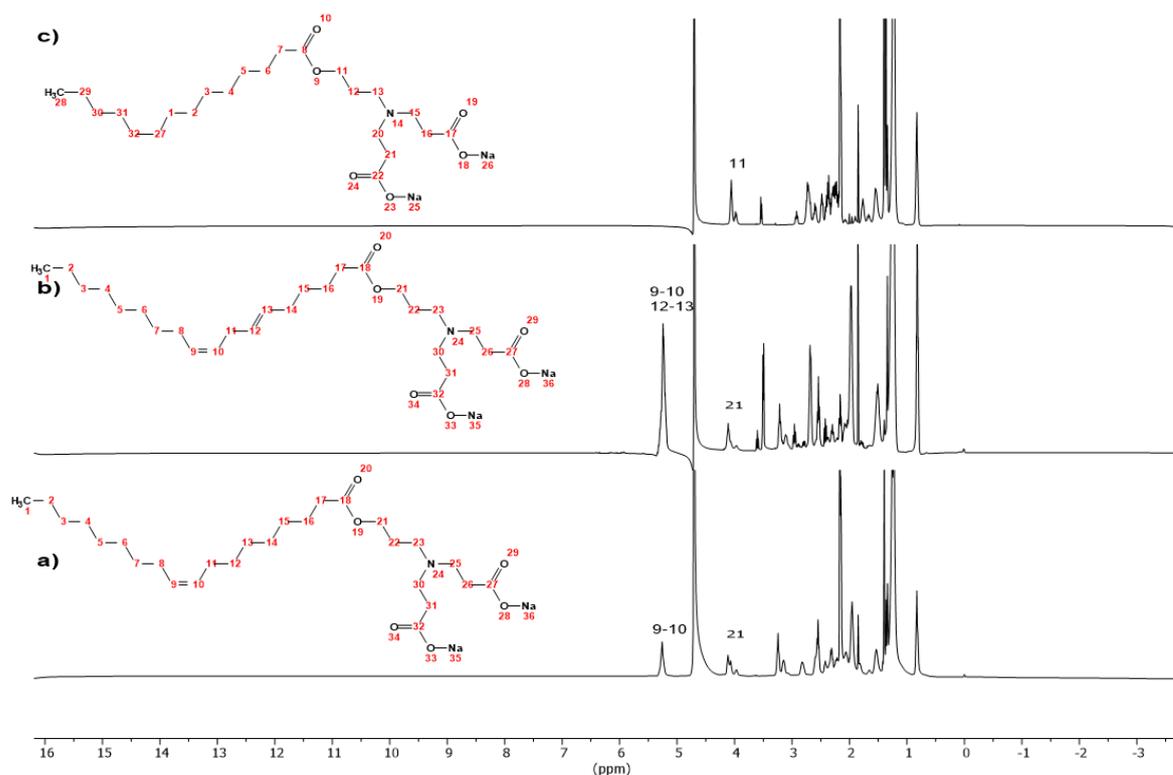


Figura 19. Espectros de RMN ^1H de a) 6AO, b) 6AL y c) 6AM. Muestra de 30 mg en 1 mL de D_2O a 25 °C, 400 MHz

En las caracterizaciones mediante RMN ^{13}C del producto (**3**) (*N,N'*-di-(terc-butiloxicarboniletil)aminopropanol) (Figura 20a) y el heterolípido 6AM (Figura 20d), se presentaron en 28.1 ppm un pico correspondiente a los dos carbonos adyacentes a los grupos terbutoxi, posteriormente en 80.2 ppm se localizaron los carbonos asignados a los metilos de los grupos terbutoxi y alrededor de 172.0 ppm las señales asignadas a los carbonos adyacentes al grupo carbonilo del éster. Respecto a los heterolípidos 6AO (Figura 20b) y 6AL (Figura 20c) estos también presentaron los picos anteriores en ~28.1, 80.2 y 172 ppm, adicionando un pico ~ de 129 ppm característicos de los carbonos del grupo insaturado del ácido oleico o linoleico, respectivamente. Enseguida, se presentan las asignaciones completas de estos espectros.

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ :

- a) 28.0, 30.8, 33.2, 49.3, 52.7, 62.9, 80.5 y 171.7 ppm.
- b) 14.06, 22.62, 24.95, 26.66, 27.16, 28.10, 29.16, 29.31, 29.52, 29.73, 29.76, 33.82, 34.31, 50.11, 62.40, 80.25, 129.66, 129.94 y 171.97 ppm.
- c) 14.05, 1.33, 24.96, 25.62, 27.19, 28.09, 29.08, 29.13, 29.16, 29.58, 29.59, 31.52, 33.82, 34.09, 34.33, 49.42, 50.15, 51.41, 62.44, 80.28, 127.91, 128.03, 130.03, 130.20 y 171.95 ppm.
- d) 14.03, 22.62, 24.92, 26.67, 28.07, 29.38, 31.85, 33.74, 34.34, 49.37, 50.08, 62.35, 80.19, 171.93 y 173.80 ppm.

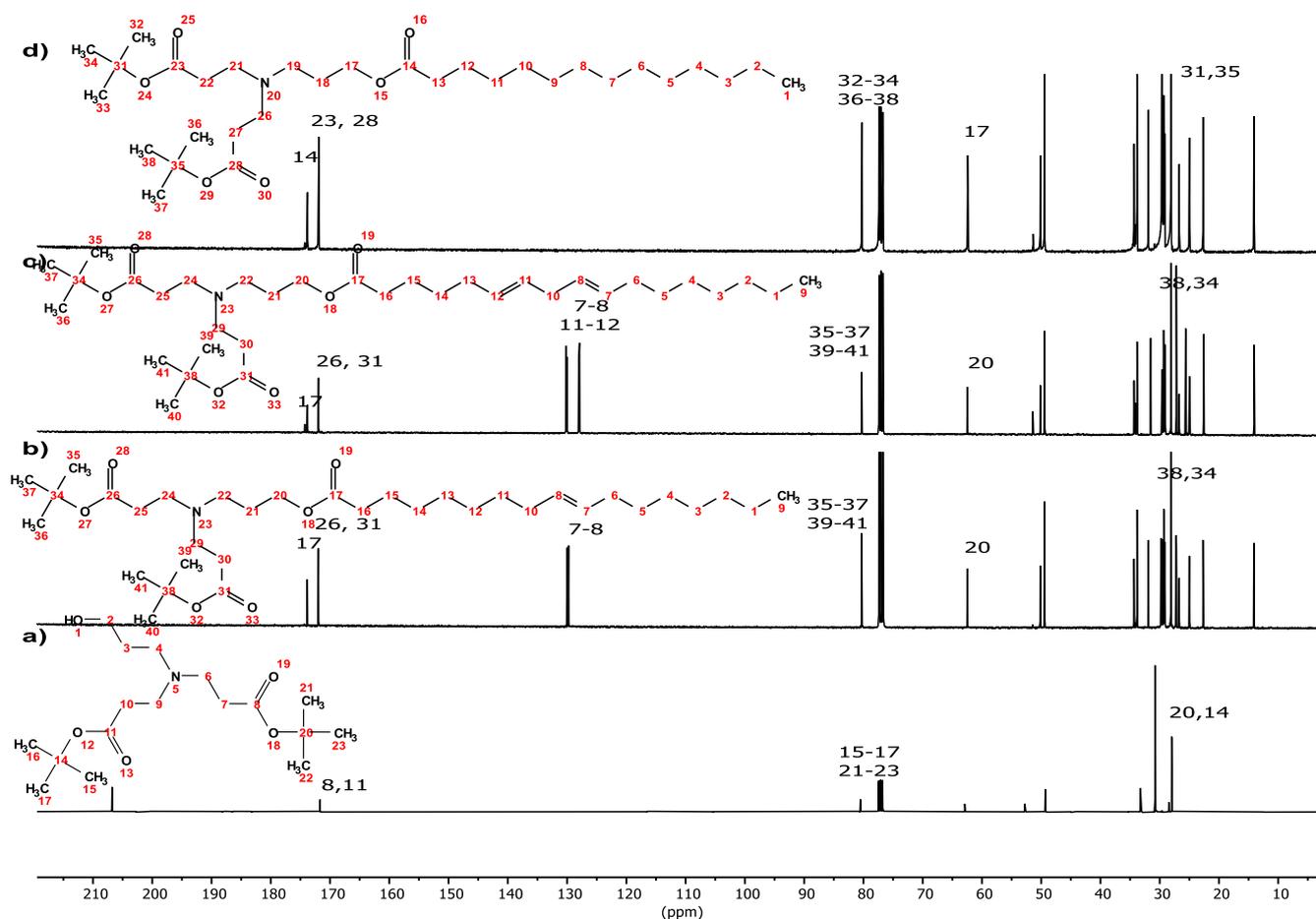


Figura 20. Espectros de RMN ^{13}C de a) producto 3, b) 5AO, c) 5AL y d) 5AM. Muestra de 30 mg en 1 mL de CDCl_3 a 25°C , 400 MHz

En las Figuras 21a, 21b y 21c se muestran los espectros de RMN ^{13}C de los BS sintetizados. En estos espectros se observó que desapareció la banda en 80.5 ppm, asignada a los carbonos de los grupos metilo del grupo terbutoxi. A continuación, se presentan las asignaciones completas de estos espectros:

RMN ^{13}C (D_2O) δ :

- a) 13.79, 22.59, 24.67, 27.00, 27.70, 29.16, 29.35, 29.61, 29.72, 29.78, 31.87, 32.28, 33.87, 48.90, 49.78, 62.55, 129.40, 129.60 y 166.60 ppm.
- b) 13.96, 22.51, 23.37, 24.79, 25.56, 27.06, 27.23, 27.37, 27.75, 29.31, 29.61, 29.78, 31.45, 32.35, 49.51, 49.71, 127.60, 129.93 y 164.61 ppm.
- c) 13.85, 22.63, 24.90, 27.75, 29.73, 31.97, 34.56, 48.51, 49.43, 63.18, 165.22 y 180.69 ppm.

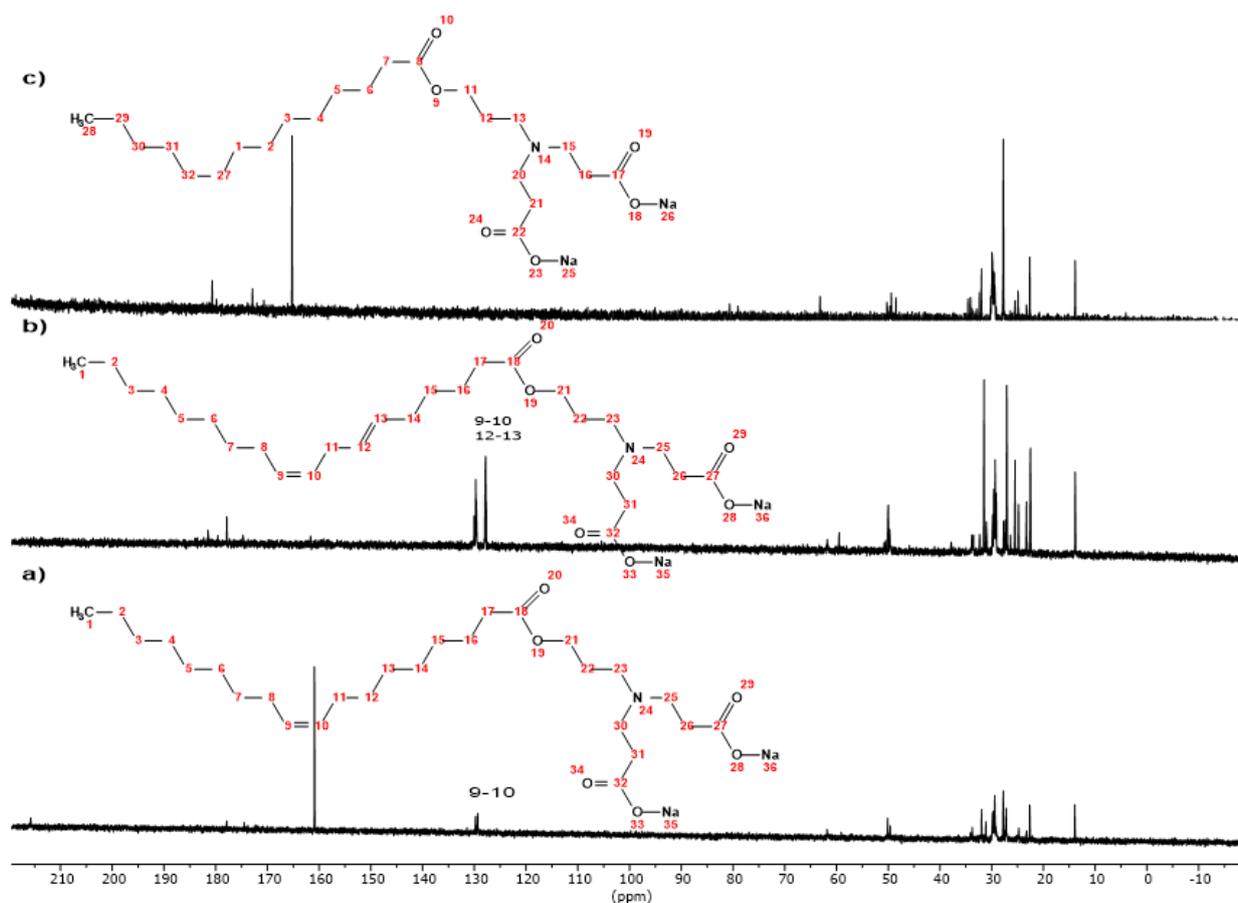


Figura 21. Espectros de RMN ^{13}C de a) 6AO, b) 6AL y c) 6AM. Muestra de 30 mg en 1 mL de D_2O a 25 °C, 400 MHz

A partir de los resultados obtenidos mediante FTIR y RMN se comprobó la obtención de los BS sintetizados.

6.2.3 Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) mediante la técnica de conductividad y tensión superficial

Los valores de CMC de los BS se determinaron a 25 °C mediante la medición de los valores de conductividad eléctrica de las soluciones de BS a diferentes concentraciones. Los valores obtenidos se graficaron en función del logaritmo negativo de la concentración de BS y los resultados se presentan en la Figura 22.

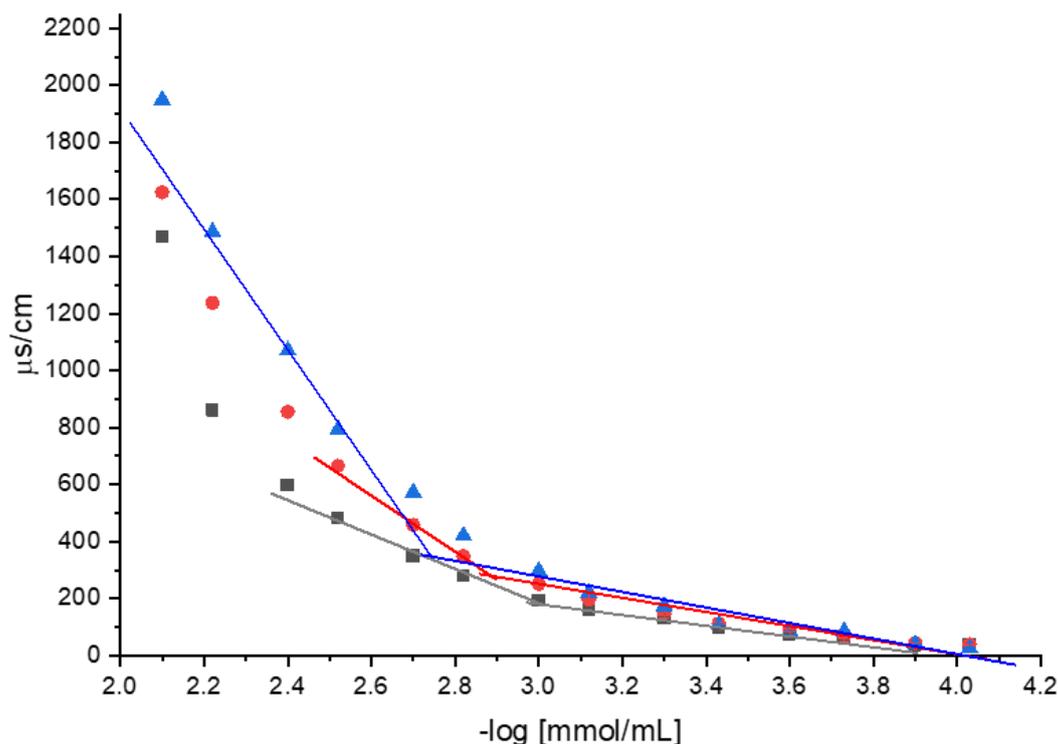


Figura 22. Determinación de los valores de CMC a 25 °C en agua, mediante conductividad eléctrica de los BS ■6AO ●6AL ▲6AM.

Se observó que los resultados obtenidos de CMC mediante la medición por conductividad eléctrica para los BS fueron (promedio de tres lecturas, \pm desviación estándar) de 1.18 ± 0.07 , 1.36 ± 0.09 y 1.83 ± 0.08 mmol/L para 6AO, 6AL y 6AM, respectivamente (Figura 22). Adicionalmente, mediante la medición de la tensión superficial se obtuvieron valores de 1.10 ± 0.15 , 1.48 ± 0.74 y 1.85 ± 0.13 mmol/L para los BS 6AO, 6AL y 6AM, respectivamente (Figura MS 1 del material suplementario I). Estos valores se consideran bajos en comparación con los reportados para tensoactivos convencionales como el dodecilsulfato de sodio (8.5 mmol/L) [160] y oleato de sodio (3.5 mmol/L) [7]. Esto podría atribuirse a la disposición estructural de los BS si se compara con el oleato de sodio, debido a que en los BS se introducen dos cabezas polares (grupos carboxilato) y siete grupos metileno adicionales. La repulsión entre cabeza-cabeza disminuyó y favoreció la formación de micelas causando un aumento en la polaridad, hidrofiliidad y actividad superficial, así como una mejora en la interacción BS-agua. Por lo tanto, se esperaba que se necesitara una menor cantidad de BS para incrementar la actividad superficial del tensoactivo y así lograr la formación de micelas [7].

6.2.4 Determinación del número de agregación (N_{agg}) y parámetro crítico de empaquetamiento

Las micelas son estructuras coloidales formadas a partir de la CMC del tensoactivo, las cuales están constituidas por la asociación de varias moléculas de tensoactivo, que recibe el nombre de N_{agg} . A continuación, en la Figura 23 se presentan las estructuras de los BS optimizadas mediante cálculos teóricos [151], [152] y en la Tabla 10, se muestran los parámetros relevantes determinados para el cálculo del N_{agg}

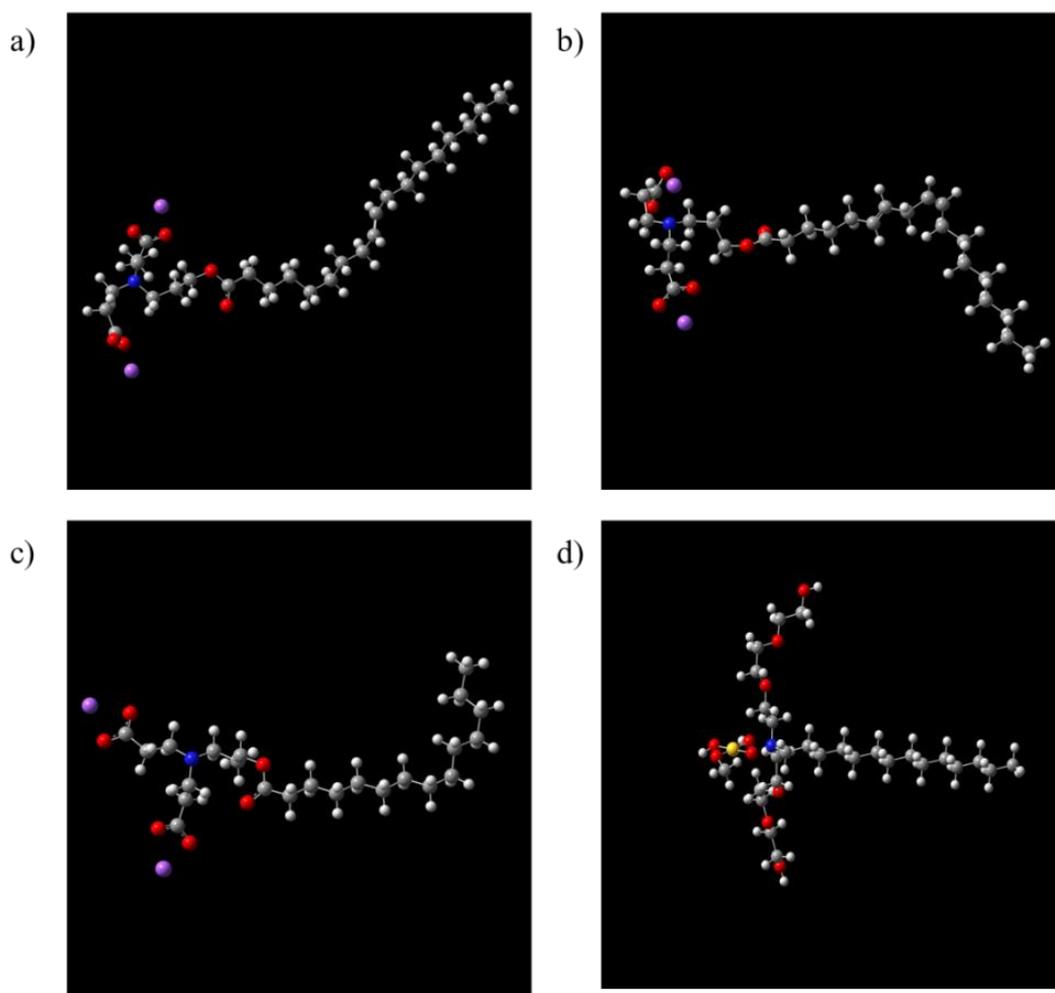


Figura 23. Estructuras optimizadas mediante DFT de los BS a) 6AO, b) 6AL, c) 6AM y d) C1EG®, el gris representa el carbono, el azul representa el nitrógeno, el rojo representa el oxígeno, el blanco representa el hidrógeno, el morado representa el sodio y el amarillo el azufre

Tabla 10. Parámetros requeridos para el cálculo teórico del N_{agg}

BS	$V_{mol\ iso} (\text{Å}^3)$	$R (\text{Å})$	$V_{mic} (\text{nm}^3)$	N_{agg}
6AO	698.53	24.39	60.76	87
6AL	690.40	22.03	44.76	65
6AM	614.45	15.73	16.38	27
C1EG®	802.02	17.99	24.40	30

$V_{mol\ iso}$: volumen molecular de isosuperficie, R: Radio micelar, V_{mic} : volumen micelar, N_{agg} : Número de agregación

En la Tabla 10 se observó que el incremento del $V_{mol\ iso}$ no es dependiente de la longitud y/o las insaturaciones del BS, sin embargo, estos si impactan en los valores de R y V_{mic} , en donde se visualizó que a mayor longitud e insaturaciones se incrementan estos valores.

Posteriormente en la determinación del N_{agg} se observó que los valores de este parámetro siguieron la tendencia de $6AM < 6AL < 6AO$. Estos BS tienen como factor común el mismo par de cabezas polares y como variables, la longitud de la cadena alifática y las insaturaciones de esta; entrando más a detalle, se observó que 6AM cuya cadena hidrófoba contiene 14 átomos de carbono presentó un N_{agg} de 27, siendo un valor inferior a los N_{agg} obtenidos para los BS con 18 carbonos en su cadena alifática 6AO (N_{agg} : 87) y 6AL (N_{agg} : 65). Con esto se demostró que existe una correlación entre el aumento de la longitud de la cadena hidrófoba y el incremento del N_{agg} , lo cual coincide con los reportes de la literatura de Lewinska y col., quienes determinaron los N_{agg} de BS de di-N-óxidos di cefálicos (DIPANOS) con cadenas alifáticas saturadas de diferente longitud y cabezas polares iguales [151], [161].

Por otra parte, los N_{agg} obtenidos para los BS con igual longitud de cadena alifática (18 carbonos) 6AO y 6AL fueron de 87 y 65 respectivamente, casi triplicando el valor del N_{agg} obtenido para el BS 6AM. Estos resultados ilustran el impacto de las insaturaciones de las cadenas alifáticas, en donde se correlacionó la adición de insaturaciones con el incremento del N_{agg} [162].

Comparando el N_{agg} obtenido para 6AM con el IL C1EG®, ambos con 14 carbonos en su cola, se obtuvieron valores de N_{agg} de 27 y 30 respectivamente. La diferencia entre estos valores podría ser atribuida al tamaño y al comportamiento a los grupos funcionales presentes en la cabeza, que podría ocasionar impedimento estérico entre las moléculas de tensoactivo necesarias para formar la micela[73].

Respecto al P_e , este nos permite determinar la forma de agregación micelar mediante una correlación entre el volumen y longitud de la cadena hidrocarbonada, así como con el área de la cabeza polar. La estimación del P_e fue obtenida mediante cálculos teóricos y a continuación en la Figura 24 se presentan las estructuras moleculares de los BS utilizadas para estimar el área del grupo de cabeza y el área de superficie accesible al solvente, lo cual se reporta en la Tabla 11.

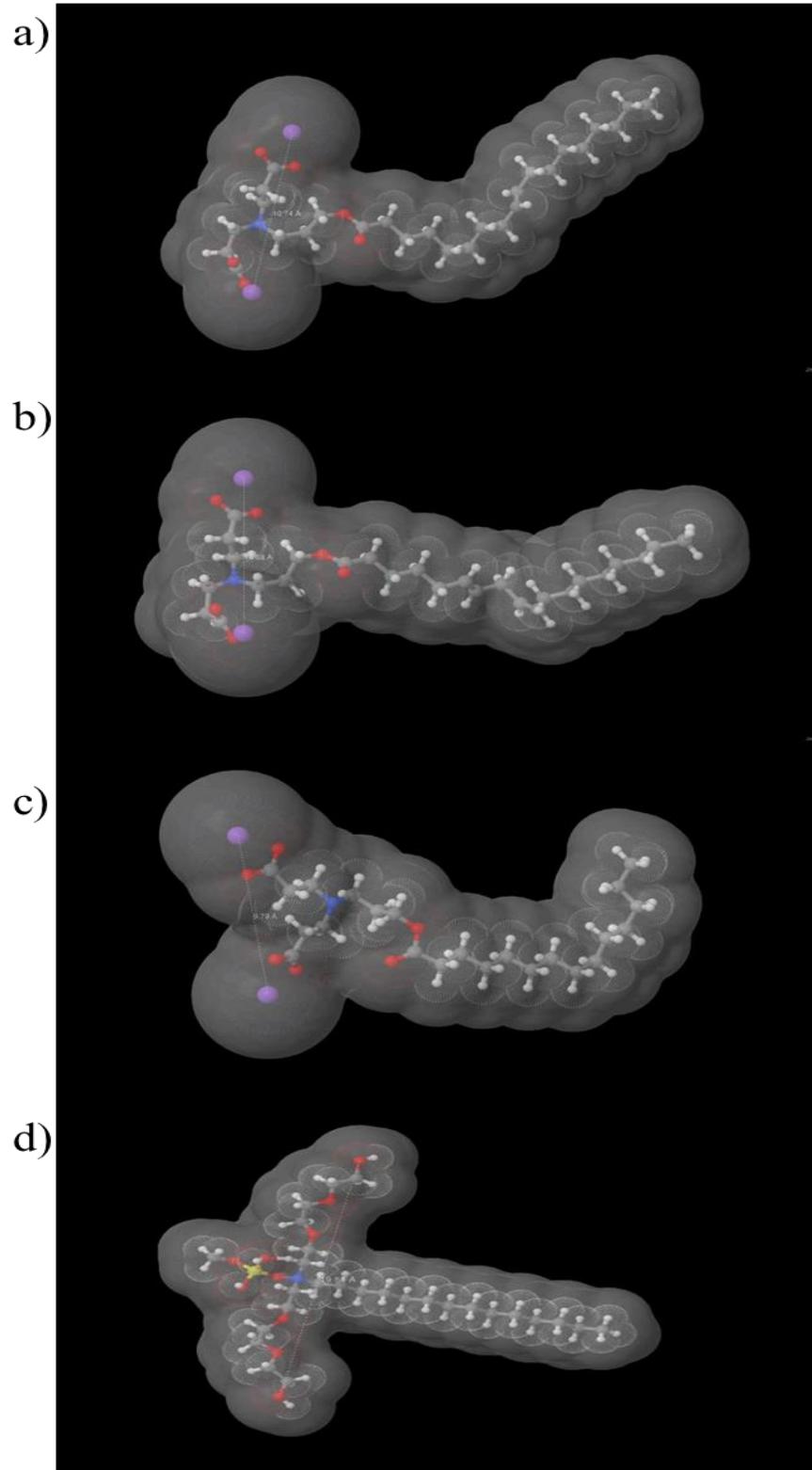


Figura 24. Estructuras moleculares mediante el visor de moléculas Jmol de los BS a) 6AO, b) 6AL, c) 6AM y d) C1EG®

En la Tabla 11 se muestran los parámetros requeridos para el cálculo del P_e y en la Figura 25 los tipos de empaquetamiento micelar.

Tabla 11. Parámetros requeridos y valores para el cálculo teórico del P_e (Ec. 21)

BS	V_0 (Å ³)	l_0 (Å)	R_a (Å)	a_0 (Å ²)	D (Å)	P_e	Forma de agregación
6AO	517.04	24.39	8.67	236.15	10.74	0.09	Esférica
6AL	509.00	22.03	8.67	236.15	10.68	0.10	Esférica
6AM	430.56	15.73	8.20	210.98	9.79	0.13	Esférica
C1EG®	351.52	17.99	12.39	481.88	19.84	0.04	Esférica

V_0 : volumen de la cadena hidrófoba; l_0 : longitud de la cadena hidrófoba; R_a : Radio efectivo de la cabeza; a_0 : área de la superficie de la cabeza polar; D : distancia entre las dos cabezas polares y P_e : parámetro crítico de empaquetamiento (ver Ec. 21)

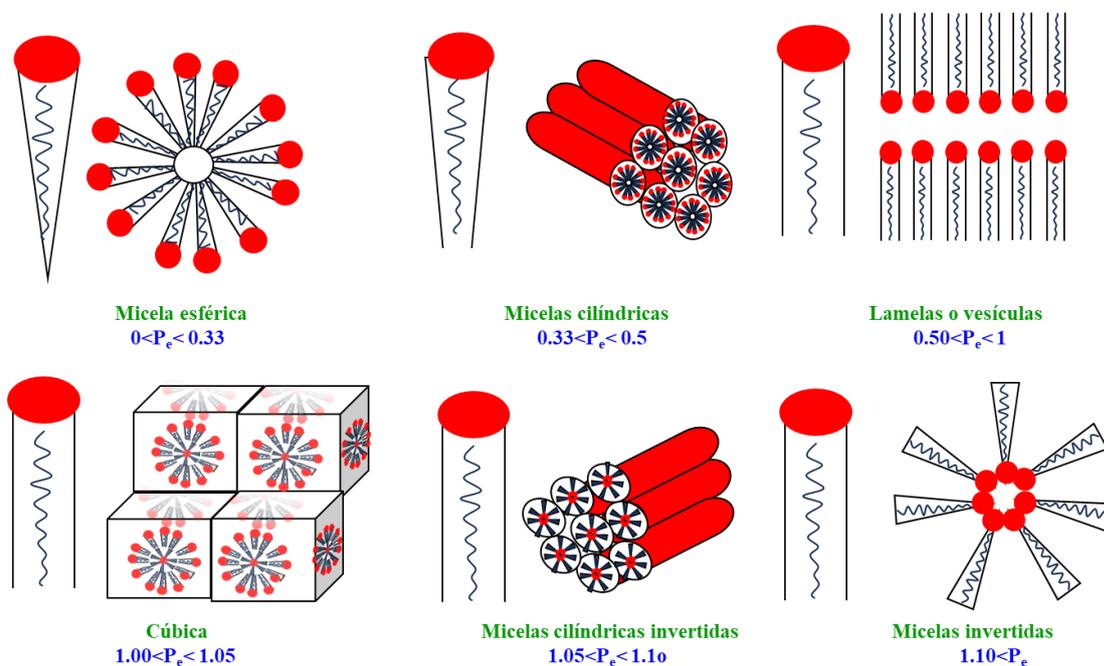


Figura 25. Tipos de empaquetamiento micelar

Se observó que el valor de V_0 presentó una influencia atribuida a las insaturaciones y longitud de la cadena hidrófoba del BS, en donde los compuestos insaturados con 18 átomos de carbono en su cadena (6AO y 6AL) presentaron valores de V_0 superiores a los compuestos saturados de 14 átomos de carbono (6AM y C1EG®). Esto se asocia a que los BS con insaturaciones ocupan mayor espacio o volumen molecular que los BS saturados.

Los P_e de los BS con cabezas polares iguales resultaron ser de 0.09, 0.10 y 0.13 para 6AO, 6AL y 6AM, respectivamente. Los valores fueron muy cercanos entre sí, ya que poseen cabezas polares iguales y su

disposición geométrica para la formación de micelas es muy similar entre sí, debido al acomodo del empaquetamiento de las moléculas, dando como resultado un arreglo micelar esférico ($0 < P_e < 0.33$) con las cabezas polares direccionadas hacia el exterior y las colas hidrófobas cortas al interior (Figura 25). [163]. Respecto a C1EG® ($P_e = 0.04$), este presenta un P_e inferior a los BS sintetizados ($P_e = 0.09 - 0.13$) y esto se correlaciona con los parámetros involucrados en la determinación de P_e , específicamente el volumen de la cola hidrófoba de los tensoactivos, los cuales al ser mayores para los BS sintetizados se obtienen valores más altos de P_e , lo que sugiere una mayor interacción entre las cabezas hidrofílicas de los tensoactivos.

6.2.5 Ensayo de viabilidad celular *in vitro* de los tensoactivos bicéfalos

Enseguida en la Figura 26a, se muestran los resultados de viabilidad celular correspondientes a los BS, en la línea celular MDA-MB-231. Las viabilidades obtenidas a 50 $\mu\text{g/mL}$ para los BS 6AL y 6AO fueron de 92 ± 0.2 y 86 ± 2.2 %, respectivamente. Mientras que para 6AM, esta se encontró en un intervalo de 78-98 % a concentraciones de 50-450 $\mu\text{g/mL}$.

Por otro lado, en la Figura 26b se muestran las viabilidades celulares en la línea celular A549. En esta se observó que el BS 6AL tiene una viabilidad celular de 98 ± 1.1 y 84 ± 3.2 % a 50 y 450 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, mientras que para 6AO fue de 99 ± 2.0 y 87 ± 3.5 %. Finalmente, el BS 6AM exhibió viabilidades de 99 ± 3.4 y 75 ± 1.6 % en concentraciones de 50 y 650 $\mu\text{g/mL}$.

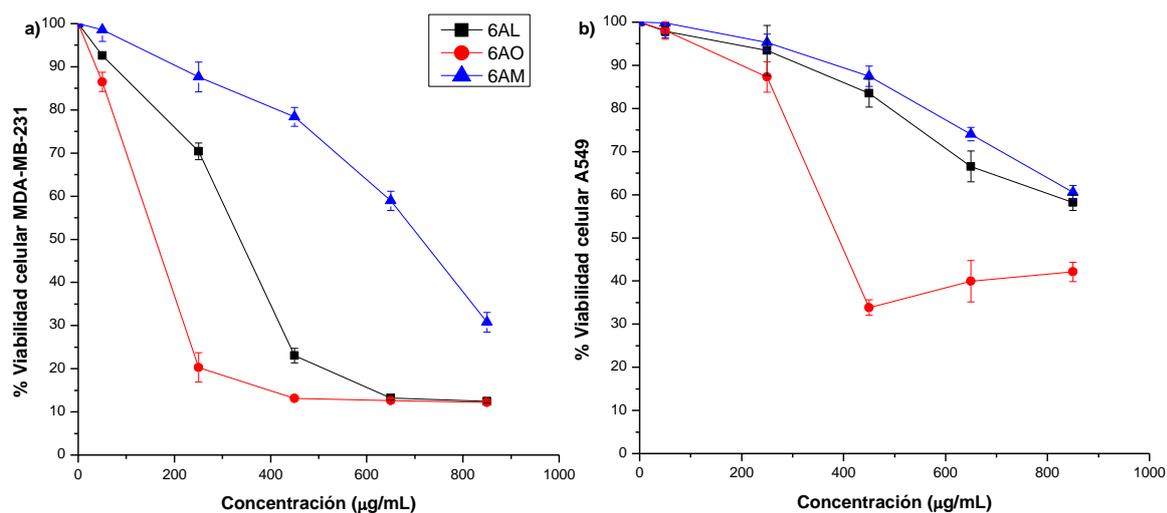


Figura 26. Ensayo de viabilidad celular de los BS en las líneas celulares a) MDA-MB-231 y b)

A549 ■ 6AL ● 6AO ▲ 6AM

Comparando los resultados de las Figuras 26a y 26b, se observó que los BS son más citotóxicos en la línea celular MDA-MB-231 que en A549. Además, se puede apreciar que el BS 6AO fue el más citotóxico para ambas líneas celulares, con un valor de viabilidad celular inferior al 20 % a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en MDA-MB-231 y alrededor del 40 % en un intervalo de concentración de 400-850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en A549. La citotoxicidad mostrada por estos BS en ambas líneas celulares fue la siguiente: 6AO > 6AL > 6AM.

Debido a que los BS sintetizados 6LA y 6MA son tensoactivos novedosos, no se encontraron previos estudios de su síntesis y/o su evaluación de viabilidad celular. Únicamente para el caso del BS 6AO, se han reportado los resultados obtenidos mediante un ensayo de viabilidad celular colorimétrico (SRB). Kalhapure y col. realizaron ensayos de viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico SRB del BS 6AO, el cuál mostró una viabilidad celular del 95% en el intervalo de concentración de 10-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa) [84]. Sin embargo, existen informes sobre la viabilidad celular de los ácidos grasos usados para obtener estos tensoactivos mediante el ensayo de luminiscencia cell-titer-Glo, que indican que los ácidos saturados son menos citotóxicos que los insaturados en líneas celulares epiteliales humanas [164]. Además, se informó que mediante el ensayo MTT en la línea celular A549, la concentración inhibitoria media para los ácidos oleico y linoleico fue 20 nM y > 40 nM respectivamente, lo que sugiere que la citotoxicidad depende del tipo de ácido graso, así como de la concentración del BS y tipo de línea celular [165].

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante la técnica de cristal violeta nos proporcionan un primer acercamiento, que sugiere que 6AM es menos agresivo que 6AL y/o 6AO en las líneas celulares estudiadas, debido a que la citotoxicidad aumentó en proporción al tamaño de las cadenas alquílicas. Por lo tanto, 6AM podría ser un candidato potencial para su uso en concentraciones más altas debido a su cadena alifática más corta. Sin embargo, se requiere la realización de otros ensayos de viabilidad celular más sensibles.

6.3 Formulación de sistemas con los tensoactivos sintetizados, pruebas preliminares para la formación de microemulsiones con los tensoactivos sintetizados y su caracterización mediante potenciometría, DLS y UV-VIS

Una vez obtenidos los BS, se procedió a la formulación de sistemas con la finalidad de obtener ME. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la etapa I de la formulación de sistemas ternarios.

En la Tabla 12, se presentan los porcentajes máximos de aceites incorporados en la formulación de estos sistemas empleando una solución micelar de composición 99.9% - 0.1% (agua-BS) a 25 °C y 37 °C.

Tabla 12. Porcentajes de aceite incorporados a los sistemas formulados

Tensoactivo	% de aceite	Canela		Menta		Jojoba		Aguacate		Oliva	
		25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
6AO		0.08	0.11	0.04	0.11	0.27	0.29	0.08	0.13	0.14	0.20
6AL		0.13	0.14	0.04	0.05	0.14	0.14	0.04	0.07	0.07	0.12

Los resultados indicaron que es favorable formular estos sistemas a una temperatura de 37 °C, debido a que permitió adicionar mayor cantidad de fase oleosa. Para el caso de 6AO, los aceites que permitieron adicionar mayor proporción fueron AcJ y AcO y para el BS 6AL los aceites con mayor capacidad de adición fueron, el AcJ, AcC y AcO. Sin embargo, estas cantidades de aceite se consideraron bajas, si se comparan con formulaciones de ME reportadas por otros investigadores. Flores y col. en el 2019, formularon una ME compuesta de 9.1 % TPGS-1000 (tensoactivo) y 8.65 % de isobutanol (co-tensoactivo), 0.73% de AcM o 0.35 % AcC y agua [6]. Los resultados obtenidos demostraron que es necesario incrementar el porcentaje de BS en la ME, que permita aumentar la proporción de fase oleosa aceptada. A continuación, en la Tabla 13 se presentan las caracterizaciones de los sistemas ternarios obtenidos.

Tabla 13. Valores obtenidos de la caracterización de sistemas formulados con diferentes BS y con cinco aceites mediante potenciometría, UV-VIS y DLS

	Canela		Menta	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
% aceite	0.079	0.109	0.039	0.108
pH	9.19±0.04	8.61±0.02	9.89±0.01	8.4±0.01
% T	22.3 ± 0.12	17.2±0.56	18.9 ± 3.34	26.4± 0.01
D _p *	216.05± 5.02	216.4± 29.98	418.0± 1.41	176.7± 12.02
D _p **	277.55±55.79	169.55±7.85	343.5±24.75	200.1±33.66
<hr/>				
6AL	%		%	
aceite	0.13	0.14	0.042	0.049
pH	8.54±0.01	8.57±0.02	8.62±0.01	8.64±0.01
% T	72.1 ± 1.71	81.2±1.91	91.1±0.61	90.6±1.25
D _p *	155.2±6.79	64.5±5.66	61.6±3.11	61.8±8.2
D _p **	115.75±9.83	83.5±2.83	62.8±0.99	75.45±0.92

		Aguacate		Oliva	
	% aceite	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
6AO	pH	8.81±0.01	8.36±0.002	8.68±0.02	8.69±0.01
	% T	28.3± 0.76	28.3± 0.66	69.1± 1.78	69.4± 0.95
6AO	D_p*	163.8±22.63	187.9±9.48	341.0±28.28	158.35±2.76
6AL	D_p**	218.70±21.64	206.65±12.1	261.15±2.05	190.3±12.73
<hr/>					
	% aceite	0.044	0.072	0.072	0.122
	pH	6.83±0.04	6.88±0.01	7.44±0.02	8.39±0.02
	% T	65.3 ± 0.06	69.63± 0.75	80.5± 0.5	91.4±0.1
6AL	D_p*	170.55±6.29	222.5±48.93	170.45±3.32	160.45±12.37
	D_p**	237.8±45.68	180.7±0.71	175.9±15.27	174.80±45.68

% aceite: porcentaje de aceite incorporado, %T: porcentaje de transmitancia mediante UV-Vis. D_p: diámetros de partícula en nm *Calculados con el IR del aceite, **calculados con el IR del ácido graso.

Los valores de pH obtenidos para las formulaciones con 6AO fueron superiores a 8.2, con naturaleza ligeramente básica mientras que para 6AL fueron superiores a 6.8. En ambos tensoactivos, los valores de pH se encuentran por encima del microambiente tumoral (pH 6.5) [20]. Respecto a la determinación de los % T, todas las formulaciones con 6AO y 6AL presentaron porcentajes inferiores al 89 % (valor deseado para un coloide traslucido) [166] y en cuanto a los valores de D_p, todos los sistemas se encontraron dentro del intervalo deseado para una ME (menor a 400 nm) [63]. Sin embargo, estos presentaron inestabilidad respecto al tiempo, lo que ocasionó una separación de fases relacionada con la heterogeneidad del sistema [167].

Debido a que no se logró la obtención de ME utilizando únicamente tres componentes (AcM, agua y BS 6AL o 6AO), se procedió con la etapa II donde se realizaron pruebas únicamente con al aceite de oliva y se añadió el uso de un co-tensoactivo (etanol y/o polietilenglicol) con la finalidad de disminuir la tensión interfacial [168] para permitir una mayor estabilidad del sistema e intentar formar una ME.

En la Tabla 14, se presentan los resultados obtenidos en estas nuevas formulaciones. En los sistemas 6AL^C y 6AO^C (C concentrados) se observó que los D_p se encontraron en un intervalo de 385 a 650 nm por encima de los D_p deseados para una ME, con desviaciones estándar muy elevadas lo que indicó la heterogeneidad de la formulación. Además, los valores de transmitancia indicaron que no se logró la formación de

sistemas traslucidos. Por lo tanto, se propuso la dilución de estos sistemas con la finalidad de eliminar los agregados presentes en la ME [69]. Los resultados mostraron que disminuyó el D_p , sin embargo, se conservaron las desviaciones elevadas y a pesar de tener transmitancias aceptables para una ME, estas fueron atribuidas a la adición del agua. Finalmente, en las pruebas que se llevaron a cabo adicionando el 50 % de co-tensoactivo etanol y/o polietilenglicol, se presentó un incremento en los D_p , efecto contrario a lo esperado al utilizar un agente co-tensoactivo, el cual se adicionó con la finalidad de coadyuvar para la obtención de soluciones coloidales homogéneas y termodinámicamente estables. Los resultados obtenidos de las formulaciones preliminares con los BS sintetizados demostraron que, debido a la escasa solubilidad de estos, no son agentes anfifílicos adecuados para la obtención de ME. Sin embargo, estos podrían utilizarse para otras aplicaciones, por ejemplo 6AO, ya ha sido reportado su uso en una nano suspensión para administración de 0.5 % de ketoconazol, donde se logró una carga del $87.47 \pm 0.31\%$ [84] o en formulación de geles al 2% de dianosina, que mejoró la permeabilidad del fármaco en las mucosas bucales, comparada con formulaciones sin este tensioactivo [85].

Tabla 14. Valores obtenidos de la caracterización de los sistemas con y sin co-tensioactivo mediante DLS y UV-VIS

	6AL ^C		6AL ^D		6AL ^E		6AL ^P	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
D_p	385.93±55.30	488.30±82.90	451.20± 50.57	506.40± 210.64	1095.67± 50.46	811.93± 96.92	622.00±21.15	1563.67±65.77
% T	4.13±0.06	14.53±0.12	79.47±0.57	84.03±0.12	85.53±0.06	81.43±0.4	75.3±0.52	92.77±0.15
	6AO ^C		6AO ^D		6AO ^E		6AO ^P	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
D_p	650.30±28.03	556.73±29.09	391.87± 215.43	368.27±26. 29	1224.0± 154.62	588.5± 19.66	2433.67± 254.07	1083.00± 68.64
% T	88.10±0.78	17.83±0.12	91.63±0.75	100±0.01	77.93±0.06	68.67± 0.98	94.9±0.61	76.43±0.12

^C: concentrado, ^D: diluido en agua Milli-Q en relación 1:10 formulación: agua, ^E: 50 % de etanol y ^P: 50 % de polietilenglicol

6.4 Formulación de microemulsiones utilizando líquidos iónicos (IL) comerciales como tensoactivos bicéfalos catiónicos

6.4.1 Determinación de la región de microemulsión mediante la construcción de diagramas de fases ternarios

Debido a los resultados no satisfactorios para formar ME o/w obtenidos con los BS sintetizados, se propuso como alternativa el uso de dos IL comerciales: C1EG® y T2EG®, cuya estructura química los clasifica dentro de los BS. Inicialmente, se procedió a realizar diagramas de fases ternarios usando como fase dispersa el AcM y agua como fase continua. Se realizaron soluciones micelares a diferentes concentraciones del IL C1EG® desde 1.25 hasta 40 % p/p que permitieron la adición desde 0.5 al 6.9 % p/p de AcM, respectivamente, mientras que para el T2EG® las formulaciones fueron desde 1.25 hasta 30 % p/p del IL lográndose la adición de 0.45 al 2.67 % p/p de AcM, respectivamente. Los porcentajes de la formulación se muestran en la Tabla 15 y en la Figura 27 se representan los diagramas ternarios obtenidos.

Tabla 15. Concentraciones de los componentes de la ME para la construcción del diagrama de fases

% Agua	% C1EG®	% AcM	% Agua	% T2EG®	% AcM
98.25	1.25	0.50±0.08	98.29	1.24	0.45±0.02
96.70	2.5	0.80±0.03	97.01	2.49	0.52±0.03
93.47	5	1.53±0.02	95.63	3.73	0.65±0.00
91.14	7.5	1.36±0.00	94.12	4.95	0.92±0.01
87.35	10	2.65±0.08	91.60	7.43	0.95±0.02
82.96	15	2.04±0.03	88.70	9.86	1.36±0.12
76.14	20	3.86±0.02	83.72	14.77	1.48±0.04
71.69	25	3.31±0.14	77.91	19.48	2.22±0.55
66.26	30	3.74±0.13	73.07	24.36	2.34±0.34
53.09	40	6.91±0.05	68.01	29.15	2.76±0.12

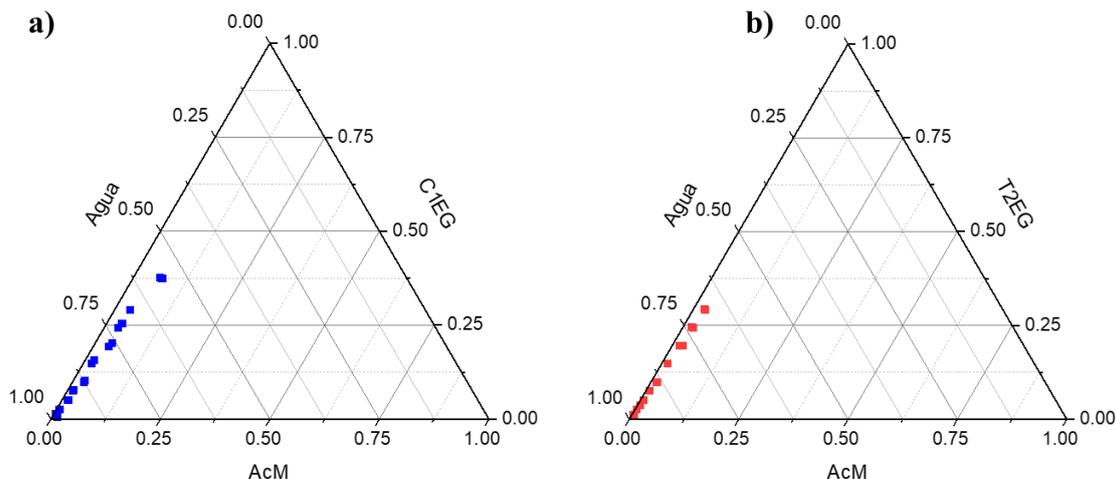


Figura 27. Diagrama parcial de fases de los sistemas con a) C1EG® y b) T2EG®

Estos resultados permitieron conocer las cantidades necesarias de cada componente y mostraron que el uso del IL C1EG® permite la obtención de una región de ME normal más amplia, comparado con la región del T2EG® [65]. A partir de estos resultados, se procedió a la formulación de ME normales dentro de la región determinada, dando como resultado ME con claridad óptica y estables termodinámicamente con el paso del tiempo. Los porcentajes de cada formulación y sus caracterizaciones fisicoquímicas se presentan enseguida en la Tabla 16.

Tabla 16. Composición de los sistemas obtenidos usando IL como tensoactivos y sus caracterizaciones por potenciometría, UV-VIS y DLS

Identificación	Tensoactivo	% Agua	% Tensoactivo	% AcM	pH	%T	D _p
1	C1EG®	98.41	1.25	0.34	5.07±0.01	99.74±0.55	476.25±11.53
2	C1EG®	97.04	2.49	0.47	7.10±0.01	99.12±0.14	284.95±10.67
3	C1EG®	94.10	4.99	0.91	7.15±0.00	99.72±0.66	380.10±10.89
4	C1EG®	91.50	7.49	1.01	7.31±0.01	100.0±0.09	113.83±14.73
5	C1EG®	88.50	9.83	1.67	7.43±0.00	96.90±0.93	341.30±7.39
6	C1EG®	83.74	14.78	1.48	7.51±0.01	99.90±0.31	254.20±1.27
7	C1EG®	77.92	19.48	2.60	7.55±0.01	99.91±0.78	251.95±6.15
8	C1EG®	73.20	24.40	2.40	7.57±0.02	96.02±1.00	140.35±4.31
9	C1EG®	68.11	29.19	2.70	7.58±0.01	99.89±0.44	122.90±3.96
10	C1EG®	57.04	38.03	4.93	7.58±0.01	95.70±0.55	147.25±3.04

11	T2EG®	98.32	1.25	0.44	5.92±0.01	99.33±1.10	450.70±7.78
12	T2EG®	96.97	2.49	0.54	6.11±0.01	99.67±0.79	317.25±5.02
13	T2EG®	95.62	3.73	0.65	6.14±0.01	98.38±1.52	495.55±3.75
14	T2EG®	94.11	4.97	0.92	6.22±0.01	98.56±0.97	482.00±84.57
15	T2EG®	91.61	7.45	0.94	6.33±0.01	99.59±1.06	347.75±24.11
16	T2EG®	88.81	9.91	1.28	6.41±0.01	98.47±0.32	269.90±23.62
17	T2EG®	83.69	14.86	1.45	6.55±0.01	98.41±0.45	407.70±5.94
18	T2EG®	78.46	19.70	1.83	6.60±0.01	98.63±1.03	610.70±40.87
19	T2EG®	73.31	24.59	2.10	6.57±0.01	97.40±1.06	479.25±14.50
20	T2EG®	67.92	29.41	2.67	6.77±0.01	97.51±1.45	464.55±23.26

En la tabla anterior, se observó que las ME 3 (C1EG®) y ME 14 (T2EG®), permiten la carga de 0.91 y 0.92 % de AcM, respectivamente, lo que superó los porcentajes de AcM utilizados en las formulaciones de ME preparadas por Flores y col (0.73%), con la diferencia que, en las formulaciones de este trabajo, se ha reducido la cantidad de tensoactivo necesaria para su obtención de 9.1 a 5 %. Adicionalmente, se evitó el uso de un co-tensioactivo, lo que se traduciría en una reducción de los costos en la preparación de la formulación [64].

Respecto a los valores de pH de las ME preparadas con C1EG®, en su mayoría fueron pH ligeramente alcalinos en un intervalo de 7.10 a 7.58 con excepción de la ME 1. Al comparar estos valores de pH con aquellos obtenidos para las formulaciones preparadas con T2EG®, estos fueron ligeramente más ácidos (de 5.92 a 6.77); en ambos resultados se pudo observar que, al aumentar la cantidad de IL se permite mayor adición del AcM. El incremento del IL en la ME, permitió el aumento del área superficial de la interfase entre la fase hidrofílica e hidrofóbica y propició una mayor adición de aceite en la ME, sin afectar la estabilidad termodinámica de la misma. Sobre los porcentajes de transmitancia, todos se encontraron por encima del 95 %, el cual es mayor al intervalo deseado (89-100%) para este tipo de sistema coloidal (ME con IL) [166]. Finalmente, las determinaciones de los D_p se realizaron siguiendo la metodología de Sieniawska y col. [1] y los resultados mostraron que el IL C1EG® permitió la formación de ME a una concentración de 2.49 a 38.03 %, incorporando hasta 4.95 % de AcM, con valores de D_p hasta de 380 nm. Contrariamente, las formulaciones preparadas con T2EG® presentaron valores de D_p elevados que en su mayoría excedieron a los deseados para una ME (100 nm hasta de 400 nm), con desviaciones estándar altas probablemente indicando la formación de emulsiones inestables termodinámicamente. Por esta razón, resultó más favorable continuar las siguientes formulaciones de ME empleando C1EG®.

6.4.2 Determinación de la solubilidad de los principios activos anticancerígenos en el aceite esencial de menta (AcM)

Para proceder con la formulación de ME cargadas de API anticancerígeno, se realizaron pruebas de solubilidad de tres API en el AcM a 25 °C. La determinación de la solubilidad fue realizada mediante la técnica visual (Vs) y por espectroscopia de UV-VIS a 215 nm para PTX, 303 nm para metotrexato y 423 nm para curcumina. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 17.

Tabla 17. Solubilidades de los API en el AcM

Visual		UV-VIS	
API	Solubilidad mg/mL	λ nm /R	Solubilidad mg/mL
Metotrexato	2.97± 0.22	303 /0.999	3.18± 0.01
Curcumina	7.72± 0.11	423 /0.997	6.31 ± 0.01
Paclitaxel	27.41± 0.18	215 / 0.986	26.94 ± 0.01

El PTX fue el API que presentó mayor solubilidad, seguido por la curcumina y el metotrexato en el AcM bajo estas condiciones. Se observó que los valores fueron muy similares entre sí por ambas técnicas, sin embargo, UV-VIS es una técnica analítica que nos permite la cuantificación más exacta. Las solubilidades de los API en el AcM fueron superiores, si se comparan con la solubilidad de estos API en agua a 25 °C reportadas por Hazardous Substances Data Bank para curcumina (0.00312 mg/mL), PTX (0.1 mg/mL) y metotrexato (2.6 mg/mL). Debido a la clasificación biofarmacéutica de estos API, clase II (muy permeable y poco soluble en agua) y IV (poco permeable y soluble en agua) respectivamente, el API elegido para posteriores etapas fue el PTX.

6.4.3 Formulación de ME aceite en agua (o/w) empleando C1EG® y aceite esencial de menta (AcM) y determinación de las condiciones óptimas para la formación de la coraza polimérica

Se formularon ME con diferentes proporciones de C1EG®, agua y AcM. Posteriormente, las gotitas de la ME fueron recubiertas con CS, las cuales posteriormente se caracterizaron y los resultados se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Propiedades de las microemulsiones sin y con coraza de quitosano

Identificación	Relación (T/A/AcM/CS)	pH	Conductividad (Dynes/cm)	D _p (nm)	PDI	% T	ζ (mV)
ME1	(3.25/96.17/0.58/0)	6.40±0.01	946.33±0.58	323.50±16.40	0.332±0.25	N/A	+46.90±2.01
ME1CS1	(1.62/97.99/0.29/0.10)	2.95±0.01	1449.33±1.53	230.33±6.47	0.267±0.10	98.31±1.37	+84.10±0.40
ME1CS4	(1.62/97.69/0.29/0.40)	3.44±0.00	1614.67±1.15	156.37±11.05	0.107±0.04	94.07±1.32	+121.90±4.99
ME2	(5.00/94.35/0.65/0)	6.48±0.01	455.00±1.00	113.33±12.46	0.435±0.09	N/A	+45.43±0.90
ME2CS1	(2.50/97.07/0.33/0.10)	2.97±0.00	1746.33±1.15	117.70±13.12	0.373±0.15	94.62±1.17	+76.43±0.71
ME2CS4	(2.50/96.77/0.33/0.40)	3.42±0.01	1867.33±0.58	178.53±7.19	0.375±0.17	95.77±0.23	+147.97±0.32
ME3	(10.00/89.08/0.92/0)	6.56±0.01	804.67±0.58	422.63±9.92	0.683±0.03	N/A	+43.37±0.65
ME3CS1	(5.00/94.53/0.46/0.10)	2.96±0.00	1917.33±0.58	257.80±4.20	0.500±0.02	95.96±1.48	+83.23±0.58
ME3CS4	(5.00/94.23/0.46/0.40)	3.44±0.00	2105.00±1.00	99.43±5.54	0.614±0.21	96.41±1.52	+116.83±1.76
ME4	(15.00/83.69/1.31/0)	6.70±0.01	999.00±0.00	357.97±16.28	0.370±0.04	N/A	+33.60±1.08
ME4CS1	(7.60/91.64/0.66/0.10)	3.09±0.01	3342.00±0.00	95.60±5.23	0.746±0.21	95.82±1.44	+66.07±0.72
ME4CS4	(7.60/91.34/0.66/0.40)	3.50±0.00	3595.00±1.00	108.93±7.81	0.593±0.33	99.96±0.07	+92.67±1.40
ME5	(20.00/78.58/1.42/0)	6.71±0.00	999.00±0.00	151.07±215.45	0.932±0.12	N/A	+42.63±1.75
ME5CS1	(10.10/89.17/0.72/0.10)	3.02±0.01	2725.33±0.58	88.25±3.13	0.542±0.11	98.68±1.10	+72.53±0.81
ME5CS4	(10.10/88.87/0.72/0.40)	3.44±0.01	2796.33±1.15	140.23±7.22	0.578±0.02	98.54±0.37	+91.43±2.76
ME6	(30.00/67.65/2.35/0)	7.00±0.01	998.00±0.00	244.00±15.26	0.464±0.11	N/A	+14.47±0.06
ME6CS1	(15.00/83.81/1.18/0.10)	3.29±0.01	3999.00±0.00	139.47±5.68	0.222±0.14	94.32±0.31	+53.50±0.69
ME6CS4	(15.00/83.51/1.18/0.40)	3.63±0.01	3999.00±0.00	94.27±0.50	0.243±0.04	96.93±1.60	+78.33±0.80

ME1-6 : gotitas de la ME sin recubrimiento de CS, ME1-6CS1: gotitas de la ME con recubrimiento CS al 0.1% en ácido acético al 1%, ME1-6CS4: gotitas de la ME con recubrimiento de CS al 0.4% en ácido acético al 1%, A: agua, PDI: polidispersidad.

En esta tabla, se puede observar que los valores de pH de las ME1-ME6 se encontraron dentro del intervalo de 6.4 -6.7, los cuales fueron superiores a los pH obtenidos en las ME recubiertas con CS (2.95- 3.29). La disminución de los valores de pH de las ME con CS, se encuentran relacionados a que el CS es un ácido débil (con valores de pKa entre 6 y 7) que requiere de pH por debajo de su pKa para su disolución.

El incremento de la concentración del CS y el aumento en los valores de la conductividad de las soluciones es un fenómeno común presentado para algunos polielectrolitos. En este caso, el ácido acético en conjunto con el CS, actúan como polielectrolitos mediante un mecanismo que consiste en que el ácido acético al ser un ácido débil se disocia en iones de hidrógeno y de ácido carboxílico que, al adicionar el CS, inicialmente se une a los iones hidrógenos y provoca un reacomodo de las cadenas de CS, propiciando una disminución en los valores de conductividad. Sin embargo, al incrementar la concentración del CS, este inicia una interacción con los iones de ácido carboxílico dando como resultado el incremento de la conductividad [169]. El aumento de la conductividad también se encontró asociado con la presencia de cargas en las gotitas de la ME, indicativo de que se logró la formación del recubrimiento con el CS [60], [170].

Por otro lado lo que concierne a los valores de D_p , todos se encontraron dentro del intervalo reportado para una ME (menor de 400 nm) [43]. Adicionalmente, se presentó una disminución del D_p al añadir la solución de CS, si se compara con las gotitas de la ME sin recubrimiento. Esto pudiera estar asociado a que esta adición propicia una dilución de los componentes de la ME promoviendo un fenómeno de reagrupación que incrementa la cantidad de micelas con un tamaño inferior [20]. Esto a su vez causa una reducción de los valores de PDI y valores de ζ superiores a + 30 mV. Estos resultados sugieren que estas ME son sistemas homogéneos y estables [60]. Profundizando en los valores de ζ , estos valores tienden a incrementarse al aumentar la concentración de CS. Este resultado sugiere la formación de la coraza del polímero en la superficie de las gotitas de la ME debido a la presencia de los grupos amino ionizados provenientes del CS [20]. En la Figura MS 2 (material suplementario II) se muestra de manera esquemática el efecto del medio ácido (CH_3COOH) sobre los grupos NH_2 del CS mediante una transferencia rápida de protones para la ionización del CS [171].

Finalmente, las pruebas de estabilidad térmica permitieron simular el envejecimiento acelerado de las ME a largo plazo, con la finalidad de asegurar su integridad con el paso del tiempo. Los resultados mostraron nulos cambios visuales, sin precipitados ni separaciones de fases lo que confirmó la estabilidad termodinámica de las ME [172].

Además, se realizó un análisis de los resultados y se determinó que las muestras ME2, ME2CS1 y ME2CS4 se consideraron como las mejores formulaciones, debido a que en estas se requirió de la menor cantidad posible de tensoactivo que permitió una mayor adición de aceite. Esto impacta directamente en la disminución de la toxicidad de la ME enfocada en liberación de fármacos, por esta razón fueron los sistemas elegidos para la observación de su microestructura mediante TEM. Las micrografías y las distribuciones de diámetros de partícula de estas ME se presentan en la Figura 28.

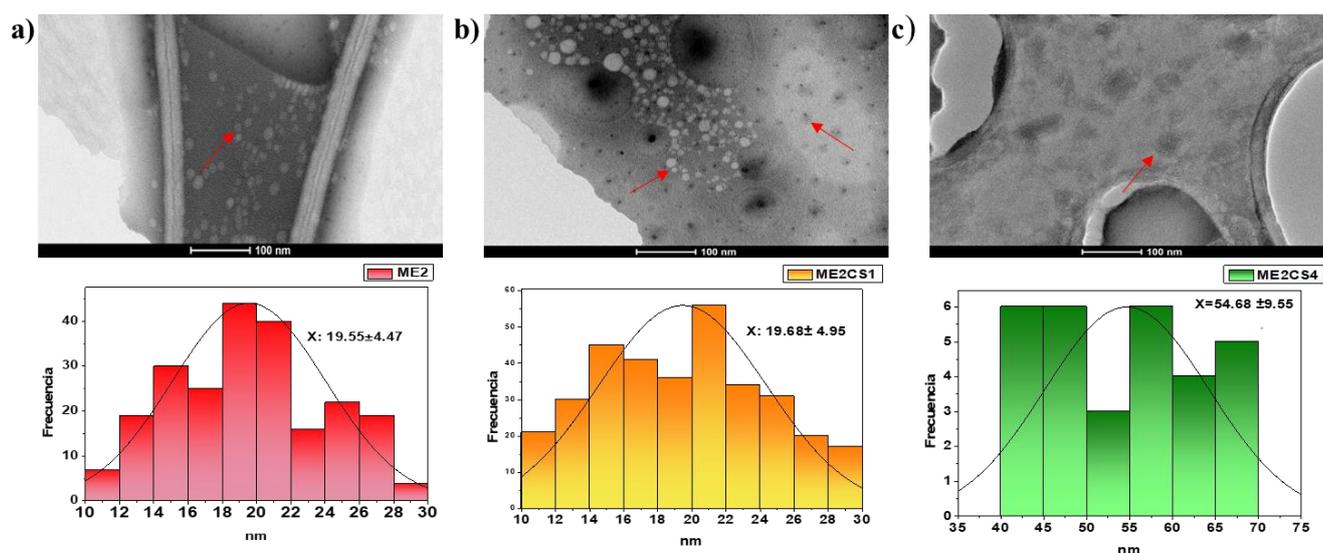


Figura 28. Micrografías y distribuciones determinadas mediante TEM a) ME2, b) ME2CS1 y c) ME2CS4

Entrando a detalle en las micrografías y distribuciones de tamaño de partícula, la muestra ME2 (las gotitas de la ME sin recubrimiento de CS), presentó una microestructura esférica y con coloración clara con D_p promedios de 19.55 ± 4.47 nm [61] (Figura 28a). Por otro lado, la muestra ME2CS1 (Figura 28b) presentó un D_p de 19.68 ± 4.97 nm, el cual es muy similar al determinado para ME2. Sin embargo, en la micrografía de ME2CS1 se observaron dos tipos de poblaciones: gotitas de la ME sin recubrimiento de CS (esféricas y claras) y partículas esféricas, con contornos más oscuros rodeando las gotitas de ME (color claro). Estas características sugieren que el uso del CS a una concentración de 0.1 % no fue suficiente para recubrir las gotitas de ME con este biopolímero [173]. Por su parte, en la micrografía de ME2CS4 (Figura 28c), se obtuvo un aumento de más del doble en el valor de D_p y cambios morfológicos comparados con las ME2 y ME2CS1. Esta presentó un D_p de 54.68 ± 9.55 nm con una apariencia globular esférica, coloración oscura y textura, comparada con las ME sin o con menor cantidad de biopolímero, lo que evidenció que a la concentración al 0.4 % de CS, se logró recubrir las gotitas de la ME con la coraza de

CS. Finalmente, se observó que los valores de D_p obtenidos mediante DLS (94-179 nm) son mayores a los obtenidos mediante TEM (54 nm). Esto demostró la influencia del CS sobre el D_p hidrodinámico, lo que se encuentra relacionado con el volumen hidrodinámico que ocupan las cadenas de este biopolímero en solución acuosa, ya que debido a que es un polisacárido, este volumen puede presentar dependencia de la concentración [174]

6.4.4 Formación y caracterización de nanodispositivos poliméricos (NDP)

Se procedió a la formulación de seis NDP y sus caracterizaciones mediante pH, conductividad, potencial z, D_p y PDI se muestra enseguida en la Tabla 19.

Tabla 19. Valores obtenidos mediante potenciometría, DLS, conductimetría y potencial Z para los NDP

NDP	Componentes	pH	Conduc tividad (μ S/cm)	ζ (mV)	D_p (nm)	PDI	Resultados de D_p (nm) posterior a las pruebas de estabilidad		
							a) Térmica	a) Mecánica	b) Almacenamiento
NDP 1	ME	6.75	1997.3	53.53	384.23	0.46	1215.67	227.1	352.98
NDP 2	0.4% CS	3.54	2029.0	174.67	397.07	0.56	240.90	52.15	375.63
NDP 3	0.4% CS-PTX	3.56	2097.0	110.03	350.03	0.88	687.43	52.57	313.47
NDP 4	0.4% CS-FA	1.26	3999.0	117.67	360.33	0.17	868.33	151.50	396.00
NDP 5	0.4% CS-FA-PTX	1.27	3999.0	111.63	382.60	0.26	337.30	244.97	252.47
NDP 6	ME-PTX	6.77	1998.0	54.03	291.73	0.70	262.83	255.37	331.80

a) ciclos de congelación/calentamiento por cuatro días a temperaturas de -30°C y 40°C , b) centrifugación a 5000 rpm por 30 minutos y c) temperatura ambiente, dentro de una gaveta por 60 días

En la tabla anterior, se puede visualizar que los NDP1 y NDP6 presentaron pH cercanos al neutro (6.7), esto se atribuyó a que son gotitas de ME sin recubrimiento biopolimérico (debido a que, para el proceso de recubrimiento, se requieren de soluciones acidificadas para solubilizar los biopolímeros). No obstante, las muestras NDP2 y NDP3 (con recubrimiento de CS) presentaron valores de pH alrededor de 3.5 mientras que para los NDP4 y NDP5 (con recubrimiento de CS-FA) fue de 1.2. Las soluciones de ácido acético al 1% (para el CS) y ácido clorhídrico al 1% (para CS-FA) para la formación de la coraza biopolimérica, presentaron un efecto significativo en la disminución del pH de la ME, propiciando el

incremento de la protonación del biopolímero y ocasionando la disminución de los pH de los NDP4 y NDP5. Contrariamente, los valores de conductividad fueron en ascenso al recubrir las gotitas de la ME con CS y CS-FA lo cual sugiere la modificación de la ME [60], [170]. Además, se pudo observar que no existe un efecto en los valores de pH y conductividad al adicionar PTX. Por otra parte, los valores del ζ en todos los NDP fueron positivos y altos, esto se atribuyó a la protonación de los grupos amino presentes en los biopolímeros, lo que indicó que existe un recubrimiento polimérico formado sobre la superficie del NDP. Estudios han demostrado que las cargas positivas en las partículas mejoran el proceso de endocitosis celular, lo cual sugiere que estos NDP puedan ser absorbidos por una membrana celular con carga negativa como las células cancerígenas [5]. También se pudo observar que todos los valores de ζ superaron un valor de +30 mV, la cual es una condición adecuada para mantener las fuerzas repulsivas en el sistema que permiten conservar su estabilidad física y termodinámica [53]. El incremento de los valores en conductividad y ζ sugieren que se logró el recubrimiento de las gotitas de la ME con la coraza de CS y/o CS-FA por ionización de los grupos amino.

Finalmente, los valores de D_p hidrodinámico de todos los NDP se encontraron dentro del intervalo deseado para una ME [43], pero altos sí se comparan con los D_p obtenidos por TEM, con PDI que demostraron que son sistemas con distribuciones amplias y probablemente DLS no es la técnica adecuada para el análisis, debido a que en esta se determina el radio hidrodinámico de una esfera hipotética que rara vez existe en los sistemas coloidales. Los resultados de PDI son indicativos que el CS y/o CS-FA se encuentran hidratados y/o solvatados, dando como resultados PDI elevados [175]. Respecto a la determinación de los valores de D_p hidrodinámico de las muestras sometidas a diferentes pruebas de estabilidad, se observó que los valores para aquellas muestras sometidas a las pruebas de estabilidad térmica y mecánica fueron muy variados comparados con los D_p iniciales. Esto se atribuyó a que al someter los NDP a cambios bruscos de temperatura y centrifugación se pudieron formar agregados por el hinchamiento del polímero, sin embargo, visualmente estas ME no mostraron cambios físicos como inestabilidad y/o separación de fases en un tiempo 60 días, sedimentación, coalescencia o cremado [64]. Por otro lado, los valores de D_p hidrodinámicos de las muestras sometidas a la prueba de almacenamiento, fueron muy similares a los iniciales, estos NDP demostraron ser formulaciones termodinámicamente estables, característica que diferencia una ME, emulsión o nanoemulsión, las cuales presentan separaciones de fases respecto al tiempo.

En las micrografías de TEM, se presentan las morfologías obtenidas para los NDP. En las Figuras 29a y 29f se observó que las partículas poseen una morfología esférica y clara ($D_p \sim 2$ nm), características de

sistemas sin coraza polimérica. Por otro lado, los NDP con coraza de CS y CS-FA (Figuras 29b y 29d respectivamente) presentaron cambios morfológicos con aspecto de partículas esféricas con textura y coloración más oscura en el contorno, así como un incremento en los valores de (D_p de 34.63 ± 8.25 y 34.87 ± 10.09 nm). Estas características morfológicas sugieren que se logró la formación de una coraza polimérica sobre las ME. Por su parte, los NDP con coraza de CS y CS-FA cargadas con PTX (Figuras 29c y 29e respectivamente) mostraron partículas ligeramente mayores de tamaño (D_p de 39.13 ± 6.38 nm y 39.14 ± 6.59 nm, respectivamente) pero la morfología esférica se conservó [61], [62], [173].

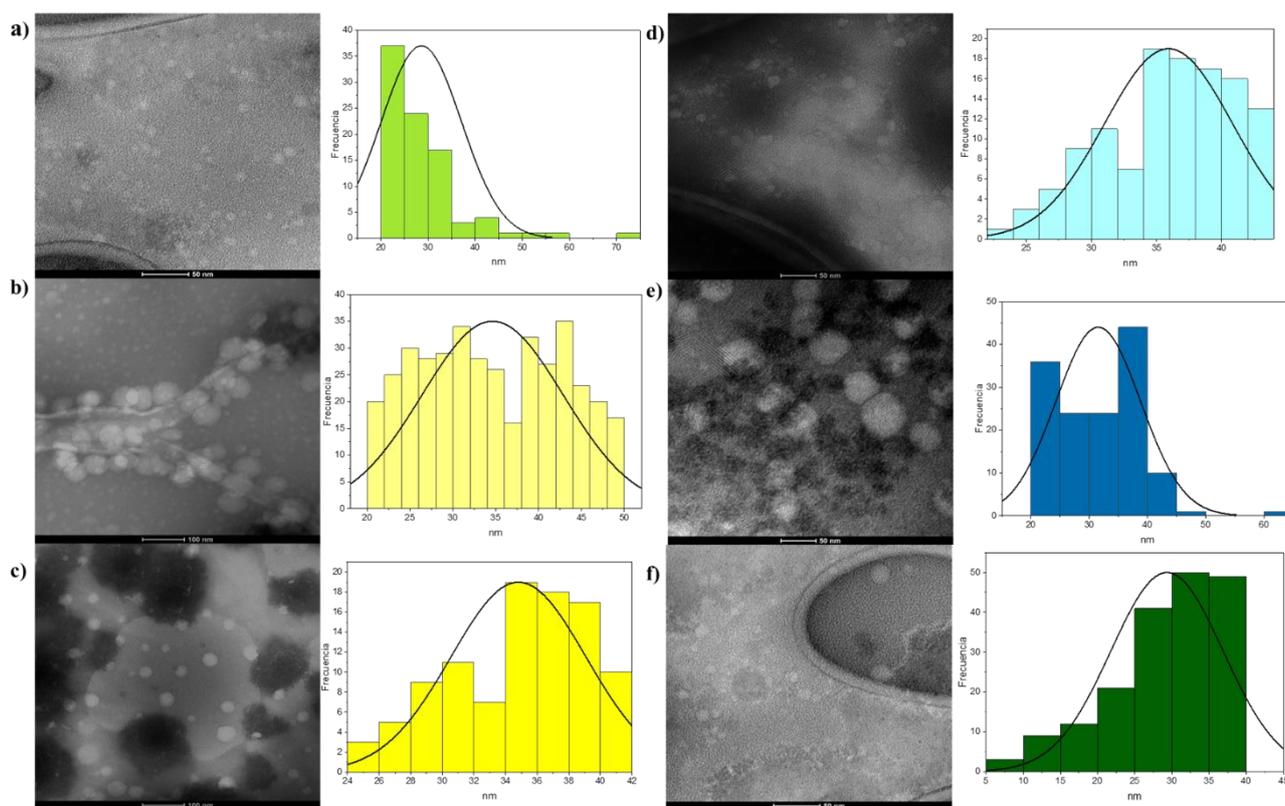


Figura 29. Micrografías y distribuciones mediante TEM para a) NDP1, b) NDP2, c) NDP3, d) NDP4, e) NDP5 y f) NDP6

Nuevamente, se pudo observar que los tamaños de partículas obtenidos mediante esta técnica son más pequeños que los obtenidos mediante DLS. Esto se debe al principio de funcionamiento inherente, en donde la morfología de las partículas de CS y/o CS-FA son afectadas por el volumen hidrodinámico que ocupan en la solución [174]. Mediante DLS, se pueden presentar aglomeraciones de partículas que en realidad son más pequeñas, mientras que por TEM, las muestras sufren un proceso de deshidratación que favorece a la obtención de los D_p reales [176].

Los valores de D_p de todos los NDP fueron inferiores a 200 nm, lo que permite su uso para la administración de fármacos anticancerígenos por *vía* intravenosa, favoreciendo a la internalización del API por medio de una focalización pasiva eficiente en el tumor, mejorando las propiedades de retención y permeación [8].

6.5 Perfiles de liberación de los nanodispositivos poliméricos (NDP) a pH de 5.8, 6.5 y 7.4 y ajuste a los modelos matemáticos de liberación

Se realizaron los perfiles de liberación de los NDP que contenían PTX en sus componentes (NDP 3, 5 y 6) a valores de pH de 5.8, 6.5 y 7.4 (Figura 30). Los resultados indicaron que a pH de 7.4 (fisiológico), se obtuvieron liberaciones del ~10 % para NDP3 y NDP6 y para NDP5 del 16 % con una liberación sostenida (liberación del API gradual y controlada durante un intervalo de tiempo), los cuales fueron inferiores a los obtenidos a pH ligeramente acidificados. A pH de 6.5, la liberación del AcM fue del 14.81, 19.64 y 10.01 % y pH de 5.8 del 11.05, 20.54 y 9.93 % para los NDP3, NDP5 y NDP6, respectivamente. A valores de pH por debajo del valor de pKa del CS, se favoreció la liberación del AcM, debido a la protonación del CS presente en los NDP con coraza de CS y/o CS-FA [53].

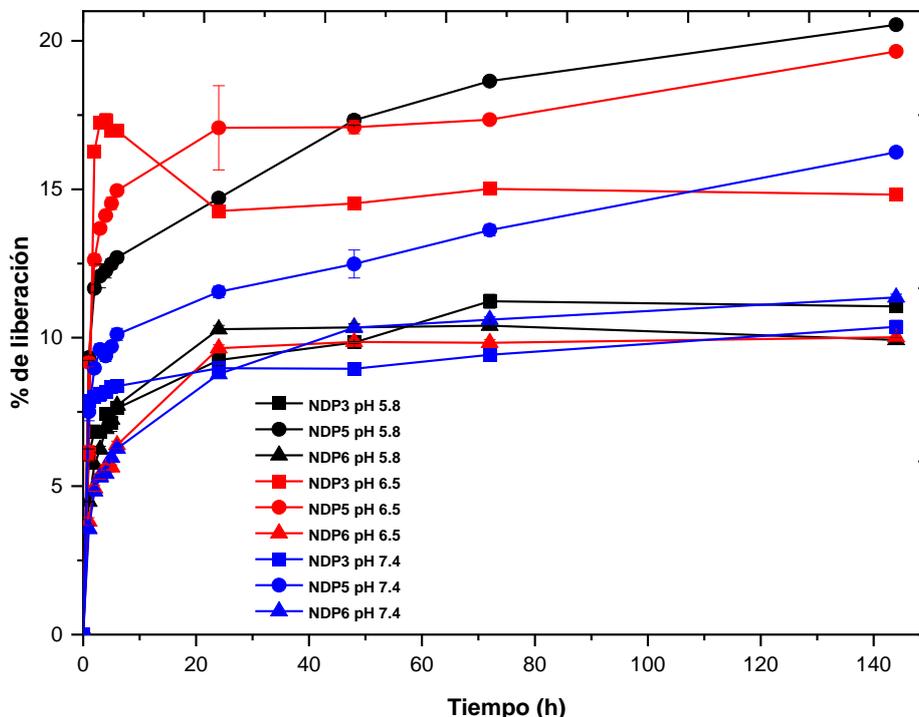


Figura 30 .Perfiles de liberación de AcM de los ■NDP3 (CS-PTX), ●NDP 5 (CS-FA- PTX), ▲ NDP 6 (ME-PTX) a pH 5.8, 6.5 y 7.4

Siguiendo con el análisis de resultados, se observó que todos los NDP la tasa de liberación de AcM incrementó a pH ácidos, destacando el NDP5 (con coraza de CS-FA), el cual liberó mayor cantidad de AcM que NDP3 (con coraza de CS) y ambos a su vez, liberaron más que NDP6 (sin coraza polimérica), el cual no presenta cambios significativos en los porcentajes de liberación en los tres valores de pH, lo que coincide con lo reportado por Díaz-Zepeda [60] y Barrera [20].

-Modelado de la cinética de liberación de los nanodispositivos poliméricos

Conforme a la información obtenida en los estudios de liberación *in vitro*, se procedió a la determinación del mecanismo de liberación del AcM de estos NDP a los diferentes valores de pH. Se realizó un ajuste de los datos obtenidos a cuatro modelos matemáticos (orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas). La liberación de los tres NDP mostró un mejor ajuste al modelo de Korsmeyer-Peppas (Tabla 20; las gráficas de los resultados experimentales versus los resultados de los modelos se muestran en el apartado de material suplementario III Figuras MS 3-11). Esto se debe a que el AcM y PTX se encuentran dentro de una coraza biopolimérica de CS y/o CS-FA y su liberación se llevó a cabo mediante un mecanismo de difusión Fickiana (con valores del exponente “n” inferiores a 0.45). Esto indicó un desplazamiento de las moléculas de PTX/AcM, a través de una membrana micro porosa, que permitió la difusión del núcleo interno hacia la coraza biopolimérica y posteriormente a la interfase mediante una difusión debida a varios factores: el gradiente de concentración, coeficiente de permeabilidad del fármaco, grosor de la membrana y grado de hinchamiento del polímero.

Tabla 20. Resultados del análisis de la cinética de liberación mediante el ajuste a cuatro modelos matemáticos

IDENTIFICACIÓN	ORDEN CERO		PRIMER ORDEN		HIGUCHI		KORSMEYER-PEPPAS		
	K ₀ (mg)	R ²	K ₁ (h ⁻¹)	R ²	K _H (h ^{-0.5})	R ²	K _{PK} (h ⁻ⁿ)	R ²	n
NDP3 pH 5.8	0.112	0.864	0.018	0.674	1.833	0.953	6.083	0.984	0.128
NDP3 pH 6.5	0.159	0.429	0.020	0.415	4.411	0.488	14.210	0.550	0.022
NDP3 pH 7.4	0.103	0.965	0.018	0.877	1.669	0.959	7.674	0.985	0.051
NDP5 pH 5.8	0.199	0.904	0.022	0.734	5.584	0.959	10.237	0.969	0.137

NDP5 pH 6.5	0.159	0.656	0.020	0.459	4.411	0.734	14.209	0.800	0.022
NDP5 pH 7.4	0.103	0.965	0.018	0.877	1.669	0.959	7.674	0.985	0.051
NDP6 pH 5.8	0.106	0.679	0.018	0.475	1.691	0.825	5.600	0.921	0.142
NDP6 pH 6.5	0.103	0.764	0.018	0.571	1.502	0.888	4.493	0.951	0.183
NDP6 pH 7.4	0.112	0.852	0.018	0.669	1.676	0.949	4.200	0.986	0.213

K_0 – constante de liberación de orden cero; K_1 – constante de velocidad de primer orden; K_H – constante de liberación de Higuchi; K_{PK} – constante de liberación de Korsmeyer-Peppas; n – coeficiente de difusión en el modelo Korsmeyer-Peppas; R^2 – coeficiente de determinación

6.6 Ensayo de viabilidad celular *in vitro* de los NDP

Los ensayos de viabilidad celular de los seis NDP se determinaron mediante la técnica de cristal violeta en líneas celulares de fibroblastos (1132SK), cáncer de pulmón (A549) y mama (MDA-MB-231) en un intervalo de concentración entre 0.1-100 $\mu\text{g/mL}$ a 24 h como un primer acercamiento de evaluación de viabilidad celular.

Los resultados en línea celular sana 1132SK (Figura 31c) mostraron que no existe una diferencia significativa en la evaluación de la viabilidad celular, ya que presentaron valores superiores al $83\pm 0.48\%$ a concentraciones inferiores de 10 $\mu\text{g/mL}$, lo que sugiere que ninguno de los seis NDP es tóxico en células sanas a esta concentración según la Norma ISO-10993-1. Enfatizando en la importancia de los resultados, estos son indicativos que los NDP obtenidos no causan daño sobre las células de fibroblastos (sanas), lo cual es de suma relevancia para el desarrollo de formulaciones para la administración dirigida de fármacos anticancerígenos, debido a que los tratamientos anticancerígenos actuales causan daño indistintamente a células sanas y cancerígenas.

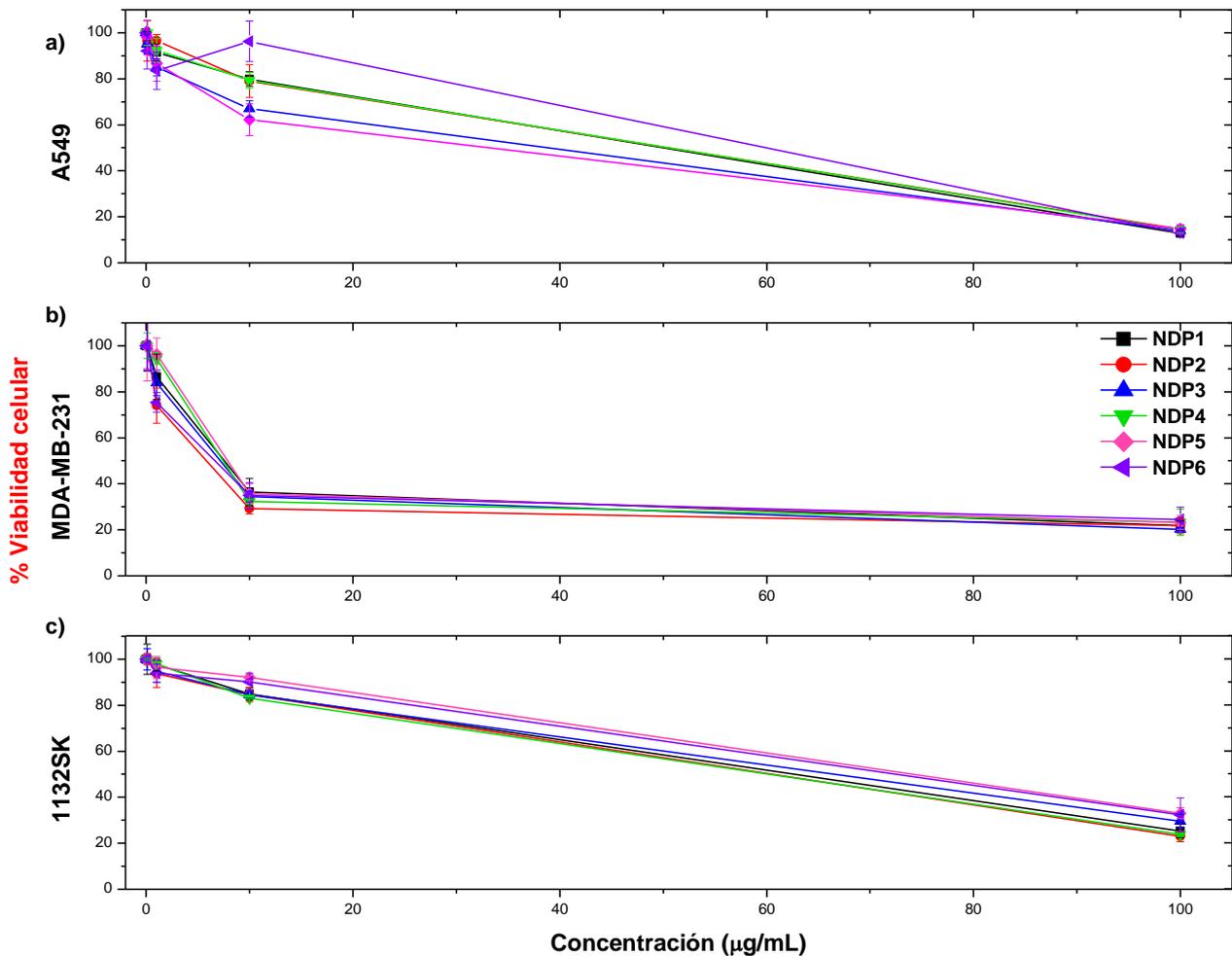


Figura 31. Viabilidad celular (%) de los NDP en líneas celulares a) cáncer de pulmón (A549), b) cáncer de mamá (MDA-MB-231) y c) fibroblastos (1132SK)

Respecto a los resultados en la línea celular A549 (Figura 31a), los NDP1, 2 y 4 (que no contienen PTX) produjeron efectos citotóxicos similares entre ellos a una concentración de 10 µg/mL lo cual indica que el AcM pudo tener un efecto en la reducción de la viabilidad de las células A549 que promovió a la muerte celular. Se sugiere que el AcM produjo un efecto sinérgico junto con los otros componentes de la formulación que permitieron obtener esas viabilidades celulares, sin embargo, se requieren más estudios del mecanismo de acción del mismo [177]. Respecto a los NDP2-5 los cuales contienen la coraza polimérica, estos demostraron ser más tóxicos, por lo que se sugirió que sucede un efecto sinérgico entre el AcM y el PTX que potencializó su actividad anticancerígena. A una concentración de 10 µg/mL, se obtuvieron las siguientes viabilidades celulares: 62 ± 6.91 , 67 ± 3.54 y 96 ± 8.75 , para NDP5, NDP3 y NDP6, respectivamente. Los resultados demostraron que los recubrimientos con coraza de CS-FA y/o CS son

seguros para formulaciones farmacéuticas, debido a que promueven y potencializan la citotoxicidad en las líneas cancerosas [178]. Los NDP2-5 poseen cargas positivas en su superficie atribuidos a la presencia de estos biopolímeros, los cuales se unen más eficientemente a la superficie negativa de las células cancerosas y promueven la internalización del API por endocitosis dentro de las células cancerosas, lo que conllevó a la mejora de la liberación del PTX [179].

Finalmente, los resultados de viabilidad celular en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 se muestran en la Figura 31b. Los NDP con y sin PTX presentaron viabilidades celulares inferiores a 74 ± 7.62 a partir de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$; esto es favorable y se sugiere que el AcM contenido en los NDP1, NDP2 y NDP4, produce un efecto antitumoral similar a los sistemas NDP3, NDP5 y NDP6 los cuales contienen PTX; con lo que se destacan las propiedades anticancerígenas del AcM como un compuesto prometedor para el desarrollo de tratamientos alternativos oncológicos. Los resultados obtenidos hasta el momento son útiles como un primer acercamiento para identificar la posible citotoxicidad de los NDP, sin embargo, se sugiere la evaluación de viabilidad celular ampliando la región de concentración de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ de los NDP para evaluar las diferencias entre cada NDP y efectuada mediante otros ensayos de viabilidad celular que proporcionen mayor sensibilidad en los resultados y que permitan conocer el mecanismo de muerte celular previo a proceder a la siguiente etapa de evaluación de los NDP.

6.7 Polimerizaciones en microemulsión de estireno (St) y acetato de vinilo (VAc)

6.7.1 Determinación de la región de microemulsión mediante la construcción de diagramas de fases ternarios

Se construyeron diagramas parciales de fases para la determinación de la región límite de ME normal, a partir de soluciones micelares a diferentes concentraciones de C1EG® desde 1.24 hasta 30 % p/p y con los monómeros St y VAc a 25 y 60 °C. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Figura 32.

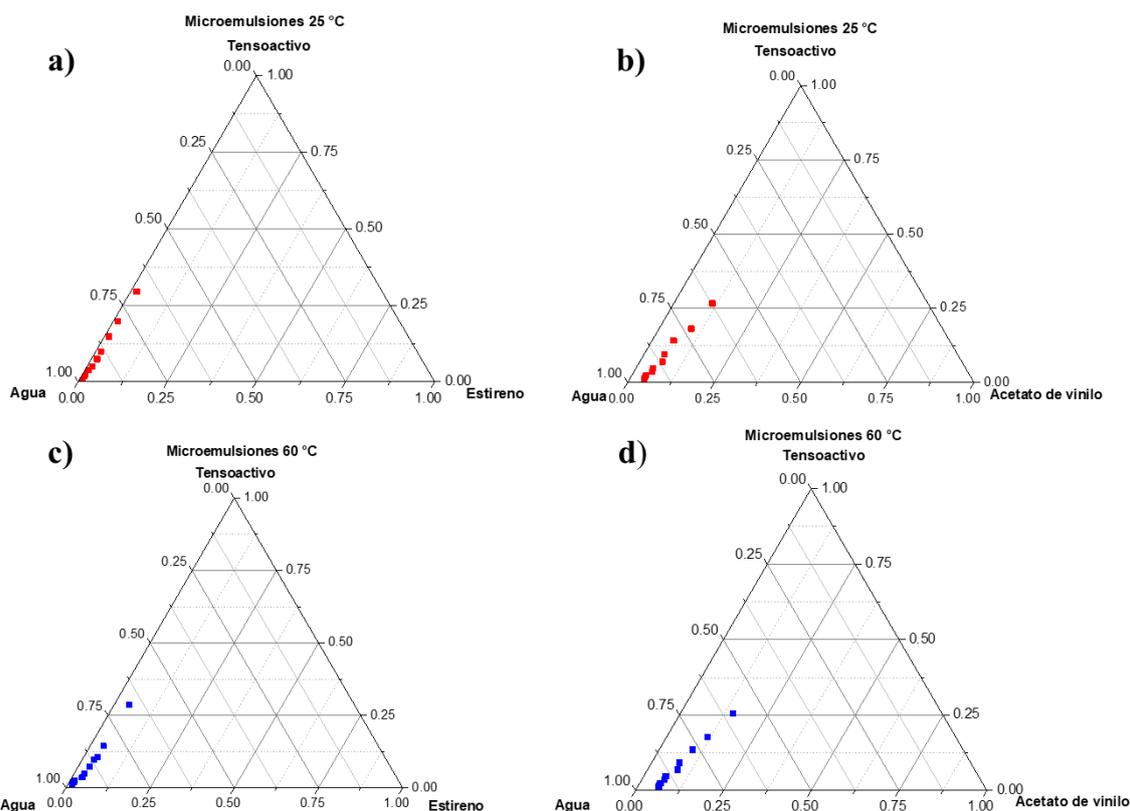


Figura 32. Diagrama parcial de fases ternario para microemulsiones a 25 °C a) St y b) VAc y a 60 °C c) St y d) VAc

Mediante el diagrama parcial de fases ternario se representó el estado de equilibrio entre las tres fases (agua-tensioactivo-monomero), que permitió el diseño de sistemas con las proporciones adecuadas de estos componentes para delimitar la región de ME.

Los resultados indicaron que la región de ME a 25 °C con St (Figura 32a) permitió la adición máxima de un 1.68 % de este monómero a una concentración máxima de C1EG® (30 %) en p/p. La región se amplió con el incremento de la temperatura a 60 °C, que permitió adicionar hasta 5.39 % en peso a la misma concentración de C1EGc (Figura 32c). Por otro lado, para las formulaciones con VAc el efecto de la temperatura de reacción incrementó, en menor medida, la región de ME con una adición máxima de 11.13 % en peso del monómero a 25 °C y 14.96 % en peso a 60 °C (Figura 32d).

En el diagrama de fases con St, se observó que a concentraciones de 5 al 30 % en peso de C1EG®, se logró una adición de monómero del 4.5 al 5.4 %, razón por la cual se optó usar la menor concentración de IL (5 % en peso) añadiendo 4 % de monómero a 60 °C. Respecto al diagrama del VAc fue más notorio el

efecto de la concentración del IL, la cual influyó en la concentración de aceptación de VAc que se añadió a la ME. Sin embargo, uno de los objetivos de este proyecto consistió en la reducción de la concentración de tensoactivo utilizado en las ME (hasta un 25 % en peso) [65], razón por la cual se optó por utilizar un 5 % en peso de C1EG® con un 6 % de VAc a 60 °C.

6.7.2 Polimerizaciones en microemulsión de estireno y acetato de vinilo

6.7.2.1 Caracterización de los látex

-Determinación de la conversión (%C), D_p , PDI, ζ y estabilidad mecánica

La mayoría de las polimerizaciones en las ME obtenidas (exceptuando la polimerización C1VAc), presentaron el llamado efecto Faraday Tyndall, característica propia de los sistemas coloidales que indica que se poseen partículas de tamaño muy pequeño [180]. En Tabla 21, se muestran las concentraciones de cada componente, los porcentajes de conversión (% C), tiempos de reacción, caracterización del tamaño de partículas, ζ y estabilidad mecánica para cada formulación realizada.

En esta tabla se puede observar que en las polimerizaciones en ME de St, se obtuvieron conversiones en un intervalo de 71.6 hasta 99.9 % y que las muestras C4St y C7St presentaron los mayores valores de conversión (99.9 y 99.8 %, respectivamente). Ambas formulaciones tuvieron como parámetros en común la cantidad de agua, C1EG®, iniciador y monómero, siendo la única variable la temperatura experimental (50 °C para C4St y 60 °C para C7St). Mediante el análisis de esta información, se pudo inferir que el incremento de la temperatura de reacción condujo a un aumento del porcentaje de conversión respecto al tiempo (Figura 33a). Para C7St, en los primeros 30 minutos de reacción se alcanzó una conversión de ~99.8 % acercándose a la conversión total, mientras que para C4St (a menor temperatura y con el mismo tiempo de reacción), solo se alcanzó a una conversión de ~82 %. Esto es debido a que el aumento de la temperatura de reacción incrementa la energía cinética de las moléculas del monómero y ocasiona un aceleramiento en la formación del polímero, además de que la constante de propagación aumenta al aumentar la temperatura. Los D_p obtenidos mediante DLS para estos sistemas son similares a lo reportado por otros investigadores ~30 nm (antes y posteriormente de las pruebas de estabilidad mecánica). Estos D_p fueron muy cercanos entre sí, debido a que ambas formulaciones contienen la misma concentración de iniciador [181].

Tabla 21. Composición real en porcentaje *p/p* de los sistemas de polimerización en microemulsión de St y VAc, porcentaje de conversión final y estabilidad mecánica de los látex

Identificación de polimerización	Temperatura °C	Concentraciones reales					% C	Tiempo (min)	\overline{pH}	$\bar{\zeta}$ (mV)	Estabilidad mecánica del látex	
		% (Tensoactivo)	% (Agua)	% (Iniciador)	% (Monómero)	D_p (nm)/ PDI					Después de la prueba de estabilidad mecánica	
C1St	50	5	92.91	0.04	2.06	86.2	150	6.39±0.15	52.59±0.86	27.4/0.054	28.7/0.080	
C2St	50	5.02	91.01	0.07	3.90	95.7	120	6.32±0.01	46.83±2.50	32.1/0.073	32.2/0.069	
C3St	60	5.02	93.13	0.04	1.82	71.6	180	6.75±0.01	63.06±1.14	23.1/0.070	24.8/0.081	
C4St	50	5.01	90.83	0.04	4.12	99.9	150	6.97±0.01	45.17±0.83	35.3/0.501	36.3/0.076	
C5St	60	5.05	91.43	0.07	3.45	96.7	10	7.30±0.01	33.59±0.62	33.5/0.062	32.4/0.059	
C6St	50	5.02	93.01	0.07	1.91	96.2	20	7.46±0.01	36.85±0.54	26.9/0.052	27.6/0.086	
C7St	60	5.03	91.05	0.04	3.88	99.8	30	7.75±0.01	48.61±4.19	34.1/0.071	34.1/0.074	
C8St	60	5.01	92.95	0.07	1.97	98.2	60	8.00±0.01	43.14±5.78	24.4/0.074	24.7/0.073	
C9St	55	5	91.93	0.05	3.02	85.4	20	7.96±0.01	60.42±7.16	31.2/0.072	31.2/0.063	
C1VAc	50	4.99	91.89	0.04	3.08	75.1	80	6.88±0.01	95.12±1.26	80.5/0.088	81.1/0.098	
C2VAc	60	5	88.83	0.07	6.11	76.8	80	6.55±0.01	39.03±0.89	127.6/0.051	129.6/0.061	
C3VAc	60	4.98	88.72	0.04	6.26	84.2	80	6.98±0.01	39.22±0.77	164.2/0.245	104.4/0.300	
C4VAc	70	4.98	88.69	0.03	6.29	53.2	80	6.65±0.02	61.30±1.99	125.5/0.077	125.9/0.134	
C5VAc	70	4.97	88.37	0.07	6.59	70.2	80	7.15±0.01	74.02±2.33	128.5/0.058	129.4/0.044	
C6VAc	70	4.99	91.84	0.07	3.10	83.8	80	7.22±0.01	45.99±0.78	138.6/0.040	134.5/0.045	
C7VAc	60	4.99	91.84	0.04	3.13	71.3	80	7.34±0.01	112.44±7.97	67.8/0.090	65.6/0.110	
C8VAc	60	5	91.98	0.07	2.95	78.8	80	7.89±0.01	114.87±4.59	94.6/0.034	95.0/0.124	
C9VAc	65	4.98	90.32	0.05	4.65	81.0	80	7.77±0.01	48.09±1.29	121.1/0.056	122.2/0.113	
C10VAc	65	4.99	90.25	0.05	4.72	82.8	80	7.48±0.01	69.75±2.73	118.4/0.081	119.2/0.221	

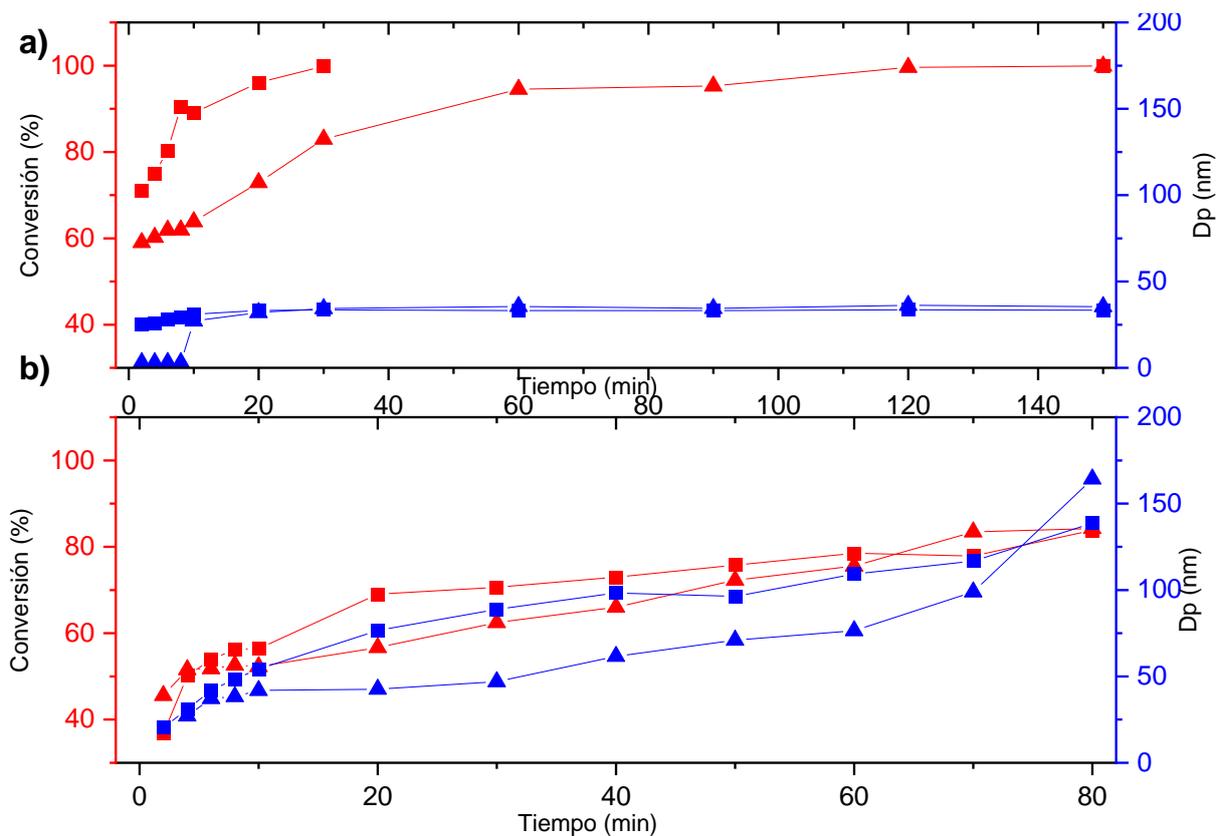


Figura 33. Diámetros promedio de partícula y porcentaje de conversión a través del tiempo, obtenidos durante las polimerizaciones en microemulsión a) ▲ %C y D_p ▲ de C4St a 50 °C y ■ %C y D_p ■ de C7St a 60 °C; b) ▲ %C y D_p ▲ de C3VAc a 60 °C y ■ %C y D_p ■ de C6VAc a 70 °C

Con respecto a las polimerizaciones con VAc, se obtuvieron porcentajes de conversión en un intervalo de 53.14 hasta 84% en un tiempo de reacción de 80 min. Las tasas de polimerización fueron menores en comparación con el St. Esto se encuentra relacionado a que el VAc (k_p : 3000 -4000 L/mol. s a 25 °C) posee mayor reactividad que el St (k_p : 120-180 L/mol. s a 25 °C), lo que le permite una aceleración en la iniciación de la polimerización.

La tasa de reacción inicialmente fue menor en C3VAc que para C6VAc, lo cual es atribuido la temperatura de reacción empleada (60 y 70 °C respectivamente), sin embargo, al término de la reacción las formulaciones con mayores porcentajes de conversión fueron C3VAc seguido de C6VAc (84 y 83% C, respectivamente) esto pudiera deberse a que C3VAc tiene mayor concentración de monómero (6.26 %) y N_p (6.833×10^{14}).

Los resultados de D_p y %C de las polimerizaciones en ME de VAc se muestran en la Figura 33b. En la figura se puede apreciar la tendencia del incremento de la conversión respecto al tiempo de reacción. Este efecto se asoció nuevamente al incremento de la temperatura de reacción, es decir, la polimerización sucedió de manera más rápida debido a una mayor temperatura lo cual puede incrementar el número de especies radicáticas. El incremento de la tasa de polimerización al aumentar la temperatura está directamente relacionado con el aumento de la constante de reacción k_p , lo cual propicia la aceleración de la polimerización.

Por otro lado, el D_p de la muestra C6VAc resultó inferior al de la muestra C3VAc (138 y 164 nm, respectivamente). Esto es atribuido a que C6VAc tiene menor concentración de monómero y por consiguiente las cadenas generadas son de menor tamaño. Adicionalmente, se observó que el incremento de la concentración de iniciador (muestra C6VAc) promueve la nucleación de las partículas, conduciendo a la obtención de D_p superiores, y con % C inferiores. Todos los valores de pH obtenidos de estas polimerizaciones se encontraron cercanos al pH neutro y los ζ superiores al +30 mV, lo que indicó que los látex obtenidos son estables [181].

-Morfología por microscopía electrónica de transmisión TEM

La morfología de las partículas y sus tamaños fueron obtenidos mediante TEM y las micrografías se muestran en la Figura 34. En esta, se puede observar una morfología esférica con formación de aglomerados y tamaños de partícula de 30.9 ± 4.62 nm para la muestra C4St (Figura 34a) y 37.7 ± 4.98 nm para C7St (Figura 34b). Nuevamente, se apreció que el incremento de la temperatura en la polimerización (C7St 60°), aumenta la reactividad de las partículas provocando la rápida generación de partículas con valores de D_p mayores. Estos valores fueron cercanos a los reportados para látex de PSt obtenidos mediante polimerizaciones en ME (~ 30 nm) [183][184]. ,

En el caso de las partículas de los látex de VAc, su morfología fue de forma irregular con aglomerados de coloración oscura y con tamaños de partícula de 115.7 ± 7.16 nm para la muestra C3VAc (Figura 34c) y 102.4 ± 9.65 nm para C6VAc (Figura 34d). En estos resultados se observó el efecto de la concentración de monómero en los tamaños finales, esto es debido a que a mayor cantidad de monómero en la polimerización (C3VAc 6.26 %) se incrementa la tasa de crecimiento del polímero.

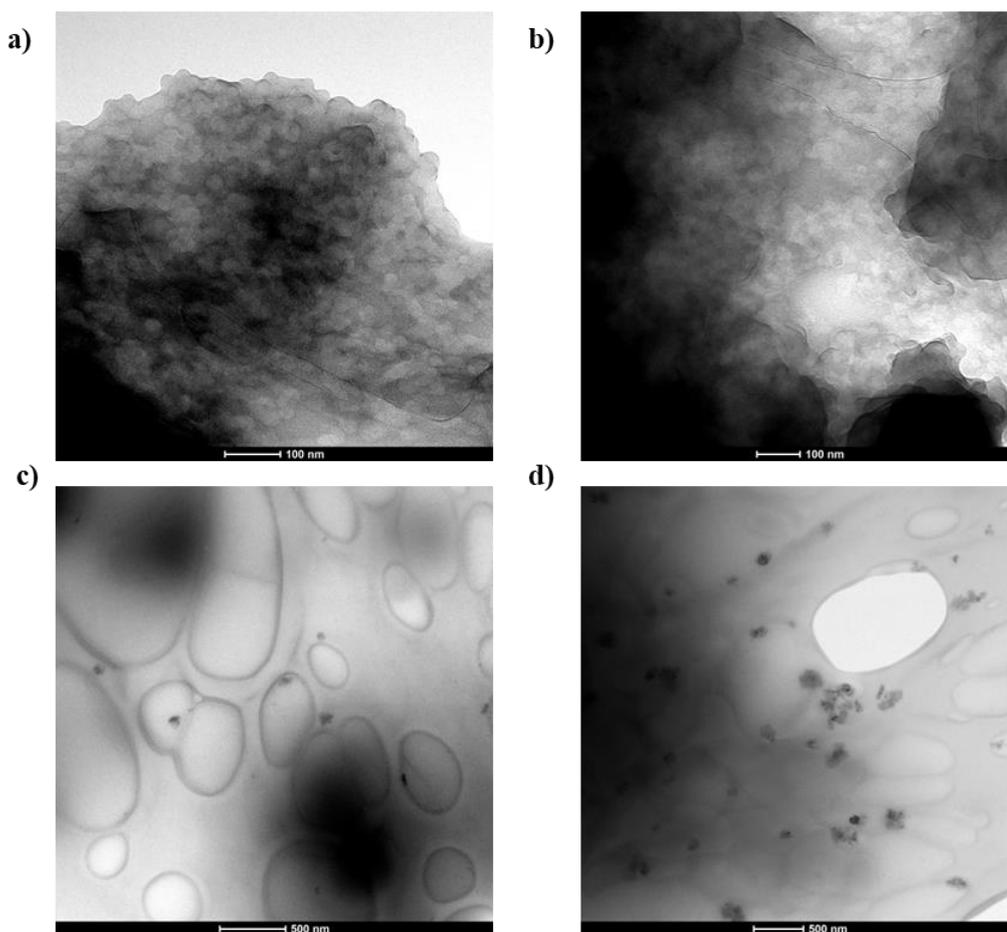


Figura 34. Micrografías de los látex obtenidas mediante TEM a) C4St, b) C7St, c) C3VAc y d) C6VAc

-Morfología por microscopía electrónica de barrido SEM

Adicionalmente, se procedió a la obtención de la morfología de las partículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las micrografías correspondientes se muestran en la Figura 35. Mediante esta técnica se pudo observar con mayor detalle la morfología de las partículas de PSt como partículas esféricas, con bordes ligeramente más claros y tamaños de 32.2 ± 3.10 para la muestra C4St (Figura 35a) y de 33.5 ± 4.51 para C7St (Figura 35b). En los resultados se presenta la tendencia de que a mayores temperaturas de polimerización se obtienen mayores D_p debido a la cinética de reacción. Mediante SEM la medición de partículas fue realizada con mayor facilidad, y los valores coinciden con los valores ya reportados para este tipo de látex (~ 30) [184].

Respecto a las micrografías de los látex de PVAc, se observó una morfología de partículas esféricas con un brillo intenso alrededor, conocido como efecto borde, el cual es producido por una gran cantidad de

electrones que penetran en mayor proporción en esta zona, con tamaños de partícula de 124.5 ± 7.68 nm para la muestra C3VAc (Figura 35c) y 105.6 ± 4.89 nm para C6VAc (Figura 35d), lo que coincidió con los resultados de TEM para estos compuestos, donde el tamaño de partícula estuvo influenciado por la concentración de monómero, por posibles efectos de nucleación.

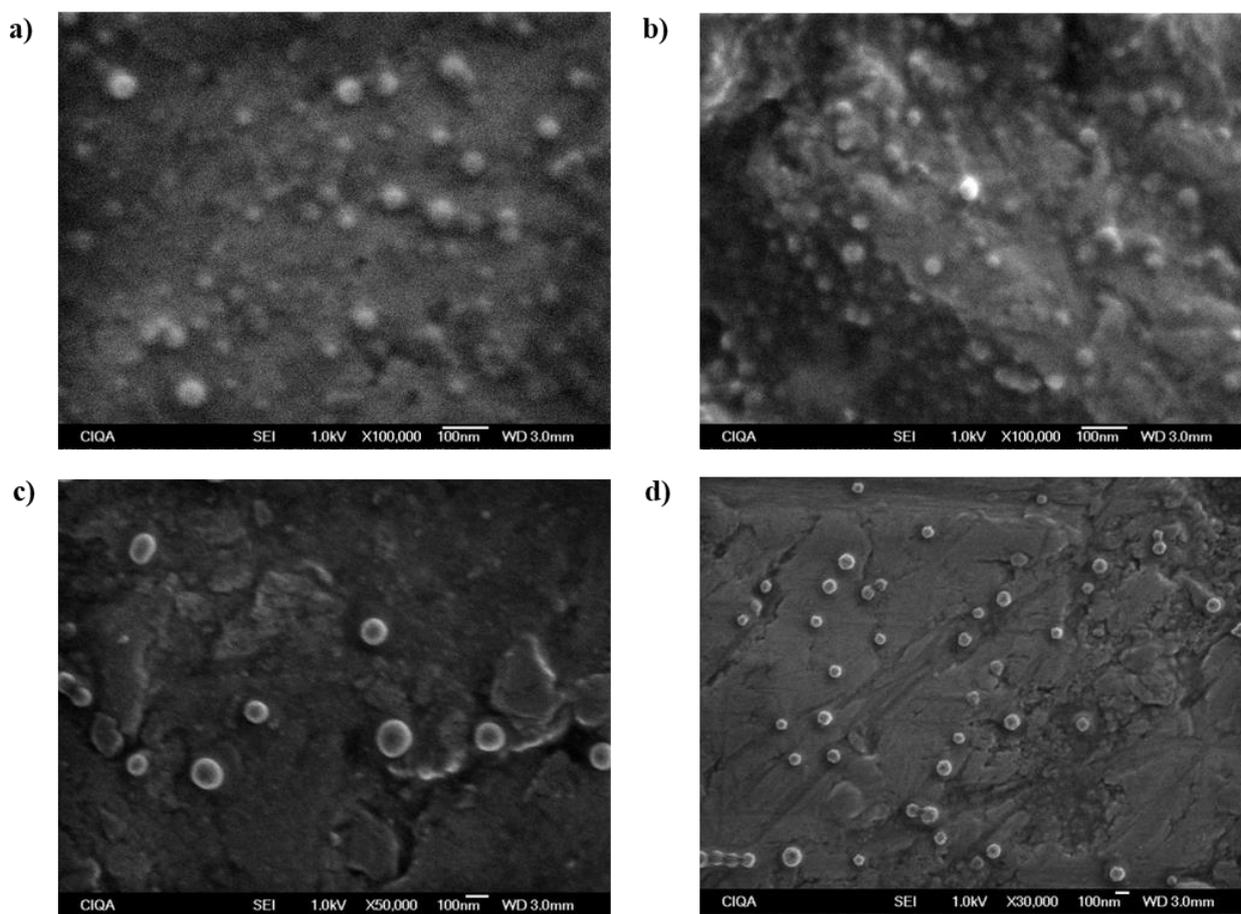


Figura 35. Micrografías de los látex obtenidas mediante SEM a) C4St 100,000X, b) C7St 100,000X, c) C3VAc 50,000X y d) C6VAc 30,000X

6.7.2.2 Caracterización de los polímeros

-Purificación de los polímeros

-Análisis estructural mediante FTIR

Mediante el análisis espectral de FTIR se identificaron los grupos funcionales de las estructuras químicas de los polímeros obtenidos. Los espectros de FTIR se muestran a continuación en la Figura 36.

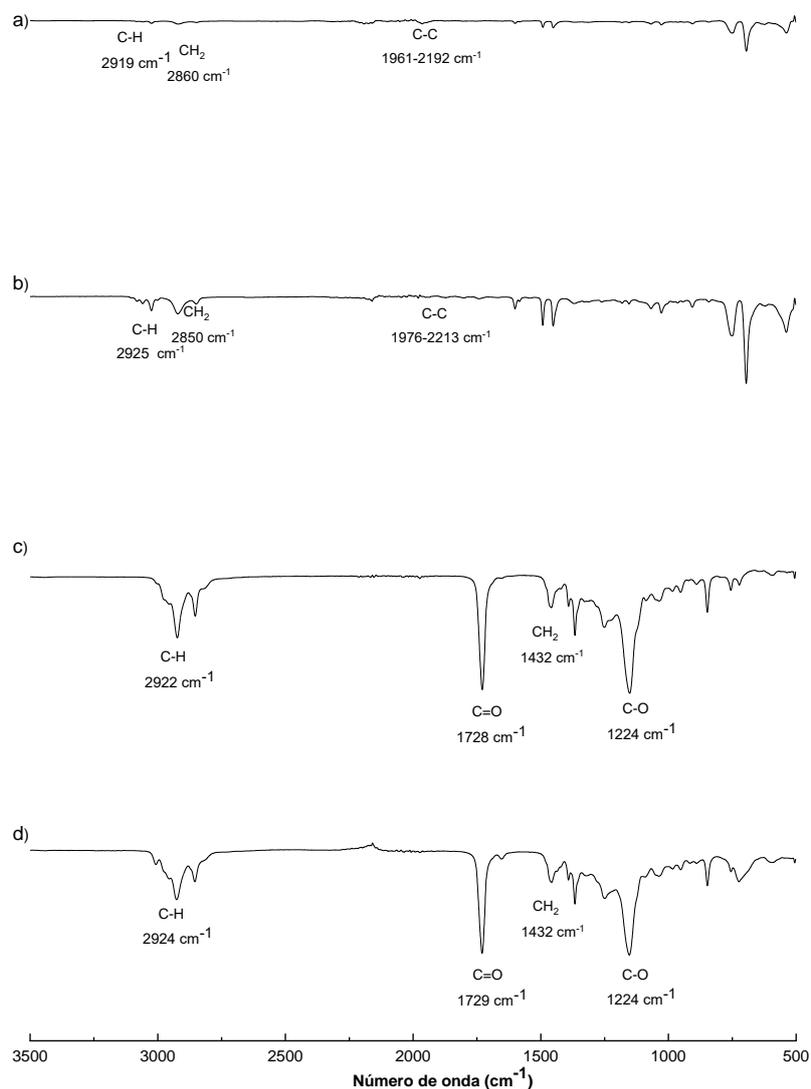


Figura 36. Espectros de FTIR de a) C7St, b) C4St, c) C6VAc y d) C3VAc (modo ATR ,25 escaneos, resolución de 4 cm^{-1})

Inicialmente, en los espectros para las muestras de poliestireno C7St (Figura 36a) y C4St (Figura 36b), se presentaron las bandas correspondientes a los estiramientos C-H en 2919 y 2925 cm^{-1} , entre 2850-2860 cm^{-1} los estiramientos de los grupos metileno (CH_2) y en un intervalo de 1961 hasta 2250 cm^{-1} los sobre tonos atribuidos a las vibraciones de los dobles enlaces aromáticos [185]. Por otro lado, las Figuras 36c y 36d corresponden a los espectros de C3VAc y C6VAc. En estos se observan alrededor de 2922 cm^{-1} la banda atribuida al estiramiento simétrico de C-H, posteriormente, alrededor de 1728 cm^{-1} se encontró el estiramiento del carbonilo C=O del éster de la molécula, seguido por una flexión de CH_2 en 1432 cm^{-1} y finalmente en 1222 cm^{-1} el estiramiento C-O, lo que coincide con lo reportado para estos polímeros [186].

-Análisis estructural mediante RMN de ^1H y ^{13}C

Mediante FTIR se dedujo que los compuestos obtenidos poseían los grupos funcionales deseados, sin embargo, se requiere la interpretación de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C como evidencia definitiva estructural y estos espectros se muestran en las Figuras 37 y 38.

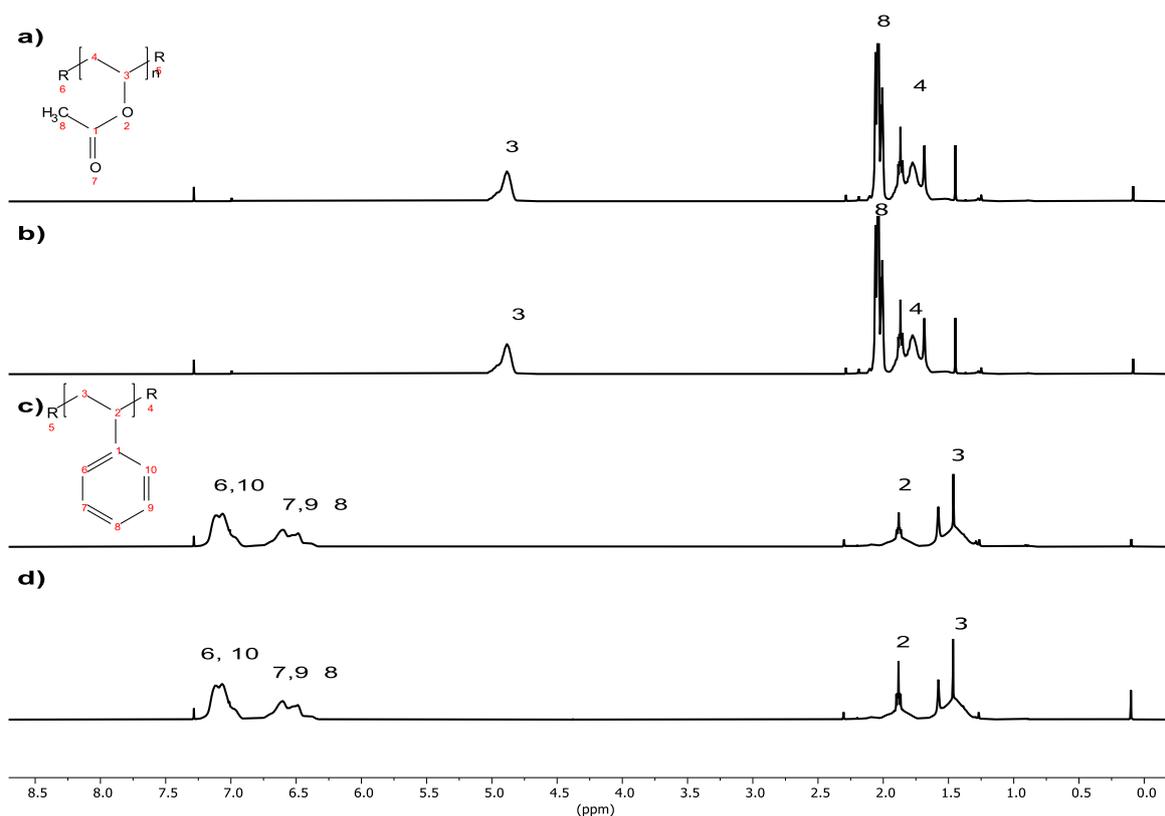


Figura 37. Espectros de RMN ^1H de a) C6VAc, b) C3VAc, c) C4St y d) C7St. Muestra de 30 mg en 1 mL de CDCl_3 a 25 °C, 400 MHz

Los espectros de RMN ^1H de los poliacetatos C6VAc y C3 VAc se muestran en las Figuras 37a y 37b respectivamente. Inicialmente, en ambos espectros se presentó una señal ancha a campo bajo en 4.90 ppm correspondiente a 1H (**3**) de la cadena alifática adyacente al éster, en 2.04 ppm se encontró el pico atribuido a los 3H (**8**) del grupo metilo del éster y en 1.77 ppm 2H (**4**) de la cadena alifática adyacente al protón (**3**) lo que coincide con los RMN de H^1 reportados para polímeros de PVAc [187].

Por otro lado, en las Figura 37c y 37d se presentan los espectros de protón de los poliestirenos C4St y C7St, respectivamente. En estos espectros se observó en 7.10 ppm 2H (**6 y 10**) en posición orto al carbono cuaternario del fenilo (**1**), en 6.55 ppm 2 H (**7 y 9**) adyacentes a los protones (**6 y 10**) en posición meta al

carbono cuaternario del fenilo (**1**), en posición para de este mismo carbono se encontró 1H (**8**) en 6.30 ppm. Adicionalmente, en 1.55 ppm se observó 1 H (**2**) de la cadena alifática en posición para al anillo fenilo y en 1.88 ppm 2H (**3**) de la cadena alifática, lo que coincide con lo publicado en otros trabajos [188].

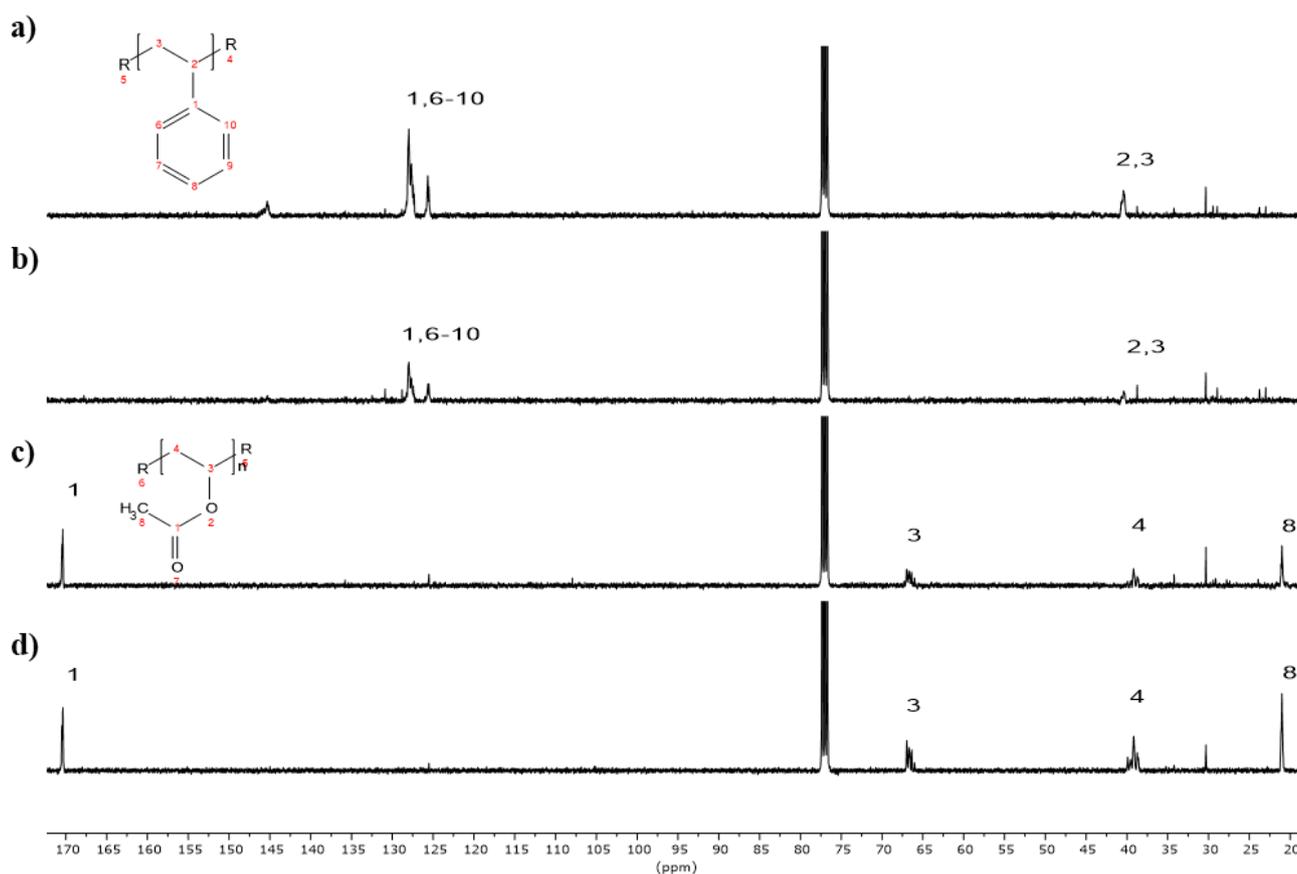


Figura 38. Espectros de RMN ^{13}C de a) C4St, b) C7St, c) C6VAc y d) C3VAc. Muestra de 30 mg en 1 mL de CDCl_3 a 25 °C, 400 MHz

En las Figuras 38a y 38b se muestran los espectros de RMN ^{13}C de C7St y C4St respectivamente. Inicialmente, en 127.64 y 125.74 ppm, se observaron los carbonos correspondientes al sistema aromático (**1, 6-10**) y en 40.71 y 40.41 ppm se encontraron los carbonos de la parte alquílica (**2 y 3**) [189]; Por otro lado, para los poliacetatos de vinilo (Figuras 38c y 38d) se presentaron señales en 170.50 ppm característicos de los carbonos del carbonilo (**1**), en 66.95 ppm el carbono del grupo metino (**3**) y en 39.41 ppm el carbono del metileno (**4**). Finalmente, a campos altos se pueden observar los carbonos de metilo (**8**) en 21.22 ppm, lo que coincide con lo esperado para estos polímeros [187].

-Peso molecular

El peso molecular de los polímeros se determinó mediante GPC y los cromatogramas correspondientes se muestran en la Figura 39 mientras que en la Tabla 22 se muestran los valores de M_n : peso molecular medio numérico, M_w : peso molecular promedio en peso, \bar{D} : M_w/M_n polidispersidad por GPC.

Tabla 22. Parámetros de cromatografía de permeación en gel

Identificación	M_n (Dalton)	M_w (Dalton)	\bar{D}
C4St	61 000	1 237 000	20.24
C7St	57 000	998 000	17.63
C3VAc	52 800	221 000	4.19
C6VAc	52 700	128 000	2.43

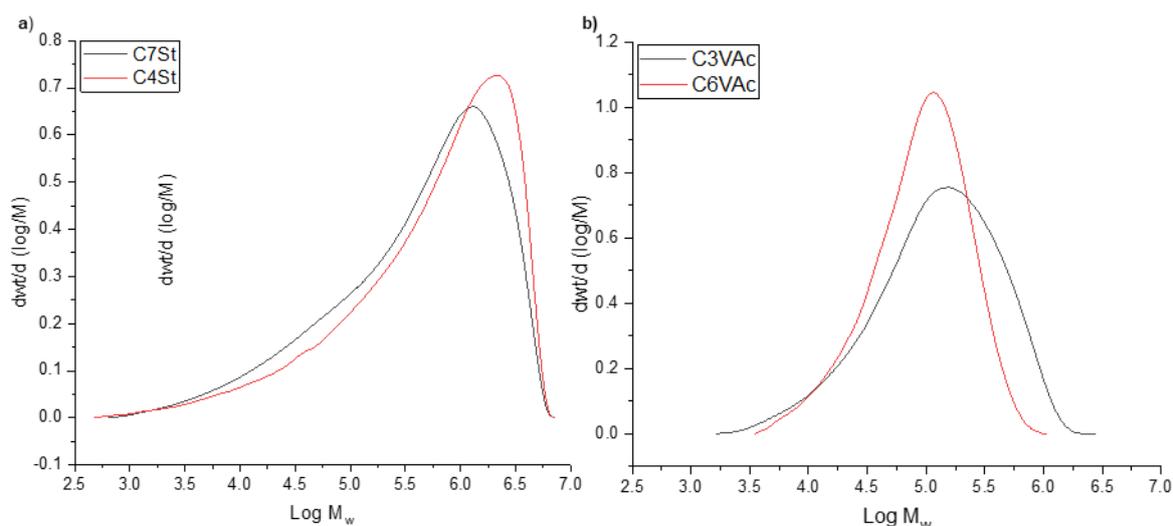


Figura 39. Cromatogramas de GPC ($\log M_w$ vs $dwt/d (\log M)$) a) C4St y C7St y b) C3VAc y C6VAc

En la Tabla 22, se aprecian elevados valores de M_w y \bar{D} amplias para las muestras C4St y C7St. Esto se debe a que en las polimerizaciones en ME hay nucleación continua que contribuye al ensanchamiento de las distribuciones de pesos moleculares [142]. En la Figura 39a se observa que la distribución de M_w tiende a una cola a bajos pesos moleculares lo cual puede correlacionarse con una nucleación tardía, en donde si las partículas continúan activas a altas conversiones, cada partícula tiene menor cantidad de monómero disponible y se disminuye la tasa de propagación, por lo cual se obtienen bajos M_w debido a que se generan cadenas de polímero cortas.

Asimismo, en la Tabla 22 se observa que a menor temperatura de reacción y a mayor tiempo de reacción (50 °C y 150 min, en el caso de C4St) se obtuvieron mayores valores de M_w , y \bar{D} , comparados con los valores obtenidos para C7St (60 °C y 30 min). Estos resultados se asocian con que al incrementarse en cinco veces el tiempo de reacción, las cadenas poliméricas incrementan su tamaño, impactando en el aumento de M_w , y \bar{D} [181]. Además, en la Tabla 22 se puede observar que para los poliestirenos las dispersidades son mayores que para el poliacetato de vinilo. Este resultado es inesperado pues otras investigaciones de polimerización en microemulsión del estireno, las polidispersidades son entre 2 y 6.9 [190], [191]. Las altas polidispersidades encontradas en esta investigación pueden deberse a interacciones entre el BS C1EG® y el estireno. El BS C1EG®, posee un carácter polar debido a que es un líquido iónico que forma dipolos. Por otro lado, el estireno tiene un momento dipolar bajo (~0.13 Debye), no posee dipolos y se considera una molécula no polar. Por lo anterior, es probable que el BS debido a su naturaleza polar no sea tan afín al estireno, razón por la cual se obtienen polidispersidades elevadas, en comparación con los resultados reportados por Gan y col. [190], [191], lo que no sucede con el VAc, debido a que es un compuesto polar que posee más grupos electronegativos y su momento dipolar se encuentra ~1.61 Debye, por otro lado se sigue que el IL C1EG® podría estar actuando como un agente de transferencia de cadena provocando las altas polidispersidades.

En los cromatogramas de la Figura 39a se representa lo dicho anteriormente acerca del PSt el cual presentó distribuciones amplias con valores de polidispersidad y M_w elevados. Evidentemente, por la forma de la curva de los cromatogramas se sabe que hay una población importante de cadenas de alto M_w (superior a 1 300 000 Da), sin embargo, se tiene una serie de poblaciones de M_w bajos, que ponderan en la fracción molar a valores inferiores[183].

Adicionalmente, se calcularon los números de partícula N_p (utilizando el D_p obtenido mediante DLS). Para las muestras de PSt, los valores fueron de $1.022E^{17}$ para C4St (D_p 35.3 nm/ M_w = 1 237 000 Da) y $1.215E^{17}$ para C7St (D_p 34.1 nm/ M_w = 998 000 Da). El M_w más bajo para la C7St se debe a que el N_p es mayor que en la C4St y la concentración de monómero es la misma pero repartido en más partículas, por lo que las cadenas crecen menos.

Por otro lado, para las muestras de C3VAc y C6VAc se obtuvieron valores de M_w de 221 000 y 128 000 Da, respectivamente. Estos resultados coinciden con lo esperado, debido a que C3VAc contiene una cantidad inferior de iniciador (0.04% p/p) por lo cual se esperarían valores mayores de M_w , debido a que hay menos iniciador reaccionando en las partículas [183]. En el caso contrario, a mayor cantidad de

iniciador (0.07 % p/p en C6VAc) se obtienen \bar{D} más estrechas (Figura 39b) y valores menores de M_w , debido a que se forman más sitios de iniciación y se obtienen polímeros con longitudes de cadena más cortas. Adicionalmente, se observó que a mayor temperatura de reacción (70 °C C6VAc) se obtuvieron menores M_w (128 000 Da) mientras que a menores temperaturas (60 °C C3VAc) mayores valores de M_w (221 000 Da), ambos polímeros con valores de \bar{D} entre 2 y 4. Estos valores se encuentran dentro de lo reportado para polimerizaciones en ME de acetato de vinilo (\bar{D} :2-7.6) [192], [193].

Por otro lado, los valores de N_p calculados resultaron ser $4.159E^{14}$ para C3VAc ($D_p = 164.2$ nm) y $6.833E^{14}$ para C6VAc ($D_p = 138.6$ nm), resultando que a mayores D_p se obtienen menores valores de N_p , esto indicó que en C6VAc se generaron mayores sitios de iniciación de reacción.

- Análisis termogravimétrico (TGA)

Las Figuras 40a y 40b muestran las curvas de pérdida de peso de los PVAc y PSt en función de la temperatura. En el caso de los PVAc, las curvas de TGA presentaron una pérdida de peso de 3.6 y 4.1 % entre 50 y 112.5 °C, atribuidas a la eliminación de compuestos volátiles como agua. Posteriormente, entre 332.0 °C (Figura 40a) y 334.6 °C (Figura 40b) se encontró una pérdida de peso alta alrededor del 68 %, correspondiente a la desacetilación de los grupos acetato de la molécula del PVAc. La siguiente pérdida para ambas muestras de PVAc fue del 8.1 y 10.9 % en peso en el intervalo de 350 a 400 °C. Esta correspondió a la descomposición del PVAc en polienos (materiales altamente insaturados por dobles enlaces conjugados) [187]. Finalmente a partir de los 400 °C, se presentaron pérdidas de peso inferiores a 19.8 % atribuidas a la descomposición por rompimiento de cadena de los polienos [187].

Con respecto a los C4St y C7St representados en las Figuras 40c y 40d, estos presentaron una pérdida en el intervalo de temperatura de 165 a 425 °C al ~99.9 % en peso del PSt puro, atribuida a la degradación de las cadenas poliméricas del PSt al convertirse en estireno volátil. Finalmente, se consumió todo el material por encima de 426 °C [194].

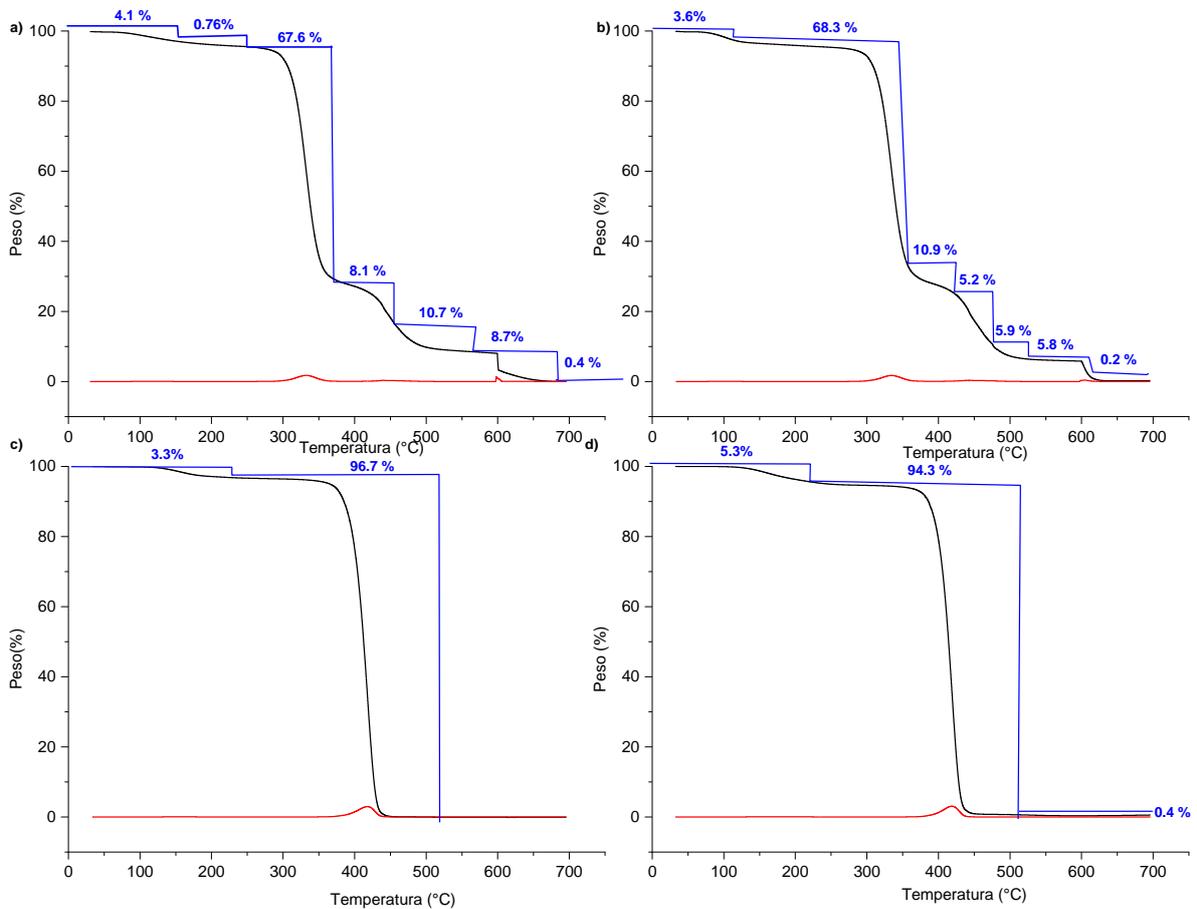


Figura 40. Curvas de TGA a) C3VAc, b)C6VAc, c) C4St y d) C7St

- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La técnica de DSC permitió obtener la temperatura de transición vítrea (T_g), esta consiste en medir la temperatura a la cual el polímero pasa de un estado rígido o vítreo, a un estado flexible o gomoso, lo que influye en las propiedades mecánicas y físicas y en las posibles aplicaciones del polímero. Los termogramas obtenidos se muestran en la Figura 41.

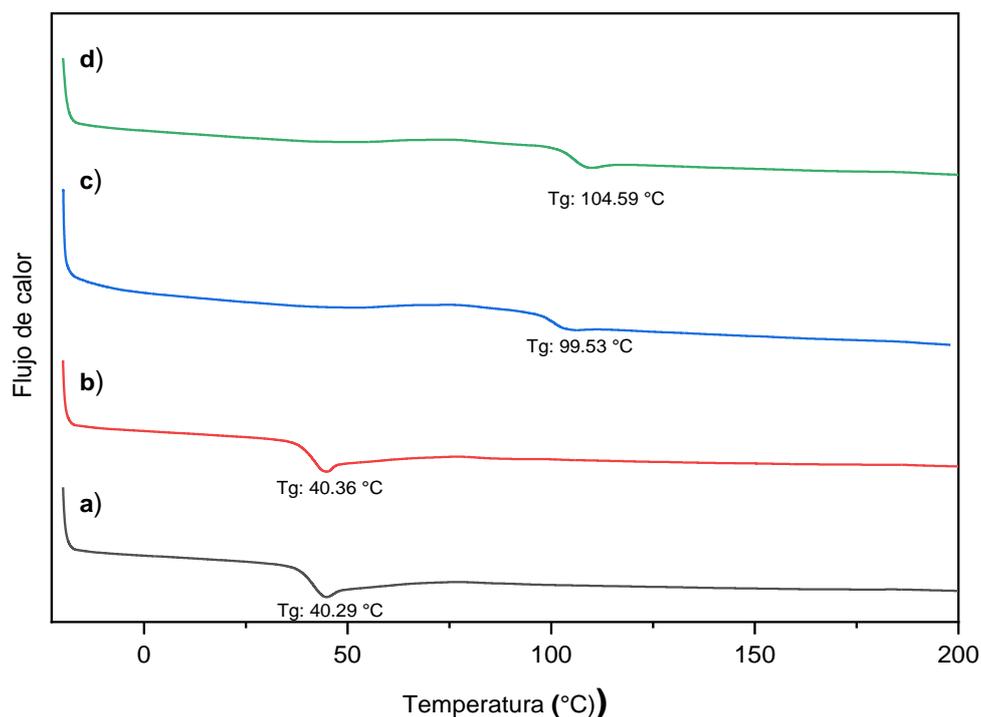


Figura 41. Termogramas de DSC a) C3VAc, b) C6VAc, c) C7St y d) C4St

En las Figuras 41a y 41b se pudo observar que los C3VAc y C6VAc presentan Tg de 40.29 y 40.36 °C, respectivamente. Esto indica que, a temperaturas inferiores a los 40 °C, el PVAc se presentará en su estado vítreo, siendo más rígido y quebradizo, y al acercarse a los 40 °C su apariencia cambiará a un estado flexible y gomoso, provocado por el aumento del movimiento molecular de las cadenas de polímero. Estos resultados concuerdan con lo reportado para estos polímeros en la literatura, ~38 °C[195]. Adicionalmente, los valores de Tg encontrados para C7St fue de 99.5 °C (Figura 41c) y C4St de 104.6 °C (Figura 41d). Ambos valores se encontraron en el intervalo reportado para los poliestirenos (~100 °C) [196][197].

-Análisis dinámico mecánico (DMA)

Mediante DMA se determina el comportamiento viscoelástico de los polímeros. La prueba consiste en aplicar una fuerza o tensión directamente sobre una muestra, a una frecuencia y temperatura determinada [198]. En la Figura 42 se presentan los gráficos de DMA representativos para los polímeros obtenidos.

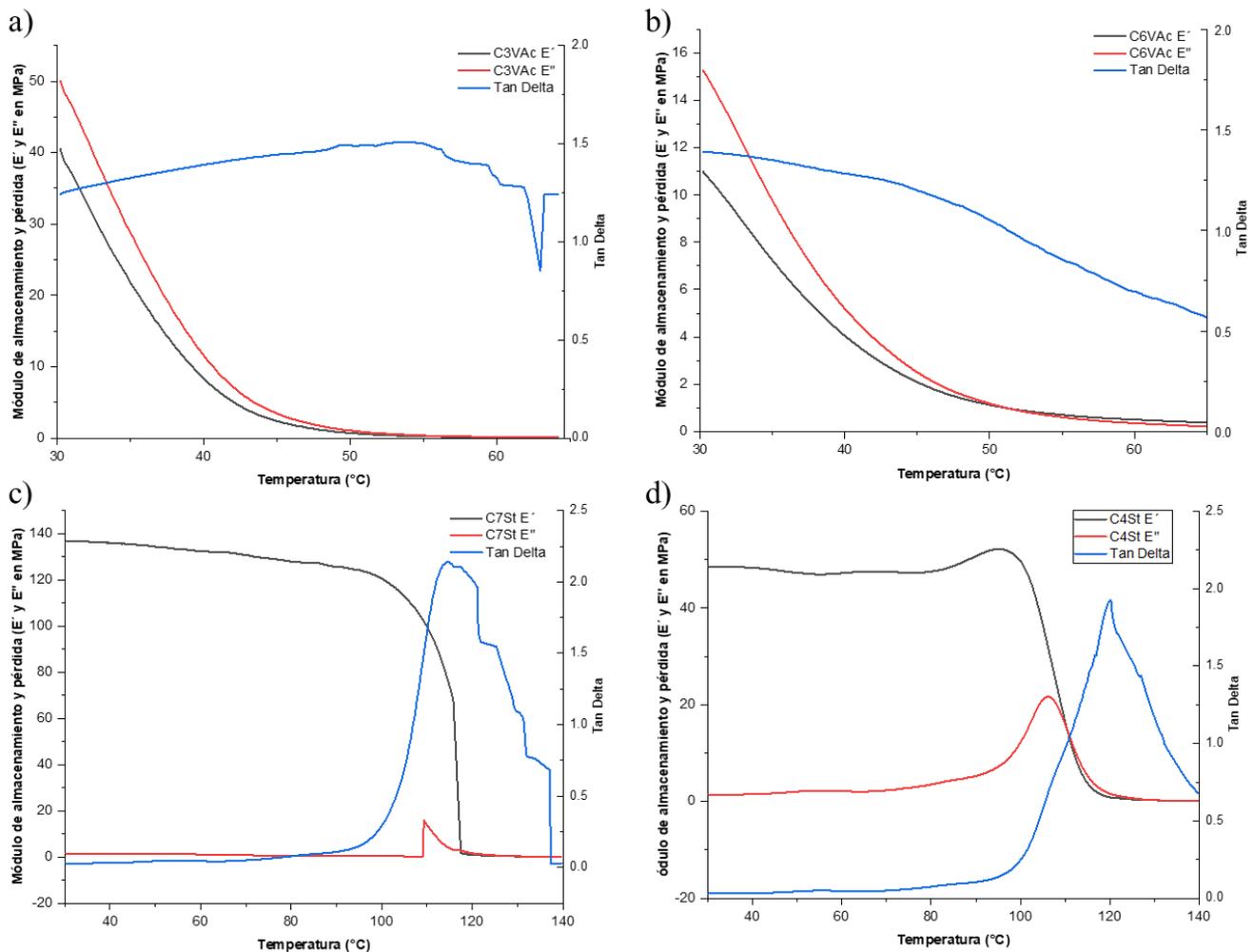


Figura 42. Curvas de DMA de relación entre el E' módulo de pérdida y E'' módulo de almacenamiento a) C3VAc, b) C6VAc, c) C7St y d) C4St

La Figura 42a corresponde al C3VAc y la Figura 42b al C6VAc en ambos casos se observó que el módulo de pérdida (E'') es cercano a la T_g del PVAc $\sim 40^\circ\text{C}$ [195], pasando de su estado vítreo a gomoso al incrementar la temperatura, E'' comienza a disminuir (pendiente negativa) debido a la pérdida de energía y a las relajaciones de corto alcance de las cadenas.

El módulo de almacenamiento (E') para C3VAc fue de 50.4 MPa y 49.50 MPa para C6VAc, lo que indica que los materiales son rígidos y tiene una alta resistencia a la deformación elástica. Los E'' relacionan el comportamiento viscoso de un polímero con la energía que pierden al someterse a la tensión dinámica. Estos resultados indicaron que se requieren mayores temperaturas para deformar C6VAc comparadas con C3VAc. La $\text{Tan } \delta$ obtenida mediante DMA corresponde a el valor de T_g de estos compuestos, resultando

de 55.07 °C (C3VAc en película con espesor de 0.31 mm) y 62.82 °C (C6VAc en película con espesor de 0.36 mm) [198]. Las diferencias entre las Tg obtenidas mediante DSC y DMA, pueden ser atribuidas al espesor de la película, debido a que a menor espesor se obtienen menores Tg, [199], [200] además del tipo de técnica, DMA se considera la más sensible a movimientos débiles ocasionadas por los segmentos de las cadenas de polímero [201], [202].

Por otro lado, en las Figuras 42c y 42d se muestran los gráficos de DMA para C7St y C4St respectivamente; estos gráficos siguieron la misma tendencia, el E' es mayor en C4St (99.71MPa/ M_w : 1 237 000) que en C7St (95.53 MPa/ M_w : 998 000). Estos polímeros presentaron una E'' de 106.34 MPa (C4St) y 109.78 MPa (C7St) siendo este último el que requirió de menor temperatura para su deformación, presentando características de un polímero rígido, con una capacidad limitada para disipar energía en forma de calor en ciclos de deformación. Adicionalmente, las Tg obtenidas mediante la Tan δ fueron de 116.75 °C y 120.15 °C para C7St (película con espesor de 0.27 mm) y C4St (película con espesor de 0.28 mm), respectivamente, siguiendo la relación de que a mayor valor de M_w y espesor de película se obtienen valores más altos de Tg [199]. También, se sugiere que los desplazamientos de las Tg obtenidas mediante DMA podrían atribuirse a la presencia de algún disolvente residual en la película [203], [204].

7. CONCLUSIONES

Con base en los hallazgos experimentales presentados en este trabajo, se desarrollaron exitosamente NDP basados en ME normales formuladas con AE y BS, con un recubrimiento biopolimérico de CS y/o CS-FA sobre las gotitas de ME, con propiedades fisicoquímicas adecuadas para la administración dirigida y liberación controlada de fármacos anticancerígenos.

Se logró la conjugación química entre el CS y el FA a través de una reacción de amidación. Las caracterizaciones mediante FTIR de CS, RMN ^1H y DRX confirmaron el injerto del FA en el CS. Los resultados obtenidos demostraron la idoneidad del CS y el CS-FA para su uso en liberación de fármacos.

Se sintetizaron tres BS dianiónicos y se determinó que los valores de CMC fueron menores en comparación con otros tensoactivos convencionales. Además, se estimó la cantidad de moléculas de tensoactivo contenidas en una micela (N_{agg}), su tipo de empaquetamiento micelar y viabilidad celular en líneas celulares de A549 y MDA-MB-231. Los BS mostraron capacidad para la formación de micelas esféricas, con baja o nula citotoxicidad, clasificándolos como compuestos bioseguros para aplicaciones biomédicas. Se recomienda realizar la evaluación de viabilidad celular de estos tensoactivos mediante otros ensayos con mayor sensibilidad como MTT.

La sustitución de los BS sintetizados por los BS catiónicos comerciales T2EG® y C1EG® permitió la obtención de ME normales con AcM como vehículo del fármaco anticancerígeno PTX, aumentando considerablemente la solubilidad de este. A partir de las ME se formularon los NDP con coraza biopolimérica de CS y/o CS-FA con respuesta al pH del ambiente tumoral. Se demostró que se logró recubrir las gotitas de ME y conferirles propiedades favorables para utilizarse como terapia dirigida contra células cancerosas MDA-MB-231 y A549, mostrando en esta línea celular el efecto sinérgico entre el PTX y el AcM. Se recomienda realizar la evaluación de viabilidad celular de estos dispositivos mediante otros ensayos (MTT o XTT).

Los perfiles de liberación de los NDP demostraron que su mecanismo de liberación es Fickiana con ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, adecuado para describir la liberación prolongada de los agentes bioactivos en condiciones de pH bajos, similares al ambiente tumoral.

Fue posible la polimerización en ME de los monómeros de St (2- 4 % p/p) y VAc (3-6 % p/p) utilizando el iniciador V50 y bajas concentraciones del BS C1EG® (5 % p/p) como agente estabilizador.

Los látex de PSt y PVAc presentaron pH cercanos al neutro, así como valores de ζ entre 39-114 mV y $D_p < 164$ nm. Se confirmó la síntesis de los polímeros mediante FTIR y RMN. Los PSt presentaron $M_w \sim 1 \times 10^6$ Da con $T_g \sim 104$ °C y los PVAc $M_w \sim 2 \times 10^5$ Da con $T_g \sim 40$ °C. Las dispersidades de los polímeros fueron < 4 para los PVAc y < 20 en el caso del PSt, por lo cual se requiere investigación adicional para explicar las dispersidades excepcionalmente elevadas encontradas en este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] M. Arshad, M. Zubair, S. S. Rahman, and A. Ullah, *Polymers for advanced applications*. Elsevier Inc., 2020. doi: 10.1016/b978-0-12-816806-6.00014-5.
- [2] P. Chanphai, V. Konka, and H. A. Tajmir-Riahi, “Folic acid–chitosan conjugation: A new drug delivery tool,” *J. Mol. Liq.*, vol. 238, pp. 155–159, 2017, doi: 10.1016/j.molliq.2017.04.132.
- [3] D. S. Silva, A. Almeida, F. Prezotti, B. Cury, S. P. Campana-Filho, and B. Sarmento, “Synthesis and characterization of 3,6-O,O’- dimyristoyl chitosan micelles for oral delivery of paclitaxel,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 152, pp. 220–228, 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.029.
- [4] E. Calzoni, A. Cesaretti, A. Polchi, A. Di Michele, B. Tancini, and C. Emiliani, “Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–15, 2019, doi: 10.3390/jfb10010004.
- [5] L. Li *et al.*, “Amphiphilic polymeric micelles based on deoxycholic acid and folic acid modified chitosan for the delivery of paclitaxel,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 10, 2018, doi: 10.3390/ijms19103132.
- [6] S. E. Flores-Villaseñor, R. D. Peralta-Rodríguez, F. Padilla-Vaca, H. I. Meléndez-Ortiz, J. C. Ramirez-Contreras, and B. Franco, “Preparation of peppermint oil-based nanodevices loaded with paclitaxel: Cytotoxic and apoptosis studies in hela cells,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 20, no. 5, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1208/s12249-019-1399-7.
- [7] R. S. Kalthapure and K. G. Akamanchi, “Synthesis, characterization and cytotoxicity evaluation of an oleic acid derived novel bicephalous dianionic surfactant,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 18, no. 3, pp. 537–545, 2015, doi: 10.1007/s11743-015-1678-6.
- [8] H. H. M. San *et al.*, “Folic Acid-Grafted Chitosan-Alginate Nanocapsules as Effective Targeted Nanocarriers for Delivery of Turmeric Oil for Breast Cancer Therapy,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 1, p. 110, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics15010110.
- [9] A. George, M. R. Sanjay, R. Srisuk, J. Parameswaranpillai, and S. Siengchin, “A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 154, pp. 329–338, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120.

- [10] R. Singh, S. Gautam, B. Sharma, and P. Jain, *Chapter 2 - Biopolymers and their classifications*. Elsevier Inc., 2021. doi: 10.1016/B978-0-12-819240-5.00002-X.
- [11] K. Varma and S. Gopi, *Chapter 7 - Biopolymers and their role in medicinal and pharmaceutical applications*. Elsevier Inc., 2021. doi: 10.1016/B978-0-12-819240-5.00007-9.
- [12] R. Song, M. Murphy, C. Li, K. Ting, C. Soo, and Z. Zheng, “Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications,” *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 12, pp. 3117–3145, 2018, doi: 10.2147/DDDT.S165440.
- [13] M. Rojas, B. Vallejo, and J. Perilla, “Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico Biopolymers as materials for developing products in pharmaceutical applications and biomedical uses,” *Rev. Ing. e Investig.*, vol. 28, no. 1, pp. 57–71, 2008.
- [14] J. Kumirska *et al.*, “Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan,” *Mar. Drugs*, vol. 8, pp. 1567–1636, 2010, doi: 10.3390/md8051567.
- [15] S. Park, E. Lih, K. Park, Y. Ki, and D. Keun, “Progress in Polymer Science Biopolymer-based functional composites for medical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 68, pp. 77–105, 2017, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2016.12.003.
- [16] N. A. Pattanashetti, G. B. Heggannavar, and M. Y. Kariduraganavar, “Smart Biopolymers and Their Biomedical Applications,” *Procedia Manuf.*, vol. 12, no. December 2016, pp. 263–279, 2017, doi: 10.1016/j.promfg.2017.08.030.
- [17] M. K. Ali, R. M. Moshikur, and M. Goto, *Surface-Active Ionic Liquids for Medical and Pharmaceutical Applications*. 2021. doi: 10.1007/978-981-16-4365-1_9.
- [18] A. Detsi *et al.*, “Nanosystems for the encapsulation of natural products: The case of chitosan biopolymer as a matrix,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7, pp. 1–68, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12070669.
- [19] L. F. Alzate, R. A. Cuervo, and M. E. Valencia, “Extracción y caracterización de quitosano fúngico experimental y comercial, como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos,” *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 16, no. 2, pp. 112–124, 2015.
- [20] C. Barrera- Martínez, F. Padilla- Vaca, I. Liankos, and R. Meléndez- Ortiz, HI. Cortez- Mazatan,

- G. Peralta- Rodríguez, “Chitosan microparticles as entrapment system for trans-cinnamaldehyde: Synthesis, drug loading, and in vitro cytotoxicity evaluation,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 9, no. March, pp. 1–7, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.188>.
- [21] D. Zhou, D. Xie, F. He, B. Song, and D. Hu, “Antiviral properties and interaction of novel chalcone derivatives containing a purine and benzenesulfonamide moiety,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 28, no. 11, pp. 2091–2097, 2018, doi: [10.1016/j.bmcl.2018.04.042](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.042).
- [22] T. Haponiuk, S. Thomas, S. Gopi, and J. Jacob, “Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review,” *Mater. Today Chem.*, vol. 9, pp. 43–55, 2018, doi: [10.1016/j.mtchem.2018.05.002](https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.002).
- [23] M. M. Silva, R. Calado, J. Marto, A. Bettencourt, A. J. Almeida, and L. M. D. Gonçalves, “Chitosan nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery system for ocular administration,” *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 12, pp. 1–16, 2017, doi: [10.3390/md15120370](https://doi.org/10.3390/md15120370).
- [24] M. Melo, M. Cerqueira, I. Mello, M. Macedo, J. Aparecida, and M. Duarte, “Evaluation of single-point equations to determine intrinsic viscosity of sodium alginate and chitosan with high deacetylation degree,” *Polym. Test.*, vol. 63, pp. 427–433, 2017, doi: [10.1016/j.polymertesting.2017.09.003](https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.09.003).
- [25] A. Ali and S. Ahmed, “A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, pp. 273–286, 2018, doi: [10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078).
- [26] M. Rinaudo, “Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials,” *Polym Int*, vol. 55, pp. 961–969, 2006, doi: [10.1002/pi](https://doi.org/10.1002/pi).
- [27] S. Raveendran, A. K. Rochani, T. Maekawa, and D. S. Kumar, “Smart carriers and nanohealers: A nanomedical insight on natural polymers,” *Materials (Basel)*, vol. 10, no. 8, 2017, doi: [10.3390/ma10080929](https://doi.org/10.3390/ma10080929).
- [28] P. Yassue *et al.*, “Chitosan-based nanocomposites for drug delivery,” *Appl. Nanocomposite Mater. Drug Deliv.*, pp. 1–26, 2018, doi: [10.1016/B978-0-12-813741-3.00001-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813741-3.00001-7).
- [29] M. A. Mohammed, J. T. M. Syeda, K. M. Wasan, and E. K. Wasan, “An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery,” *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 4, 2017, doi: [10.3390/pharmaceutics9040053](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053).

- [30] S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal, and E. Capanoglu, "Guidelines for cell viability assays," *Food Front.*, vol. 1, no. 3, pp. 332–349, 2020, doi: 10.1002/fft2.44.
- [31] Ö. S. Aslantürk, "In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages," *Genotoxicity - A Predict. Risk to Our Actual World*, pp. 1–18, 2018, doi: 10.5772/intechopen.71923.
- [32] I. Beeby, E. Magalhães, M. Poças, J. Collins, T. Lemos, M. Barros, L. Ferreira, L. Cabral, C. Pires, "Secondary metabolites (essential oils) from sand-dune plants induce cytotoxic effects in cancer cells," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 258, p. 112803, 2020, doi: 10.1016/j.jep.2020.112803.
- [33] M. H. Alkhatib, W. A. Al-otaibi, and A. Noor, "Chemico-Biological Interactions Antineoplastic activity of mitomycin C formulated in nanoemulsions-based essential oils on HeLa cervical cancer cells," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 291, no. March, pp. 72–80, 2018, doi: 10.1016/j.cbi.2018.06.009.
- [34] A. G. Waks and E. P. Winer, "Breast Cancer Treatment: A Review," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 321, no. 3, pp. 288–300, 2019, doi: 10.1001/jama.2018.19323.
- [35] S. Nussbaumer, P. Bonnabry, J. L. Veuthey, and S. Fleury-Souverain, "Analysis of anticancer drugs: A review," *Talanta*, vol. 85, no. 5, pp. 2265–2289, 2011, doi: 10.1016/j.talanta.2011.08.034.
- [36] K. Blowman, M. Magalhães, and M. F. L. Lemos, "Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products," *Hindawi*, 2018, doi: <https://doi.org/10.1155/2018/3149362>.
- [37] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, and A. Sparreboom, "Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation," *Eur. J. Cancer* 37, vol. 37, pp. 1590–1598, 2001, doi: 10.1016/s0959-8049(01)00171-x.
- [38] E. Ruel *et al.*, "A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 57, pp. 53–63, 2004, doi: 10.1016/S0939-6411(03)00095-X.
- [39] A. Jain and S. K. Jain, "In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 35, no. 5, pp. 404–416, 2008, doi: 10.1016/j.ejps.2008.08.008.
- [40] A. Jain, S. K. Jain, N. Ganesh, J. Barve, and A. M. Beg, "Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 179–190, 2010, doi:

10.1016/j.nano.2009.03.002.

- [41] Li. X; Kong. X; Zhang.J; Wang. Y; Wang. Y; Shi. S; Guo. G; Luo. F; Zhao.X; Wei. Y; Qian.Z;,, “A Novel Composite Hydrogel Based on Chitosan and Inorganic Phosphate for Local Drug Delivery of Camptothecin Nanocolloids,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 7, pp. 2271–2280, 2012, doi: 10.1002/jps.
- [42] J. L. Arias, L. H. Reddy, and P. Couvreur, “Fe 3O 4/chitosan nanocomposite for magnetic drug targeting to cancer,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 15, pp. 7622–7632, 2012, doi: 10.1039/c2jm15339d.
- [43] S. Bano, M. Afzal, M. M. Waraich, K. Alamgir, and S. Nazir, “Paclitaxel loaded magnetic nanocomposites with folate modified chitosan/carboxymethyl surface; a vehicle for imaging and targeted drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 513, no. 1–2, pp. 554–563, 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.051.
- [44] A. Khdair *et al.*, “Modified-chitosan nanoparticles: Novel drug delivery systems improve oral bioavailability of doxorubicin,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 93, pp. 38–44, 2016, doi: 10.1016/j.ejps.2016.07.012.
- [45] X. Cheng, X. Zeng, Y. Zheng, X. Wang, and R. Tang, “Surface-fluorinated and pH-sensitive carboxymethyl chitosan nanoparticles to overcome biological barriers for improved drug delivery in vivo,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 208, pp. 59–69, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.063.
- [46] P. Balan, J. Indrakumar, P. Murali, and P. S. Korrapati, “Bi-faceted delivery of phytochemicals through chitosan nanoparticles impregnated nanofibers for cancer therapeutics,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 142, pp. 201–211, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.093.
- [47] D. V. Giacone *et al.*, “Effect of nanoemulsion modification with chitosan and sodium alginate on the topical delivery and efficacy of the cytotoxic agent piplartine in 2D and 3D skin cancer models,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 165, pp. 1055–1065, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.167.
- [48] Y. Q. Miao *et al.*, “Chitosan oligosaccharide modified liposomes enhance lung cancer delivery of paclitaxel,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 42, no. 10, pp. 1714–1722, 2021, doi: 10.1038/s41401-020-00594-0.
- [49] S. J. Sun, P. Deng, C. E. Peng, H. Y. Ji, L. F. Mao, and L. Z. Peng, “Selenium-Modified Chitosan

Induces HepG2 Cell Apoptosis and Differential Protein Analysis,” *Cancer Manag. Res.*, vol. 14, pp. 3335–3345, 2022, doi: 10.2147/CMAR.S382546.

- [50] I. D. Zlotnikov, D. A. Streltsov, A. A. Ezhov, and E. V. Kudryashova, “Smart pH- and Temperature-Sensitive Micelles Based on Chitosan Grafted with Fatty Acids to Increase the Efficiency and Selectivity of Doxorubicin and Its Adjuvant Regarding the Tumor Cells,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 4, 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15041135.
- [51] B. S. Dash, Y. J. Lu, Y. S. Huang, and J. P. Chen, “Chitosan-coated magnetic graphene oxide for targeted delivery of doxorubicin as a nanomedicine approach to treat glioblastoma,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 260, no. P1, p. 129401, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129401.
- [52] F. Ma *et al.*, “Effects of Folic Acid and Vitamin B12, Alone and in Combination on Cognitive Function and Inflammatory Factors in the Elderly with Mild Cognitive Impairment: A Single-blind Experimental Design,” *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 16, pp. 622–632, 2019, doi: 10.2174/1567205016666190725144629.
- [53] N. Amiryaghoubi *et al.*, “Smart chitosan–folate hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin to osteosarcoma cells,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 220, no. October, p. 112911, 2022, doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.112911.
- [54] Y. Zhao *et al.*, “Dexamethasone Pretreatment Potentiates a Folic Acid-Functionalized Delivery System for Enhanced Lung Cancer Therapy,” *Mol. Pharm.*, 2024, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00472.
- [55] M. Arteché Pujana, L. Pérez-Alvarez, L. C. Cesteros Iturbe, and I. Katime, “pH-sensitive chitosan–folate nanogels crosslinked with biocompatible dicarboxylic acids,” *Eur. Polym. J.*, vol. 61, pp. 215–225, 2014, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.10.007.
- [56] R. K. Salar and N. Kumar, “Synthesis and characterization of vincristine loaded folic acid–chitosan conjugated nanoparticles,” *Resour. Technol.*, vol. 2, no. 4, pp. 199–214, 2016, doi: 10.1016/j.reffit.2016.10.006.
- [57] H. R. Naghibi Beidokhti, R. Ghaffarzadegan, S. Mirzakhanelouei, L. Ghazizadeh, and F. A. Dorkoosh, “Preparation, Characterization, and Optimization of Folic Acid-Chitosan-Methotrexate Core-Shell Nanoparticles by Box-Behnken Design for Tumor-Targeted Drug Delivery,” *AAPS*

PharmSciTech, vol. 18, no. 1, pp. 115–129, 2017, doi: 10.1208/s12249-015-0445-3.

- [58] T. P. Hoar and J. . Schulman, “Transparent water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle,” *Nature*, 1943, doi: 10.1038/152102a0.
- [59] J. Schulman, W. Stoeckenius, and L. Prince, “Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy,” *Struct. micro Emuls. by electron Microsc.*, pp. 1677–1680, 1959, doi: <https://doi.org/10.1021/j150580a027>.
- [60] D. Díaz-Zepeda, R. D. Peralta-Rodríguez, B. Puente-Urbina, G. Cortez-Mazatan, and H. I. Meléndez-Ortiz, “pH responsive chitosan-coated microemulsions as drug delivery systems,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1080/00914037.2020.1857761.
- [61] B. Kumari and K. Kesavan, “Effect of chitosan coating on microemulsion for effective dermal clotrimazole delivery,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 22, no. 4, pp. 617–626, 2017, doi: 10.1080/10837450.2016.1230629.
- [62] K. Kesavan, S. Kant, P. N. Singh, and J. K. Pandit, “Mucoadhesive chitosan-coated cationic microemulsion of dexamethasone for ocular delivery: In vitro and in vivo evaluation,” *Curr. Eye Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 342–352, 2013, doi: 10.3109/02713683.2012.745879.
- [63] E. B. Souto, A. Cano, C. Martins-Gomes, T. E. Coutinho, A. Zielińska, and A. M. Silva, “Microemulsions and Nanoemulsions in Skin Drug Delivery,” *Bioengineering*, vol. 9, no. 4, pp. 1–22, 2022, doi: 10.3390/bioengineering9040158.
- [64] R. D. Peralta-Rodríguez, S. E. Flores-Villaseñor, J. C. Ramirez-Contreras, D. R. de Araujo, and T. Rodrigues, “Formation, Stability and Cytotoxicity of Precursor Microemulsions to Prepare Core-Shell Polymeric Nanoparticles for Pharmaceutical Applications,” *Macromol. Symp.*, vol. 374, no. 1, pp. 1–6, 2017, doi: 10.1002/masy.201600129.
- [65] S. Flores, M. Rial-Hermida, J. Ramirez, A. Pazos, A. Concheiro, and R. Alvarez-Lorenzo, C. Peralta, “Microemulsions for Colorectal Cancer Treatments. General Considerations and Formulation of Methotrexate,” *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 16, pp. 498–508, 2016, doi: 10.2174/1389557515666150909142920.
- [66] S. Madhav and D. Gupta, “A review on microemulsion based system,” *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol.

2, no. 8, pp. 1888–1899, 2011, doi: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(8\).1888-99](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(8).1888-99).

- [67] L. Guerrero-Hernández, H. I. Meléndez-Ortiz, G. Y. Cortez-Mazatan, S. Vaillant-Sánchez, and R. D. Peralta-Rodríguez, “Gemini and Bicephalous Surfactants: A Review on Their Synthesis, Micelle Formation, and Uses,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 3, 2022, doi: 10.3390/ijms23031798.
- [68] S. Chowdhury, A. Rakshit, A. Acharjee, and B. Saha, “Biodegradability and biocompatibility: Advancements in synthetic surfactants,” *J. Mol. Liq.*, p. 115105, 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2020.115105.
- [69] E. Sieniawska, Ł. Świątek, M. Wota, B. Rajtar, and M. Polz-Dacewicz, “Microemulsions of essentials oils – Increase of solubility and antioxidant activity or cytotoxicity,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 129, pp. 115–124, 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.04.038.
- [70] X. Ge, M. Wei, S. He, and W. E. Yuan, “Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery,” *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 2, 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11020055.
- [71] Q. Q. Zhang, B. X. Cai, H. Z. Gang, S. Z. Yang, and B. Z. Mu, “A family of novel bio-based zwitterionic surfactants derived from oleic acid,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 72, pp. 38393–38396, 2014, doi: 10.1039/c4ra06851c.
- [72] R. S. Kalhapure *et al.*, “pH-responsive chitosan nanoparticles from a novel twin-chain anionic amphiphile for controlled and targeted delivery of vancomycin,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.049.
- [73] A. Sharma and B. L. Bhargava, “Self-Assembly of Cations in Aqueous Solutions of Multiheaded Cationic Surfactants: All Atom Molecular Dynamics Simulation Studies,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 122, no. 48, pp. 10943–10952, 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b08911.
- [74] G. Karpichev, Y. Jahan, N. Paul, N. Petropolis, C. Mercer, T. Grindley, T. Marangoni, “The micellar and surface properties of a unique type of two-headed surfactant – Pentaerythritol based di-cationic surfactants,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 423, pp. 94–100, 2014, doi: 10.1016/j.jcis.2014.02.017.
- [75] A. M. Xu, J. Jiang, X. Pei, and B. Song, “Novel Oil-in-Water Emulsions Stabilised by Ionic Surfactant and Similarly Charged Nanoparticles at Very Low Concentrations,” *Wiley-VCH*, doi:

10.1002/ange.201802266.

- [76] M. Fariya, A. Jain, V. Dhawan, S. Shah, and M. S. Nagarsenker, “Bolaamphiphiles: A pharmaceutical review,” *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 4, no. Suppl 2, pp. 483–491, 2014, doi: 10.5681/apb.2014.072.
- [77] T. M. Palhano Zanela, I. F. Latczuk, E. C. Muniz, and C. A. P. Almeida, “Synthesis of bolaform surfactants from recycled poly(ethylene terephthalate) waste,” *J. Clean. Prod.*, vol. 320, no. December 2020, 2021, doi: 10.1016/j.jclepro.2021.128762.
- [78] A. El Yadini, H. Saufi, E. Perez, M. Blanzat, S. Franceschi-Messant, and S. El Hajjaji, “Synthesis and characterization of bolaform surfactants from sugar derivative and their associates with 2-aminobenzimidazole as inhibitor of zinc in 3% NaCl medium,” *Int. J. Corros. Scale Inhib.*, vol. 12, no. 1, pp. 32–47, 2023, doi: 10.17675/2305-6894-2023-12-1-2.
- [79] B. Brycki, A. Szulc, and M. Babkova, “Synthesis of silver nanoparticles with gemini surfactants as efficient capping and stabilizing agents,” *Appl. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3390/app11010154.
- [80] V. Kumar, A. Chatterjee, N. Kumar, A. Ganguly, I. Chakraborty, and M. Banerjee, *D-Glucose derived novel gemini surfactants: Synthesis and study of their surface properties, interaction with DNA, and cytotoxicity*, vol. 397. Elsevier Ltd, 2014. doi: 10.1016/j.carres.2014.08.005.
- [81] L. Vasileva *et al.*, “Synthesis, Properties, and Biomedical Application of Dicationic Gemini Surfactants with Dodecane Spacer and Carbamate Fragments,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 15, 2023, doi: 10.3390/ijms241512312.
- [82] R. Liao *et al.*, “Synthesis, physicochemical property, and antibacterial activity of novel nonionic 1-alkylaminoglycerol Gemini surfactants,” *Arab. J. Chem.*, vol. 16, no. 10, p. 105111, 2023, doi: 10.1016/j.arabjc.2023.105111.
- [83] M. A. Deyab *et al.*, “Synthesis, surface activity, and corrosion inhibition capabilities of new non-ionic gemini surfactants,” *Sci. Rep.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–15, 2024, doi: 10.1038/s41598-024-57853-x.
- [84] R. S. Kalhapure and K. G. Akamanchi, “A novel biocompatible bicephalous dianionic surfactant from oleic acid for solid lipid nanoparticles,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 105, pp. 215–

222, 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.011.

- [85] E. Ojewole, R. Kalhapure, K. Akamanchi, and T. Govender, “Novel oleic acid derivatives enhance buccal permeation of didanosine,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 40, no. 5, pp. 657–668, 2014, doi: 10.3109/03639045.2014.892958.
- [86] S. S. Makhathini, C. A. Omolo, R. Gannimani, C. Mocktar, and T. Govender, “pH-Responsive Micelles From an Oleic Acid Tail and Propionic Acid Heads Dendritic Amphiphile for the Delivery of Antibiotics,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 109, no. 8, pp. 2594–2606, 2020, doi: 10.1016/j.xphs.2020.05.011.
- [87] K. S. Chaudhari and K. G. Akamanchi, “Novel bicephalous heterolipid based self-microemulsifying drug delivery system for solubility and bioavailability enhancement of efavirenz,” *Int. J. Pharm.*, vol. 560, pp. 205–218, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.065.
- [88] M. Hejazifar, O. Lanaridi, and K. Bica-Schröder, “Ionic liquid based microemulsions: A review,” *J. Mol. Liq.*, vol. 303, p. 112264, 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2019.112264.
- [89] S. Pedro, C. Freire, A. Silvestre, and M. Freire, “Advances Brought by Ionic Liquids in the Development of Polymer-Based Drug Delivery Systems,” 2021, pp. 113–135. doi: 10.1007/978-981-16-4365-1_7.
- [90] M. Goto and M. Moniruzzaman, “Application of Ionic Liquids in Drug Delivery,” *Appl. Ion. Liq. Drug Deliv.*, no. November, pp. 1–242, 2021, doi: 10.1007/978-981-16-4365-1.
- [91] S. Goindi, P. Arora, N. Kumar, and A. Puri, “Development of Novel Ionic Liquid-Based Microemulsion Formulation for Dermal Delivery of 5-Fluorouracil,” vol. 15, no. 4, pp. 810–821, 2014, doi: 10.1208/s12249-014-0103-1.
- [92] Y. Zhang, Y. Cao, X. Meng, C. Li, and H. Wang, “Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Enhancement of transdermal delivery of artemisinin using microemulsion vehicle based on ionic liquid and lidocaine ibuprofen,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 189, no. February, p. 110886, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110886.
- [93] B. Lu *et al.*, “Enhancing the Solubility and Transdermal Delivery of Drugs Using Ionic Liquid-In-Oil Microemulsions,” vol. 2102794, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1002/adfm.202102794.
- [94] B. Adorjan and G. Buchbauer, “Biological properties of essential oils: An updated review,” *Flavour*

Fragr. J., vol. 25, no. 6, pp. 407–426, 2010, doi: 10.1002/ffj.2024.

- [95] H. L. Zhang, L. Ye, M. Shi, Y. Zhu, H. Chi, L. Pan, C. Xu, Y. Zheng, X. Xiang, “Industrial Crops & Products Phytochemical components and biological activities of essential oils from three selected medicinal plants,” *Ind. Crop. Prod.*, no. September, p. 113127, 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2020.113127.
- [96] H. El-abid, C. Amaral, S. C. Cunha, T. V Augusto, and J. O. Fernandes, “Chemical composition and anti-cancer properties of *Juniperus oxycedrus* L . essential oils on estrogen receptor-positive breast cancer cells,” *J. Funct. Foods*, vol. 59, no. March, pp. 261–271, 2019, doi: 10.1016/j.jff.2019.05.042.
- [97] M. F. Ramadan Hassanien, *Introduction to Bioactive Phytochemicals from Vegetable Oil and Oilseed Processing By-products*. 2023. doi: 10.1007/978-3-030-91381-6_1.
- [98] A. AKTAŞ ŞÜKÜROĞLU, “Preliminary in vitro assessment of cytotoxic and genotoxic effects of avocado (*Persea Americana*) oil in breast cancer cell line (MCF-7),” *Adiyaman Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.*, vol. 9, no. 3, pp. 162–168, 2023, doi: 10.30569/adiyamansaglik.1332125.
- [99] C. Markellos, M. E. Ourailidou, M. Gavriatopoulou, P. Halvatsiotis, T. N. Sergentanis, and T. Psaltopoulou, “Olive oil intake and cancer risk: A systematic review and meta-analysis,” *PLoS One*, vol. 17, no. 1 January, 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0261649.
- [100] H. A. Gad *et al.*, “Jojoba oil: An updated comprehensive review on chemistry, pharmaceutical uses, and toxicity,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 11, pp. 1–22, 2021, doi: 10.3390/polym13111711.
- [101] S. Banerjee, “Anticancer Potential and Molecular Mechanisms of Cinnamaldehyde and Its Congeners Present in the Cinnamon Plant,” *J. Physiol.*, vol. 3, pp. 173–207, 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/physiologia3020013> Academic.
- [102] M. Naksawat, C. Norkaew, and K. Charoensedtasin, “Anti-leukemic effect of menthol , a peppermint compound , on induction of apoptosis and autophagy,” pp. 1–20, 2023, doi: 10.7717/peerj.15049.
- [103] H. Zhao *et al.*, “Biomedicine & Pharmacotherapy Peppermint essential oil : its phytochemistry , biological activity , pharmacological effect and application,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 154, p. 113559, 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113559.

- [104] A. K. and L. J. Erich Schmidta, Stefanie Bailb, Gerhard Buchbauerb, Ivanka Stoilovac, Teodora Atanasovad, Albena Stoyanovad and AKurt, “Chemical Composition, Olfactory Evaluation and Antioxidant Effects of Essential Oil from *Mentha x piperita* Erich,” vol. 1, no. 4, pp. 9–12, 2010, doi: 10.1177/1934578X0900400819.
- [105] B. Sujatha, E. Himabindu, S. Bttu, and K. Abbulu, “Microemulsions-A review,” vol. 12, no. 6, pp. 750–753, 2020.
- [106] H. Zhong, G. Chan, Y. Hu, and H. Hu, “A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products,” pp. 1–19, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10040263.
- [107] M. V. Cano-Cortes, J. A. Laz-Ruiz, J. J. Diaz-Mochon, and R. M. Sanchez-Martin, “Characterization and therapeutic effect of a pH stimuli responsive polymeric nanoformulation for controlled drug release,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 6, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/POLYM12061265.
- [108] Y. Guo, M. Qu, D. Qin, Y. Chen, Y. Liu, Y. Huang, M. Chen, “Transferrin-Functionalized Microemulsions Coloaded with Coix Seed Oil and Tripterine Deeply Penetrate to Improve Cervical Cancer Therapy,” *Mol. Pharm.*, 2019, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00717.
- [109] S. F. Hassan, S. Asghar, I. Ullah Khan, R. Munir, and S. H. Khalid, “Curcumin Encapsulation in Geranium Oil Microemulsion Elevates Its Antibacterial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anticancer Activities,” *ACS Omega*, vol. 9, no. 5, pp. 5624–5636, 2024, doi: 10.1021/acsomega.3c08033.
- [110] F. Panyajai, Pawaret.Chueahongthong *et al.*, “Anticancer activity of *Zingiber ottensii* essential oil and its nanoformulations,” *PLoS One*, vol. 17, no. 1, pp. 1–15, 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0262335.
- [111] P. Panyajai *et al.*, “Anticancer activity of *Curcuma aeruginosa* essential oil and its nanoformulations: cytotoxicity, apoptosis and cell migration effects,” *BMC Complement. Med. Ther.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–13, 2024, doi: 10.1186/s12906-023-04261-9.
- [112] K. Sonamuthu, “Applications of Nanotechnology in Drug Delivery Systems,” *Adv. Phys. Theor. Appl.*, vol. 80, pp. 7–13, 2019, doi: 10.7176/apta/80-02.
- [113] R. K. Harwansh, R. Deshmukh, M. A. Barkat, and M. A. Rahman, “Bioinspired Polymeric-based

Core-shell Smart Nano-systems,” *Pharm. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 3, pp. 181–205, 2019, doi: 10.2174/2211738507666190429104550.

- [114] X. Zhou *et al.*, “Calcium Carbonate-Based Nanoplatfoms for Cancer Therapeutics: Current State of Art and Future Breakthroughs,” *ACS Omega*, 2024, doi: 10.1021/acsomega.3c09987.
- [115] E. O. Akala and S. K. Adesina, *Fabrication of polymeric core-shell nanostructures*. Elsevier Inc., 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-813629-4.00001-2.
- [116] D. Lombardo, M. A. Kiselev, and M. T. Caccamo, “Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine,” *J. Nanomater.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/3702518.
- [117] M. A. Al-Kinani, A. J. Haider, and S. Al-Musawi, “Design, Construction and Characterization of Intelligence Polymer Coated Core–Shell Nanocarrier for Curcumin Drug Encapsulation and Delivery in Lung Cancer Therapy Purposes,” *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, vol. 31, no. 1, pp. 70–79, 2021, doi: 10.1007/s10904-020-01672-w.
- [118] M. Asgari, M. Soleymani, T. Miri, and A. Barati, “Design of thermosensitive polymer-coated magnetic mesoporous silica nanocomposites with a core-shell-shell structure as a magnetic/temperature dual-responsive drug delivery vehicle,” *Polym. Adv. Technol.*, vol. 32, no. 10, pp. 4101–4109, 2021, doi: 10.1002/pat.5417.
- [119] S. Al-Musawi, S. Albukhaty, H. Al-Karagoly, and F. Almalki, “Design and synthesis of multi-functional superparamagnetic core-gold shell coated with chitosan and folate nanoparticles for targeted antitumor therapy,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3390/nano11010032.
- [120] R. Al-Obaidy, A. J. Haider, S. Al-Musawi, and N. Arsad, “Targeted delivery of paclitaxel drug using polymer-coated magnetic nanoparticles for fibrosarcoma therapy: in vitro and in vivo studies,” *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–24, 2023, doi: 10.1038/s41598-023-30221-x.
- [121] E. Saldívar-Guerra, “Polimerización y Copolimerización por Radicales Libres.” Saltillo, p. 58, 2018.
- [122] A. Horta Zubiaja, *Macromoléculas*. UNED, 1991.
- [123] J. Barth, M. Buback, G. Schmidt-Naake, and I. Woecht, “Termination kinetics of free-radical

- polymerization in ionic liquids,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 50, no. 24, pp. 5708–5712, 2009, doi: 10.1016/j.polymer.2009.09.065.
- [124] J. F. Stanzione, R. E. Jensen, P. J. Costanzo, and G. R. Palmese, “Synthesis and characterization of ionic polymer networks in a room-temperature ionic liquid,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, no. 11, pp. 6142–6150, 2012, doi: 10.1021/am301777h.
- [125] I. Polenz, I. Tchernook, J. Friedrich, F. G. Schmidt, and S. Spange, “Kinetic study on the catalytic effect of ionic liquids on the polymerization of methyl methacrylate co-initiated by imine bases,” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 216, no. 4, pp. 386–394, 2015, doi: 10.1002/macp.201400469.
- [126] C. Dietlin, M. Podgorska-Golubska, and E. Andrzejewska, “The efficiency of photoinitiators in ionic liquids,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 281, pp. 8–17, 2014, doi: 10.1016/j.jphotochem.2014.03.005.
- [127] P. Y. Chow and L. M. Gan, “Microemulsion polymerizations and reactions,” *Adv. Polym. Sci.*, vol. 175, pp. 257–298, 2005, doi: 10.1007/b100117.
- [128] F. M. Pavel, “Microemulsion polymerization,” *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–16, 2004, doi: 10.1081/DIS-120027662.
- [129] H. B. Li *et al.*, “Research on the decomposition kinetics and thermal hazards of 2,2’-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride by experimental and simulation approach,” *Thermochim. Acta*, vol. 689, no. March, p. 178595, 2020, doi: 10.1016/j.tca.2020.178595.
- [130] A. Jiménez, R. D. Peralta-Rodríguez, E. Saldívar-Guerra, G. Y. Cortez-Mazatán, L. de A. A. Soriano-Melgar, and C. Guerrero-Sánchez, “Emulsion Polymerization Using an Amphiphilic Oligoether Ionic Liquid as a Surfactant,” *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 17, 2022, doi: 10.3390/polym14173475.
- [131] Y. Wu, M. Fei, R. Qiu, W. Liu, and J. Qiu, “A review on styrene substitutes in thermosets and their composites,” *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 11, 2019, doi: 10.3390/polym11111815.
- [132] K. Engstrom, “Styrene,” *Biol. Monit Surveill Work Expo. to Chem*, pp. 99–110, 1984, doi: 10.5040/9798400605284.ch-086.
- [133] G. C. Tustin, R. D. Colberg, and J. R. Zoeller, “Synthesis of vinyl acetate monomer from synthesis gas,” *Catal. Today*, vol. 58, no. 4, pp. 281–291, 2000, doi: 10.1016/S0920-5861(00)00262-5.

- [134] H. Robles, *Vinyl Acetate*, Third Edit., vol. 4. Elsevier, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00074-9.
- [135] L. A. Camacho-Cruz, M. A. Velazco-Medel, and E. Bucio, *Aqueous polymerizations*. Elsevier B.V., 2020. doi: 10.1016/b978-0-12-819542-0.00009-9.
- [136] B. Tieke, “Polymerisation of styrene in microemulsion with cationic surfactant mixtures,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 283, no. 4, pp. 421–430, 2005, doi: 10.1007/s00396-004-1168-2.
- [137] J. E. López-Aguilar, R. O. Vargas, C. E. Escobar-Toledo, E. Mendizábal, J. E. Puig, and F. López-Serrano, “Main events occurring in styrene microemulsion polymerization,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 13, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1002/app.41720.
- [138] Y. Sarov and I. Capek, “Kinetic events of (micro)emulsion polymerization of styrene,” *Polym. Bull.*, vol. 77, no. 9, pp. 4851–4865, 2020, doi: 10.1007/s00289-019-02976-9.
- [139] R. G. López *et al.*, “Kinetic description of the free radical polymerization of vinyl acetate in cationic microemulsions,” *Macromolecules*, vol. 33, no. 8, pp. 2848–2854, 2000, doi: 10.1021/ma991011j.
- [140] N. Sosa *et al.*, “A comparison of the characteristics of poly(vinyl acetate) latex with high solid content made by emulsion and semi-continuous microemulsion polymerization,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, no. 16, pp. 6923–6928, 2001, doi: 10.1016/S0032-3861(01)00157-4.
- [141] M. Gómez-Cisneros *et al.*, “Surfactant concentration effects on the microemulsion polymerization of vinyl acetate,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 46, no. 9, pp. 2900–2907, 2005, doi: 10.1016/j.polymer.2005.02.044.
- [142] J. R. Herrera, V. M. Ovando-Medina, R. G. López, E. Mendizábal, G. Y. Cortez-Mazatán, and R. D. Peralta, “Kinetics and monomer partitioning during polymerization of vinyl acetate in microemulsions stabilized with AOT and n-butanol,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 293, no. 2, pp. 655–664, 2015, doi: 10.1007/s00396-014-3479-2.
- [143] S. Yu *et al.*, “Polymerization of ionic liquid-based microemulsions: A versatile method for the synthesis of polymer electrolytes,” *Macromolecules*, vol. 41, no. 10, pp. 3389–3392, 2008, doi: 10.1021/ma8003696.
- [144] J. Shi, P. Wu, and F. Yan, “Further investigation of the intermolecular interactions and component distributions in a [Bmim][BF₄]-based polystyrene composite membranes using two-dimensional

correlation infrared spectroscopy,” *Langmuir*, vol. 26, no. 13, pp. 11427–11434, 2010, doi: 10.1021/la1009225.

- [145] F. Yan *et al.*, “Enhanced proton conduction in polymer electrolyte membranes as synthesized by polymerization of protic ionic liquid-based microemulsions,” *Chem. Mater.*, vol. 21, no. 8, pp. 1480–1484, 2009, doi: 10.1021/cm900098r.
- [146] G. X. Wang, M. Lu, Z. H. Hou, and H. Wu, “Reactivity ratios of controlled/living copolymerization of styrene and acrylonitrile in ionic liquid microemulsion,” *J. Polym. Res.*, vol. 20, no. 2, 2013, doi: 10.1007/s10965-013-0080-1.
- [147] S. Ullah *et al.*, “Folate-Modified Chitosan 5-Fluorouracil Nanoparticles-Embedded Calcium Alginate Beads for Colon Targeted Delivery,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 7, pp. 1–17, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14071366.
- [148] R. S. C. M. D. Q. Antonino *et al.*, “Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone),” *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 5, pp. 1–12, 2017, doi: 10.3390/md15050141.
- [149] R. Czechowska-Biskup, R. A. Wach, J. M. Rosiak, and P. Ulański, “Procedure for determination of the molecular weight of Chitosan by viscometry,” *Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv.*, vol. 23, pp. 45–54, 2018, doi: 10.15259/PCACD.23.04.
- [150] R. S. Kalhapure and K. G. Akamanchi, “Oleodendrimers: A novel class of multicephalous heterolipids as chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 454, no. 1, pp. 158–166, 2013, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.028.
- [151] A. Lewińska, M. Witwicki, R. Frâckowiak, A. Jezierski, and K. A. Wilk, “Experimental and theoretical approach to aggregation behavior of new di-N-oxide surfactants in an aquatic environment,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, no. 49, pp. 14324–14332, 2012, doi: 10.1021/jp306282m.
- [152] R. A. Khalil and A. H. A. Zarari, “Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 318, pp. 85–89, 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.01.046.
- [153] A. Zajac, J. Hanuza, M. Wandas, and L. Dymińska, “Determination of N-acetylation degree in

chitosan using Raman spectroscopy,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 134, pp. 114–120, 2015, doi: 10.1016/j.saa.2014.06.071.

[154] E. Vunain, A. K. Mishra, and B. B. Mamba, *Fundamentals of chitosan for biomedical applications*, vol. 1. Elsevier, 2016. doi: 10.1016/B978-0-08-100230-8.00001-7.

[155] D. Ozdil and H. M. Aydin, “Polymers for medical and tissue engineering applications,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 89, no. 12, pp. 1793–1810, 2014, doi: 10.1002/jctb.4505.

[156] A. M. Ramírez Castro, D. M. Escobar Sierra, and N. A. Vergara Castrillón, “Determining the Relation between the Proportion of the Amino Group and the Degree of Deacetylation of Chitosan,” *Rev. Ciencias*, vol. 18, no. 1, pp. 73–88, 2013, [Online]. Available: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcien/v18n1/v18n1a06.pdf>

[157] C. N. Nguyen, B. N. Tran, H. N. Thi, P. P. Huu, and H. N. Thi, “Physical absorption of folic acid and chitosan on dihydroartemisinin-loaded poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles via electrostatic interaction for their enhanced uptake and anticancer effect,” *J. Nanomater.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/6808530.

[158] R. Czechowska-Biskup and a Wojtasz-Pająk, “Solutions of Hydrochloric Acid As Simple Solvents of Chitosan for Viscosity-and Light-Scattering-Based Molecular Weight,” *Polish chitin Soc.*, pp. 87–94, 2007, [Online]. Available: [http://www.ptchit.lodz.pl/file-PTChit_\(dq5otdxrr4z5z94l\).pdf](http://www.ptchit.lodz.pl/file-PTChit_(dq5otdxrr4z5z94l).pdf)

[159] U. Bazylińska, J. Kulbacka, and K. A. Wilk, “Dicephalic ionic surfactants in fabrication of biocompatible nanoemulsions: Factors influencing droplet size and stability,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 460, pp. 312–320, 2014, doi: 10.1016/j.colsurfa.2013.12.042.

[160] M. A. Motin, M. A. Hafiz Mia, and A. K. M. Nasimul Islam, “Thermodynamic properties of Sodium Dodecyl Sulfate aqueous solutions with Methanol, Ethanol, n-Propanol and iso-Propanol at different temperatures,” *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 19, no. 2, pp. 172–180, 2015, doi: 10.1016/j.jscs.2012.01.009.

[161] N. Sultana, “Role of ammonium ion on the aggregation and adsorption properties of sodium dodecylsulfate,” *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 1, pp. 92–99, 2018, doi: 10.1080/01932691.2017.1297720.

[162] C. M. Tcacenco, R. Zana, and B. L. Bales, “Effect of the nature of the counterion on the properties

of anionic surfactants. 5. Self-association behavior and micellar properties of ammonium dodecyl sulfate,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 33, pp. 15997–16004, 2005, doi: 10.1021/jp052544z.

- [163] S. Abbott, “Surfactant Science : Principles and Practice,” *Surfactant Sci. Princ. Pract.*, pp. 1–249, 2015.
- [164] C. R. Brinkmann, A. Brodkorb, S. Thiel, and J. J. Kehoe, “The cytotoxicity of fatty acid/ α -lactalbumin complexes depends on the amount and type of fatty acid,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 115, no. 6, pp. 591–600, 2013, doi: 10.1002/ejlt.201200165.
- [165] S. Kızılsahin, Ç. Köksal Karayıldırım, B. Bakan, A. Nalbantsoy, and N. Karabay Yavaşoğlu, “Cytotoxicity and genotoxicity evaluations of oleic acid and conjugated linoleic acid,” *İstanbul J. Pharm.*, vol. 52, no. 1, pp. 14–19, 2022, doi: 10.26650/istanbuljpharm.2022.1023891.
- [166] M. Gharbavi, A. Sharafi, P. M. Fath, S. Oruji, H. Pakzad, and H. K. Manjili, “Formulation and biocompatibility of microemulsion-based pmbn as an efficient system for paclitaxel delivery,” *J. Appl. Biotechnol. Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 51–62, 2021, doi: 10.30491/jabr.2020.114985.
- [167] S. Kale and S. Deore, “Emulsion Microemulsion and Nanoemulsion,” *Syst. Rev. Pharm.*, vol. 8, no. 1, pp. 39–47, 2017.
- [168] M. A. Abd Sisak, R. Daik, and S. Ramli, “STUDY ON THE EFFECT OF OIL PHASE AND CO-SURFACTANT ON MICROEMULSION SYSTEMS,” *Malaysian J. Anal. Sci.*, vol. 21, no. 6, pp. 1409–1416, 2017, doi: 10.17576/mjas-2017-2106-23.
- [169] S. A. Salazar-Brann, R. Patiño-Herrera, J. Navarrete-Damián, and J. F. Louvier-Hernández, “Electrospinning of chitosan from different acid solutions,” *AIMS Bioeng.*, vol. 8, no. 1, pp. 112–129, 2021, doi: 10.3934/bioeng.2021011.
- [170] P. M. D. Moreno *et al.*, “Delivery of Splice Switching Oligonucleotides by Amphiphilic Chitosan-Based Nanoparticles,” *Mol. Pharm.*, vol. 13, no. 2, pp. 344–356, 2016, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00538.
- [171] Grynwald, “Ionization and Proton Exchange of Amines in Acetic Acid,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 71, no. 2, pp. 2955–2957, 1964.
- [172] F. Montaña and J. Pereira, “Macromoléculas en sistemas de microemulsión,” *Cienc. e Ing.*, vol. 43, no. 1, pp. 115–128, 2021, doi: 10.53766/cei/2021.43.01.12.

- [173] A. M. Al-mahallawi, D. Ahmed, M. Hassan, and D. A. El-, "Journal of Drug Delivery Science and Technology Enhanced ocular delivery of clotrimazole via loading into mucoadhesive microemulsion system: In vitro characterization and in vivo assessment," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 64, no. May, p. 102561, 2021, doi: 10.1016/j.jddst.2021.102561.
- [174] S. Sreekumar, F. M. Goycoolea, B. M. Moerschbacher, and G. R. Rivera-Rodriguez, "Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23064-4.
- [175] M. Danaei *et al.*, "Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 2, pp. 1–17, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.
- [176] M. Fathi, P. Sahandi Zangabad, J. Barar, A. Aghanejad, H. Erfan-Niya, and Y. Omid, "Thermo-sensitive chitosan copolymer-gold hybrid nanoparticles as a nanocarrier for delivery of erlotinib," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 106, pp. 266–276, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.020.
- [177] D. Yücel, C. V. Sezer, E. Yücel, and H. M. Kutlu, "Antiproliferative and cytotoxic activities of Mentha x piperita L. essential oil in non-small cell lung cancer cells," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 60, no. 10, pp. 753–758, 2022, doi: 10.56042/ijeb.v60i10.47280.
- [178] J. Jiang *et al.*, "Development of drug-loaded chitosan hollow nanoparticles for delivery of paclitaxel to human lung cancer A549 cells," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 43, no. 8, pp. 1304–1313, 2017, doi: 10.1080/03639045.2017.1318895.
- [179] F. Wang, S. Yang, D. Hua, J. Yuan, C. Huang, and Q. Gao, "A novel preparation method of paclitaxel-loaded folate-modified chitosan microparticles and in vitro evaluation," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 27, no. 3, pp. 276–289, 2016, doi: 10.1080/09205063.2015.1121366.
- [180] A. Vilela, F. Cosme, and T. Pinto, "Emulsions, foams, and suspensions: The microscience of the beverage industry," *Beverages*, vol. 4, no. 2, pp. 1–16, 2018, doi: 10.3390/beverages4020025.
- [181] L. M. Gan, C. H. Chew, I. Lye, and T. Imae, "Microemulsion polymerization of styrene," *Polym. Bull.*, vol. 25, no. 2, pp. 193–198, 1991, doi: 10.1007/BF00310791.
- [182] S. Chakraborty, K. Jähnichen, H. Komber, A. A. Basfar, and B. Voit, "Synthesis of magnetic polystyrene nanoparticles using amphiphilic ionic liquid stabilized RAFT mediated miniemulsion

- polymerization,” *Macromolecules*, vol. 47, no. 13, pp. 4186–4198, 2014, doi: 10.1021/ma5008013.
- [183] C. C. Co, P. Cotts, S. Burauer, R. De Vries, and E. W. Kaler, “Microemulsion polymerization. 3. Molecular weight and particle size distributions,” *Macromolecules*, vol. 34, no. 10, pp. 3245–3254, 2001, doi: 10.1021/ma001248b.
- [184] J. Jang and H. K. Ha, “Fabrication of hollow polystyrene nanosphere in microemulsion polymerization using triblock copolymer,” *Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. Div. Polym. Chem.*, vol. 43, no. 1, pp. 580–581, 2002, doi: <https://doi.org/10.1021/la0257283>.
- [185] E. H. Alsharaeh, A. A. Othman, and M. A. Aldosari, “Microwave irradiation effect on the dispersion and thermal stability of RGO nanosheets within a polystyrene matrix,” *Materials (Basel)*, vol. 7, no. 7, pp. 5212–5224, 2014, doi: 10.3390/ma7075212.
- [186] G. Acik, C. E. Cansoy, and M. Kamaci, “Effect of flow rate on wetting and optical properties of electrospun poly(vinyl acetate) micro-fibers,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 297, no. 1, pp. 77–83, 2019, doi: 10.1007/s00396-018-4443-3.
- [187] B. I. Cherifi, M. Belbachir, and A. Rahmouni, “Green anionic polymerization of vinyl acetate using Maghnite-Na⁺ (Algerian MMT): synthesis characterization and reactional mechanism,” *Discov. Chem. Eng.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–23, 2021, doi: 10.1007/s43938-021-00005-8.
- [188] J. W. Wackerly and J. F. Dunne, “Synthesis of Polystyrene and Molecular Weight Determination by ¹H NMR End-Group Analysis,” *J. Chem. Educ.*, vol. 94, no. 11, pp. 1790–1793, 2017, doi: 10.1021/acs.jchemed.6b00814.
- [189] W. Wang, G. Zheng, and H. Wang, “Syndiospecific polymerization of styrene by half-titanocene catalysts with the sulfur-containing donor ligand,” *E-Polymers*, vol. 14, no. 4, pp. 277–281, 2014, doi: 10.1515/epoly-2014-0030.
- [190] L. M. Gan, C. H. Chew, and I. Lye, “Styrene polymerization in oil-in-water microemulsions: kinetics of polymerization,” *Die Makromol. Chemie*, vol. 193, no. 6, pp. 1249–1260, 1992, doi: 10.1002/macp.1992.021930601.
- [191] L. M. Gan, C. H. Chew, K. C. Lee, and S. C. Ng, “Formation of polystyrene nanoparticles in ternary cationic microemulsions,” *Polymer (Guildf)*, vol. 35, no. 12, pp. 2659–2664, 1994, doi: 10.1016/0032-3861(94)90396-4.

- [192] R. G. López *et al.*, “Polymerization of vinyl acetate in ternary microemulsions stabilized with hexadecyltrimethylammonium bromide,” *Polym. Bull.*, vol. 38, no. 4, pp. 411–417, 1997, doi: 10.1007/s002890050067.
- [193] S. R. Mothe, P. Ang, H. H. Lau, A. B. Y. Oh, and P. Thoniyot, “Investigating the potential of degradable poly(vinyl acetate) copolymer microparticles for encapsulation and in vitro release studies,” *Next Mater.*, vol. 1, no. 4, p. 100055, 2023, doi: 10.1016/j.nxmte.2023.100055.
- [194] R. Botan, N. A. Gonçalves, S. B. De Moraes, and L. M. F. Lona, “Preparação e avaliação de nanocompósitos de poliestireno - Hidróxido duplo lamelar HDL de ZnAl - organofuncionalizado com laurato/palmitato Preparação e avaliação de nanocompósitos de poliestireno - hidróxido duplo lamelar HDL de ZnAl - organofuncionaliza,” *Polimeros*, vol. 25, no. 1, pp. 117–124, 2015, doi: 10.1590/0104-1428.1798.
- [195] E. Browne, Z. A. Worku, and A. M. Healy, “Physicochemical properties of poly-vinyl polymers and their influence on ketoprofen amorphous solid dispersion performance: A polymer selection case study,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 5, 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12050433.
- [196] L. Gao, J. Oh, Y. Tu, T. Chang, and C. Y. Li, “Glass transition temperature of cyclic polystyrene and the linear counterpart contamination effect,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 170, no. January, pp. 198–203, 2019, doi: 10.1016/j.polymer.2019.03.018.
- [197] N. Brun, P. Bourson, S. Margueron, and M. Duc, “Study of the thermal behavior of syndiotactic and atactic polystyrene by Raman spectroscopy,” *JEEP 2011 - 37th Conf. Phase Equilibria*, no. November 2016, 2011, doi: 10.1051/jeep/201100004.
- [198] M. A. Bashir, “Use of Dynamic Mechanical Analysis (DMA) for Characterizing Interfacial Interactions in Filled Polymers,” pp. 108–120, 2021, doi: [https://doi.org/ 10.3390/solids2010006](https://doi.org/10.3390/solids2010006) Academic.
- [199] L. Singh, P. J. Ludovice, and C. L. Henderson, “Influence of molecular weight and film thickness on the glass transition temperature and coefficient of thermal expansion of supported ultrathin polymer films,” *Thin Solid Films*, vol. 449, no. 1–2, pp. 231–241, 2004, doi: 10.1016/S0040-6090(03)01353-1.
- [200] Y. A. C. Real, “Tesis de Maestría de Yuli Alexia Cortés Real,” Centro de Investigación en Química

aplicada, 2021.

- [201] O. Chaabouni and S. Boufi, “Cellulose nanofibrils/polyvinyl acetate nanocomposite adhesives with improved mechanical properties,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 156, pp. 64–70, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.016.
- [202] S. D. Jiang, Z. M. Bai, G. Tang, Y. Hu, and L. Song, “Fabrication and characterization of graphene oxide-reinforced poly(vinyl alcohol)-based hybrid composites by the sol-gel method,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 102, pp. 51–58, 2014, doi: 10.1016/j.compscitech.2014.06.029.
- [203] K. Akabori, K. Tanaka, T. Nagamura, A. Takahara, and T. Kajiyama, “Molecular Motion in Ultrathin Polystyrene Films : Dynamic Mechanical Analysis of Surface and Interfacial Effects,” pp. 9735–9741, 2005, doi: <https://doi.org/10.1021/ma051143e>.
- [204] K. C. M. Nair, S. Thomas, and G. Groeninckx, “Thermal and dynamic mechanical analysis of polystyrene composites reinforced with short sisal fibres,” vol. 61, pp. 2519–2529, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(01\)00170-1](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(01)00170-1).

MATERIAL SUPLEMENTARIO

I. Determinación de CMC mediante tensión superficial

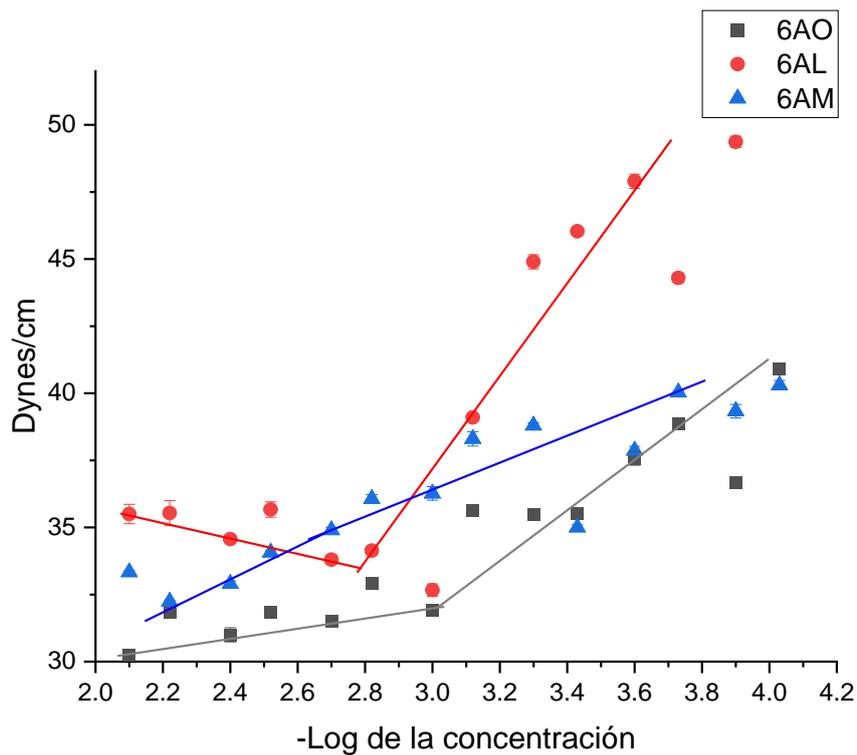


Figura MS 1. Determinación de los valores de CMC a 25 °C en agua mediante tensión superficial para los BS ■6AO ●6AL ▲6AM.

II. Modelos matemáticos de liberación

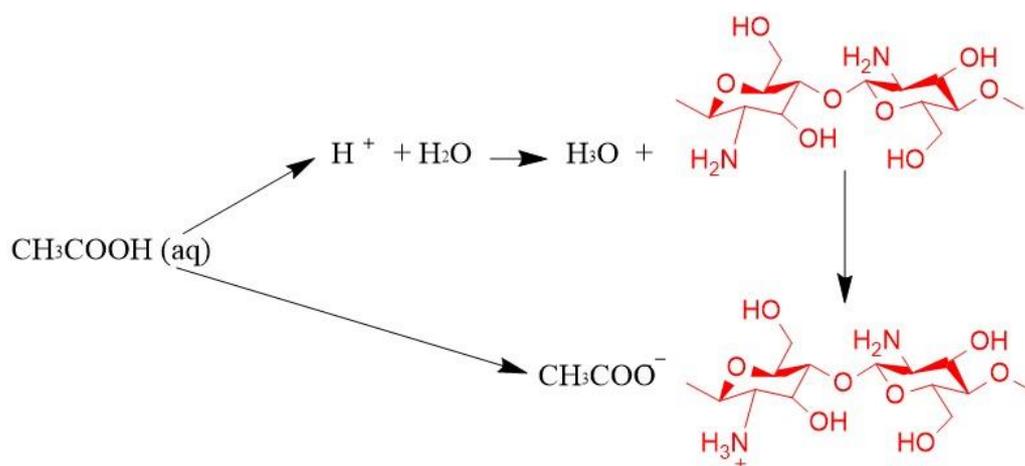


Figura MS 2. Efecto del medio ácido (CH_3COOH) sobre los grupos NH_2 del CS mediante una transferencia rápida de protones para la ionización del CS

III. Modelos matemáticos de liberación

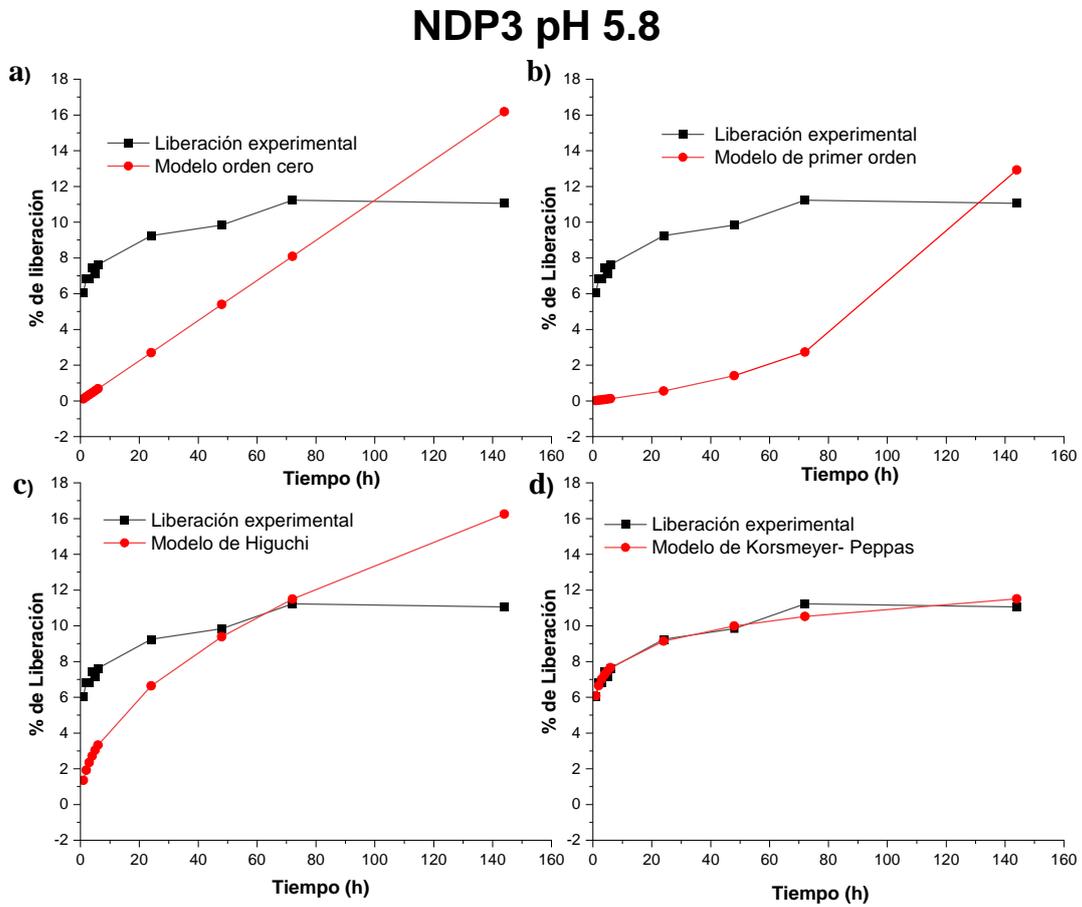


Figura MS 3. Gráficos de liberación experimental y del ajuste de los modelos matemáticos del NDP3 en buffer a pH 5.8 modelos de a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi y d) Korsmeyer-Peppas

NDP3 pH 6.5

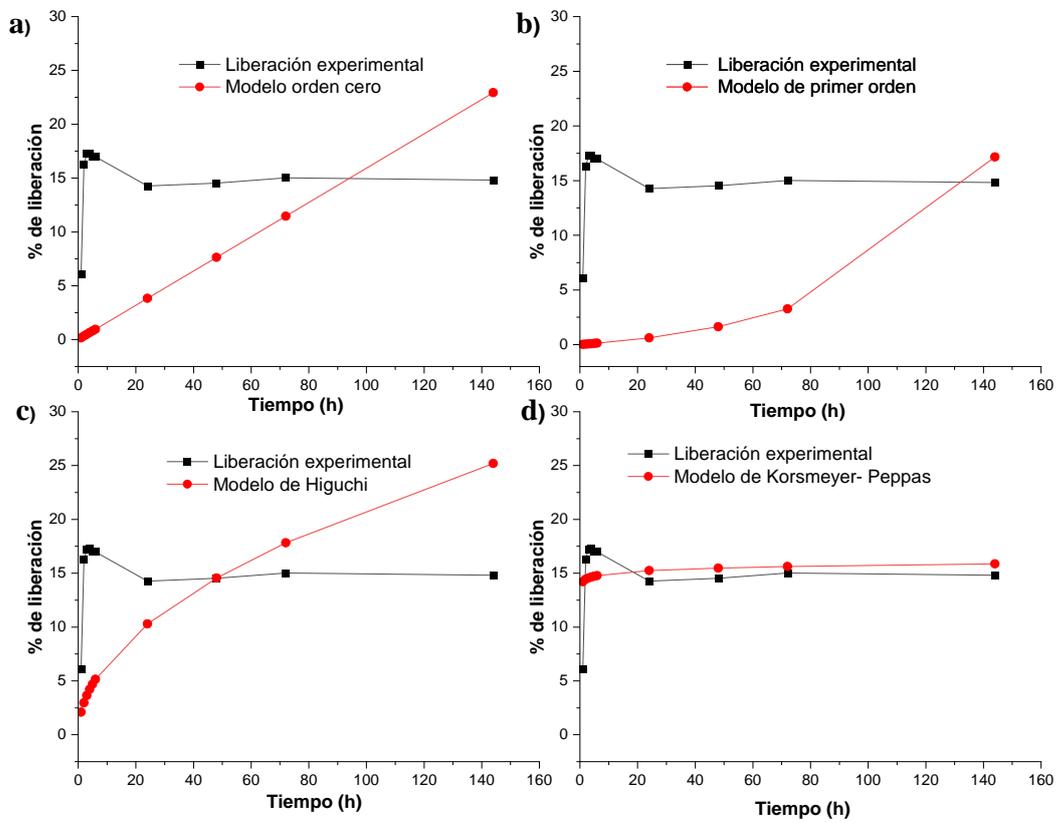


Figura MS 4. Gráficos de liberación experimental y del ajuste de los modelos matemáticos del NDP3 en buffer a pH 6.5 modelos de a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi y d)Korsmeier-Peppas

NDP3 pH 7.4

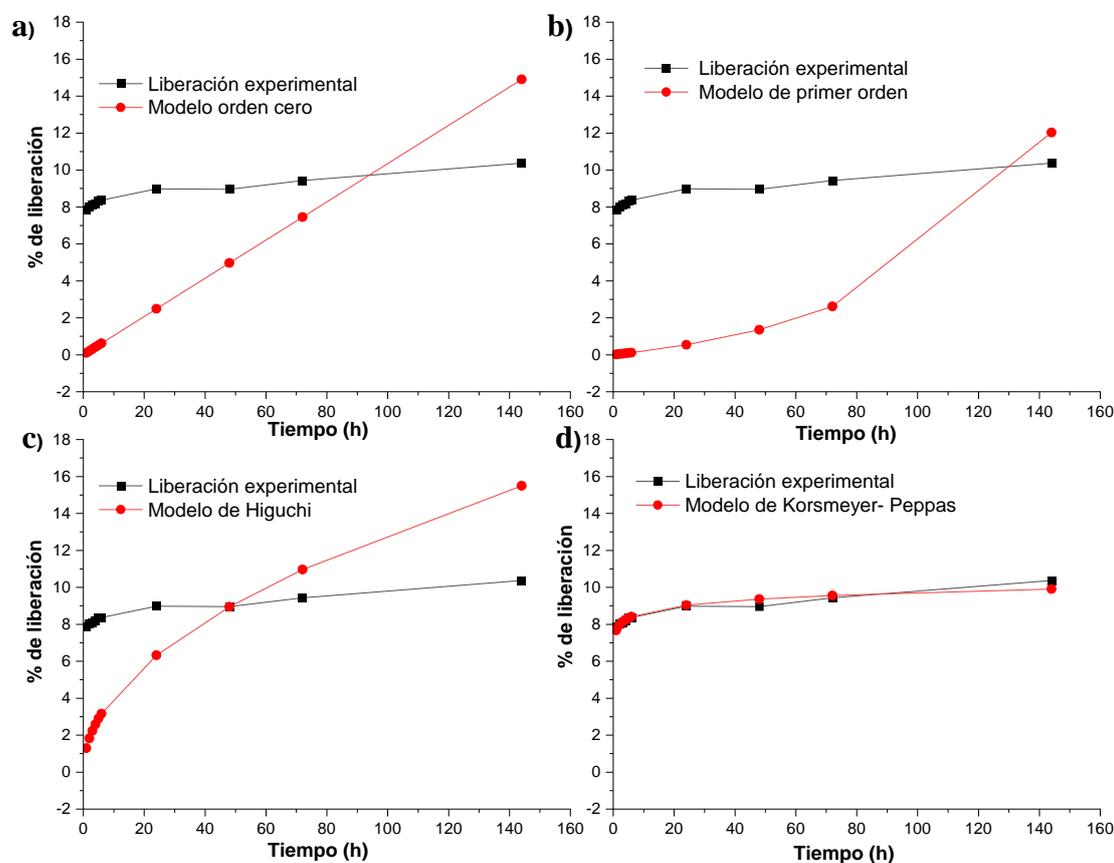


Figura MS 5. Gráficos de liberación experimental y del ajuste de los modelos matemáticos del NDP3 en buffer a pH 7.4 modelos de a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi y d) Korsmeyer-Peppas

NDP5 pH 5.8

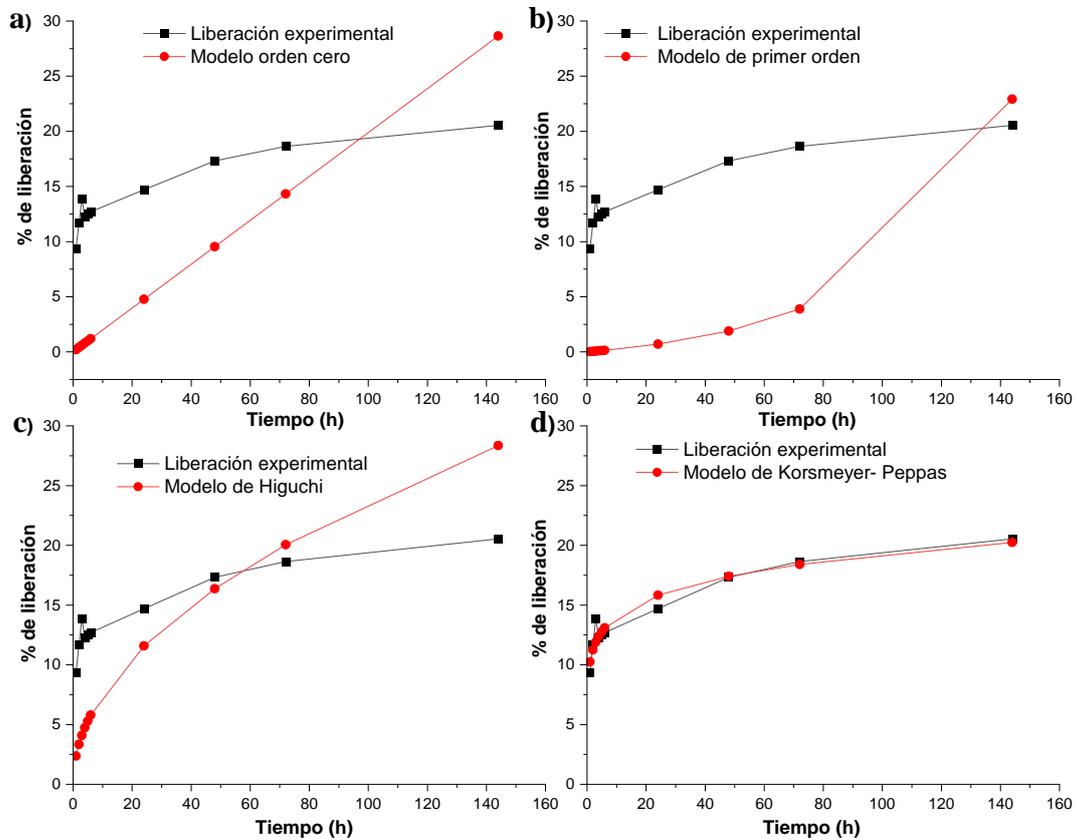


Figura MS 6. Gráficos de liberación experimental y del ajuste de los modelos matemáticos del NDP5 en buffer a pH 5.8 modelos de a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi y d) Korsmeier-Peppas

NDP5 pH 6.5

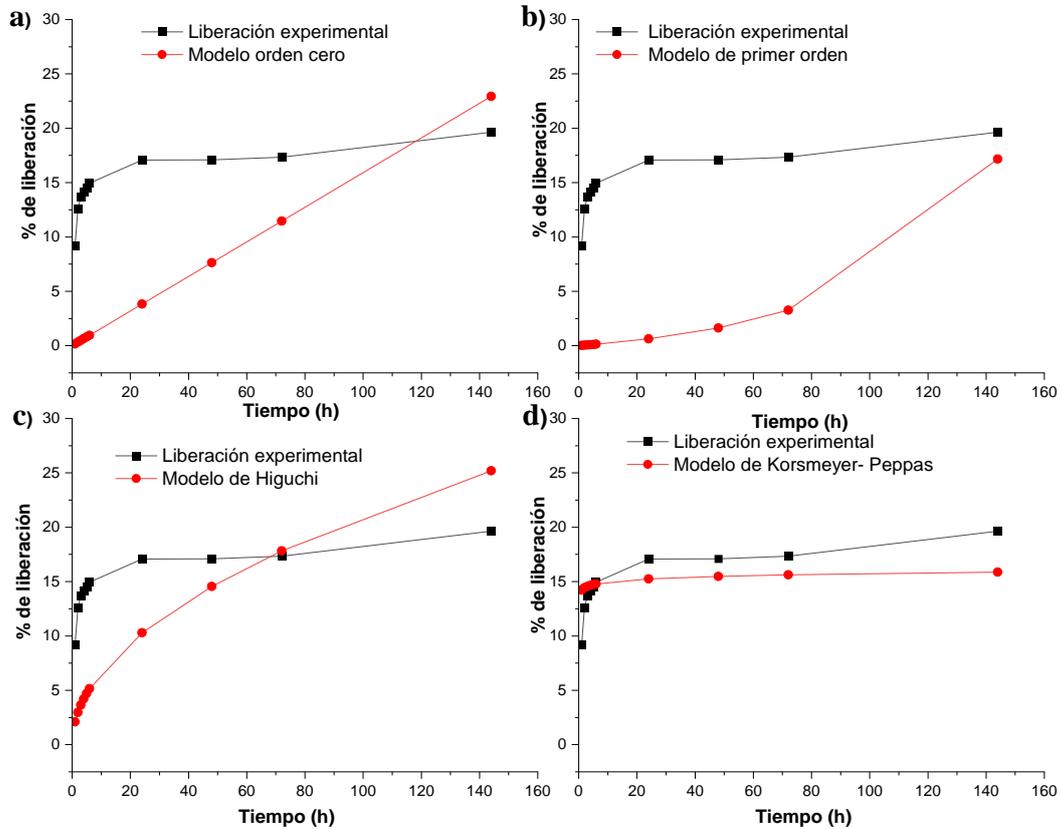


Figura MS 7. Gráficos de liberación experimental y del ajuste de los modelos matemáticos del NDP5 en buffer a pH 6.5 modelos de a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi y d) Korsmeyer-Peppas

NDP5 pH 7.4

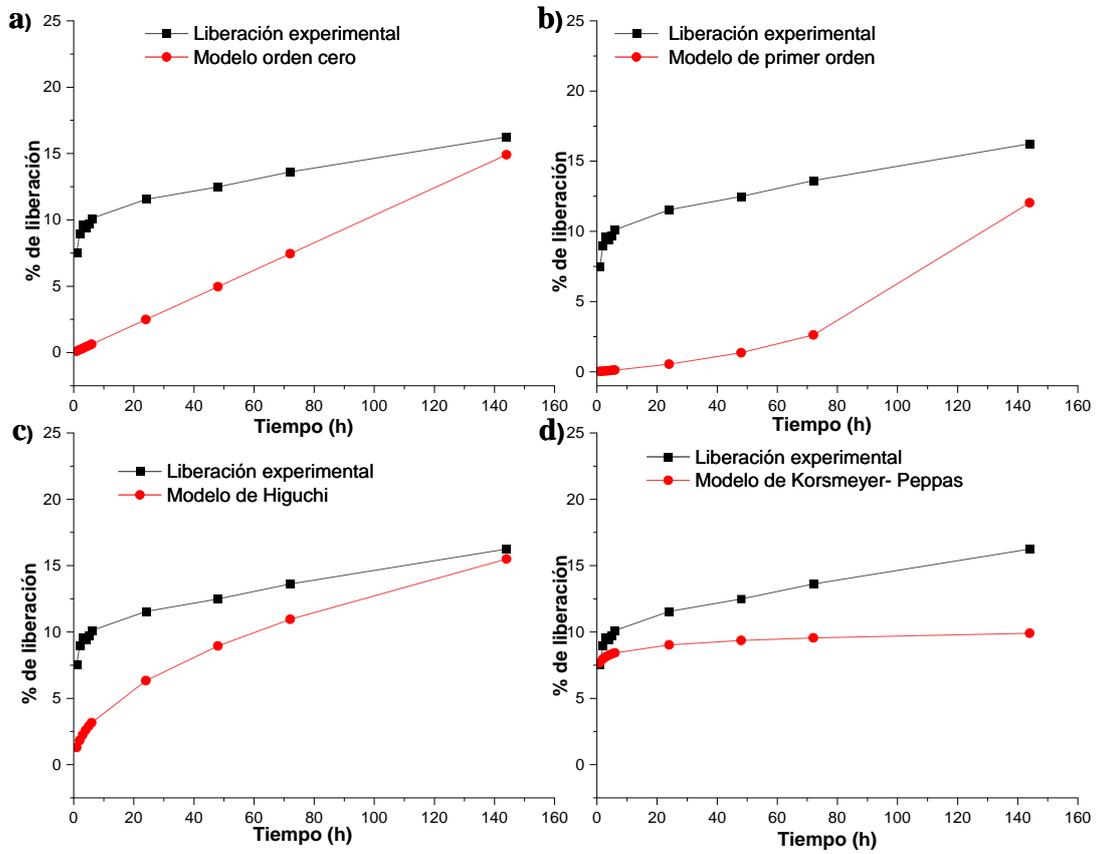


Figura MS 8. Gráficos de liberación experimental y del ajuste de los modelos matemáticos del NDP5 en buffer a pH 7.4 modelos de a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi y d)Korsmeyer-Peppas

NDP6 pH 5.8

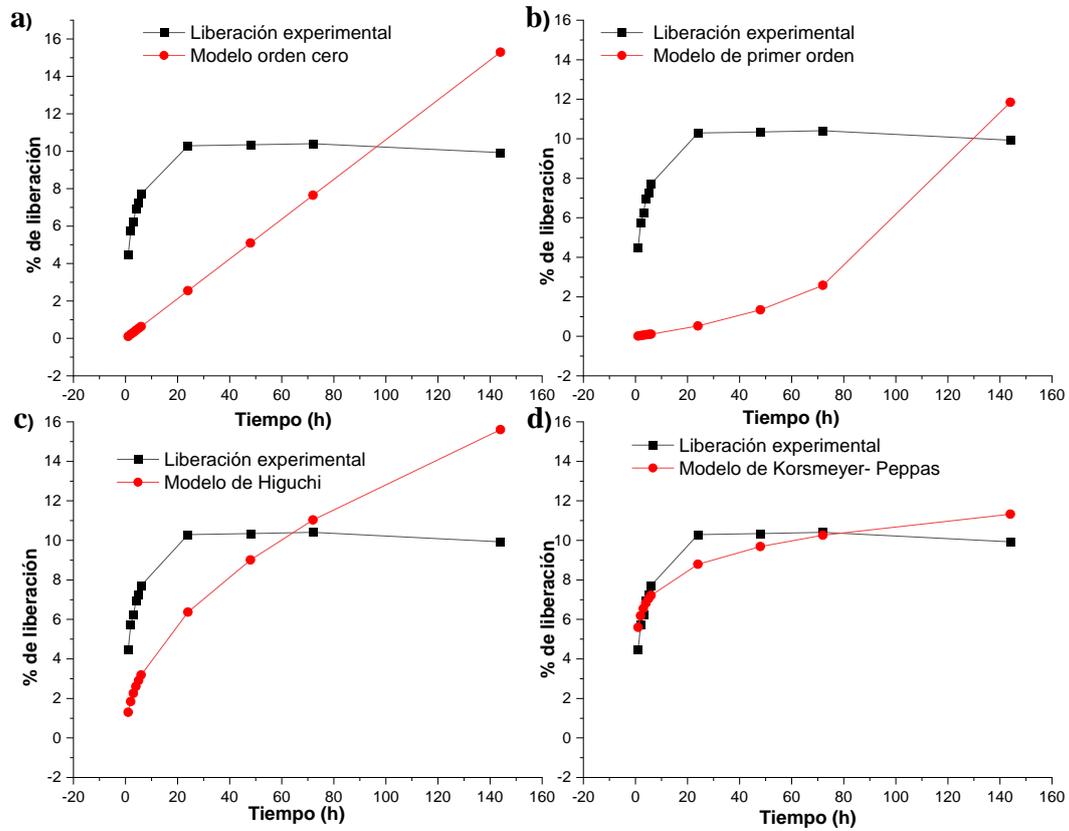


Figura MS 9. Gráficos de liberación experimental y del ajuste de los modelos matemáticos del NDP6 en buffer a pH 5.8 modelos de a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi y d)Korsmeyer-Peppas

NDP6 pH 6.5

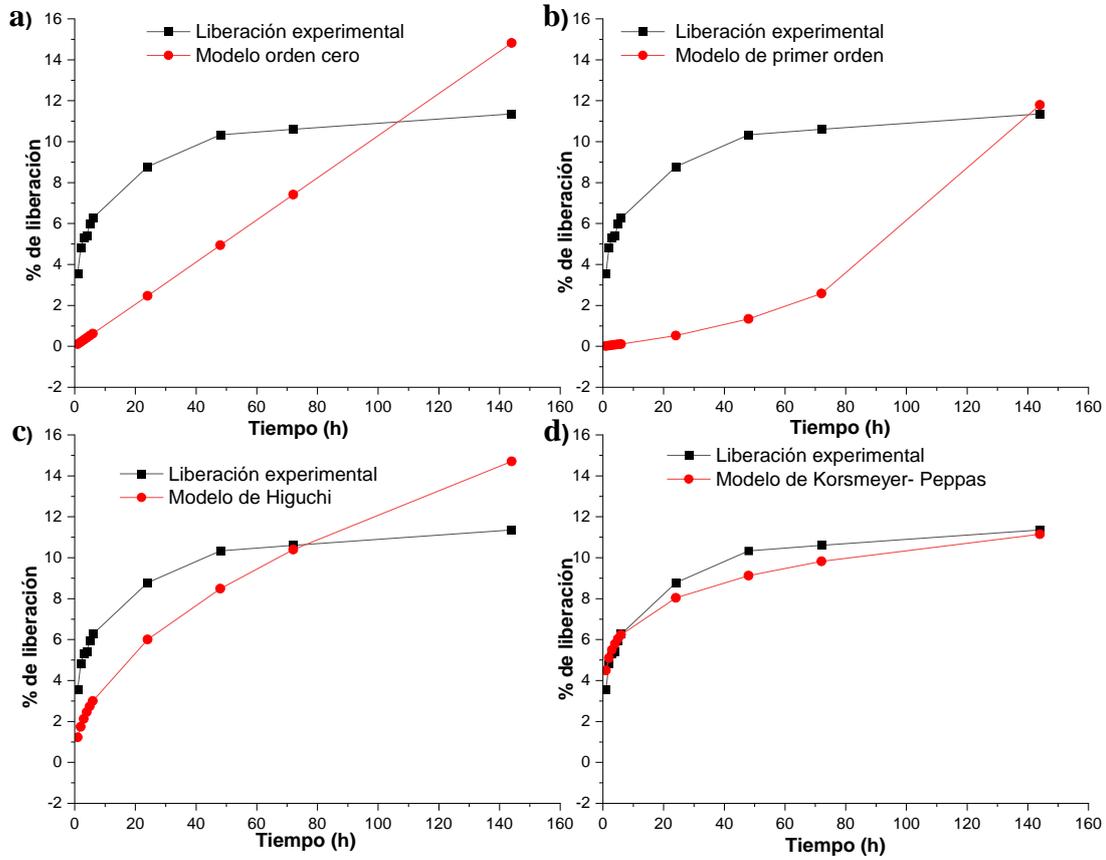


Figura MS 10. Gráficos de liberación experimental y del ajuste de los modelos matemáticos del NDP6 en buffer a pH 6.5 modelos de a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi y d) Korsmeyer-Peppas

NDP6 pH 7.4

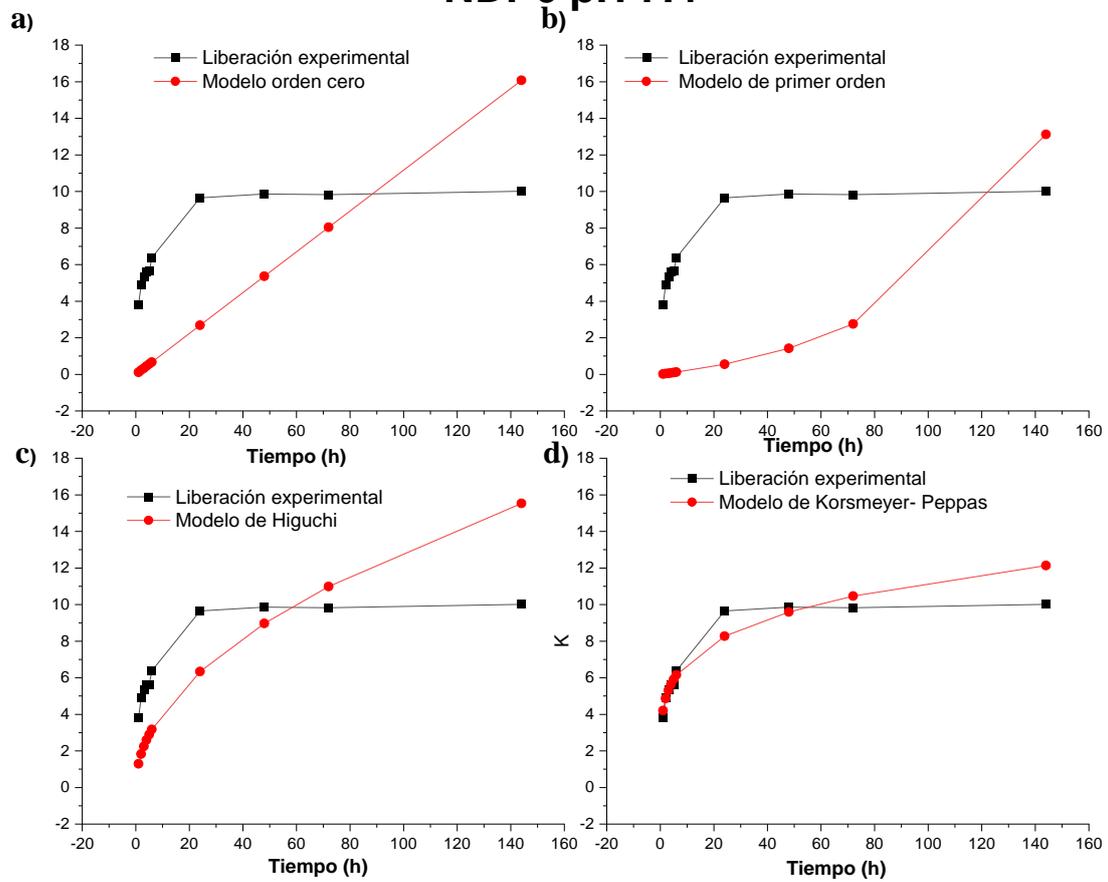


Figura MS 11. Gráficos de liberación experimental y del ajuste de los modelos matemáticos del NDP6 en buffer a pH 7.4 modelos de a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi y d)Korsmeyer-Peppas