



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

DISEÑO, FABRICACIÓN Y EVALUACIÓN DE MOTORES TIPO  
JANUS PROPULSADOS POR ULTRASONIDO Y CONTROLADOS  
POR CAMPOS MAGNÉTICOS PARA EL ACARREAMIENTO DE  
FÁRMACOS EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA

### *TESIS*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

*Mariana Leal Estrada*

*Nestor Miguel Valdez Garduño*

TUTOR DE TESIS

*Dr. Víctor Julián García Gradilla*

Ensenada, Baja California, a 29 de Octubre de 2020.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

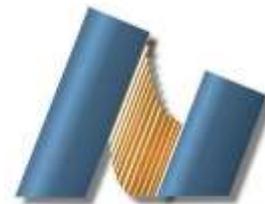
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA  
BIONANOTECNOLOGÍA-NANOFABRICACIÓN

DISEÑO, FABRICACIÓN Y EVALUACIÓN DE MOTORES TIPO JANUS PROPULSADOS POR  
ULTRASONIDO Y CONTROLADOS POR CAMPOS MAGNÉTICOS PARA EL ACARREAMIENTO DE  
FÁRMACOS EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:  
MARIANA LEAL ESTRADA  
NESTOR MIGUEL VALDEZ GARDUÑO

**DIRECTOR DE TESIS**  
DR. VÍCTOR JULIÁN GARCÍA GRADILLA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, A 29 DE OCTUBRE DE 2020

Hacemos constar que el trabajo que presentamos es de nuestra autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y aceptamos que en caso de no respetar lo anterior podemos ser sujetos de sanciones universitarias.

Afirmamos que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y nos hacemos responsables de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized initial 'M' and 'L' that form a loop. The name 'Mariana Leal Estrada' is written in a cursive script across the loop, with 'EAL' written in a larger, bold font at the bottom.

---

Mariana Leal Estrada

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'N' and 'V' that form a loop. The name 'Nestor Miguel Valdez Garduño' is written in a cursive script across the loop.

---

Nestor Miguel Valdez Garduño

# Dedicatoria

**Nestor Miguel Valdez Garduño**

*Quisiera dedicar este trabajo a mis sobrinos:  
Xavier y Ximena; los motores de mis decisiones.*

# Agradecimientos

## **Mariana Leal Estrada**

Quiero agradecerles primero a mis padres, por haberme dado la oportunidad de estudiar lo que deseaba aún cuando éso implicaba ir al otro lado del país, por haber confiado y por apoyarme.

También le agradezco a la licenciatura, al CNyN y a la UNAM por los aprendizajes. Agradezco a los profesores, investigadores y técnicos que nos compartieron un poco de sus conocimientos y a todo el personal que de una u otra forma hizo que nuestra estancia fuera más placentera.

Para este trabajo quiero hacer una mención importante a los investigadores que resolvieron dudas, dieron sugerencias o ayudaron por algún medio durante la planeación y elaboración del proyecto, entre los que se encuentran la Dra. Karla Oyuky Juárez, la Dra. Kanchan Chauhan, el Dr. Prakhar Sengar, la Dra. Patricia Juárez y el Dr. Joseph Wang. Sin ellos no habría sido posible llegar a este resultado.

Especialmente, quiero agradecer a la M. Cs. Diana Sandoval y al M. Cs. Sergio Oliveros por tomarse el tiempo para leer detenidamente, hacer tantos comentarios y mejorar nuestro trabajo.

Por otro lado, le doy las gracias a mis amigos en general y específicamente a Daniel Jurado, por sus consejos sobre la síntesis de partículas, las porras, las risas, las horas interminables en el laboratorio y la frustración compartida. A Brian por la paciencia y consejos en el laboratorio. A Andrea por hacer este proceso más veloz, placentero y satisfactorio. A Victoria por las palabras y las fuerzas. A Rodrigo que se involucró en el proyecto aún sin tener que hacerlo. A mi segunda familia, mis LDH (Gerardo, Rodrigo, Marina, Javier y Miguel), cuyo nombre parece un mal chiste pues siempre estuvieron más arriba de lo que pensaban. Gracias por apoyarme durante tantos buenos y malos ratos, por los apapachos, las pláticas duras, los silencios, las risas, por motivarme y hacerme ver las cosas diferente, los extraño inmensamente.

Gracias a Miguel porque sin él tampoco habría sido posible este trabajo conjunto, por mantenerte trabajando a pesar de todo, apoyar en lo que te era posible, ser curioso y obtener resultados de preguntas que quizá, en un inicio, ni siquiera se habían planteado. Agradezco a nuestro asesor, el Dr. Víctor García, por creer en el proyecto, haber confiado en nosotros y buscar motivarnos constantemente.

Finalmente, agradecemos a PAPIIME PE104818 por la beca y financiamiento para el proyecto, así como a CONACYT 239953.

## **Nestor Miguel Valdez Garduño**

Este trabajo que arca la culminación de mis estudios me hace pensar en todas las personas que contribuyeron para hacerlo posible. Quisiera agradecer a todos los profesores y compañeros del CNYN y de la UNAM que motivaron a querer hacer algo más que solo ciencia; en especial quiero agradecer a la persona que comenzó todo mi tutor el ahora M. Cs, Luis Baldo, por darme una razón para perseguir mi carrera como nanotecnólogo y ahora poder ser colegas en un ambiente profesional.

Asimismo, mi agradecimiento para la Dra. Gabriela que me acompañó durante 3 años como mi profesora ayudándome a dar un poco más de mí cada semestre y para la Dra. Patricia ya que me hizo darme cuenta de la pasión que siento por el área biomédica. Por otra parte, a mi asesor el Dr. Víctor, el cual durante más de dos años me ayudó a iniciar mi carrera en investigación; de la misma forma a mis mayores M. Cs. Diana y M. Cs. Sergio, que contribuyeron con su tiempo y esfuerzo a este trabajo.

Pero la etapa universitaria es más que solo la escuela y por ello quiero agradecer a las personas que me apoyaron durante este proyecto. Rodrigo (Ro) por ser ese hermano menor que me orientó hacia un mejor camino siempre, Daniel (Dany) mi amigo incondicional, por enseñarme a moverme aun cuando me costaba más y ser el mejor compañero que tuve durante mi universidad, a Daniel (Dano) por ser más que un amigo un ejemplo de cómo aprender, Andrea por ser una amiga ejemplar y darme la motivación siempre que lo necesité. Además, gracias a mis hermanos por representar un apoyo durante toda mi estancia en Ensenada.

A mi grupo de aventuras, grupo de estudio, compañeros de casa y sobre todo mis amigos durante la universidad, mis muy apreciados LDH (Gerry, Marina, Rodrigo, Xavier y Mariana) por hacerme crecer como persona, pulir mis errores, regalarme incontables risas, un sinfín de historias y sobre todo por cambiar mi experiencia universitaria y hacerme quedar en ella hasta el final. De ellos, quiero agradecer en específico a Mariana, por ser mi equipo a lo largo de la universidad, escuchar un sinfín de teorías, cuestionarme con el fin de entender y ayudarme a pulirme como estudiante y ayudarme a condensar el esfuerzo contenido en estas páginas de la mejor manera posible.

Finalmente, quiero agradecer a los sinodales de este trabajo por los comentarios y consejos a fin de tener un mejor resultado, Dra. Karla, Dra. Patricia, Dr. Raymond, Dra. Gabriela, M. Cs. Diana y M. Cs. Sergio. Al Dr. Prakhar por mostrar interesen proyecto durante toda su realización.

A la DGCI de la UNAM, al proyecto PAPIME PE104818 y al proyecto CONACYT 239953, por la beca y financiamiento para la realización de este trabajo.

# Resumen

Actualmente los procedimientos médicos necesarios para el tratamiento de enfermedades como lo es el cáncer, resultan en ocasiones nocivos para la salud del paciente debido a la baja selectividad de los tratamientos y su invasividad. Como alternativa a dichos tratamientos se ha propuesto la entrega localizada de fármacos; esta solución complementaria abre una posibilidad para reducir reducir los efectos secundarios. Asimismo, dentro de las herramientas utilizadas para dicho tipo de entrega se encuentran los micro y nano motores, que pueden incrementar la eficiencia del tratamiento gracias al control externo que estos permiten. Sin embargo, la mayoría de estos motores no son viabilidad dado que sus materiales no suelen ser biocompatibles.

Como respuesta a este problema, en el presente trabajo se propuso fabricar micro y nano motores tipo Janus conformados por materiales biocompatibles. Primero, se sintetizaron partículas de ácido poli láctico co-glicólico (PLGA) cargadas con tamoxifeno (TAM) a través del método de nanoprecipitación. Después, a través de la técnica de pulverización catódica se depositó una estructura tricapa en uno de sus hemisferios; la estructura está conformada por una capa de adhesión de titanio (Ti), una capa magnética de níquel (Ni) para el direccionamiento de sus trayectorias a través de un campo magnético externo y una capa diferencial de densidad de tungsteno (W), que incrementa la velocidad de los mismos. Por otra parte, se estudió el efecto de sus componentes metálicos tanto en la aglomeración como en la propulsión de los motores.

Para aumentar su selectividad se propone funcionalizar los motores con anticuerpos anti-ER $\alpha$ . Los motores se evaluarán *in vitro* en células de cáncer de mama de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 para conocer su selectividad en cuanto a la internalización, así como su citotoxicidad. De igual manera, se estudiará y determinará el mecanismo de propulsión con materiales biocompatibles utilizando ultrasonido y su efecto en el medio de cultivo. También se propone caracterizar las propiedades físicas y químicas de los motores, al igual que la tasa de liberación del fármaco. Finalmente, se espera conocer si el concepto propuesto tiene una alta selectividad en la liberación del fármaco para el tratamiento del cáncer de mama.

En el presente trabajo se logró sintetizar micromotores tipo Janus con un núcleo polimérico (PLGA) cargado con fármaco (TAM) y con uno de sus hemisferios recubiertos con una tricapa metálica (Ti-Ni-W). También se consiguió propulsarlos al excitarlos con ultrasonido y controlar su dirección por medio de un campo magnético externo. Se observó un decremento en el tamaño de las partículas de PLGA cargadas con TAM al incrementar la concentración de surfactante o al reducir la concentración de PLGA. La capa de adhesión afectó la respuesta magnética dando como resultado la aglomeración de los motores, al igual que con el incremento de la capa de Ni. Además, se corroboró el efecto de la capa de W en la propulsión de los micromotores, tal como lo explica Valdez-Garduño *et al.* (2020).

# Índice de figuras.

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Proceso de metástasis (NIH, 2019).....  | 10 |
| <b>Figura 2.</b> Representación del efecto EPR y su relación con las nanopartículas de entrega pasiva (Abdalla et al., 2018).....  | 18 |
| <b>Figura 3.</b> Tipos de motores biológicos. <b>a)</b> Motores lineales, <b>b)</b> Motores rotatorios, <b>c)</b> Motores de revolución (Guo et al., 2016).....  | 21 |
| <b>Figura 4.</b> Ejemplos de motores híbridos. <b>A)</b> <b>(a)</b> Estructura esquemática y mecanismo de propulsión de un motor acústico recubierto de membrana celular, <b>(b)</b> Micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de un nanohilo de oro (AuNW) recubierto de membrana de glóbulos rojo y plaquetas (RBC-PL), y <b>(c)</b> Propulsión por ultrasonido de un motor RBC-PL en sangre. <b>B)</b> <b>(a)</b> Estructura esquemática y mecanismo de propulsión de un glóbulo rojo con nanopartículas magnéticas en su interior <b>(b)</b> Micrografía de un glóbulo rojo con nanopartículas magnéticas en su interior, y <b>(c)</b> Propulsión por campos magnéticos de un motor de glóbulo rojo con nanopartículas magnéticas en su interior <b>C)</b> <b>(a)</b> Estructura esquemática y mecanismo de propulsión de un motor magnético basado en espermatozoides, <b>(b)</b> imagen óptica de un micromotor híbrido basado en espermatozoides y <b>(c)</b> micro hélice magnética para transporte de espermatozoide. <b>D)</b> <b>(a)</b> Estructura esquemática y mecanismo de propulsión de un motor a base de bacterias, <b>(b)</b> Micrografía SEM de un micronadador impulsado por una bacteria <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> (MSR-1), y <b>(c)</b> propulsión activa del micro nadador con motor MSR-1. (Esteban-Fernández de Ávila et al., 2018b) ..... | 22 |
| <b>Figura 5.</b> Ejemplos de motores tipo Janus clasificados de acuerdo a su método de síntesis (Ye et al., 2019).....   | 23 |
| <b>Figura 6.</b> Tipos de ultrasonido y estructuras típicamente propulsadas por cada uno de ellos...25   | 25 |
| <b>Figura 7.</b> Diseño propuesto del motor. ....  | 27 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema de la síntesis de partículas poliméricas por nanoprecipitación.....   | 31 |
| <b>Figura 9.</b> Esquema de sistema de pulverización catódica por magnetrón (Gómez, 2015).....   | 32 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema del principio de funcionamiento de la elipsometría (Adaptado de Wollan, 2019). ....  | 34 |
| <b>Figura 11.</b> Microscopio óptico y sus componentes (Di Gianfrancesco, 2017). ....  | 35 |
| <b>Figura 12.</b> Esquema del microscopio electrónico de barrido (MEB). Adaptado de (Price, 2002). ....  | 37 |
| <b>Figura 13.</b> Motores tipo Janus. <b>a)</b> Propulsados por reacciones enzimáticas (Ma et al., 2015), <b>b)</b> Controlados a partir de luz UV (Gao et al., 2017), <b>c)</b> Transportadores de fármacos y con propulsión catalítica (Hu et al., 2018).....  | 41 |
| <b>Figura 14.</b> Motores propulsados o controlados con ultrasonido. <b>a)</b> Propulsión basada en asimetría de composición (Wang et al., 2012), <b>b)</b> Modulación del movimiento de los motores a través de ultrasonido (Xu et al., 2014), <b>c)</b> Nanohilo recubierto de membranas de glóbulos rojos (Wu et al., 2015), <b>d)</b> Motor para la detección de células cancerígenas (Fernández de Ávila et al., 2015) <b>e)</b> Motor capaz de detectar VPH (Qualliotine et al., 2019).....  | 44 |
| <b>Figura 15.</b> Motores propulsados con ultrasonido y controlados con campos magnéticos externos. <b>a)</b> Motor tipo varilla de tres segmentos para la captura y transporte de bacterias, así como para el transporte de fármacos (García-Gradilla et al., 2013), <b>b)</b> Motor diseñado a partir de glóbulos rojos (Wu et al., 2015).....   | 46 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 16.</b> Diseños de los motores Janus propulsados por ultrasonido y controlados por campos magnéticos estudiados por <b>a)</b> Oliveros (2017) y <b>b)</b> García (2018). .....   | 47 |
| <b>Figura 17.</b> Motores con materiales biocompatibles. <b>a)</b> Motores catalíticos a base de Zn con propulsión en medios ácidos (Mou et al., 2014), <b>b)</b> Motores catalíticos a base de Zn con propulsión en medios acuosos con control por campos magnéticos (Gao et al., 2013), <b>c)</b> Nanomotores de óxido de hierro (IV) con puntos cuánticos de telurio y seleniuro de cadmio propulsados por luz visible (Pacheco, Jurado-Sánchez y Escarpa, 2019), <b>d)</b> Motores helicoidales a base de plantas vascularizadas con recubrimiento de níquel (Gao et al., 2014). .....   | 48 |
| <b>Figura 18.</b> Esquemas de MNMs para la entrega de fármacos por distintos mecanismos de propulsión. <b>a)</b> Motores catalíticos a base de Ni-Au-Pt con control de liberación por estímulo magnético (Adaptado de Kagan et al., 2010), <b>b)</b> Motores catalíticos a base de Zn con liberación de nanopartículas por ruptura (Sattayasamitsathit et al., 2014), <b>c)</b> Nanohilo magnético flexible con adhesión de partículas poliméricas (Gao et al., 2012), <b>d)</b> Nanohilos de Ni propulsados por ultrasonido y Au con mesoporoso para transporte fármacos accionado por infrarrojo cercano (García-Gradilla et al., 2014). ..... | 50 |
| <b>Figura 19.</b> Motores que han sido probados in vivo. <b>a)</b> Motores catalíticos para el transporte de nanopartículas a un medio ácido (Gao et al., 2015), <b>b)</b> Estructuras helicoidales controladas con campos magnéticos rotacionales (Servant et al., 2015), <b>c)</b> Copas poliméricas para el transporte de virus vacuna oncolítica (VV) (Myers et al., 2016).....  | 52 |
| <b>Figura 20.</b> Arreglo experimental para la propulsión ultrasónica de los motores y la determinación de sus velocidades. ....   | 61 |
| <b>Figura 21.</b> Fotografías de microscopía óptica de micropartículas con a) 2.5% de PVA y 30 mg de PLGA y b) 2.5% de PVA y 5 mg de PLGA. ....  | 66 |
| <b>Figura 22.</b> Efecto del tamaño de gota sobre el tamaño de la partícula con respecto al tiempo entre goteo en partículas de PLGA, PVA 2.5%, PLGA 5 mg. ....  | 67 |
| <b>Figura 23.</b> Efecto del tamaño de gota sobre el tamaño de la partícula con respecto al tiempo entre goteo en partículas PLGA con tamoxifeno encapsulado, PVA 2.5%, PLGA 2.5 mg, TAM 2.5 mg.....   | 68 |
| <b>Figura 24.</b> Registro térmico de los blancos al interior de la cámara de depósito con un incremento en la potencia aplicada 15 sscm de flujo de Ar, presión de trabajo de 2 mTorr. ....   | 69 |
| <b>Figura 25.</b> Curvas de crecimiento de películas delgadas por método de pulverización catódica; potencia 60 W, flujo de Ar 25 sccm y presión de trabajo de 2 mTorr.....  | 70 |
| <b>Figura 26.</b> Efectos del espesor de la capa de níquel sobre la aglomeración de motores tipo Janus con núcleo de SiO <sub>2</sub> . ....   | 71 |
| <b>Figura 27.</b> Efectos del espesor de la capa magnética sobre la aglomeración de motores tipo Janus con núcleo de PLGA.....   | 73 |
| <b>Figura 28.</b> Efecto del espesor de la capa de tungsteno sobre la aglomeración de motores tipo Janus con núcleo de SiO <sub>2</sub> . ....   | 74 |
| <b>Figura 29.</b> Espectro de intensidad por frecuencia de tamaños de partículas PLGA.....   | 76 |
| <b>Figura 30.</b> Efecto del espesor de la capa magnética sobre la movilidad de motores tipo Janus con núcleo de SiO <sub>2</sub> , con espesores de capas Ti 5 nm, Ni variable y W 60 nm. Ultrasonido de 4.144Mhz con una intensidad de 3.5 Vpp. ....   | 77 |
| <b>Figura 31.</b> Efectos del espesor de la capa magnética sobre la movilidad. Ultrasonido de 4.144Mhz con una intensidad de 3.5 Vpp. ....   | 78 |
| <b>Figura 32.</b> Efectos del espesor de la capa diferencial de densidad sobre la movilidad. ....  | 79 |

**Figura 33.** Representación de la formación de aglomerados de motores por uniones metálicas durante el proceso de depósito de películas delgadas.....83

**Figura 34.** Representación del crecimiento del tamaño de grano en la capa de níquel conforme incrementa su espesor y el confinamiento en tamaños existente en la interfaz.....88

# Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Variación del tamaño de las partículas con diferentes concentraciones de PVA.....  | 65 |
| <b>Tabla 2.</b> Variación del tamaño de las partículas con distintas cantidades de PLGA.....   | 66 |
| Tabla 3. Efecto de la capa de Ti sobre la adhesión de las capas de Ni y W.....   | 70 |
| <b>Tabla 4.</b> Efecto de la aglomeración en la longitud de trayectoria de micromotores tipo Janus con núcleo de SiO <sub>2</sub> . .... | 72 |
| <b>Tabla 5.</b> Registro de control de síntesis de micromotores tipo Janus.....  | 77 |

# Tabla de contenidos

|   |           |
|---|-----------|
| Dedicatoria   | II        |
| Agradecimientos   | III       |
| Resumen   | V         |
| Índice de figuras.  | VI        |
| Índice de tablas  | IX        |
| Capítulo 1: Introducción.                                 | 2         |
| <b>1.1 Planteamiento del problema y justificación.</b>    | <b>4</b>  |
| <b>1.2 Objetivos generales y específicos del trabajo.</b> | <b>7</b>  |
| <b>1.2.1 Objetivo general.</b>                            | <b>7</b>  |
| <i>1.2.2 Objetivos específicos.</i>                       | 8         |
| Capítulo 2: Marco Teórico.                                | 9         |
| <b>2.1 Cáncer.</b>  | <b>9</b>  |
| 2.1.1 Cáncer de mama.                                     | 10        |
| 2.1.1.1 Receptor de estrógeno (ER).                       | 10        |
| 2.1.1.1.1 ER- $\alpha$ .                                  | 11        |
| 2.1.1.1.2 ER- $\beta$ .                                   | 12        |
| 2.1.1.2 Tamoxifeno.                                       | 13        |
| <b>2.2 Vehículos de entrega de fármacos</b>               | <b>14</b> |
| 2.2.1 Características.                                    | 14        |
| 2.2.1.1 Biocompatibilidad.                                | 15        |
| 2.2.1.1.1 Forma.  | 16        |
| 2.2.1.1.2 Tamaño.   | 16        |
| 2.2.1.1.3 Carga superficial.                              | 16        |
| 2.2.2 Tipos de entrega de fármacos.                       | 17        |
| 2.2.2.1 Entrega pasiva.                                   | 17        |
| 2.2.2.2 Entrega dirigida.                                 | 18        |
| <b>2.3 Micro/Nanomotores (MNM).</b>                       | <b>19</b> |
| 2.3.1 Motores biológicos.                                 | 20        |
| 2.3.1.1 Motores biohíbridos.                              | 21        |
| 2.3.2 Motores tipo Janus.                                 | 22        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.3 Micro/Nanomotores propulsados por ultrasonido.                    | 24        |
| 2.3.4 Control por campos magnéticos.                                    | 25        |
| <b>2.4 Materiales.</b>  | <b>26</b> |
| 2.4.1 Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).                            | 27        |
| 2.4.2 Níquel.   | 28        |
| 2.4.5 Tungsteno.  | 29        |
| 2.4.4 Titanio.  | 29        |
| <b>2.5 Técnicas de síntesis.</b>  | <b>30</b> |
| 2.5.1 Nanoprecipitación.  | 30        |
| 2.5.2 Pulverización catódica.   | 32        |
| <b>2.6 Técnicas de caracterización.</b>                                 | <b>33</b> |
| 2.6.1 Determinación de eficiencia de encapsulamiento.                   | 33        |
| 2.6.2 Elipsometría para determinación de espesores.                     | 33        |
| 2.6.3 Microscopía.  | 34        |
| 2.6.3.1 Microscopía óptica  | 34        |
| 2.6.3.2 Tratamiento de imágenes   | 35        |
| 2.6.3.2.1 Estadística para tamaños                                      | 36        |
| 2.6.3.2.2 Seguimiento de trayectorias.                                  | 36        |
| 2.6.3.3 Microscopía electrónica de barrido.                             | 36        |
| 2.6.4 Espectroscopía de dispersión dinámica de luz.                     | 37        |
| 2.6.5 Pruebas <i>in vitro</i> .   | 38        |
| 2.6.5.1 Prueba de liberación <i>in vitro</i> .                          | 38        |
| 2.6.5.2 Pruebas de internalización.                                     | 39        |
| 2.6.5.3 Pruebas de toxicidad.   | 40        |
| 2.6.5.3.1 Ensayo MTT.   | 40        |
| Capítulo 3: Estado del Arte.  | 41        |
| <b>3.1 Motores tipo Janus.</b>  | <b>41</b> |
| <b>3.2 Motores propulsados por ultrasonido.</b>                         | <b>42</b> |
| <b>3.3 Motores controlados por campos magnéticos.</b>                   | <b>45</b> |
| <b>3.4 Motores biocompatibles.</b>                                      | <b>48</b> |
| <b>3.5 Motores acarreadores de fármacos para tratamiento de cáncer.</b> | <b>49</b> |
| <b>3.6 Motores en sistemas <i>in vivo</i>.</b>                          | <b>51</b> |
| Capítulo 4: Desarrollo experimental.                                    | 54        |
|   | XI        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.1 Hipótesis.</b>                                       | <b>54</b> |
| <b>4.2 Planteamiento experimental.</b>                      | <b>54</b> |
| 4.2.1 Síntesis de partículas de PLGA.                       | 54        |
| 4.2.1.1 Síntesis de partículas de PLGA+TAM.                 | 55        |
| 4.2.2 Síntesis de motores tipo Janus.                       | 56        |
| 4.2.2.1 Calibración de la cámara de pulverización catódica. | 56        |
| 4.2.2.2 Variación en la capa de adhesión.                   | 57        |
| 4.2.2.3 Variación en la capa magnética.                     | 58        |
| 4.2.2.4 Variación en la capa diferencial de densidad.       | 59        |
| 4.2.3 Determinación de tamaños.                             | 59        |
| 4.2.3.1 Conteo estadístico.                                 | 59        |
| 4.2.3.2 Espectroscopía de dispersión dinámica de luz.       | 60        |
| 4.2.4 Determinación de velocidades.                         | 60        |
| <b>4.3 Experimentos propuestos a futuro.</b>                | <b>61</b> |
| 4.3.1 Síntesis de partículas de PLGA+FITC.                  | 62        |
| 4.3.2 Eficiencia de encapsulamiento.                        | 62        |
| 4.3.3 Perfil de liberación.                                 | 62        |
| 4.3.4 Funcionalización de motores.                          | 63        |
| 4.3.5 Cultivo de células.                                   | 63        |
| 4.3.5.1 Pruebas de internalización.                         | 64        |
| 4.3.5.2 Ensayo de citotoxicidad.                            | 64        |
| 4.3.6 <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>       | 65        |
| <b>4.4 Resultados.</b>                                      | <b>65</b> |
| 4.4.1 Síntesis de partículas de PLGA.                       | 65        |
| 4.4.1.1 Síntesis de partículas de PLGA+TAM.                 | 67        |
| 4.4.2 Síntesis de motores tipo Janus.                       | 68        |
| 4.4.2.1 Calibración de la cámara de pulverización catódica. | 68        |
| 4.4.2.2 Variación en la capa de adhesión.                   | 70        |
| 4.4.2.3 Variación en la capa magnética.                     | 71        |
| 4.4.2.4 Variación en la capa diferencial de densidad        | 73        |
| 4.4.3 Determinación de tamaños.                             | 74        |
| 4.4.3.1 Conteo estadístico.                                 | 74        |
| 4.4.3.2 Espectroscopía de dispersión dinámica de luz.       | 75        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.4.4 Determinación de velocidades                          | 76         |
| <b>4.5 Discusión de resultados.</b>                         | <b>79</b>  |
| 4.5.1 Síntesis de partículas de PLGA.                       | 79         |
| 4.5.1.1 Síntesis de partículas de PLGA+TAM.                 | 81         |
| 4.5.1.2 Síntesis de partículas de PLGA+FITC.                | 81         |
| 4.5.2 Síntesis de motores tipo Janus.                       | 82         |
| 4.5.2.1 Calibración de la cámara de pulverización catódica. | 83         |
| 4.5.2.2 Variación en la capa de adhesión.                   | 84         |
| 4.5.2.3 Variación en la capa magnética.                     | 85         |
| 4.5.2.4 Variación en la capa diferencial de densidad.       | 92         |
| 4.5.3 Determinación de tamaños.                             | 94         |
| 4.5.3.1 Conteo estadístico.                                 | 94         |
| 4.5.3.2 Espectroscopía de dispersión dinámica de luz.       | 95         |
| 4.5.4 Determinación de velocidades.                         | 96         |
| 4.5.5 Eficiencia de encapsulamiento.                        | 96         |
| 4.5.6 Perfil de liberación                                  | 97         |
| 4.5.7 Funcionalización de motores.                          | 97         |
| 4.5.8 Cultivo de células.                                   | 97         |
| 4.5.8.1 Pruebas de internalización.                         | 97         |
| 4.5.8.2 Ensayo de citotoxicidad.                            | 99         |
| Capítulo 5: Conclusiones.                                   | 100        |
| <b>5.1 Trabajo actual.</b>                                  | <b>100</b> |
| <b>5.2 Trabajo a futuro.</b>                                | <b>101</b> |
| Referencias.  | 102        |

# Capítulo 1: Introducción.

En la actualidad, los avances tanto en ciencia de materiales como en el entendimiento de los fenómenos físicos han llevado a una serie de revoluciones tecnológicas que tienen como propósito solucionar los problemas actuales de la sociedad. La nanotecnología como rama del conocimiento busca implementar los fenómenos físicos que suceden en la escala nanométrica creando soluciones más eficientes, innovadoras o complementarias a las soluciones ya existentes.

Dentro de las ramas de la ciencia que buscan generar soluciones, la nanoingeniería se encarga de crear dispositivos de bajas dimensiones utilizando procesos innovadores de manipulación de la materia, que pueden tener aplicaciones en diversos campos de la ciencia. Por ejemplo, en el almacenamiento energético (Nan *et al.*, 2019), la producción de energías renovable (Tian *et al.*, 2019) o en el ámbito médico (Li *et al.*, 2011). Los micro y nano dispositivos buscan en su mayoría, replicar movimiento o trabajos en la macro escala, como pueden ser: rotores, motores, algunos sensores, compuertas, separadores, dispositivos de entrega de fármacos e inclusive los equipos quirúrgicos (Li *et al.*, 2017a). Sin embargo, uno de los retos a solucionar en la micro y nano escala es el desarrollo de dispositivos que puedan realizar tareas con precisión y de manera controlada. Es como respuesta a esta necesidad que surge el desarrollo de micro y nano motores (MNM).

El concepto de MNMs se encuentra inspirado en estructuras biológicas que pueden autopropulsarse como lo son las bacterias o algunos microorganismos, además pueden desempeñar una o varias tareas. Los MNMs poseen la capacidad de poder realizar más de una tarea utilizando mecanismos de acción independientes, o inclusive

adaptarse al ambiente en el que planean ser utilizados. Además, son estructuras que pueden transformar la energía de su entorno o de un estímulo en movimiento mecánico para poder realizar tareas de manera eficiente, controlada y con un costo bajo (Wang y Pumera, 2015).

Debido a las características que presentan los MNMs tales como su tamaño, su habilidad de propulsarse y la capacidad de controlar su movimiento, estos dispositivos tienen el potencial de ser aplicados para realizar tareas en zonas de difícil acceso. Para que este potencial sea aprovechado es necesario elegir materiales adecuados; es decir, que no afecten su funcionamiento ni el organismo en el que es introducido. Todo lo descrito anteriormente los hace excelentes candidatos para ser utilizados en aplicaciones biomédicas.

Dentro de los MNMs que son grandes candidatos para ser aplicados como dispositivos biomédicos se encuentran los MNMs tipo Janus que han tenido éxito en conseguir implementar mecanismos de propulsión no dañinos para el cuerpo (Wang *et al.*, 2012; Quallotine *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2019). En adición, se han desarrollado trabajos con propuestas de diseño que pueden utilizar ultrasonido como fuente energía para su propulsión (Oliveros, 2017; Xu *et al.*, 2017; Wang y Pumera, 2015; Ahmed *et al.*, 2014; Valdez-Garduño *et al.*, 2020), lo que es especialmente importante porque éste es ampliamente utilizado en el ámbito médico (Miller *et al.*, 2012; Misaridis y Jensen, 2005; Repacholi *et al.*, 2012).

De manera complementaria, los campos magnéticos pueden utilizarse para direccionar la trayectoria de dichos dispositivos al interior de los sistemas biológicos (Schattling *et al.*, 2017; Vicenti *et al.*, 2019) sin la necesidad de campos magnéticos muy

intensos ( $< 1$  mT) (Binhi y Savin, 2003). Actualmente este tipo de MNMs buscan encaminarse a la entrega o acarreamiento de fármacos como una posible aplicación (Wu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015b).

## 1.1 Planteamiento del problema y justificación.

En la actualidad, la mayoría de los tratamientos médicos administran los fármacos con un enfoque sistémico. Es decir, estos ingresan al cuerpo, entran al torrente sanguíneo y se distribuyen por todo el organismo con el fin de combatir una enfermedad. Esta estrategia no es selectiva y posee una baja efectividad (Gerber, 2008); por consiguiente, tiende a tener efectos secundarios indeseables, ya que no tratan únicamente a las células o lugares afectados (Vedotin, 2017; Mario Villela-Martinez *et al.*, 2017). Como solución se plantean tratamientos más específicos, capaces de llegar a los sitios de interés conocidos como sistemas de entrega dirigida de fármacos (Bae y Park, 2011).

El cáncer es capaz de distribuirse y desarrollarse de manera descontrolada, por lo que es importante que se trate de manera eficiente en etapas tempranas de la enfermedad. En específico, el cáncer con mayor presencia en mujeres en todo el mundo es el de mama (American Cancer Society, 2019), por lo que su tratamiento sin generar daños colaterales es de especial relevancia para reducir su tasa de mortalidad y aumentar la calidad de vida de los pacientes. Los tratamientos convencionales, como las quimioterapias o terapias radiativas, tienen efectos secundarios indeseables, los cuales hacen que el paciente abandone la terapia o deteriore su estado físico (Gorey *et al.*, 2014; Akiyama *et al.*, 2018).

Por lo anterior, utilizar a los MNMs como vehículos para el transporte de fármacos abre una ventana de oportunidad para este tipo de tratamientos, ya que proponen una entrega más eficiente y selectiva. Las ventajas que tienen sobre otros sistemas de entrega de fármacos es su participación activa y controlada ya que al tener una propulsión pueden realizar las tareas de manera más rápida y desplazarse a otros lugares de interés sin limitarse al transporte pasivo (Gao y Wang, 2014).

Adicionalmente, sus diseños pueden incorporar materiales biocompatibles y sus mecanismos de propulsión pueden tener fuentes de energía que no dañen a los organismos, siendo el ultrasonido una alternativa muy atractiva por su alta compatibilidad y sus usos ya probados en aplicaciones médicas (Nistor y Rusu, 2019). Además, es posible añadir otros componentes que ayuden a desempeñar la tarea de manera más eficiente o inclusive más de una tarea; por ejemplo, nanopartículas que permitan su control mediante campos magnéticos (Liu *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2017) o recubrimientos biológicos que reducen la respuesta inmune del organismo (Wu *et al.*, 2015).

Por otra parte, los diseños existentes de MNMs (Wang *et al.*, 2012; Parmar *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015; Oliveros, 2017; Su *et al.*, 2019) no han priorizado la biocompatibilidad, por lo que su aplicación al interior del cuerpo se ve dificultada. Como respuesta/alternativa, en el presente trabajo se seleccionaron materiales que no generen daño y de esta manera reducir el riesgo de una respuesta inmune negativa durante su aplicación. Para ello, se propone el uso de un diseño de MNMs propulsados por ultrasonido y controlados por campos magnéticos para el tratamiento de cáncer de mama.

El diseño planteado prioriza la biocompatibilidad, por lo cual está compuesto por un núcleo polimérico conformado principalmente por ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), en el cual se encapsula el fármaco tamoxifeno (TAM) y está recubierto por una estructura metálica multicapa en uno de sus hemisferios, la cual se encuentra compuesta por una capa de adhesión de titanio (Ti), una capa magnética de níquel (Ni) y una capa de alta densidad de tungsteno (W), material con aplicaciones biomédicas (Li *et al.*, 2014). Esta tricapa metálica es la que permite su propulsión, la cual se encuentra basada en la asimetría de densidad y busca reducir las asimetrías de forma, para incrementar su biocompatibilidad. Además de dotarlo con un control por medio de campos magnético, el cual lo vuelve un sistema de actuación controlada. Adicionalmente, se estudió el efecto de los parámetros de síntesis del núcleo y las capas metálicas en la velocidad de los MNMs para poder eficientar su funcionamiento y parámetros de operación.

La importancia de este trabajo recae en la versatilidad que presenta el diseño de estos motores. Los MNMs propuestos son un sistema innovador que posee características fácilmente manipulables; por esa razón, son excelentes candidatos para el transporte y liberación de fármacos de una manera no invasiva y controlada. Dado que su mecanismo de propulsión es accionado y mantenido por la presencia de ondas de ultrasonido. Además, su trayectoria puede ser controlada a través de campos magnéticos para hacer más eficiente su propulsión (Valdez-Garduño *et al.*, 2020).

Con la finalidad de incrementar la selectividad de este sistema, una de las perspectivas a futuro sería funcionalizar la superficie con anticuerpos que reconozcan y se unan a proteínas expresadas en las células cancerígenas. Esto permitirá que la

entrega del fármaco sea mayoritariamente en las células de cáncer de mama, este proceso es comúnmente llamado entrega dirigida de fármacos.

En un futuro se plantean realizar pruebas *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-123) para evaluar la eficiencia de internalización de internalización y el efecto de cada uno de los componentes del diseño de estos MNMs en la viabilidad celular. El poder comprobar que el arreglo propuesto para este tipo de motores es funcional en un medio biológico, *in vitro* con células de cáncer de mama, es el paso siguiente para proyectarlos como un sistema viable que puede potencialmente ser utilizado en humanos.

En los capítulos siguientes se desarrollará una explicación detallada de los componentes del proyecto. Comenzando en el capítulo 2 por el marco teórico en el cual se desenvuelve el trabajo, seguido del estado del arte actual en nanomotores y vehículos de entrega de fármacos en el capítulo 3. Para así continuar con el desarrollo experimental en el capítulo 4 donde se presenta la metodología, resultados experimentales y su discusión. Finalmente, se exponen las conclusiones en el capítulo 5.

## 1.2 Objetivos generales y específicos del trabajo.

### 1.2.1 Objetivo general.

El presente trabajo tiene como objetivo el diseñar, sintetizar y evaluar la propulsión de micro/nanomotores tipo Janus para el transporte de tamoxifeno. En adición, se plantea evaluar su funcionamiento en estudios *in vitro* en el tratamiento de cáncer de mama responsivo a estrógenos (ER+), objetivo que no se cumplió debido a la contingencia presentadas durante el periodo de cuarentena.

### *1.2.2 Objetivos específicos.*

- Sintetizar partículas de PLGA mediante el método de nanoprecipitación.
- Encapsular tamoxifeno en las partículas de PLGA (PLGA-TAM) a través del método de nanoprecipitación.
- Conocer el efecto de la concentración de surfactante, el volumen de la gota, la velocidad de goteo y la concentración del polímero en el tamaño de las partículas.
- Depositar una película delgada Ti-Ni-W sobre las partículas (PLGA-TAM).
- Propulsar a los motores por medio de ultrasonido y controlar su trayectoria utilizando campos magnéticos en un medio acuoso.
- Evaluar la velocidad y aglomeración de los motores posterior a su propulsión en un medio acuoso.
- Observar el efecto de la capa de adhesión en la aglomeración y velocidad de los motores.
- Observar el efecto de la capa magnética (Ni) en la aglomeración y la velocidad de los motores.
- Observar el efecto de la capa diferencial de densidad (W) en la velocidad de los motores.

## Capítulo 2: Marco Teórico.

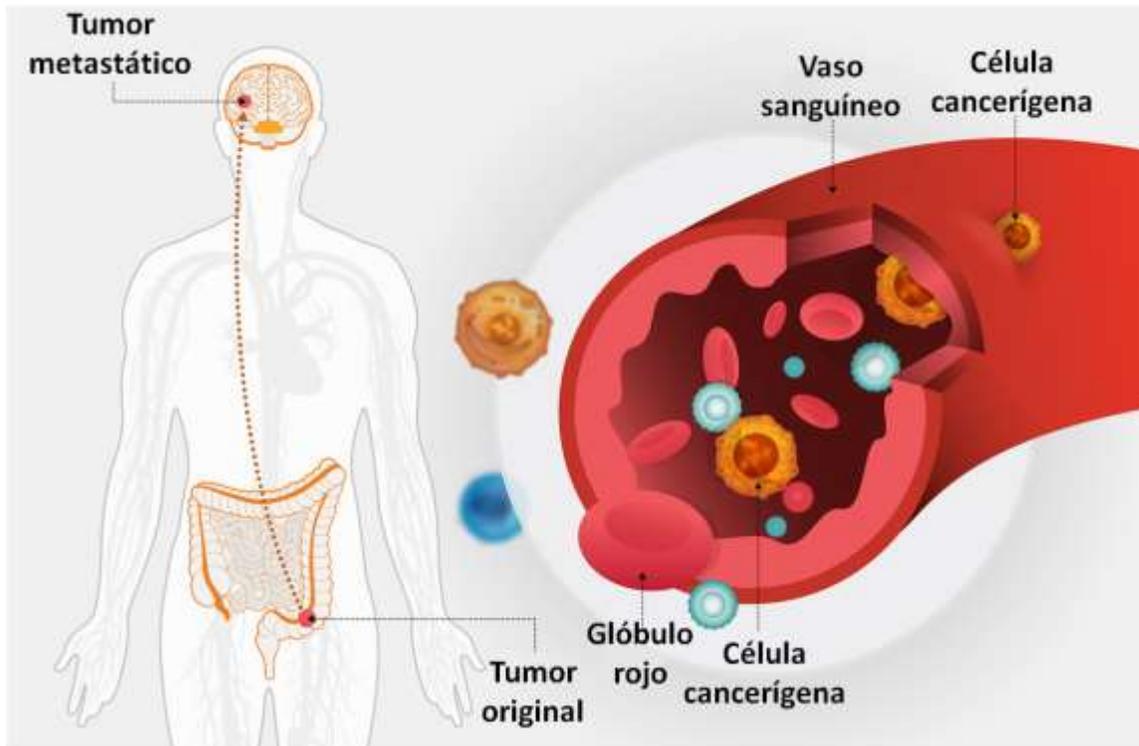
El marco teórico comprende los conceptos necesarios para el entendimiento del desarrollo experimental y la selección de pruebas. Se empezará con el padecimiento para el cual se planteó el diseño de estos MNMs: el cáncer.

### 2.1 Cáncer.

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una división celular inmoderada, capaz de esparcirse a los tejidos circundantes. En varios tipos de cáncer se pueden formar tumores, que son masas de tejido generados por la acumulación de células que se dividen incluso cuando no son necesarias. Además, a diferencia de las células normales, las células cancerígenas son capaces de evadir los procesos de apoptosis (National Cancer Institute, 2015; Cancer Research UK, 2019).

Asimismo, los tumores cancerígenos pueden invadir tejidos circundantes, así como introducirse en el torrente sanguíneo o el sistema linfático para llegar a lugares distantes y formar tumores secundarios. Este proceso es conocido como metástasis (**Figura 1**) y puede llegar a complicar el alcance de los tratamientos.

Debido a que el cáncer puede manifestarse en casi cualquier parte del cuerpo, existen más de 100 tipos diferentes de cáncer, cuyo nombre está dado por el órgano o tejido en el que se localiza; sin embargo, se pueden dividir en cinco categorías: carcinomas, linfomas, leucemias, tumores cerebrales y sarcomas (National Cancer Institute, 2015; Cancer Research UK, 2019; Organización Mundial de la Salud, 2019).



**Figura 1.** Proceso de metástasis (NIH, 2019).

### 2.1.1 Cáncer de mama.

En este trabajo nos enfocaremos en el cáncer de mama, debido a que es el tipo de cáncer más común en mujeres, con más del 25% de los casos totales de cáncer en mujeres. Comúnmente, suele presentarse como carcinoma in situ o invasivo; no obstante, algunos casos se clasifican como sarcoma, particularmente cistosarcoma filoides o angiosarcoma (American Cancer Society, 2019; Johns Hopkins University, 2019).

#### 2.1.1.1 Receptor de estrógeno (ER).

Otra opción para clasificar al cáncer de mama es evaluar la presencia de receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) o de factor de crecimiento epidérmico

humano 2 (HER2). Esto con el objetivo de elegir un tratamiento que se adecúe al tipo de proteínas que la célula produzca (American Cancer Society, 2019).

Cabe mencionar que existen dos tipos de receptores de estrógeno: ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ . A grandes rasgos, se puede hablar de ellos como receptores nucleares que contienen un dominio central conservado, conformado por el dominio de unión al ADN y el dominio de unión del ligando (Gross y Yee, 2002; Williams y Lin, 2013).

#### 2.1.1.1.1 ER- $\alpha$ .

Este subtipo de receptores de estrógeno fue el primero en ser identificado en tejido mamario y se encuentra expresado en un subgrupo de células epiteliales. Aunque también está presente en útero, ovarios, huesos, órganos reproductores masculinos, próstata, hígado y tejido adiposo (Gross y Yee, 2002; Williams y Lin, 2013; Paterni *et al.*, 2014).

Algunas de las funciones generales de este receptor están relacionadas con las glándulas mamarias y el útero, aunque también se le atribuye el mantenimiento de la homeostasis esquelética y la regulación del metabolismo (Paterni *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha encontrado un aumento en la proliferación de las células de cáncer de mama cuando los receptores de estrógeno son activados. Cabe destacar que su sobreexpresión suele darse en etapas avanzadas de algunos tipos de cáncer de mama, como el carcinoma lobular o etapas tempranas de carcinoma ductal, por lo que puede utilizarse como marcador para un tratamiento más efectivo (Paterni *et al.*, 2014).

En cuanto a terminología, aquellas células cancerígenas que contienen ER- $\alpha$  son denominadas células de cáncer de mama ER+. Además, el crecimiento de este tipo de

células está relacionado a la presencia de estrógeno. Es relevante destacar a este grupo, ya que alrededor del 70% de los casos de cáncer de mama son ER+ y dependientes de hormonas (Lumachi, *et al.*, 2013).

#### 2.1.1.1.2 ER- $\beta$ .

En el caso del ER- $\beta$ , es posible encontrarlo en tejido mamario tanto en células epiteliales como estromales. Además, está expresado en próstata, vejiga, ovarios, colon, tejido adiposo y sistema inmunológico. Sus funciones más importantes están relacionadas con este último, así como con el sistema nervioso central (Paterni *et al.*, 2014).

A pesar de que aún no se encuentra bien estudiada su función, existe evidencia para sustentar que su papel en el cáncer de mama es contrarrestar los efectos proliferativos de ER- $\alpha$ . Incluso, cuando se trata de cáncer de próstata ha mostrado desencadenar un efecto pro-apoptótico (Paterni *et al.*, 2014).

Es importante mencionar que, aunque este subtipo es menos común e incluso puede dejar de ser expresado en etapas avanzadas de carcinoma lobular, se ha encontrado que cuando está presente responde favorablemente ante medicamentos como el tamoxifeno (Paterni *et al.*, 2014; Williams y Lin, 2013). Lo cual nos dice que sin importar qué tipo de receptor de estrógeno exprese la célula de cáncer de mama, ambos responden favorablemente a tamoxifeno.

### 2.1.1.2 Tamoxifeno.

Los tratamientos actuales para el cáncer de mama suelen ser la cirugía, radioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida, inmunoterapia y quimioterapia (National Center Institute, 2019).

En el caso de la terapia hormonal para cáncer de mama ER+, el tamoxifeno es uno de los fármacos utilizados, pues se ha observado que posee las propiedades de un antagonista parcial de estrógeno tanto en modelos animales como en mujeres, por lo que se dice que es un inhibidor competitivo de estradiol (un tipo de estrógeno) en la unión al ER (Kufe, *et al.*, 2003).

En general, los estrógenos modulan el crecimiento celular al incrementar los factores de crecimiento y disminuir los factores inhibitorios de crecimiento, los cuales inician o previenen el progreso del ciclo celular al interactuar con sus receptores de membrana. Por esta razón, el tamoxifeno es uno de los tratamientos utilizados para este tipo de cáncer, ya que previene de manera reversible el crecimiento estimulado por estrógeno (Kufe, *et al.*, 2003).

A grandes rasgos, los antiestrógenos como el tamoxifeno, se unen al ER de tipo y producen un cambio en su estructura terciaria, lo cual altera su interacción con los elementos de respuesta a estrógeno (ERE). Por otro lado, tienen el efecto contrario a los estrógenos, pues disminuyen la producción de factores de crecimiento (TGF- $\alpha$ , IGF-1) y aumentan la de inhibidores de crecimiento (TGF- $\beta$ ) (Kufe, *et al.*, 2003).

No obstante, una de las desventajas del tamoxifeno es que, al ser suministrado de manera sistémica puede llegar a causar cáncer endometrial, este riesgo aumenta para las mujeres posmenopáusicas; sin embargo, el número de casos es menor al 1% por año

(National Institute of Cancer, 2019; American Cancer Society, 2019). Adicionalmente, presenta cuatro grandes efectos secundarios: la sensación de sofoco, ganancia de peso, insomnio y dolor articular (Garreau *et al.*, 2006). Estos son síntomas que pueden llevar a la suspensión del tratamiento, también se han reportado dejar secuelas por su interacción con el cerebro, como es la depresión asociada a altas dosis de este medicamento, que merma la calidad de vida del paciente aún cuando éste supera el cáncer (Lee *et al.*, 2007).

## 2.2 Vehículos de entrega de fármacos

A manera de disminuir los efectos secundarios de algunos fármacos al ser administrados sistémicamente, se han desarrollado vehículos de transporte que pueden definirse como sistemas en los que se encapsula un fármaco. El objetivo de estos vehículos es aumentar la selectividad del medicamento, su efectividad y la eficiencia de su entrega (Senapati *et al.*, 2018).

### 2.2.1 Características.

Dependiendo de la aplicación que se le vaya a dar a los vehículos, se deberán ajustar sus características fisicoquímicas. Por ejemplo, se debe considerar su forma, tamaño, carga superficial y materiales dependiendo del lugar al que se dirijan y las sustancias que vayan a transportar.

### 2.2.1.1 Biocompatibilidad.

Una característica fundamental para la elección de materiales en aplicaciones biomédicas es la biocompatibilidad. Esta propiedad es definida como la cualidad de un material para reemplazar, mejorar o sustituir funciones en un sistema biológico sin generar estrés o una respuesta dañina (Kennedy *et al.*, 2012). De la misma forma, esta propiedad puede verse definida en términos de su respuesta inmune, pues pretende evitar las respuestas negativas y minimizar el rechazo del huésped (Remes y Williams, 1992). También se ha definido como la capacidad de un material para generar una respuesta apropiada en el huésped, la cual dependerá de la aplicación (Anderson, 2012).

Con el fin de reducir el daño generado al organismo por parte de estos sistemas, los diseños buscan emplear materiales compatibles con el organismo. Estos pueden tener tres vertientes: materiales bioinertes que buscan evitar cualquier tipo de reacción con el organismo, materiales bioactivos que promueven una respuesta favorable al interior del organismo y los materiales inteligentes, con los cuales se obtiene una respuesta adaptativa y mejorada en el organismo (Parmar *et al.*, 2015).

Los materiales biocompatibles son elementos que buscan desempeñar funciones como la mejora estructural de los tejidos circundantes o los que se están supliendo, el restablecimiento de funciones corporales y sistémicas o combatir de problemas de salud. Sin embargo, para que cumplan con su función, es importante que no generen una reacción adversa o contraproducente dentro del organismo; por el contrario, se busca que éstos tengan una respuesta benéfica en su aplicación con el fin de implementar mejoras en las funciones del mismo (Hermawan *et al.*, 2011).

#### 2.2.1.1.1 Forma.

La morfología del vehículo afecta su internalización celular, su tiempo de circulación y su destino dentro del organismo. De acuerdo con Blanco *et al.* (2015), se ha comprobado que en la nano escala los filamentos permanecen en el torrente sanguíneo más de una semana, mientras que las partículas esféricas sólo están 2 ó 3 días. Un efecto relacionado es que las partículas esféricas son internalizadas más rápido.

#### 2.2.1.1.2 Tamaño.

El tamaño puede influenciar el tiempo que el material se encontrará en el cuerpo, su extravasación y su procesamiento por macrófagos. En el caso de las partículas que son utilizadas para el tratamiento de cáncer, se recomienda que tengan un tamaño aproximado de 100 nm, pues se encuentran en circulación el tiempo suficiente para cumplir su función, pues son capaces de extravasarse a los tumores por medio de las fenestras, que son los espacios entre células (Blanco *et al.*, 2015).

#### 2.2.1.1.3 Carga superficial.

Por otro lado, la carga superficial permite modificar el tiempo que el material permanece en el torrente sanguíneo, así como mejorar su acumulación en el sitio de interés. Por ejemplo, se ha demostrado que las partículas poliméricas cargadas negativamente tienen un mayor tiempo en circulación y una menor acumulación en hígado y bazo. Mientras que las partículas cargadas positivamente suelen distribuirse de una manera no específica y por ende su acumulación no es regular (Blanco *et al.*, 2015).

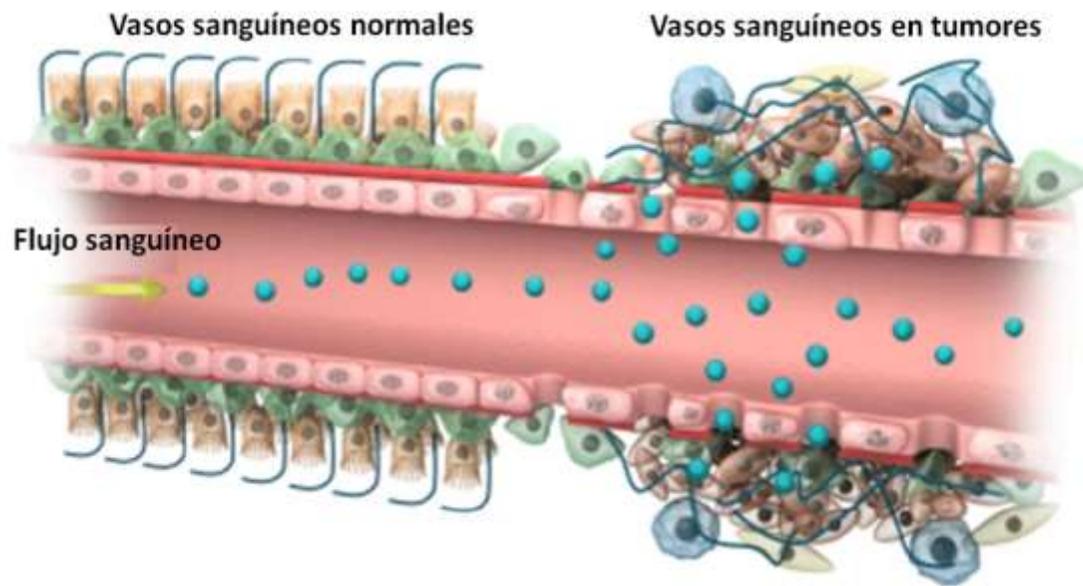
## 2.2.2 Tipos de entrega de fármacos.

Es indispensable elegir las propiedades adecuadas del vehículo de entrega dependiendo de su aplicación. Además, dependiendo de sus propiedades se clasifican en vehículos de entrega pasiva y activa; el primer tipo hace uso de las propiedades del vehículo para que pueda acumularse en el sitio afectado, mientras que el segundo incluye elementos que interactúan de manera específica con un agente al interior del cuerpo (Torchilin, 2010).

### 2.2.2.1 Entrega pasiva.

Los vehículos de direccionamiento pasivo al ser aplicados al tratamiento de cáncer aprovechan el efecto de resiliencia y permeabilidad aumentada (EPR, por sus siglas en inglés). En otras palabras, su efectividad se basa en el tamaño del material, su tiempo de circulación y principalmente, en las características de los tumores (Torchilin, 2010; Attia *et al.*, 2019).

Para comprender mejor este efecto, se debe mencionar que los tumores están formados por células que crecen de manera no controlada, por lo que requieren una gran cantidad de nutrientes. Por ello, se encuentran altamente irrigados, pero sus vasos sanguíneos tienen fugas que proporcionan un lugar idóneo para que los materiales que transportan el fármaco queden atrapados (**Figura 2**) y tengan tiempo suficiente para liberarlo (Torchilin, 2010; Attia *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Representación del efecto EPR y su relación con las nanopartículas de entrega pasiva (Abdalla et al., 2018).

#### 2.2.2.2 Entrega dirigida.

En cuanto a los vehículos de direccionamiento activo, la superficie de estos materiales se funcionaliza con ciertos ligandos que pueden ser identificados por un tejido específico. También se han utilizado materiales sensibles a estímulos como temperatura, ultrasonido o pH para liberar el fármaco en un sitio específico. Debido a que su acumulación en el sitio de interés ya no depende del efecto EPR, se dice que este tipo de sistemas tiene una mayor eficiencia. De igual forma, ofrecen a los pacientes una mayor seguridad, puesto que al ser tan específicos protegen a las células sanas de los efectos adversos de los fármacos, reducen la dosis requerida para combatir el cáncer y evitan que las células tumorales adquieran resistencia a los medicamentos (Torchilin, 2010; Bhatia, 2010; Attia *et al.*, 2019).

Dentro de esta categoría se encuentran los materiales inteligentes, llamados así porque son capaces de responder a los cambios del ambiente donde desempeñan su

función. Por lo que su eficiencia no depende de su tiempo de permanencia en el organismo, debido a que su movimiento está influenciado por factores como el pH o la concentración de O<sub>2</sub> (Albanese, *et al.*, 2012).

## 2.3 Micro/Nanomotores (MNM).

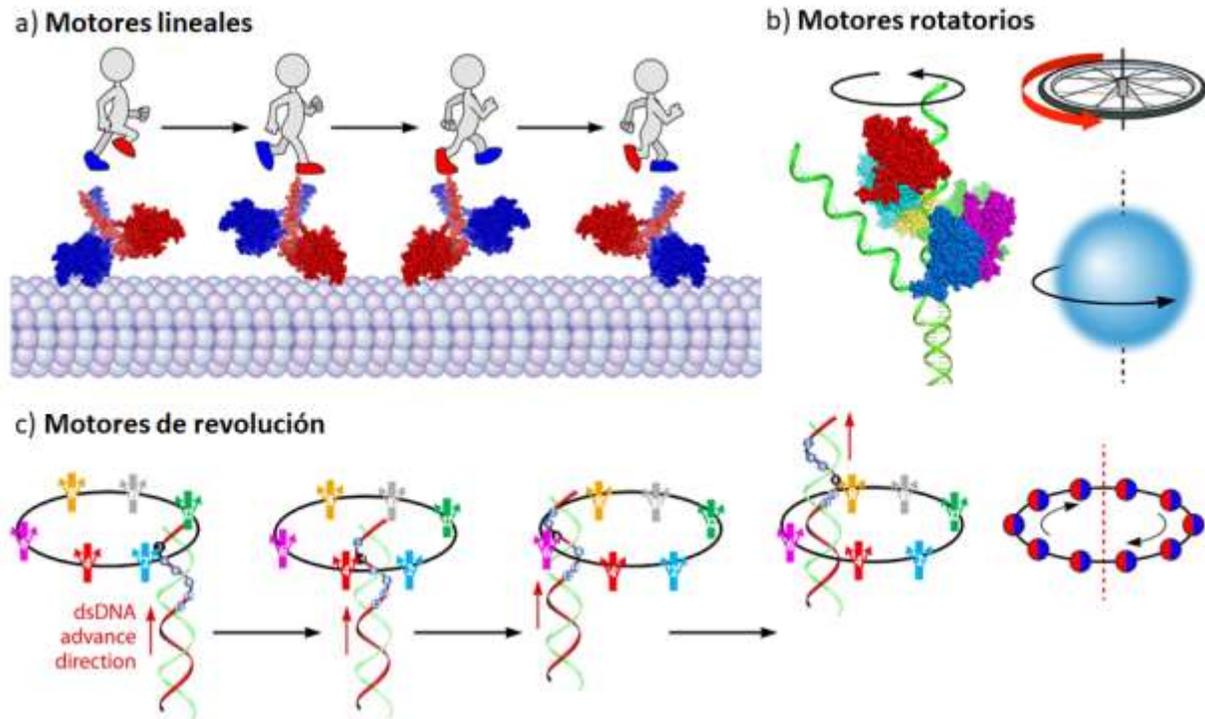
Los motores en escalas pequeñas funcionan como una plataforma para la nueva generación de tratamientos médicos; esto principalmente por su versatilidad de funcionar con distintos mecanismos de movimiento (Tu *et al.*, 2017). Pueden poseer propulsión externa o autopropulsión y buscan imitar sistemas biológicos que poseen un movimiento autónomo y controlado (Li *et al.*, 2017a), con el fin de poder ser operados al interior de locaciones de difícil acceso. Por otro lado, el tamaño de sus diseños va desde los 30 nm hasta 20 µm (Safdar *et al.*, 2018), lo que facilita ajustar el diseño a las aplicaciones propuestas. Sin embargo, los mecanismos de propulsión aún están bajo estudio y continuamente se busca utilizar nuevos fenómenos para propulsarlos. Por lo tanto, son un campo en continuo desarrollo.

Existen distintos obstáculos que presenta la locomoción a esta escala, como lo son: el movimiento Browniano, las fuerzas asociadas a los bajos números de Reynolds y la disponibilidad de energía en el lugar donde realizarán sus tareas (Li *et al.*, 2017; Abdelmohsen *et al.*, 2014; Tu *et al.*, 2017). La manera en la que se abordan estos fenómenos dicta los componentes que se han utilizado, como pueden ser polímeros, metales o materiales inorgánicos. Asimismo, determina la clasificación de los MNMS; por ejemplo, químicos, propulsados por luz o por campos magnéticos.

### 2.3.1 Motores biológicos.

Los motores biológicos o motores moleculares son sintetizados por sistemas biológicos y son responsables de la motilidad de algunos seres vivos, así como de procesos metabólicos importantes. Su participación en los procesos en los que están involucrados es clave, ya que sin ellos estos procesos serían termodinámicamente favorables. A partir de su descubrimiento estos motores sirvieron como inspiración para el desarrollo de MNMs sintéticos/artificiales (Guo *et al.*, 2016).

Estos motores se clasifican de acuerdo a los movimientos que desempeñan, y se encuentran divididos en 3 tipos (**Figura 3**). Los lineales, que únicamente ayudan a realizar la contracción o distensión de un elemento; (Roberts *et al.*, 2013) los rotatorios, que realizan giros completos alrededor de su propio eje y tienen etapas para su movimiento (Enemark y Joshua-Tor, 2006). Finalmente, los de revolución, que giran alrededor de otro objeto y estos tienen funciones como el empaquetamiento de proteínas o ADN (Burroughs *et al.*, 2007).

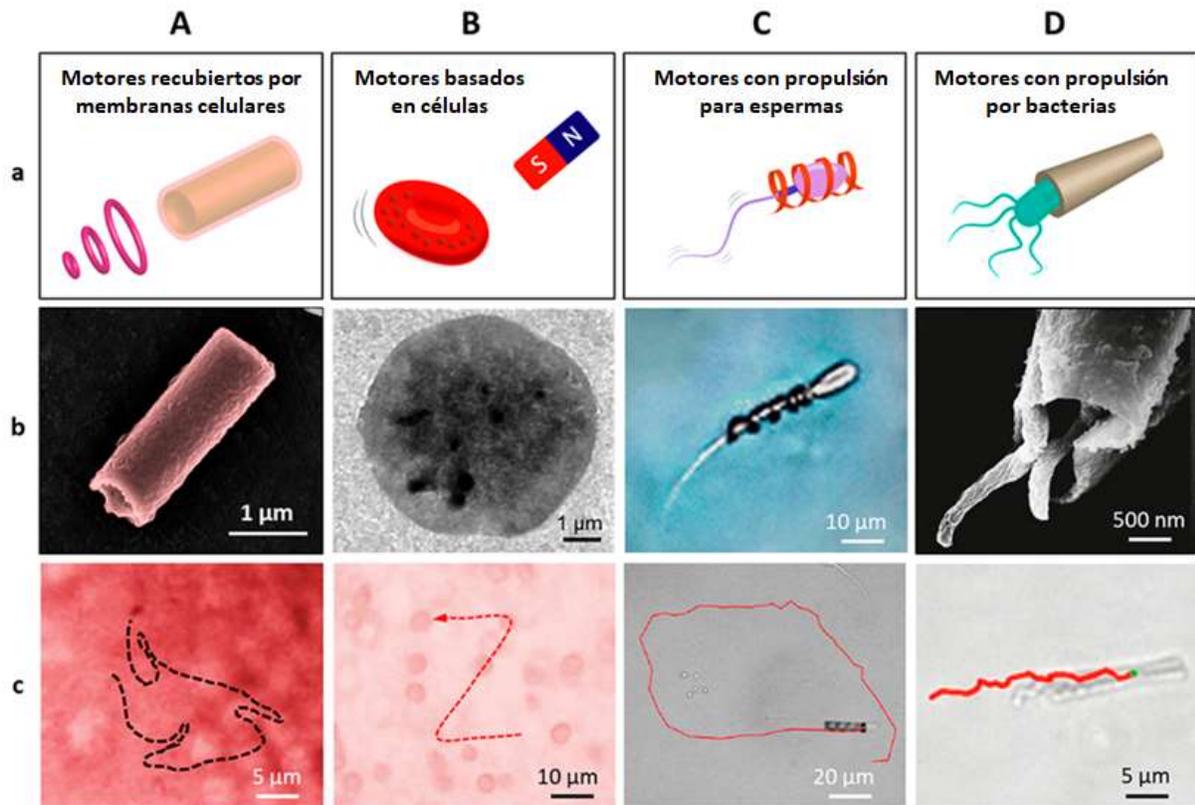


**Figura 3.** Tipos de motores biológicos. **a)** Motores lineales, **b)** Motores rotatorios, **c)** Motores de revolución (Guo et al., 2016).

### 2.3.1.1 Motores biohíbridos.

Otra de las posibles vertientes son los motores bio-híbridos, caracterizados por la implementación de agentes biológicos como fuente principal de movimiento, ya poseen locomoción por sí mismos (**Figura 4b,c**) (Esteban-Fernández de Ávila *et al.*, 2018).

Sin embargo, también pueden tratarse de estructuras sintéticas a las cuales se les añade un componente biológico con propiedades catalíticas (enzimas) para hacer uso de combustibles que se encuentran al interior del cuerpo, como lo son la glucosa o la urea (**Figura 4a**). Cabe resaltar que éstos emplean distintos mecanismos de movimiento como la electroforesis, la cual es generada por un gradiente de protones o de iones en el medio (Katuri *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Ejemplos de motores híbridos. **A)** (a) Estructura esquemática y mecanismo de propulsión de un motor acústico recubierto de membrana celular, (b) Micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de un nanohilo de oro (AuNW) recubierto de membrana de glóbulos rojo y plaquetas (RBC-PL), y (c) Propulsión por ultrasonido de un motor RBC-PL en sangre. **B)** (a) Estructura esquemática y mecanismo de propulsión de un glóbulo rojo con nanopartículas magnéticas en su interior (b) Micrografía de un glóbulo rojo con nanopartículas magnéticas en su interior, y (c) Propulsión por campos magnéticos de un motor de glóbulo rojo con nanopartículas magnéticas en su interior **C)** (a) Estructura esquemática y mecanismo de propulsión de un motor magnético basado en espermatozoides, (b) imagen óptica de un micromotor híbrido basado en espermatozoides y (c) micro hélice magnética para transporte de espermatozoide. **D)** (a) Estructura esquemática y mecanismo de propulsión de un motor a base de bacterias, (b) Micrografía SEM de un micronadador impulsado por una bacteria *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MSR-1), y (c) propulsión activa del micro nadador con motor MSR-1. (Esteban-Fernández de Ávila et al., 2018b)

### 2.3.2 Motores tipo Janus.

Un tipo de motor que resulta de especial interés para el trabajo, son los de tipo Janus. Los MNMs tipo Janus poseen dos caras con distintas propiedades (**Figura 5**). Su principal característica es que están conformadas por dos caras de elementos con diferentes propiedades fisicoquímicas (Su *et al.*, 2019). Su propulsión normalmente se

relaciona a estas propiedades superficiales, en las que un lado provee una mayor propulsión que el otro y por ello se tiene una dirección preferencial para el movimiento.



**Figura 5.** Ejemplos de motores tipo Janus clasificados de acuerdo a su método de síntesis (Ye et al., 2019).

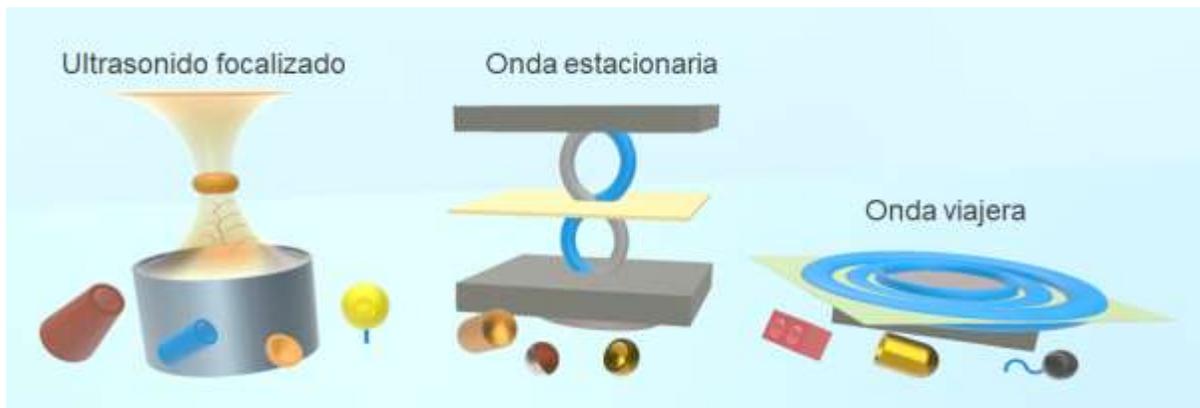
Cabe destacar que el primer acercamiento de las estructuras tipo Janus a la obtención de energía fue a través del diseño de motores catalíticos. Éstos colectan su energía de manera local, por ello su movimiento depende de la descomposición de elementos en su entorno a partir de reacciones químicas superficiales (Li *et al.*, 2017a). Aunque, los combustibles y los productos de su descomposición pueden generar reacciones adversas en el organismo. Asimismo, los materiales catalíticos pueden afectar las rutas metabólicas de los sistemas biológicos y reducir la biocompatibilidad de estos diseños (Gao *et al.*, 2012).

Otro acercamiento es obtener energía de fuentes externas al organismo o en la vecindad del motor. Así surgieron los motores que colectan la energía de fuentes que pueden estar en contacto con el cuerpo. Dichas fuentes hacen posible la transmisión de energía sin dañar al organismo, tal es el caso de los campos que son generados por una fuente ajena al lugar de aplicación; pueden ser electromagnéticos (luz), magnéticos, eléctricos o vibratoriales (ultrasonido), entre otros (Abdelmohsen *et al.*, 2014). El uso de estos campos supone, la implementación de fenómenos con acción a distancia.

### 2.3.3 Micro/Nanomotores propulsados por ultrasonido.

Dentro de los distintos mecanismos de propulsión que existen se encuentra la acustoforesis impulsada por ultrasonido, el cual genera vibraciones en los materiales. Los motores propulsados de este modo tienen tres principales clasificaciones de acuerdo con cómo se propagan las ondas en el sistema (**Figura 6**). La primera ocurre cuando el ultrasonido se encuentra focalizado en la estructura, lo cual aporta mucha energía al sistema y es propicio para los cambios de fase de algunos componentes, como la generación y desprendimiento de burbujas. Mientras que las otras dos clasificaciones generalmente se refieren a la orientación de los frentes de onda con respecto al movimiento, perpendicular y paralelo, que dan lugar a los tipos llamados de onda estacionaria y de onda viajera, respectivamente (Xu *et al.*, 2017). Por otra parte, es importante observar que los arreglos experimentales pueden variar en el acomodo de los transductores y el movimiento no tiene que estar únicamente confinado a una dirección, ya que la generación de la onda puede cambiar de orientación y su interacción es lo que propulsa los sistemas.

En el presente trabajo se fabricaron micromotores de onda estacionaria. Los materiales y su distribución en el diseño de dicho tipo de motores propician una diferencia en las corrientes generadas por las vibraciones asociadas a la densidad de los materiales como lo describe Nadal y Lauga (2014). Por otra parte, de acuerdo a la geometría de los motores las vibraciones pueden provocar oscilaciones en las estructuras y estas contribuyen al movimiento (Valdez-Garduño *et al.*, 2020).



**Figura 6.** Tipos de ultrasonido y estructuras típicamente propulsadas por cada uno de ellos.

#### 2.3.4 Control por campos magnéticos.

Independientemente de la propulsión de los MNMs, el control de los mismos puede ser complicado, en especial si se busca manipularlos por un campo magnético externo. El magnetismo presenta un área de oportunidad, ya que al añadir un material magnético en el diseño y utilizar un campo magnético externo, se pueden generar torques que alteran la dirección en la que se mueven los motores. La principal causa de este fenómeno es que un material ferromagnético alinea sus dominios magnéticos en el sentido de un campo magnético externo, que al moverse genera una torca sobre los materiales y la trayectoria resultante es tangente a la dirección del campo magnético externo (Baraban *et al.*, 2013).

## 2.4 Materiales.

Una parte crucial al diseñar los MNMs es la elección del material. Los materiales no sólo deben ser los adecuados para aprovechar los fenómenos antes descritos y así generar propulsión, también deben ser biocompatibles si se desea implementarlos en seres vivos. Esto nos lleva a un nuevo objeto de estudio: los biomateriales.

Al tratarse de sistemas a micro y nanoescala, los motores deben cumplir con ciertos criterios de acuerdo a su aplicación para considerarse biocompatibles; entre ellos se encuentran los mecanismos de degradación, su tamaño, forma y características superficiales (Wang y Pumera, 2017).

Las posibles consecuencias posteriores a la aplicación están estrechamente relacionadas con los mecanismos de degradación de los materiales y son proporcionales al tiempo de interacción. Los diseños que tienen un tiempo de operación prolongado son más susceptibles a verse alterados por los procesos de degradación. Tal es el caso de los metales o polímeros al interior del cuerpo; ambos poseen una tendencia a degradarse, por lo que sus subproductos no deben alterar rutas metabólicas u otros mecanismos celulares ajenos al propósito de su uso (Parmar *et al.*, 2015; Cañas-Carrell *et al.*, 2014).

Una vez analizadas las características requeridas por el motor propuesto en este trabajo (**Figura 7**), como lo son: materiales biocompatibles que puedan transportar un fármaco y degradarse al interior del cuerpo, una distribución asimétrica en la densidad del motor y una respuesta magnética en su interior. Se realizó una selección de materiales, de los cuales se hablarán con mayor detalle a continuación.

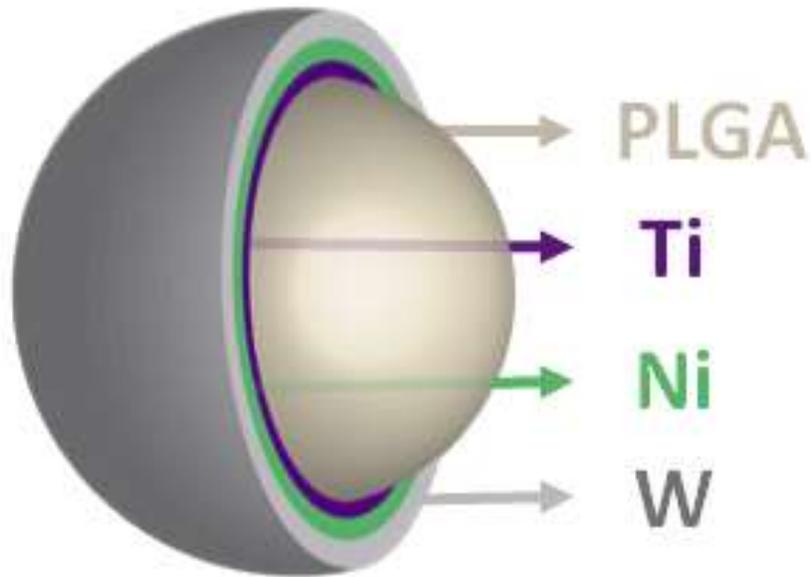


Figura 7. Diseño propuesto del motor.

#### 2.4.1 Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

El primer material seleccionado para la entrega de fármacos fue el ácido poliláctico co-glicólico (PLGA por sus siglas en inglés), que es un copolímero, que entre sus diversas aplicaciones ha mostrado un gran potencial como acarreador de fármacos, proteínas, así como otras macromoléculas y en ingeniería de tejidos suele utilizarse para fabricar andamios (Makadia y Siegel, 2005).

Una de las ventajas que posee a diferencia de otros polímeros es que ya se encuentra aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés). Además, sus características fisicoquímicas pueden ser modificadas al variar la razón entre los polímeros que lo conforman, su estereoisomería o su peso molecular (Bala *et al.*, 2004; Makadia y Siegel, 2005). De esta manera, es posible controlar la cantidad de medicamento que se libera y su tiempo de degradación dentro del organismo.

## 2.4.2 Níquel.

Con respecto al recubrimiento, se consideraron dos elementos níquel (Ni) y tungsteno (W). Ambos metales han sido utilizados en aplicaciones al interior del cuerpo humano, el Ni se utiliza comúnmente en filamentos o prótesis con memoria de forma, en su mayoría se encuentra como compuesto de una aleación (Cañas-Carell *et al.*, 2014).

En el diseño propuesto en este trabajo, el níquel cumple la función de ayudar a la orientación por campos magnéticos por su naturaleza ferromagnética (Finch *et al.*, 2008; Chinde y Grover, 2017). Tiende a tener una estructura granular, la cual contribuye a la formación de dominios magnéticos de tamaño similar al tamaño de grano (Kumar, 2010), De igual manera, cuando es depositada en películas delgadas tiende a formar policristales de tamaño variable; el tamaño se encuentra modulado por la superficie en donde se realiza el crecimiento. Otra afectación de la superficie está dada por las deformaciones o esfuerzos mecánicos que alteran la respuesta magnética de las películas delgadas (Wu *et al.*, 2010)

Al encontrarse en una estructura de capas, el níquel altera de manera positiva el crecimiento de tungsteno en la interface y con ello se disminuye la posibilidad de la liberación de estructura  $\beta$  de tungsteno, la cual tiene antecedentes de ser tóxica (Hermawan *et al.*, 2011; Dewidar *et al.*, 2006; Witten, 2012; Malischewsky y Tuan, 2009).

#### 2.4.5 Tungsteno.

Algunas de las aplicaciones biomédicas del tungsteno (W) son la fabricación pequeños alambres que ayudan a prevenir el colapso de arterias o venas (Cañas-Carell *et al.*, 2014).

Para el caso de los motores propuestos en este trabajo, la última consideración del diseño es la interacción de los átomos metálicos posterior a los procesos de degradación por los que atraviesa el micromotor. La capa externa de W, no presenta riesgos a la salud, ya que la dosis contenida en 100 mg de motores sería menor a la que se respira en una ciudad industrializada; sin tomar en cuenta la frecuencia de administración. Por otra parte, la eliminación de este metal es por orina, por lo cual es difícil que llegue a interactuar directamente con los alvéolos pulmonares, donde presenta su mayor riesgo al ser aspirado y envenenar los centros de intercambio de oxígeno (Kennedy *et al.*, 2012; Idil y Donaldson, 2018; Peuster *et al.*, 2003; Ogundipe *et al.*, 2006).

Dentro de las características de este material se encuentra su alta densidad de 19.3 g/cm<sup>3</sup> (National Center for Biotechnology Information, 2020), la cual proporciona un elemento diferencial que permite una diferencia de densidades elevada y promueve una mayor propulsión en el diseño utilizado.

#### 2.4.4 Titanio.

Al diseño se le puede incorporar una capa pequeña de titanio (Ti) para mejorar la adhesión de las capas metálicas al núcleo polimérico. En otros casos, el Ti es el metal más utilizado en los materiales como placas o prótesis tanto en uso neurológico u ortopédico (López-Huerta *et al.*, 2014; Stojanovic, 2018). También reduce la emisión de

iones de Ni que pueden llegar a formar parte de procesos biológicos (Finch *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2004).

Además, cuando es utilizado como sustrato para el crecimiento o depósito de películas delgadas de níquel, modifica la respuesta magnética de sus dominios magnéticos (Bhatt *et al.*, 2006).

## 2.5 Técnicas de síntesis.

Para la fabricación de los MNMs se llevaron a cabo dos etapas de síntesis, la primera se enfocó en la creación del núcleo; es decir, la partícula de PLGA cargada con tamoxifeno a través de la técnica de nanoprecipitación. Mientras que en la segunda etapa se recubrió parcialmente a la esfera con capas metálicas con la técnica de pulverización catódica.

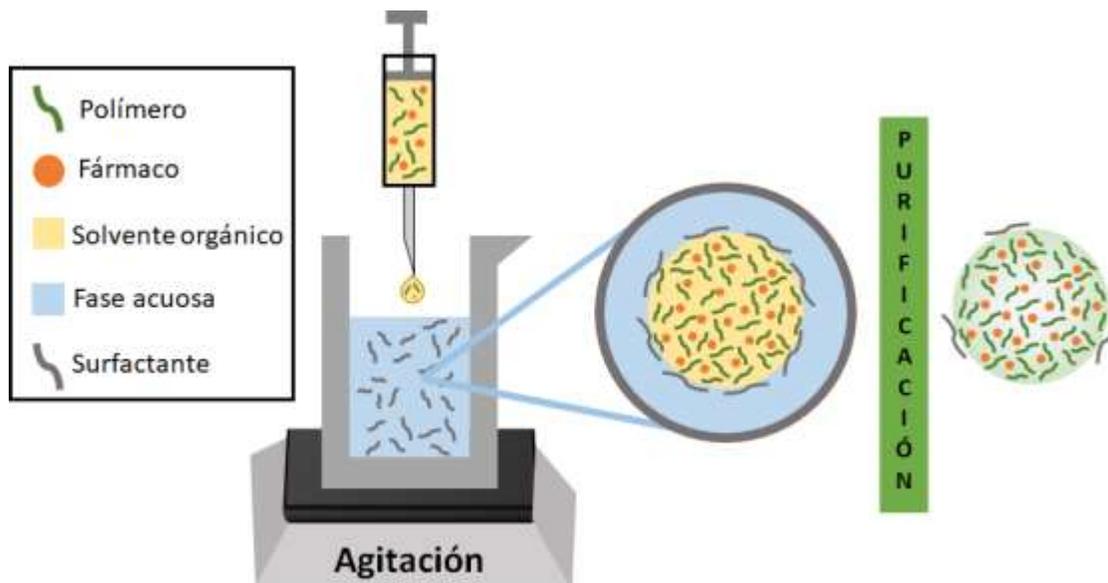
### 2.5.1 Nanoprecipitación.

Existen diferentes técnicas para la síntesis de partículas poliméricas; sin embargo, debido a que se utilizará PLGA y se encapsulará tamoxifeno, un fármaco hidrofóbico, se recomienda su síntesis por nanoprecipitación ya que se suele tener una mayor eficiencia de encapsulamiento. Además, es un método sencillo, con alta reproducibilidad y bajo requerimiento energético (Bekele *et al.*, 2016; Swider *et al.*, 2018; Hernández-Giottonini *et al.*, 2020).

El procedimiento consiste en disolver el polímero y el fármaco en un solvente polar; posteriormente, esta solución es agregada a una velocidad controlada en una fase acuosa con un surfactante (**Figura 8**). Después de la síntesis se requiere tanto de un proceso de recolección como de purificación, pues es necesario eliminar los excedentes

del solvente polar, del surfactante o incluso del polímero, ya que son impurezas potencialmente tóxicas. Cabe mencionar que el tamaño de las partículas es reducido principalmente al disminuir la concentración del polímero (Bekele *et al.*, 2016; Swider *et al.*, 2018; Hernández-Giottonini *et al.*, 2020)

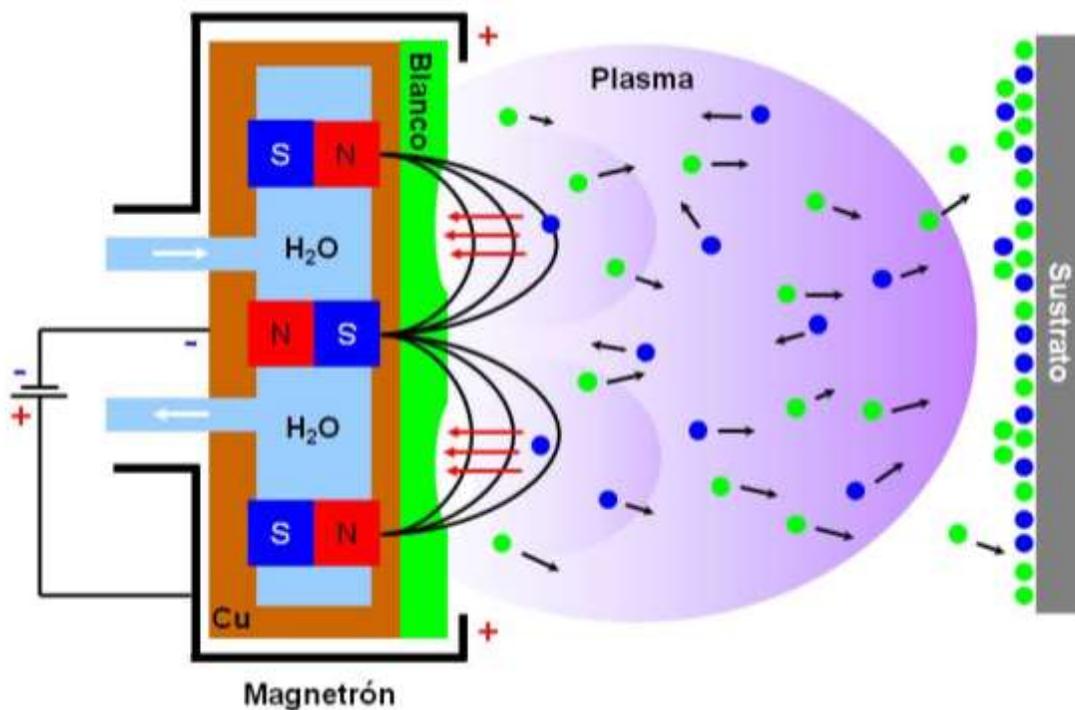
De manera más precisa, es posible explicar la formación de partículas a través de la teoría de nucleación que está integrada por varias etapas: nucleación, crecimiento de los núcleos y agregación de partículas. En la primera se rompe la interfaz entre el polímero y el solvente orgánico, pues este último es desplazado hacia la fase acuosa por difusión. Cuando esto ocurre comienzan a formarse zonas con alta concentración de polímero, a las cuales conocemos como núcleos. Después, los núcleos aumentan de tamaño al integrar nuevas partículas con el fin de disminuir la energía del sistema. Finalmente, los conjuntos de núcleos con partículas se aglomeran entre sí (Barreras-Urbina, 2016).



**Figura 8.** Esquema de la síntesis de partículas poliméricas por nanoprecipitación.

## 2.5.2 Pulverización catódica.

La pulverización catódica o *sputtering* es una técnica que consiste en desprender átomos de un blanco, a través del impacto de los iones de un gas, para depositarlos de un sustrato; por lo que es utilizada para depositar capas de materiales sobre casi cualquier sustrato. Los componentes del sistema experimental son un ánodo y un cátodo, entre los cuales se genera un campo eléctrico para ionizar las partículas de un gas, normalmente noble. Además, se encuentra el blanco hacia el cual son aceleradas las moléculas del gas. Las partículas desprendidas generan un arco de plasma que impacta el sustrato sobre el que se plantea realizar el depósito (**Figura 9**) (Kelly y Arnell, 2000).



**Figura 9.** Esquema de sistema de pulverización catódica por magnetrón (Gómez, 2015).

Asimismo, los parámetros de control con los cuales se puede variar el espesor de la película depositada son: el tiempo de depósito, la presión a la cual se realiza el depósito y el voltaje aplicado entre el ánodo y el cátodo. Ambas son directamente proporcionales

al número de partículas depositadas sobre el sustrato; no obstante, al ser mayor la presión o el voltaje aplicado también la homogeneidad del depósito disminuye.

## 2.6 Técnicas de caracterización.

### 2.6.1 Determinación de eficiencia de encapsulamiento.

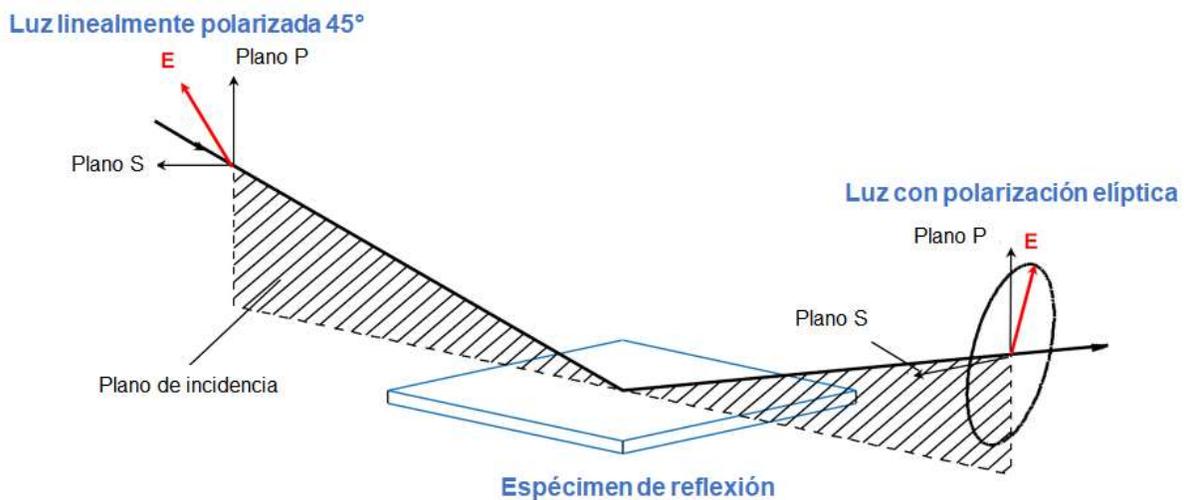
Es importante cuantificar la cantidad de fármaco que ha sido encapsulado en las partículas, pues de esta forma es posible calcular la concentración adecuada que se requiere suministrar a un paciente para tratar su padecimiento.

Por ello, se debe realizar una cuantificación total del contenido encapsulado. El primer paso es realizar la digestión de las partículas. Posteriormente, se separan los restos de la partícula a través de centrifugación, de tal forma que el fármaco permanezca disuelto en el sobrenadante. Este último es analizado en un espectrofotómetro que indica la transmisión y absorción del haz de luz que pasa a través de la solución. La longitud de onda de la luz dependerá del fármaco de estudio, en el caso del tamoxifeno su máxima absorción se encuentra a 275 nm (Sahana *et al.*, 2010). La relación entre la absorción y la concentración de fármaco es provista por una curva de calibración, la cual se obtiene al analizar concentraciones conocidas del fármaco (Maji *et al.*, 2014).

### 2.6.2 Elipsometría para determinación de espesores.

Esta técnica es importante para determinar las tasas de crecimiento de películas delgadas y se basa en el desfase de una fuente de luz con polarización lineal a 45°. La reflexión del haz incidente en las películas hace que la luz de polarización  $p$  y  $s$  se desfase generando una polarización elíptica como se observa en la **Figura 10**. El

desfasamiento se encuentra asociado al espesor y coeficiente de refracción de la película y con ello se puede determinar los espesores de una película delgada. La determinación de los espesores de una película delgada puede ser medida con elipsometría, siempre y cuando se conozcan las propiedades ópticas del material a medir o en su defecto el modelo óptico del material; esto gracias a que el detector puede determinar los grados de desfasamiento de la luz reflejada con respecto a la de la fuente de luz (McCrackin *et al.*, 1963).



**Figura 10.** Esquema del principio de funcionamiento de la elipsometría (Adaptado de Wollan, 2019).

### 2.6.3 Microscopía.

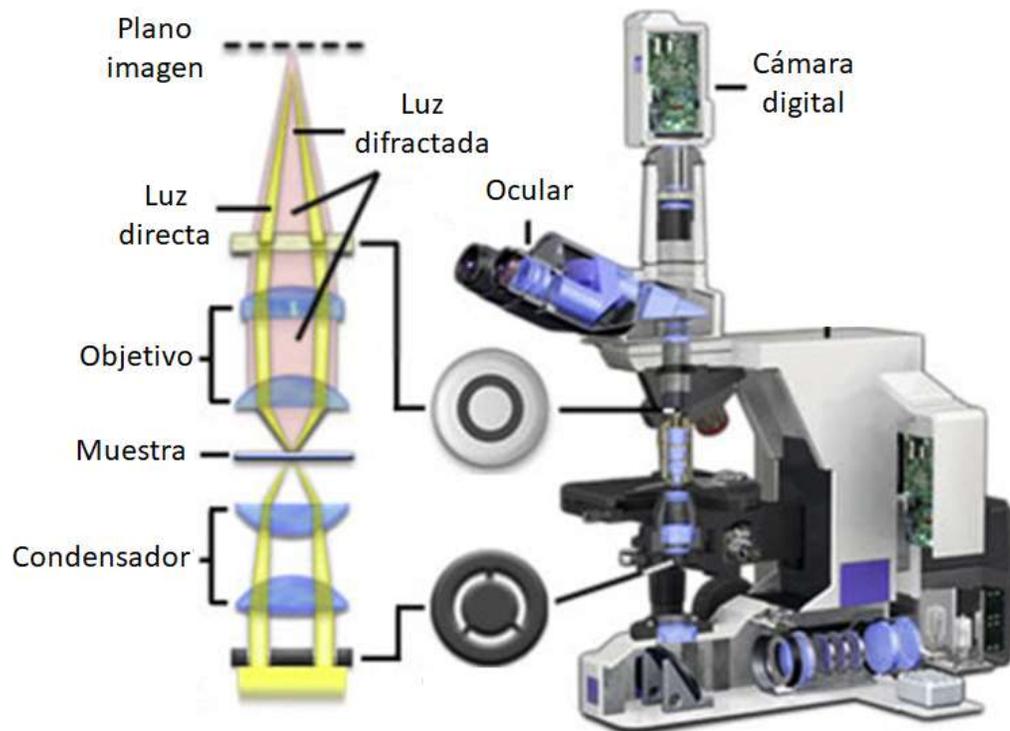
La microscopía es una técnica utilizada para observar magnificaciones de los objetos en escalas pequeñas para ser estudiadas con mayor detalle. Permite obtener información sobre la morfología (Nin, 2000).

#### 2.6.3.1 Microscopía óptica

Este tipo de microscopía utiliza la luz visible y un sistema de lentes para magnificar las imágenes obtenidas de la muestra (**Figura 11**). Aunque en su momento se

observaban las muestras a través de los oculares y aún están presentes, en la actualidad las imágenes son capturadas generalmente por cámaras digitales para su posterior análisis (Di Gianfrancesco, 2017).

Es importante mencionar que el límite de resolución de este microscopio depende de la longitud de onda de la luz en el espectro visible. Los mejores equipos son confiables para visualizar objetos de al menos 250 nm (Thorley *et al.*, 2014).



**Figura 11.** Microscopio óptico y sus componentes (Di Gianfrancesco, 2017).

### 2.6.3.2 Tratamiento de imágenes

La obtención de imágenes a partir de la microscopía es un campo de creciente interés, ya que en estas imágenes o videos contienen información de las dimensiones o posiciones de los objetos de estudio. Existen distintas técnicas de análisis, pero para los fines del presente estudio se utilizaron dos: estadística para tamaños y seguimiento de trayectorias.

#### 2.6.3.2.1 Estadística para tamaños

Uno de los métodos utilizados para el tratamiento de datos en imágenes es el conteo de tamaños en micrografías, que consiste en usar herramientas digitales que consideran la magnificación y distancia focal para calcular el tamaño de los objetos. Lo que caracteriza este tipo de conteos es el muestreo aleatorio cuyo fin es tener un conteo significativo de las muestras y un tratamiento estadístico, en el cual se conoce la variabilidad de los tamaños (Corn, 1965).

#### 2.6.3.2.2 Seguimiento de trayectorias.

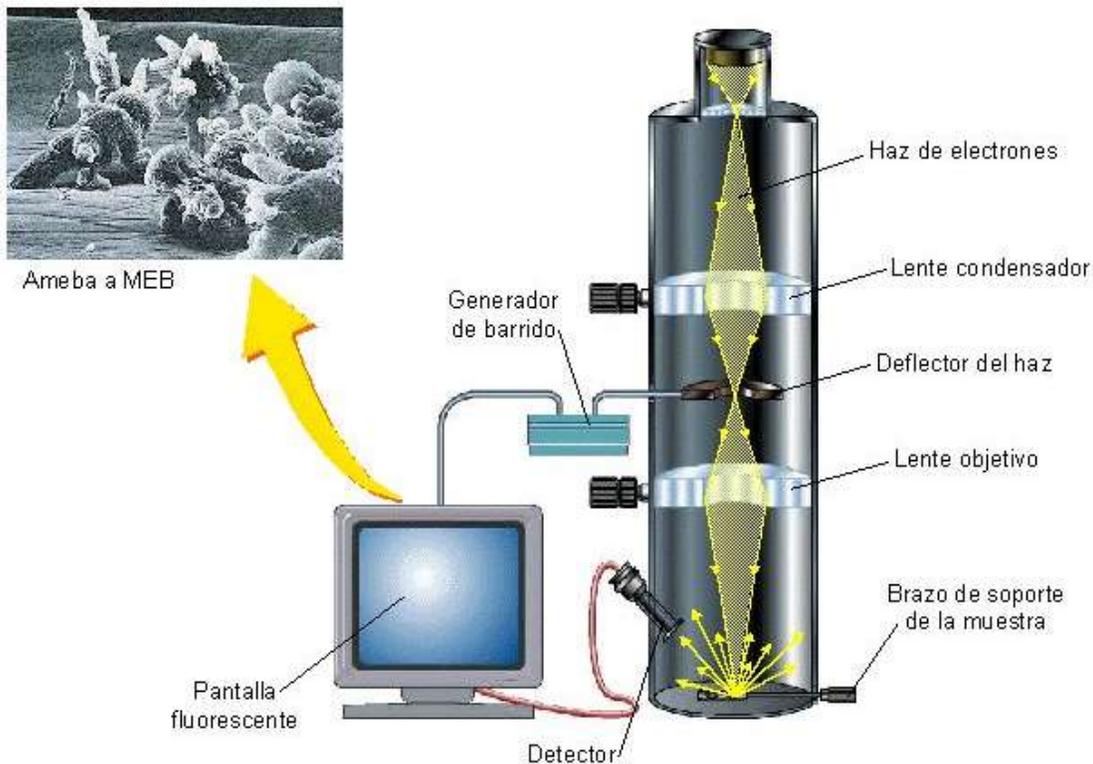
Al utilizar herramientas digitales como cámaras se pueden realizar videos de los objetos a escalas pequeñas. Mediante un software se puede seguir sus trayectorias en los videos, ya sea de manera manual o automatizada, lo que permite cuantificar su velocidad y aceleración (Genovesio, Zhang, Olivo-Marin, 2003).

#### 2.6.3.3 Microscopía electrónica de barrido.

La característica principal de la microscopía electrónica es el utilizar un haz de electrones para visualizar la muestra, además al tratarse de electrones se requiere de trabajar en el vacío para evitar desvíos en la trayectoria de los electrones. Es importante recalcar que, a diferencia de la luz, los electrones interactúan con el espécimen pero no se observan imágenes directamente si no una interpretación de los electrones dispersados por la muestra (Dedavid *et al.*, 2007).

La microscopía electrónica de barrido, como su nombre lo indica, barre con un haz de electrones la muestra para obtener datos de los electrones dispersados por la misma,

en cada punto que se sitúa el haz (**Figura 12**). La energía asociada a los electrones del haz es muy alta por lo que las longitudes de onda que éstos tienen son mucho menores que las de la luz en el espectro óptico y por ello las ampliificaciones que se alcanzan superan a las del microscopio óptico. Asimismo, el límite actual de resolución se encuentra en los 50 pm (Erni *et al.*, 2009).



**Figura 12.** Esquema del microscopio electrónico de barrido (MEB). Adaptado de (Price, 2002).

#### 2.6.4 Espectroscopía de dispersión dinámica de luz.

La espectroscopía de dispersión dinámica de luz, también conocida como DLS, por sus siglas en inglés. Es una técnica que consiste en hacer interactuar un haz de luz con una solución que contiene estructuras suspendidas. Estas partículas se encuentran en constante movimiento debido al movimiento browniano, por ello dispersan la luz a distintos puntos y generan fenómenos de interferencia. El detector que incorpora este tipo de sistemas permite obtener el ángulo y frecuencia con la que se dispersa el haz de

luz. A través de estos parámetros se calcula el tamaño y distribución de tamaños de las partículas en la solución (Hoo *et al.*, 2008).

#### 2.6.5 Pruebas *in vitro*.

Antes de poder llevar un concepto a su aplicación médica es necesario realizar pruebas preclínicas, entre las que se encuentran los estudios *in vitro*, que consisten en evaluar al sistema en células, tejidos, y cultivos de órganos. Este tipo de estudios suelen ser los más rápidos, simples y baratos. Además, permiten tener un gran control de las variables experimentales; no obstante, no simulan de manera fiel la complejidad de un organismo (Honek, 2017).

##### 2.6.5.1 Prueba de liberación *in vitro*.

Además de conocer la cantidad de fármaco encapsulada en las partículas, se debe analizar su perfil de liberación en un ambiente parecido al fisiológico y así conocer la estabilidad del sistema. Algunos de los factores que tienen una influencia en la liberación en partículas poliméricas son la desorción del fármaco que se encuentra en la superficie, su difusión, la erosión del polímero, al igual que la biodegradación (Lu *et al.*, 2011).

Estas pruebas se realizan a temperatura fisiológica (37 °C) y un pH de 7.4. Existen distintas formas de hacerlo, pero la técnica que se propone utilizar se conoce como muestreo y separación. Ésta consiste en colocar una cantidad específica de partículas en el medio de liberación a una temperatura y agitación constante. Después de cada cierto tiempo se toma una muestra del sobrenadante para medir su absorbancia y

calcular la concentración del fármaco con ayuda de una curva de calibración (D'Souza, 2014).

#### 2.6.5.2 Pruebas de internalización.

Las pruebas de internalización son realizadas para conocer la manera en que las partículas están interactuando con las células. De esta forma se puede evaluar la eficiencia del vehículo al liberar una sustancia, así como su selectividad (Drasler *et al.*, 2017).

Uno de los métodos reportados es la cuantificación fluorescente, en la que se aprovecha la fluorescencia intrínseca de algunas nanopartículas o se utilizan marcadores fluorescentes para monitorear el desplazamiento y destino de objetos al interior del cuerpo. Posteriormente, las partículas son detectadas a través de espectroscopía de fluorescencia, citometría de flujo o técnicas de imagen de fluorescencia. Cabe mencionar que esta estrategia es adecuada para análisis cualitativos (Drasler *et al.*, 2017).

Entre las sustancias reportadas en diversos trabajos para este método se encuentra el fluorocromo isocianato de fluoresceína (FITC), que al ser fluorescente permite observar su localización al interior de tejidos y es utilizado en imagenología molecular para el seguimiento de distintos compuestos; Así mismo, fue empleado como herramienta de diagnóstico de cáncer. Se han observado efectos benéficos en los diseños con su uso, como la facilidad para excitar la fluorescencia en los diseños (Li *et al.*, 2017a; Abdelmohsen *et al.*, 2014). De igual forma, las nanopartículas que incorporan este compuesto demostraron generar una menor inflamación en tejido circundante a dichas partículas (Li *et al.*, 2017a; Safdar *et al.*, 2018).

### 2.6.5.3 Pruebas de toxicidad.

La toxicidad es la cualidad de generar un daño o envenenar el cuerpo. Las pruebas de toxicidad se apoyan de diferentes técnicas para medir la viabilidad celular con el fin de predecir los riesgos de una sustancia. El presente trabajo se enfocó en uno de los ensayos más comunes conocido como ensayo MTT (Tolosa *et al.*, 2014).

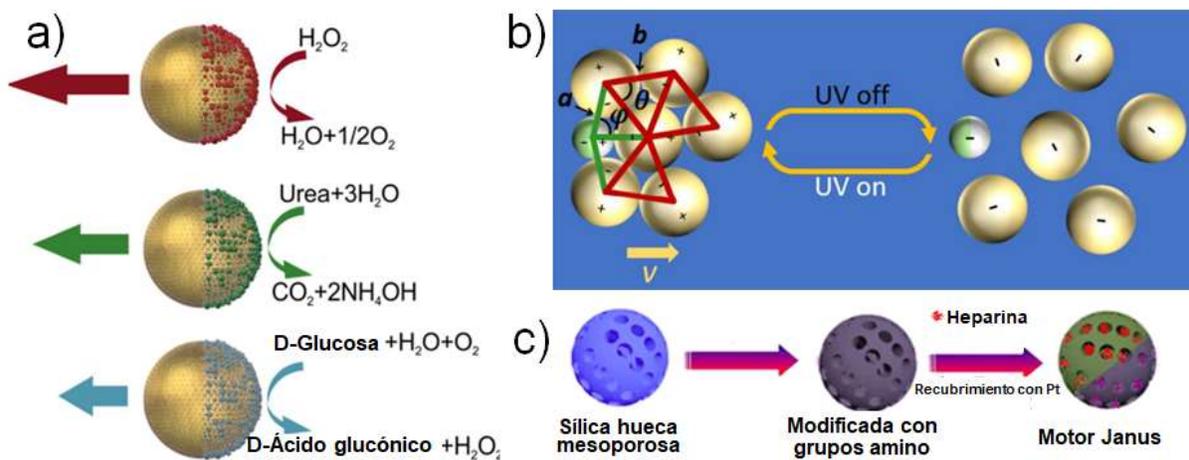
#### 2.6.5.3.1 Ensayo MTT.

El ensayo MTT es un análisis colorimétrico capaz de medir la actividad metabólica celular cuyo principio está basado en la reducción de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán, lo que produce un cambio de color de amarillo a morado. Esta reacción es catalizada por la enzima succinato deshidrogenasa que se encuentra en la mitocondria, por lo tanto, sólo ocurre cuando las células se encuentran vivas (Tolosa *et al.*, 2014; Niles *et al.*, 2008).

# Capítulo 3: Estado del Arte.

## 3.1 Motores tipo Janus.

En el campo de investigación de las estructuras y diseños conocidas como MNMs se tienen estudios que buscan entender su principio de funcionamiento o ver las afectaciones de sus componentes en su comportamiento. Entre ellos se encuentra el de Ma *et al.* (2015), quienes desarrollaron un nanomotor biocompatible tipo Janus construido a partir de nanopartículas huecas de sílica mesoporosa (**Figura 13a**). Este motor fue capaz de autopropulsarse a través de reacciones catalizadas por las enzimas catalasa, ureasa y glucosa oxidasa. La propulsión del motor era posible debido a que las enzimas sólo estaban presentes en una mitad de las nanopartículas. Este trabajo resalta las ventajas de utilizar el transporte activo de moléculas a sitios específicos con ayuda de la quimiotaxis.



**Figura 13.** Motores tipo Janus. **a)** Propulsados por reacciones enzimáticas (Ma *et al.*, 2015), **b)** Controlados a partir de luz UV (Gao *et al.*, 2017), **c)** Transportadores de fármacos y con propulsión catalítica (Hu *et al.*, 2018).

De igual forma, en 2017, Gao *et al.* fabricaron un micromotor al recubrir con platino (Pt) una partícula de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) a través de la técnica de pulverización catódica (**Figura 13b**). Con este estudio demostraron que los MNMs podían ser controlados con luz

ultravioleta (UV) para ensamblarse con otras partículas o separarse cuando la luz UV ya no estaba presente.

Asimismo, se han creado MNMs tipo Janus para transportar medicamentos; por ejemplo, Hu *et al.* (2018) propusieron el transporte de heparina al encapsularla en nanopartículas de óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) mesoporoso. Posteriormente, recubrieron con platino la mitad de las esferas con la técnica de pulverización catódica (**Figura 13c**). Su propulsión fue catalítica, ya que el platino descompone peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en oxígeno y agua (Ye *et al.*, 2019).

### 3.2 Motores propulsados por ultrasonido.

El ultrasonido es una de las fuentes de energía (campos externos) más utilizadas para los MNMs, ya que la energía que proporciona a los tejidos es fácil de controlar a través de la potencia o frecuencia de incidencia. Además, es necesario contar con un diseño que pueda convertir la energía de este campo vibracional en energía traslacional. Comúnmente, esto se consigue con la vibración asimétrica del motor o con la inducción de un gradiente vibracional, ambos casos propician la generación de corrientes y regiones de baja presión que promueven el movimiento del motor en una dirección preferencial (Nadal y Lauga, 2014; Valdez-Garduño *et al.*, 2020).

Con respecto a la implementación de vibraciones asimétricas, se encuentran dos vertientes principales. La primera se basa en la geometría, donde la vibración del campo ultrasónico genera movimiento en todo el motor y la influencia de fuerzas externas sobre el motor es menor en una dirección, por lo que el movimiento tiene dicho sentido como en el trabajo de Juang (2010). En contraste, la segunda busca direccionar la energía en un sentido

preferencial; es decir, al vibrar el motor, el diseño y los materiales conducen o amplifican la respuesta en una dirección. La respuesta puede ser de tipo vibratorio o de otro tipo, como en el trabajo de Tu (2017) en el cual se obtuvo una respuesta térmica. Inclusive, no es necesario que ocurra en los materiales del motor, también puede modificarse el medio; por ejemplo, cuando se crean burbujas (Bertin *et al.*, 2015).

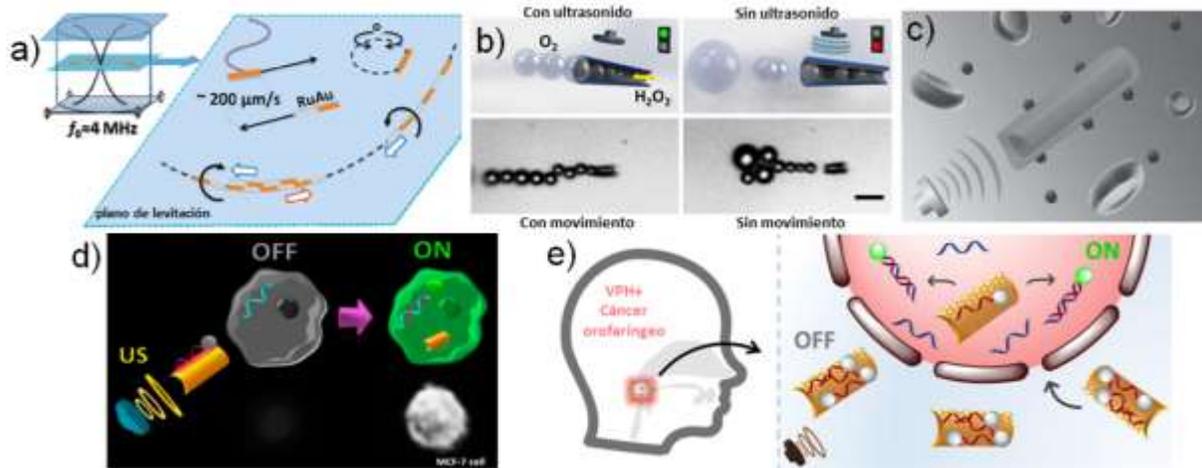
Se debe destacar que la energía acústica presenta algunos inconvenientes, al igual que otras fuentes de energía que emplean diferentes diseños de MNMs; entre ellos se encuentran, el bajo entendimiento de los fenómenos acústicos al interior de sistemas complejos, la dificultad de observación y la transferibilidad de condiciones de laboratorio al ambiente de prueba (Tu *et al.*, 2017).

En 2012, Wang y colaboradores estudiaron la propulsión ultrasónica de nanoalambres metálicos segmentados de oro-rutenio (AuRu) y oro-platino (AuPt) (**Figura 14a**). Se propuso que su mecanismo de propulsión se basaba en la asimetría de composición, ya que siempre se propulsaban hacia el mismo lado (Xu *et al.*, 2017).

Sin embargo, el ultrasonido puede ser más que un tipo de propulsión, también puede modular el movimiento de los motores; por ejemplo, en 2014, Xu *et al.* probaron que era posible modular la velocidad de los micromotores catalíticos propulsados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observaron que entre mayor era la energía del ultrasonido menor era la velocidad de los micromotores (**Figura 14b**).

Otra aplicación novedosa de los motores propulsados por ultrasonido es neutralizar toxinas. Este sistema fue desarrollado por Wu *et al.* (2015c). Su experimento consistió en recubrir un nanoalambre de oro con la membrana de eritrocitos. De esta forma la membrana funciona como una esponja que atrae y absorbe a las toxinas para neutralizarlas (**Figura 14c**). Una

gran ventaja que tiene este sistema es que es estable a largo plazo y tiene una propulsión ultrasónica eficiente en sangre.



**Figura 14.** Motores propulsados o controlados con ultrasonido. **a)** Propulsión basada en asimetría de composición (Wang et al., 2012), **b)** Modulación del movimiento de los motores a través de ultrasonido (Xu et al., 2014), **c)** Nanohilo recubierto de membranas de glóbulos rojos (Wu et al., 2015), **d)** Motor para la detección de células cancerígenas (Fernández de Ávila et al., 2015) **e)** Motor capaz de detectar VPH (Qualliotine et al., 2019).

De igual forma, se ha propuesto utilizar MNMs como sistemas de detección de enfermedades, un ejemplo es el trabajo de Fernández de Ávila *et al.* (2015) quienes fabricaron un motor propulsado por ultrasonido a partir de un nanoalambre de oro funcionalizado con óxido de grafeno y marcado con una hebra de ADN. Este mecanismo funciona como un interruptor, pues cuando la hebra de ADN está en el grafeno no presenta fluorescencia, pero al entrar en la célula y unirse a su RNA complementario, por el que posee una mayor afinidad, comienza a fluorescer (**Figura 13d**). Al propulsar los motores con ultrasonido y exponerlos a las células se observó una fluorescencia 17 veces mayor que en condiciones estáticas.

En 2019, Qualliotine *et al.* desarrollaron un motor con el mismo arreglo que el antes mencionado, cuyo objetivo principal era detectar el virus del papiloma humano (VPH) de manera *in vitro*, ya que esta enfermedad está asociada al cáncer orofaríngeo (**Figura 14e**).

Se encontró que al propulsar al motor se obtenía una fluorescencia 2.3 veces mayor, por lo que el diagnóstico era más sencillo.

### 3.3 Motores controlados por campos magnéticos.

Otra de las opciones que se buscan implementar por la biocompatibilidad, son los campos magnéticos; éstos reducen sus alteraciones a los sistemas biológicos al romper la simetría de los campos; es decir, que las líneas de campo magnético se vean interrumpidas y al acortar el tiempo de exposición a los mismos. En contraste con otros campos, la teoría electromagnética tiene un gran desarrollo aún a esta escala, lo cual permite explicar y controlar los campos con precisión (Garcia-Gradilla *et al.*, 2013).

El movimiento de este tipo de motores se puede encontrar en dos categorías principales: movimiento activo o actuadores y movimiento pasivo o surfedores. En el primer caso, el campo magnético acompaña al movimiento y tiene cambios constantes para producir movimiento. Mientras que, en el segundo tipo, el movimiento se da por la existencia de líneas de campo y es independiente de los cambios en este (Zhiqun y Bo, 2017).

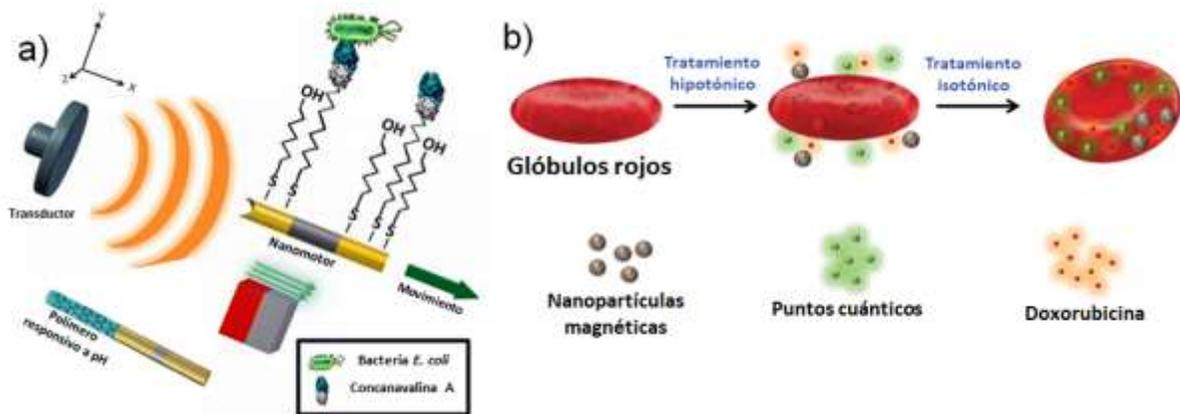
Las posibles complicaciones de este tipo de diseños recaen en la fabricación de los mismos. Incluso con un pequeño margen de error, los diseños presentan anomalías en el movimiento. Otro de los inconvenientes son las bajas tasas de motilidad, la toxicidad asociada a los materiales de construcción o la complejidad para controlarlos (Ebbens *et al.*, 2017).

#### 3.3.1 Motores propulsados por ultrasonido y controlados por campos magnéticos.

En 2013, Garcia-Gradilla *et al.* fabricaron un motor tipo varilla de tres segmentos: oro-níquel-oro (Au-Ni-Au) propulsado por ultrasonido y controlado con campos magnéticos externos

gracias al níquel (**Figura 15a**). Además, se funcionalizaron los segmentos de oro con lectina y anticuerpos anti-proteína A con el fin de capturar y transportar de manera dirigida, bacterias como *E. coli* y *S. aureus*. Otra aplicación que se probó fue la liberación de fármacos al agregar un segmento polimérico sensible al pH. Cabe destacar que los MNMs que poseen direccionamiento son una variante que permitirá su control aún después de realizada la tarea, además de implementar materiales o estructuras que no dañen a los sistemas biológicos y sigan realizando de manera eficiente la entrega de fármacos.

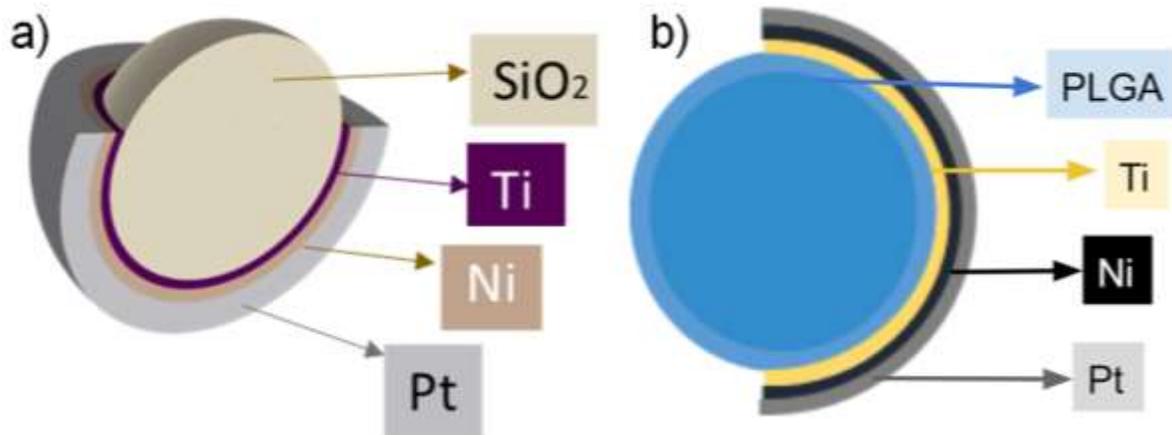
En 2015, el grupo de Wu y Esteban-Fernandez diseñó un motor basado en glóbulos rojos a los que se les aplicó un tratamiento hipotónico para encapsular puntos cuánticos, doxorubicina y nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (**Figura 15b**). Con ello se logró crear una plataforma multifuncional de diagnóstico y transporte de fármacos, que además era propulsada por ultrasonido gracias a la distribución heterogénea de nanopartículas y a su vez podía ser controlada por campos magnéticos externos.



**Figura 15.** Motores propulsados con ultrasonido y controlados con campos magnéticos externos. **a)** Motor tipo varilla de tres segmentos para la captura y transporte de bacterias, así como para el transporte de fármacos (García-Gradilla et al., 2013), **b)** Motor diseñado a partir de glóbulos rojos (Wu et al., 2015).

En 2017, Oliveros sintetizó micromotores tipo Janus que consistían en partículas esféricas de SiO<sub>2</sub> recubiertas por medio de la técnica de pulverización catódica con titanio, níquel y platino (**Figura 16a**). El primer material se encargaba de la adhesión entre los metales y la

partícula, el segundo le confería propiedades magnéticas y el último aportaba una alta densidad para aumentar la velocidad de propulsión. Estos motores fueron propulsados por ultrasonido y se logró controlar su trayectoria por medio de campos magnéticos.



**Figura 16.** Diseños de los motores Janus propulsados por ultrasonido y controlados por campos magnéticos estudiados por **a)** Oliveros (2017) y **b)** García (2018).

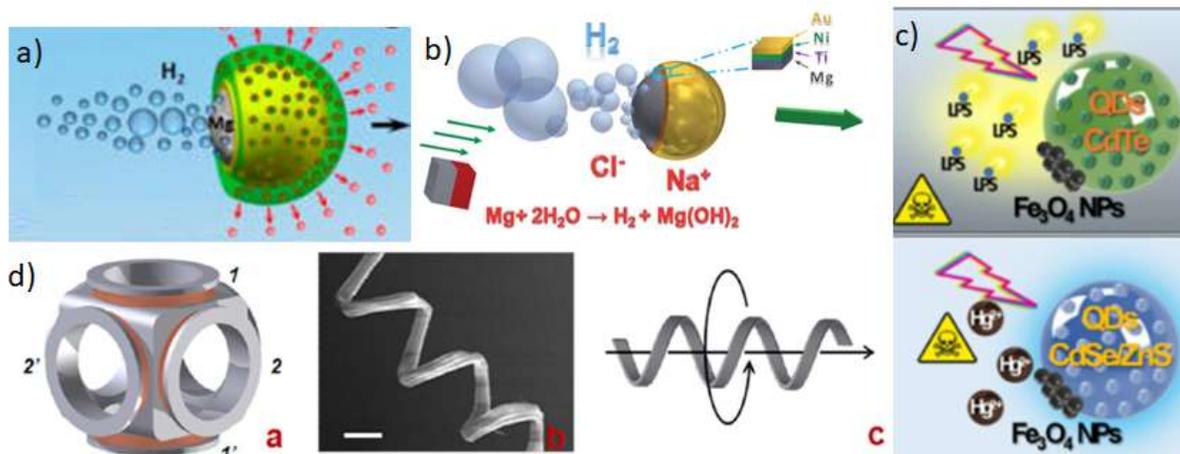
De igual forma, para comprender mejor el comportamiento de los MNMs tipo Janus y la relevancia de la asimetría de densidades, se analizó el movimiento de partículas como las de Oliveros, aunque el platino fue cambiado por otros metales; por ejemplo, aluminio, cromo, oro y plata. Con este trabajo se concluyó que el movimiento puede describirse a través de un modelo de dímeros oscilatorios (Valdez-Garduño *et al.*, 2020).

Por otro lado, García (2018) utilizó el mismo arreglo que Oliveros (2017) pero sustituyó el núcleo de partículas de sílica por partículas de PLGA (**Figura 16b**). A partir de este experimento se sugirió que este sistema podría utilizarse para el acarreamiento de fármacos. Finalmente, el diseño permanecerá funcional aún cuando la parte polimérica esté completamente degradada, lo cual facilita su recuperación y reduce la cantidad de metales al interior del cuerpo (Hermawan *et al.*, 2011).

### 3.4 Motores biocompatibles.

Dentro de los MNMs que poseen la cualidad de biocompatibilidad distintos diseños han buscado implementarse. Destacando los trabajos realizados con zinc (Zn) y magnesio (Mg), como los de Mou *et al.* (2014) y Gao *et al.*, (2013) mostrados en la **Figura 17a** y **17b**, respectivamente. Ambos están basados en reacciones superficiales con combustibles, pero poseen la desventaja de tener un corto tiempo de utilidad. En cambio, los motores de acción a distancia pueden tener tiempos de acción prolongados, aunque sus diseños todavía no son aptos para aplicaciones *in vivo* (Esteban-Fernandez *et al.*, 2018a).

Un ejemplo de los avances más prometedores es el trabajo de Pacheco, Jurado-Sánchez y Escarpa (2019) presentado en la **Figura 17c**, donde estructuras de óxido de hierro dopadas con puntos cuánticos de telurio de cadmio son introducidas a un organismo y conducidas con luz; sin embargo, presentan daño a los tejidos circundantes, dificultades en su manejo y control.



**Figura 17.** Motores con materiales biocompatibles. **a)** Motores catalíticos a base de Zn con propulsión en medios ácidos (Mou *et al.*, 2014), **b)** Motores catalíticos a base de Zn con propulsión en medios acuosos con control por campos magnéticos (Gao *et al.*, 2013), **c)** Nanomotores de óxido de hierro (IV) con puntos cuánticos de telurio y seleniuro de cadmio propulsados por luz visible (Pacheco, Jurado-Sánchez y Escarpa, 2019), **d)** Motores helicoidales a base de plantas vascularizadas con recubrimiento de níquel (Gao *et al.*, 2014).

Por otra parte, se han desarrollado modelos con materiales magnéticos como níquel con una buena respuesta al interior del organismo; aunque su propulsión requiere de equipos complicados y no es viable aún para una aplicación de bajo costo. Ejemplo de este tipo de diseños es el trabajo de Gao *et al.* (2014) que se observa en la **Figura 17d**, en el cual se realizan micromotores basados en fibras naturales con un recubrimiento magnético para hacer rotar estos y fungir como un motor o una turbina.

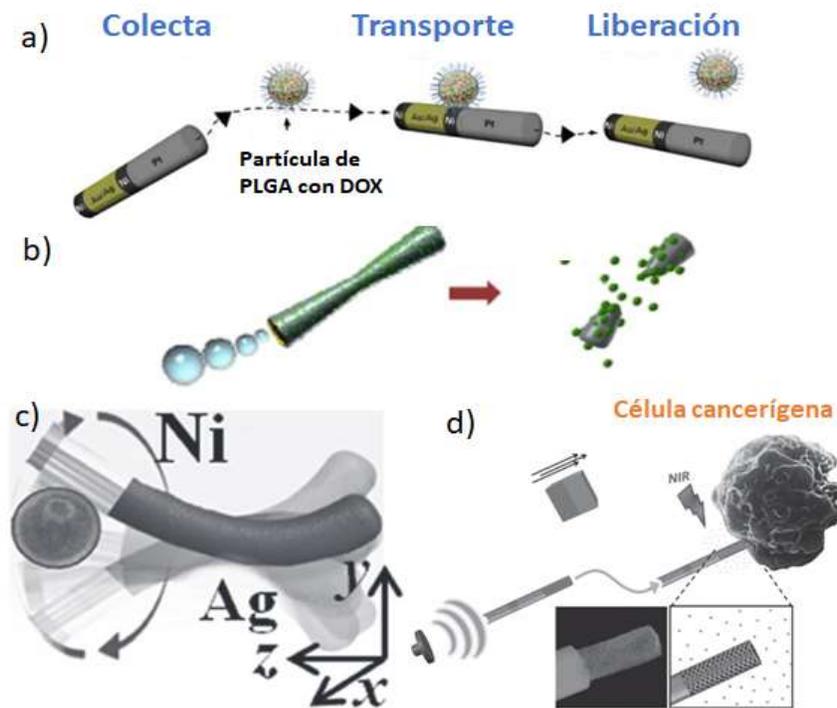
Por otra parte, no se ha logrado que motores completamente sintéticos puedan ser propulsados al interior del cuerpo de manera autónoma. Por ello los MNMs propulsados por ultrasonido son una alternativa para lograr superar dicho obstáculo, la interacción de los MNMs con los fluidos biológicos y corporales es un fenómeno que debe estudiarse, en especial cuando se utilizan fuentes de acción a distancia, ya que la atenuación del campo es el principal impedimento para la conversión de energía en movimiento (O'Brien Jr, 2007).

### 3.5 Motores acarreadores de fármacos para tratamiento de cáncer.

Del mismo modo, los MNMs presentan la habilidad de responder a estímulos externos y pueden fungir como vehículos de entrega de fármacos de tercera generación. Estos vehículos pueden utilizar efectos de transporte pasivo y activo para hacer más eficiente su desempeño (Gao y Wang, 2014); no obstante, estos efectos pueden alterar las propuestas de diseño tanto en forma como en tamaño y sobre todo la viabilidad de degradación de los materiales.

Frente a dichos problemas se han propuesto distintos enfoques acompañados de diferentes diseños, principalmente diferenciados por la manera en que convierten la energía a movimiento, lo que se conoce como mecanismo de propulsión. Dentro de los trabajos

realizados se comenzó con motores catalíticos propulsados por la descomposición de peróxido de hidrógeno en una superficie de platino (Pt); un ejemplo es el diseño propuesto por Kagan *et al.* (2010) (**Figura 18a**), compuesto por metales y enfocado en el transporte fármacos con liberación modulada a través de campos magnéticos. Continuando con estos desarrollos, Sattayasamitsathit *et al.* (2014) buscó sustituir el tipo de combustible con otros materiales, como el Zn, que degrada el ácido y realiza el acarreamiento de fármacos mediante nanopartículas porosas de oro (Au) o sílica (SiO<sub>2</sub>, su diseño se puede observar en la **Figura 18b**.



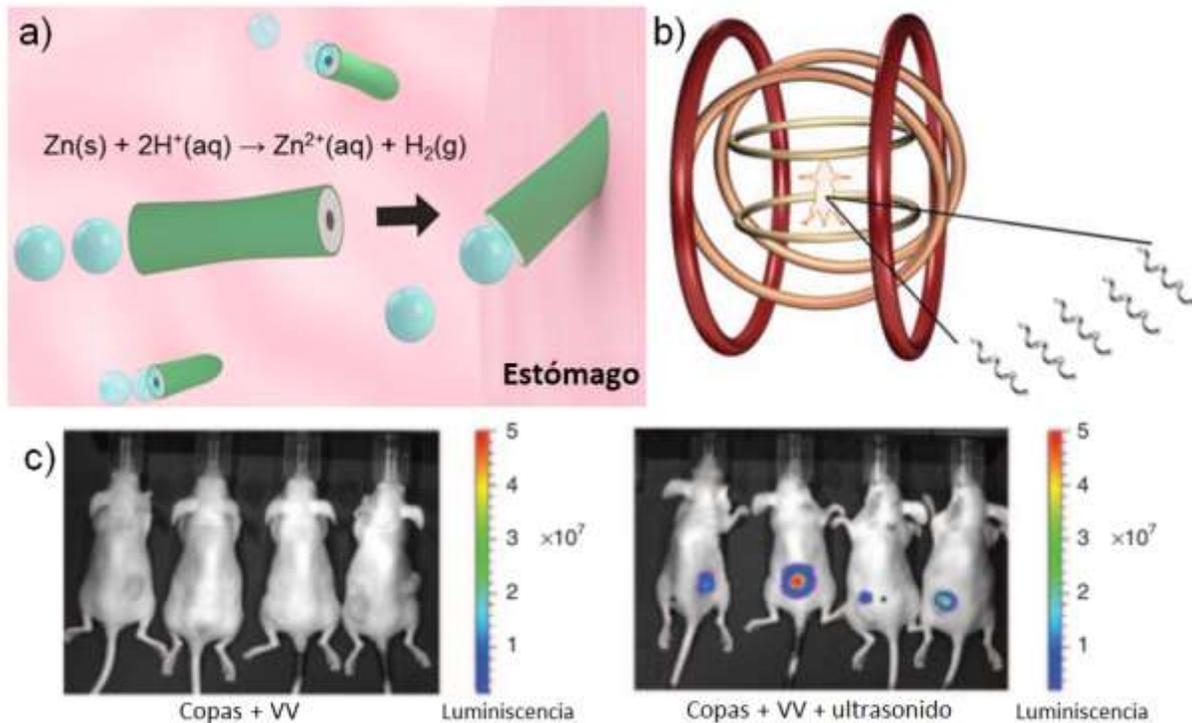
**Figura 18.** Esquemas de MNMs para la entrega de fármacos por distintos mecanismos de propulsión. **a)** Motores catalíticos a base de Ni-Au-Pt con control de liberación por estímulo magnético (Adaptado de Kagan *et al.*, 2010), **b)** Motores catalíticos a base de Zn con liberación de nanopartículas por ruptura (Sattayasamitsathit *et al.*, 2014), **c)** Nanohilo magnético flexible con adhesión de partículas poliméricas (Gao *et al.*, 2012), **d)** Nanohilos de Ni propulsados por ultrasonido y Au con mesoporoso para transporte fármacos accionado por infrarrojo cercano (García-Gradilla *et al.*, 2014).

Otra de las líneas de investigación de MNMs son los motores de acción a distancia, principalmente magnéticos y propulsados por ultrasonido. Un ejemplo del primer tipo es el

trabajo de Gao *et al.* (2012), en el que se presentan nanohilos o rodillos de un material magnético con una sección en la cual se puede adherir un fármaco. Cuando las estructuras son excitadas con un campo magnético comienzan a oscilar; haciendo uso de la orientación del campo magnético su trayectoria obtiene una dirección específica (**Figura 18c**). Finalmente, trabajos como el de Garcia-Gradilla *et al.* (2014) (**Figura 18d**) ejemplifican a los motores metálicos propulsados por ultrasonido capaces de liberar un fármaco con una acción a distancia. Este tipo de MNMs son de especial interés para el presente trabajo, ya que prueban que los motores con alta penetración en tejidos y control de trayectorias son una alternativa viable para el transporte de cargas médicas.

### 3.6 Motores en sistemas *in vivo*.

El estudio realizado por Gao *et al.* (2015) muestra el primer estudio *in vivo* de motores artificiales, el modelo utilizado fue el de ratones. Los micromotores estaban compuestos de poli(3,4-etilendioxitiofeno) y zinc (PEDOT/Zn) y cargados con nanopartículas de oro. Básicamente, su funcionamiento se basa en la reacción catalítica superficial en medios ácidos para formar burbujas de hidrógeno. El motor penetra en el estómago, donde el zinc es degradado por el ambiente ácido, lo cual libera las nanopartículas de su interior (**Figura 19a**). Cabe mencionar que, después de la degradación de los motores no se obtuvieron productos tóxicos ni se observaron anomalías. Por lo tanto, se concluyó que el uso de estos micromotores administrados por la vía oral en ratones es completamente seguro.



**Figura 19.** Motores que han sido probados *in vivo*. **a)** Motores catalíticos para el transporte de nanopartículas a un medio ácido (Gao et al., 2015), **b)** Estructuras helicoidales controladas con campos magnéticos rotacionales (Servant et al., 2015), **c)** Copas poliméricas para el transporte de virus vacuna oncolítica (VV) (Myers et al., 2016).

En ese mismo año, Servant *et al.* probaron *in vivo* en ratones, estructuras helicoidales que son controladas a través de campos magnéticos rotacionales para replicar el movimiento de flagelos bacterianos (**Figura 19b**). Las estructuras se introdujeron a la cavidad peritoneal y fueron controladas con éxito, a pesar de que su velocidad fue menor a la obtenida *in vitro*. Cabe mencionar que la visualización y monitoreo de las estructuras fue posible gracias a que se encontraban funcionalizadas con un fluoróforo de infrarrojo cercano.

En 2016, Myers y colaboradores introdujeron copas poliméricas propulsadas por ultrasonido enfocado en roedores. El objetivo de la investigación fue comprobar su viabilidad para el tratamiento de cáncer al transportar un virus vacuna oncolítica (VV). Por otro lado, para monitorear la entrega se modificó al VV para expresar luciferasa y se midió la luminiscencia con un sistema de imagen *in vivo* (**Figura 19c**).



# Capítulo 4: Desarrollo experimental.

## 4.1 Hipótesis.

Los MNMs tipo Janus con núcleo de partículas PLGA-TAM recubiertas con Ti-Ni-W son un modelo viable en el transporte y liberación de tamoxifeno para el tratamiento de cáncer de mama ER+.

## 4.2 Planteamiento experimental.

Con base en la hipótesis se decidió elaborar un diseño de MNMs biocompatibles, basado en la propulsión por ultrasonido y con un control por campos magnéticos.

### 4.2.1 Síntesis de partículas de PLGA.

El primer paso para fabricar a los MNMs fue sintetizar el núcleo del diseño, que consiste en una partícula polimérica. A lo largo de este proceso también se variaron parámetros como la frecuencia de goteo y el tamaño de la gota para evaluar su influencia en la síntesis de las partículas. Estas variaciones fueron en el tiempo entre goteo de 0.5, 1, 2, 3 y 5 segundos y el volumen de gota con 16, 30 y 50  $\mu\text{l}$ . Por otra parte, se decidió evaluar el efecto de la concentración de PVA y la cantidad de PLGA en el tamaño de las partículas.

En primer lugar, se colocaron 30 mg de PLGA (Sigma-Aldrich) en un vaso de precipitados con 3 ml de diclorometano VWR con 98% de pureza que se agitaron hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, la solución de PLGA y diclorometano se vertió poco a poco con ayuda de una bureta en un vaso de precipitados con 20 ml de una solución con diferentes concentraciones de alcohol polivinílico (1, 1.5, 2.5%) obtenido de

Sigma-Aldrich con 99% de pureza. La mezcla se agitó a 1000 rpm durante la noche para que el diclorometano se evaporara. Para recuperar las partículas, se centrifugó la mezcla a 3000 rpm por 5 minutos y a 9000 rpm por 15 minutos. Las partículas se almacenaron a -4°C durante un día.

Para conocer el efecto de la cantidad de PLGA se siguió la metodología anteriormente descrita en este caso se probaron cuatro cantidades de PLGA distintas: 5, 10, 20 y 30 mg en un vaso de precipitados con 3 ml de diclorometano que se agitaron hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, la solución de PLGA se vertió poco a poco con ayuda de una bureta en un vaso de precipitados con 20 ml de una solución con diferentes concentraciones de alcohol polivinílico (PVA) (1, 1.5, 2.5%). La mezcla se agitó a 1000 rpm durante la noche para que el diclorometano se evaporara. Para recuperar las partículas, se centrifugó la mezcla a 3000 rpm por 5 minutos y a 9000 rpm por 15 minutos. Las partículas se almacenaron a -4°C.

#### 4.2.1.1 Síntesis de partículas de PLGA+TAM.

Las partículas de PLGA cargadas con tamoxifeno se sintetizaron por el método de nanoprecipitación, de acuerdo con el procedimiento descrito por Sahana *et al.* (2010). Se comenzó por colocar 2.5 mg de PLGA Sigma-Aldrich y 2.5 mg de tamoxifeno Sigma-Aldrich con 99.8% de pureza en un vaso de precipitado con 1.5 ml de diclorometano VWR con 98% de pureza. A continuación, se agitó hasta obtener una solución homogénea y se vertió poco a poco con una pipeta en un vaso de precipitados con 10 ml de una solución acuosa al 2% de alcohol polivinílico que se encontraba en agitación a 1,000 rpm. La mezcla se agitó toda la noche para que el diclorometano se evaporara. Las partículas grandes se centrifugaron a

3,000 rpm por 5 minutos y las pequeñas se recolectaron a 9,000 rpm por 15 minutos. Las partículas se almacenaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante un día; sin embargo, para almacenamientos más largos se liofilizaron (Sahana *et al.*, 2010; Chaisri *et al.*, 2009; Maji *et al.*, 2014).

#### 4.2.2 Síntesis de motores tipo Janus.

Para generar estructuras tipo Janus se depositó parcialmente una película delgada de metales (Ti-Ni-W) sobre las partículas de PLGA a través de la técnica de pulverización catódica.

Las partículas de PLGA cargadas con tamoxifeno fueron suspendidas en agua destilada, luego se colocaron gotas de 10  $\mu\text{l}$  sobre un portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se depositó una película Ti-Ni-W o Ni-W, con blancos al 99.98% de pureza, en la cámara de pulverización catódica Intercovamex V1PVD (versión de 2 cañones). Las condiciones de trabajo durante el depósito fueron: presión base de 3  $\mu\text{Torr}$ , presión de trabajo de 2.1 mTorr, energía de trabajo de 60 W y flujo de argón de 26.3  $\text{cm}^3/\text{min}$ . El depósito de Ni fue de 3 minutos que equivalen a 15 nm y para el W fueron 5 minutos para obtener un espesor de 60 nm. Cabe mencionar que antes de los depósitos se limpiaron a ambos blancos durante 2 minutos. En los casos en los que se depositó Ti, la capa tuvo un espesor de 5 nm.

##### 4.2.2.1 Calibración de la cámara de pulverización catódica.

La calibración de la cámara de pulverización catódica es necesaria para saber los tiempos y su relación con el crecimiento en los depósitos. así como el control óptimo de presión y la diferencia de voltaje aplicado.

Se comenzó estandarizando la presión de trabajo en la cámara de pulverización catódica Intercovamex V1PVD (versión de 2 cañones) para todos los depósitos para no sobrecalentar los blancos, al monitorear la temperatura de los blancos utilizados con respecto a un tiempo estándar de limpieza de 5 minutos. El monitoreo fue realizado para variaciones del potencial aplicado entre 60 y 100 watts con incrementos de 10 W con un flujo estándar de 15 sscm de Ar con una presión de trabajo de 2 mTorr.

Finalmente, las pruebas de estandarización para depósito fueron realizadas al depositar sobre sustratos de silicio [100] de 3 mm x 2 mm utilizando 60 W de potencia con una presión de 25 sscm a una presión de depósito de 2 mTorr. La variación para realizar las curvas de calibración fue realizada sobre el tiempo de depósito con 1, 3, 4 y 5 minutos para los blancos de Ti, Ni y W respectivamente.

Por otra parte, la medición de espesores fue realizada con un elipsómetro Woollam Alpha SE con un ángulo de incidencia de 65°.

#### 4.2.2.2 Variación en la capa de adhesión.

Para verificar la afectación de la capa de adhesión sobre la propulsión y en la adhesión de los depósitos de Ni y W, se realizó el proceso de síntesis de MNMs antes descrito sustituyendo el núcleo de PLGA por una microesfera de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) de diámetro promedio de 1.2  $\mu\text{m}$ . La variación del depósito de Ti se realizó en dos grupos de dos muestras. Asimismo, se realizaron dos grupos control sin la presencia de la capa de Ti. Por otra parte, la composición para los espesores de las capas depositadas fueron 5 nm de Ti para todos los grupos de prueba y 0 nm para los grupos control, 15 nm de Ni y 60 nm de W para todas las muestras.

Adicionalmente, se observaron las muestras bajo el microscopio óptico modelo Nikon Eclipse Ni-U con un objetivo de alta definición de 20x, para ver delaminaciones en los depósitos; Por otra parte, se realizó una prueba de desprendimiento adicionando 5 µl de agua en 5 lugares de una muestra observando si hubo desprendimiento de alguna de las capas. Finalmente, se realizó un conteo del número de muestras que presentaban desprendimiento de las capas.

#### 4.2.2.3 Variación en la capa magnética.

De igual forma, se varió la composición de la capa magnética para observar el efecto de la misma en la propulsión y en la aglomeración de los MNMs.

Por ello, se sintetizaron tipo Janus utilizando el proceso antes descrito sustituyendo el núcleo de PLGA por una microesfera de sílica (SiO<sub>2</sub>) de diámetro promedio de 1.2 µm. Se sintetizaron 2 grupos de 4 muestras, la variación de espesor en la capa magnética se realizó con aumentos de 5 desde 15 nm hasta 25 nm de espesor, teniendo una muestra control con 0 nm. Lo anterior se llevó a cabo de igual manera para el grupo control. Con espesores de 5 y 60 nm en las capas de Ti y W, respectivamente. Posteriormente, se realizó el procedimiento antes descrito con un núcleo polimérico (PLGA), teniendo dos grupos de estudio, con y sin la capa de Ti.

Las mediciones de los tamaños de aglomerados fueron realizadas con un microscopio óptico Nikon Eclipse Ni-U y una lámpara de mercurio de super alta presión Nikon HB10101AF, para ello se colocaron las partículas sobre un portaobjetos y se observaron con el objetivo 40x. A continuación, se tomaron varias imágenes con la cámara C11440 Hamamatsu orca flash 4.0 que posteriormente, fueron analizadas con el programa NIS-

Elements e ImageJ. Todas las mediciones fueron hechas después de excitar las muestras con ultrasonido de una frecuencia de 4.144 Mhz durante 40 segundos.

#### 4.2.2.4 Variación en la capa diferencial de densidad.

Asimismo, se varió el espesor de la capa de W para corroborar el efecto de la misma sobre la propulsión de los MNMs. El proceso de síntesis es similar al de síntesis de MNMs tipo Janus sustituyendo el núcleo de PLGA por una microesfera de sílica de diámetro promedio de 1.2  $\mu\text{m}$ . Se realizaron muestras con 0, 30, 60 y 90 nm de espesor en la capa de W; 5 nm de Ti y 15 nm de Ni para todas ellas. Además, se sintetizó un grupo control para las 4 muestras. De igual manera, las observaciones fueron hechas por medio del microscopio óptico Nikon Eclipse Ni-U y una lámpara de mercurio Nikon HB10101AF, con el objetivo 40x. A continuación, se tomaron varias imágenes con la cámara C11440 Hamamatsu orca flash 4.0 y analizadas con el programa NIS-Elements e ImageJ. Adicionalmente, se tomaron imágenes durante varios días para observar si las partículas eran estables.

#### 4.2.3 Determinación de tamaños.

Por otra parte, para estudiar y comprender el efecto del tamaño en el experimento se analizaron los tamaños por dos técnicas diferentes.

##### 4.2.3.1 Conteo estadístico.

La primera determinación se realizó por medio del microscopio óptico Nikon Eclipse Ni-U y una lámpara de mercurio de super alta presión Nikon HB10101AF, para ello se colocaron las partículas sobre un portaobjetos y se observaron con el objetivo 40x.

#### 4.2.3.2 Espectroscopía de dispersión dinámica de luz.

De manera complementaria, se analizó el tamaño de las partículas con la técnica de dispersión dinámica de luz con Zetasizer Nano-Zs, las partículas se encontraban suspendidas en agua destilada y como índice de refracción para PLGA se utilizó el valor de 1.47 (Kondyurin, *et al.*, 2011).

#### 4.2.4 Determinación de velocidades.

El arreglo experimental (**Figura 20**) utilizado para propulsar a los motores con ultrasonido fue una celda de ultrasonido de acero inoxidable de 50 mm x 50 mm x 0.94 mm. recubierta con tres capas de cinta kapton; en el centro se encuentra una cavidad circular de 6 mm de diámetro y 180  $\mu\text{m}$  de profundidad. La parte trasera de la placa posee el transductor piezoeléctrico Ferroperm PZ26 con un diámetro de 10 mm x 0.5 mm. El transductor piezoeléctrico fue alimentado con un amplificador de alto poder y un generador de ondas aleatorias Agilent 33120A con una señal sinusoidal a una frecuencia de 4.144 MHz y un voltaje de 3.5 Vpp. El sistema fue monitoreado con un osciloscopio digital Tektronix 3014B a 100 MHz. Las condiciones utilizadas son similares a las reportadas por Wang *et al.* (2012) y García-Gradilla *et al.* (2013).



**Figura 20.** Arreglo experimental para la propulsión ultrasónica de los motores y la determinación de sus velocidades.

Para el análisis se colocó una gota de 2.5  $\mu\text{l}$  de la solución de micromotores tipo Janus en la cavidad y se cubrió con un cubreobjetos de 18 mm x 18 mm x 0.14 mm con el objetivo de reflejar y generar la onda estacionaria. Asimismo, el control magnético de los motores utilizó un imán cilíndrico de neodimio.

La adquisición de videos e imágenes fue a través del microscopio óptico Nikon Eclipse Ni-U con un objetivo 20x, iluminado con una lámpara de mercurio de super alta presión Nikon HB10101AF en modo reflectancia y una cámara C11440 Hamamatsu orca flash 4.0 con una velocidad de captura de 20 cuadros por segundo. Las velocidades fueron medidas con el programa de análisis NIS-Elements.

### 4.3 Experimentos propuestos a futuro.

Debido al cierre de los laboratorios a causa del COVID-19, se decidieron plantear una serie de experimentos a futuro cuyo fin es comprobar la funcionalidad de estos MNMs en el tratamiento de cáncer de mama.

#### 4.3.1 Síntesis de partículas de PLGA+FITC.

Con el objetivo de realizar pruebas de internalización se marcarán a las partículas poliméricas de manera fluorescente para facilitar su visualización con un microscopio confocal.

En este caso, se propone utilizar el mismo procedimiento anteriormente descrito para las partículas cargadas con tamoxifeno, pero se agregó 1 µl de una solución de FITC al 4% a la fase orgánica (Maji *et al.*, 2014).

#### 4.3.2 Eficiencia de encapsulamiento.

De acuerdo a lo reportado por Maji *et al.*, se propone colocar 2 mg de partículas en un tubo eppendorf con 1 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 M y 5% de dodecilsulfato sódico (SDS) e incubar a 37°C por 2-3 horas con una agitación de 120 rpm. Posteriormente, la solución debe ser centrifugada a 9,000 por 15 min y el sobrenadante analizado con el espectrofotómetro a 275 nm. La eficiencia de encapsulamiento se calculará con la siguiente fórmula (Sahana *et al.*, 2010):

$$E = \frac{mt * m}{M} * 100$$

Donde  $E$  es la eficiencia de encapsulamiento,  $mt$  la masa de tamoxifeno en 1 mg de partículas,  $m$  la masa de la muestra y  $M$  la masa total de tamoxifeno esperado en la muestra.

#### 4.3.3 Perfil de liberación.

Se propone colocar 3 mg de partículas en un tubo eppendorf con 1 ml de buffer salino de fosfatos (PBS) con un pH de 7.4 e incubarlas a 37°C con una agitación de 120 rpm. Se

realizarán mediciones después de 1, 3, 6 y 24 horas, posteriormente cada 24 horas durante los primeros 10 días y cada 5 días hasta cumplan 30 días. Para ello se centrifugará la solución a 9,000 rpm por 15 min, el sobrenadante será analizado a 275 nm. Mientras tanto, a los tubos con el pellet resultante de la centrifugación se les agregará 1 ml de PBS y se incubarán nuevamente para los análisis posteriores (Maji *et al.*, 2014).

#### 4.3.4 Funcionalización de motores.

Debido a que se busca aumentar la selectividad de los MNMs para células de cáncer de mama ER+, se propone funcionalizar a los motores del lado de la partícula que no está recubierta. La estrategia que se utilizará es una conjugación covalente, ya que los grupos funcionales que tiene el núcleo polimérico son carboxilos (-COOH) e hidroxilos (-OH), ambos pueden reaccionar con los grupos isotiocianato o que contengan nitrógeno y sulfuros (Cañas-Carell *et al.*, 2014).

Para crear el enlace covalente entre los grupos carboxilo del PLGA y los grupos amino del anticuerpo anti-ER se eligió a la química carbodiimida. Primero se preparó una solución en la que se mezclaron los MNMs, los anticuerpos y los *cross-linkers* EDC/sulfo-NHS. La suspensión fue colocada en un baño de hielo y agitada durante cuatro horas. Finalmente, se retiraron los anticuerpos no conjugados a través de centrifugación (Jahan y Haddadi, 2015).

#### 4.3.5 Cultivo de células.

Las células MCF-7 y MDA-MB-231 se cultivarán en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina estreptomycin, 1% L-glutamina, 1.5 g/l de bicarbonato de sodio y 0.01 mg/ml de insulina

humana recombinante. Las células serán mantenidas y propagadas en medio de cultivo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Chauhan *et al.*, 2018).

#### 4.3.5.1 Pruebas de internalización.

Se propone utilizar la microscopía confocal para medir la internalización de las partículas de PLGA cargadas con FITC con y sin funcionalizar, así como con y sin el recubrimiento metálico en células MCF-7 (ER+) y MDA-MB-231 (ER-). Para las imágenes de fluorescencia, se colocarán a las dos líneas celulares con una concentración de 10<sup>4</sup> células/ml por 24 horas en placas de cultivo. La suspensión de partículas se agregará al medio de cultivo que contiene a las células. Posteriormente, las células se lavarán tres veces con PBS, se agregarán 2 ml de medio DMEM a cada plato y se incubarán por 3 horas. Finalmente, las células se fijarán para ser observadas con el microscopio confocal con una longitud de onda de excitación de 492 nm (Maji *et al.*, 2014).

#### 4.3.5.2 Ensayo de citotoxicidad.

Para este análisis, se propone tripsinar células MCF-7 en la fase de crecimiento exponencial que corresponde a una confluencia de 75-80%. La citotoxicidad será determinada a través del ensayo colorimétrico, basado en la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y el kit de ensayo toxicológico *in vitro* de Sigma Aldrich. El reactivo MTT debe ser agregado como lo indica el instructivo. Para la muerte celular se propone utilizar como control positivo dimetilsulfóxido (DMSO) y como control positivo de supervivencia a células en medio DMEM. Los experimentos se desarrollarán por triplicado y de manera independiente. Por otra parte, la absorbancia será medida en una

placa de 96 pozos a 570 nm. Además, el control de supervivencia será establecido como 100% de supervivencia y se comparará con las otras mediciones (Chauhan *et al.*, 2018).

#### 4.3.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Finalmente, se observarán las partículas con un microscopio electrónico de barrido JEOL JIB-4500, pero en este caso es necesario recubrir a las partículas de PLGA con una capa de oro depositada con la técnica de evaporación térmica con una evaporadora SVJ 700.

### 4.4 Resultados.

#### 4.4.1 Síntesis de partículas de PLGA.

Con el objetivo de conocer la influencia de la concentración de PVA en el tamaño de las micropartículas de PLGA, se sintetizaron tres muestras con 1, 1.5 y 2.5% de PVA, respectivamente. Posteriormente, se observaron con un microscopio óptico para corroborar su morfología esférica y para determinar el diámetro promedio. Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Tabla 1**. Los resultados muestran un decaimiento en el tamaño de partícula conforme se incrementó la concentración de PVA en la solución acuosa. Asimismo, el decremento es lineal.

**Tabla 1.** Variación del tamaño de las partículas con diferentes concentraciones de PVA.

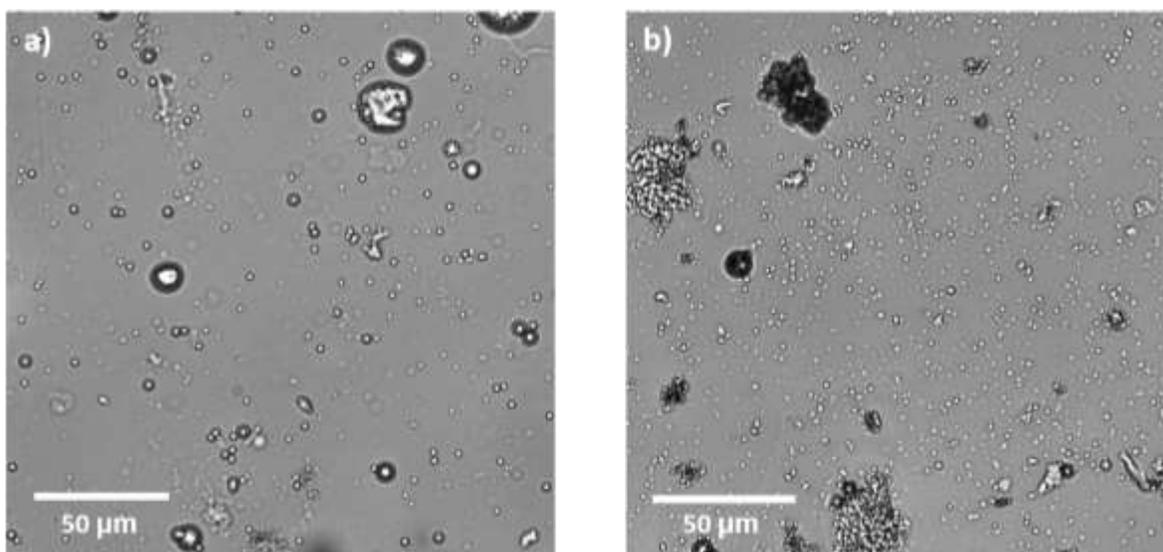
| <b>Muestra</b>              | <b>PVA (%)</b> | <b>PLGA (mg)</b> | <b>Tamaño (µm)</b> |
|-----------------------------|----------------|------------------|--------------------|
| <b>MP-PVA<sub>1</sub></b>   | 1              | 30               | 3.4                |
| <b>MP-PVA<sub>1.5</sub></b> | 1.5            |                  | 2.8                |
| <b>MP-PVA<sub>2.5</sub></b> | 2.5            |                  | 2.2                |

Posteriormente, para determinar el efecto de la cantidad de PLGA en el tamaño de las partículas se siguió el mismo método de síntesis con PVA al 2.5% y cuatro cantidades diferentes de PLGA. Los resultados de esa evaluación se presentan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Variación del tamaño de las partículas con distintas cantidades de PLGA.

| Muestra               | PVA (%) | PLGA (mg) | Tamaño ( $\mu\text{m}$ ) |
|-----------------------|---------|-----------|--------------------------|
| MP-PLGA <sub>5</sub>  | 2.5     | 5         | 1.5                      |
| MP-PLGA <sub>10</sub> |         | 10        | 1.7                      |
| MP-PLGA <sub>20</sub> |         | 20        | 1.9                      |
| MP-PLGA <sub>30</sub> |         | 30        | 2.2                      |

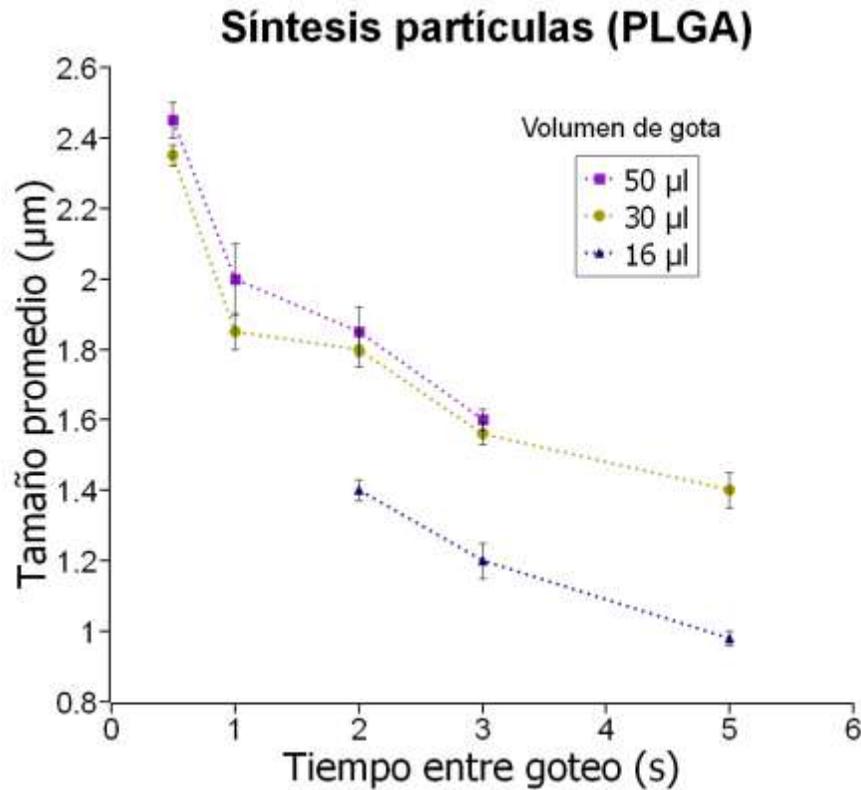
En la **Figura 21** se muestran las imágenes capturadas del microscopio óptico para las partículas MP-PVA<sub>2.5</sub> y MP-PLGA<sub>5</sub>, respectivamente. En ambos casos, se pueden ver partículas esféricas y aglomerados de partículas.



**Figura 21.** Fotografías de microscopía óptica de micropartículas con a) 2.5% de PVA y 30 mg de PLGA y b) 2.5% de PVA y 5 mg de PLGA.

Finalmente, se evaluó la relación entre el tamaño de partícula con el tiempo entre goteo y el volumen de gota, se realizó la misma síntesis con PVA (2.5%) y PLGA (5 mg) variando tanto el volumen de gota entre 16, 30 y 60  $\mu\text{l}$  como el tiempo entre goteo de 0.5, 1,

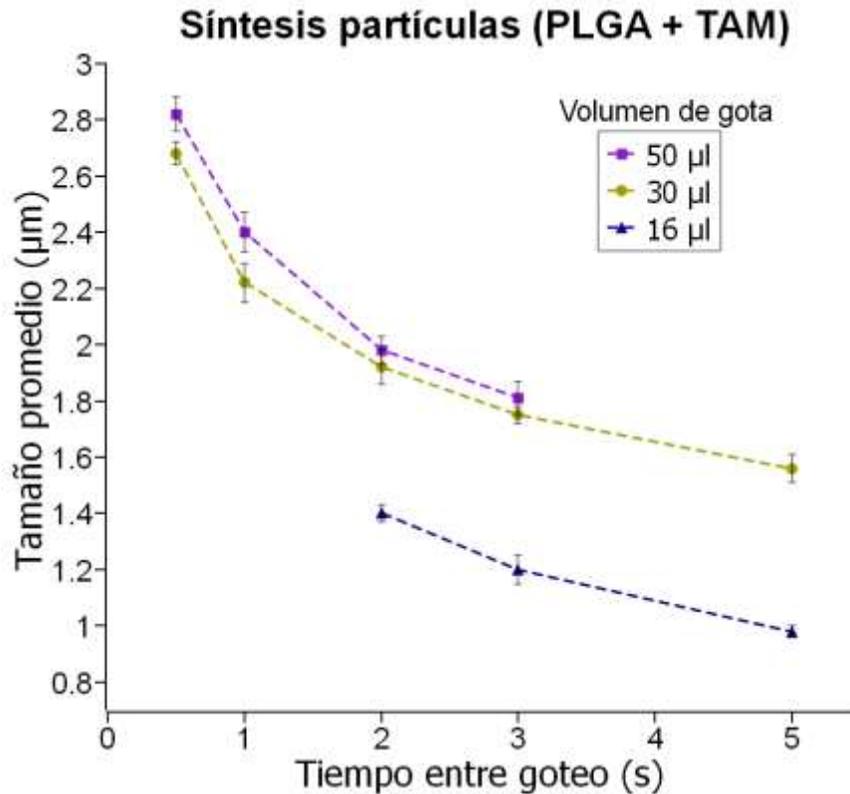
2, 3 y 5 segundos. Los resultados de las mediciones de tamaños por microscopía de las muestras se presentan en la **Figura 22**. La tendencia mostrada es una reducción en el tamaño al incrementar el tiempo entre goteo o reducir el tamaño de la gota.



**Figura 22.** Efecto del tamaño de gota sobre el tamaño de la partícula con respecto al tiempo entre goteo en partículas de PLGA, PVA 2.5%, PLGA 5 mg.

#### 4.4.1.1 Síntesis de partículas de PLGA+TAM.

Otro efecto que se estudió la relación entre el volumen de gota (16, 30, 60 µl) y el tiempo entre goteo (0.5, 1, 2, 3, 5 s) durante la síntesis de partículas de PLGA con TAM añadido, dichos resultados están representados en la **Figura 23**. Se puede apreciar una tendencia decreciente; es decir, al incrementar el tiempo entre goteo el tamaño promedio de las partículas se redujo. De igual manera, la disminución en el tamaño de gota da como consecuencia una disminución en el tamaño de las partículas.



**Figura 23.** Efecto del tamaño de gota sobre el tamaño de la partícula con respecto al tiempo entre goteo en partículas PLGA con tamoxifeno encapsulado, PVA 2.5%, PLGA 2.5 mg, TAM 2.5 mg.

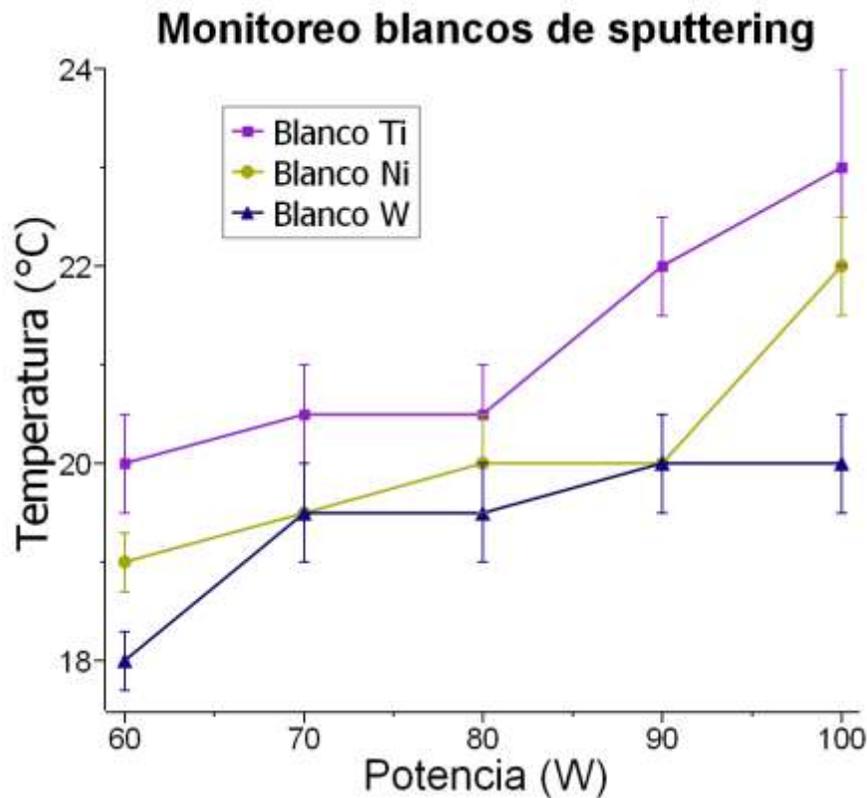
#### 4.4.2 Síntesis de motores tipo Janus.

Una vez sintetizadas las partículas, éstas fueron utilizadas como núcleos para la síntesis de MNMs tipo Janus con la técnica de pulverización catódica; se comenzó por la calibración de la cámara de depósito.

##### 4.4.2.1 Calibración de la cámara de pulverización catódica.

La calibración de los parámetros de trabajo tiene como primera parte la obtención de la potencia de trabajo óptima. En este trabajo se buscó obtener la potencia de trabajo a la cual los blancos presentan depósito y la temperatura más baja, variando la potencia aplicada

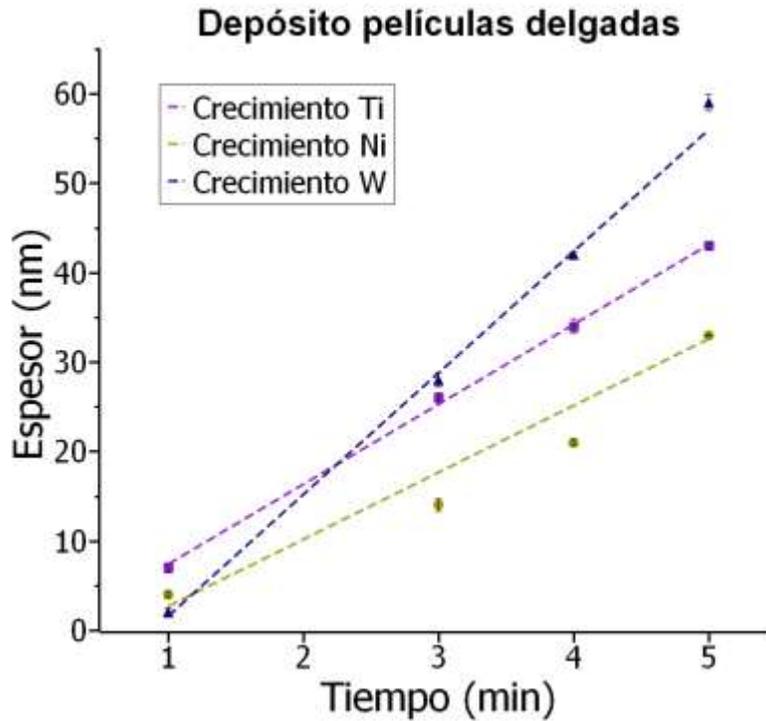
entre 60 y 100 W. Las temperaturas registradas para cada blanco se muestran en la **Figura 24**.



**Figura 24.** Registro térmico de los blancos al interior de la cámara de depósito con un incremento en la potencia aplicada 15 sscm de flujo de Ar, presión de trabajo de 2 mTorr.

En la figura anterior, se aprecia un incremento en la temperatura del blanco al incrementar la potencia aplicada. Por otra parte, se observa que el Ti es el que registra la mayor temperatura, mientras que W es el que incrementa en menor medida su temperatura. Finalmente, la temperatura tiene las menores variaciones en el intervalo de 70 a 80 W; asimismo, la temperatura más baja de trabajo se encuentra en 60 W para los tres blancos.

En cuanto a la **Figura 25**, se obtuvieron las tasas de depósito para los tres blancos para 4 tiempos de depósito distintos (1, 2, 3 y 5 minutos) y las curvas de calibración.



**Figura 25.** Curvas de crecimiento de películas delgadas por método de pulverización catódica; potencia 60 W, flujo de Ar 25 sccm y presión de trabajo de 2 mTorr.

Cabe mencionar que la  $R^2$  en todos los ajustes fue mayor a 0.97, por lo tanto, se concluye que su comportamiento es lineal.

#### 4.4.2.2 Variación en la capa de adhesión.

Este experimento se enfocó en observar el efecto de la capa de titanio o capa de adhesión sobre el comportamiento de los MNMs con un núcleo de  $\text{SiO}_2$  de  $\sim 1.2 \mu\text{m}$  y de las capas depositadas posteriormente (Ni, W) al ser sometidas a una prueba de desprendimiento con agua. Las observaciones se encuentran en la **Tabla 3**.

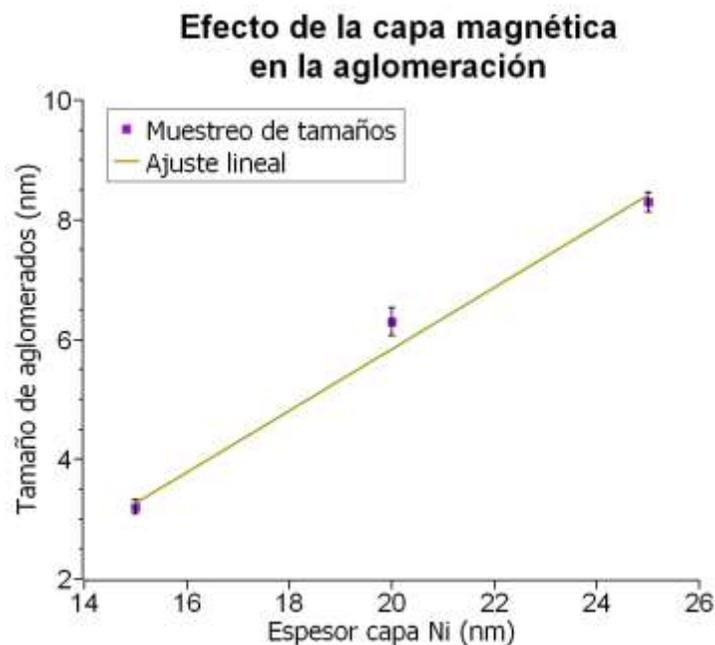
**Tabla 3.** Efecto de la capa de Ti sobre la adhesión de las capas de Ni y W.

| Grupo             | Desprendimiento | Desprendimiento |
|-------------------|-----------------|-----------------|
|                   | Ni (%)          | W (%)           |
| G-Ti <sub>5</sub> | 0               | 0               |
| G-Ti <sub>0</sub> | 25              | 40              |

De la tabla anterior se aprecia que las tasas de desprendimiento con la prueba de agua, la capa de W tiene una tasa de 40% y la capa de Ni tiene una de 25%, el desprendimiento fue nulo para el grupo que contenía la capa de Ti.

#### 4.4.2.3 Variación en la capa magnética.

El análisis de estructuras tipo Janus con núcleo de silica ( $\text{SiO}_2$ ) con incrementos de 5 nm en su capa magnética desde 15 hasta 25 nm, fue realizado para determinar el efecto de la capa magnética en la aglomeración de los MNMs. El tamaño promedio de los aglomerados se obtuvo al comparar el área de cada aglomerado a la de un círculo. Como resultado, el tamaño del aglomerado es igual al diámetro de dicho círculo; las mediciones se realizaron al final de la excitación de 4.144 Mhz. Se encontró que las trayectorias en ocasiones eran desviadas por efecto de la aglomeración. Los resultados de las observaciones anteriores se muestran en la **Figura 26**.



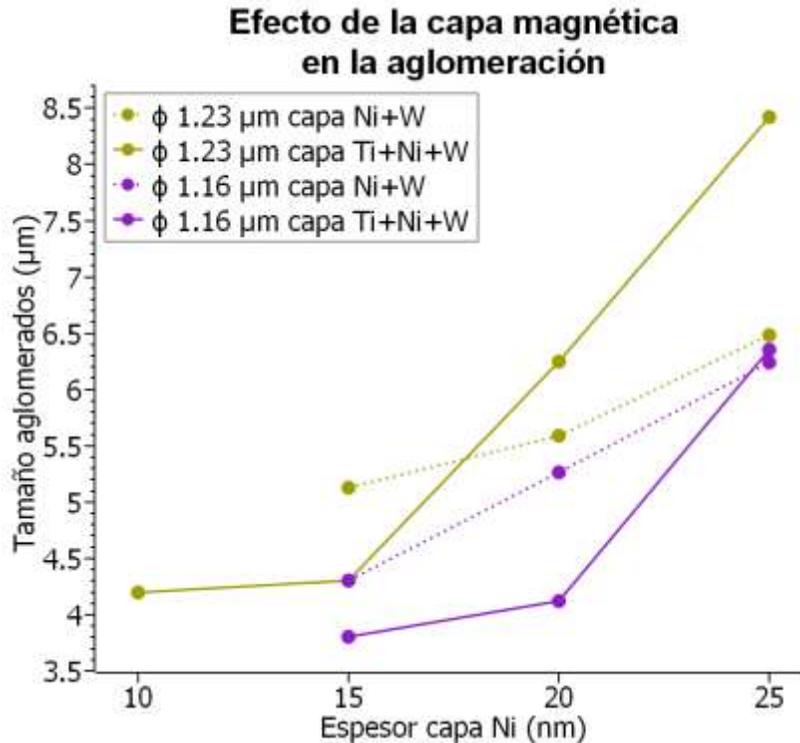
**Figura 26.** Efectos del espesor de la capa de níquel sobre la aglomeración de motores tipo Janus con núcleo de  $\text{SiO}_2$ .

La aglomeración tiene una dependencia lineal con el espesor de la capa de Ni, como se puede ver en el ajuste lineal que se muestra en la figura anterior. Además, la  $R^2$  asociada a la regresión es de 0.97. Asimismo, las trayectorias de los motores en las muestras con aglomerados de mayor tamaño fueron más cortas en comparación con los motores con aglomerados más pequeños como se muestra en la **Tabla 4**, es importante mencionar que para esta tabla únicamente fueron cuantificados los motores cuya trayectoria a cabo en la adición a un aglomerado.

**Tabla 4.** Efecto de la aglomeración en la longitud de trayectoria de micromotores tipo Janus con núcleo de  $\text{SiO}_2$ .

| Tamaño promedio del aglomerado ( $\mu\text{m}$ ) | Longitud promedio de recorrido ( $\mu\text{m}$ ) |
|--|--|
| $3.2 \pm 0.12$                                   | 39   |
| $6.3 \pm 0.23$                                   | 31   |
| $8.3 \pm 0.16$                                   | 25   |

Además, este efecto también se obtuvo en motores con núcleo de PLGA, teniendo los resultados en la **Figura 27**, con una comparativa del efecto de la existencia de la capa de adhesión (Ti) y dos grupos con núcleos de distinto diámetro.



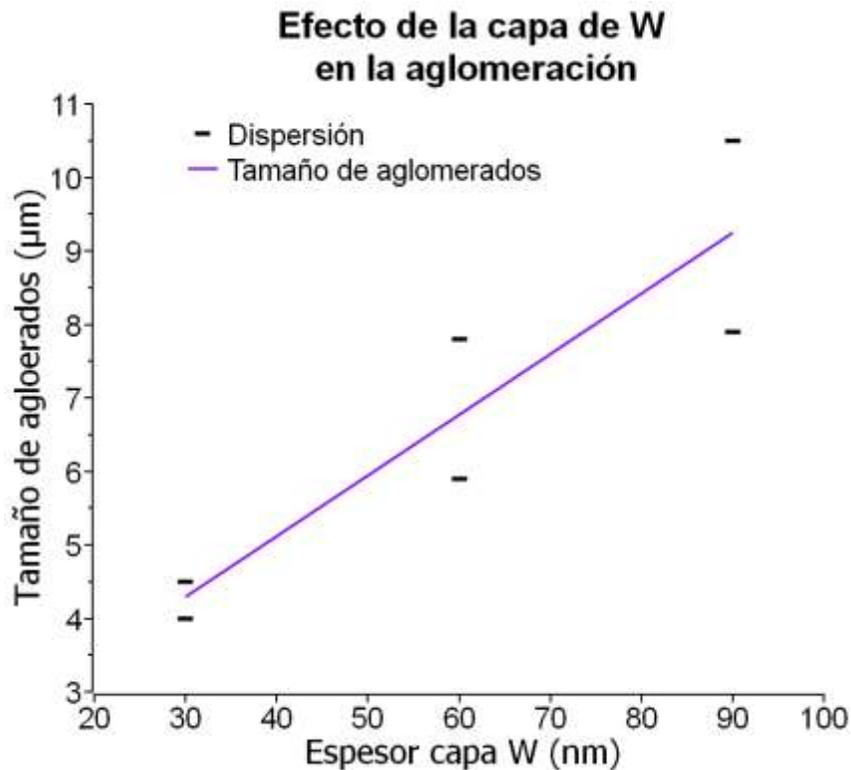
**Figura 27.** Efectos del espesor de la capa magnética sobre la aglomeración de motores tipo Janus con núcleo de PLGA.

En las gráficas anteriores se tiene un comportamiento lineal con una inflexión notoria en las muestras que poseen Ti e inflexiones menores en las muestras que no poseen dicha capa. Es importante destacar, que independientemente de la presencia de la capa de Ti, las partículas con núcleos más grandes presentaron mayor aglomeración. Sin embargo, los incrementos en el tamaño promedio de los aglomerados fueron mayores en las muestras que poseen Ti.

#### 4.4.2.4 Variación en la capa diferencial de densidad

Al igual que en los apartados anteriores, primero se analizó el efecto del espesor de la capa diferencial de densidad sobre la aglomeración de las estructuras tipo Janus con núcleo de sílica ( $\text{SiO}_2$ ). La **Figura 28** muestra el efecto del incremento de espesor, el cual tiene un comportamiento lineal; es decir, que el tamaño de los aglomerados se ve

incrementado en conjunto con el espesor de la capa de W. Además, las mediciones presentaron una dispersión mayor conforme incrementó el espesor.



**Figura 28.** Efecto del espesor de la capa de tungsteno sobre la aglomeración de motores tipo Janus con núcleo de SiO<sub>2</sub>.

#### 4.4.3 Determinación de tamaños.

Los tamaños de las partículas fueron medidos a partir de un promedio de 10 muestras y aproximadamente 100 partículas o motores.

##### 4.4.3.1 Conteo estadístico.

Primeramente, se realizó la caracterización de las micropartículas de PLGA a través de microscopía óptica para corroborar que su morfología era esférica y su diámetro se encontraba dentro del rango de 0.8-1.2 µm (**Figura 23**). Se encontró que las partículas

sintetizadas tenían una distribución de tamaños dentro del rango esperado, aunque se observaron algunas variaciones al alterar los parámetros de síntesis.

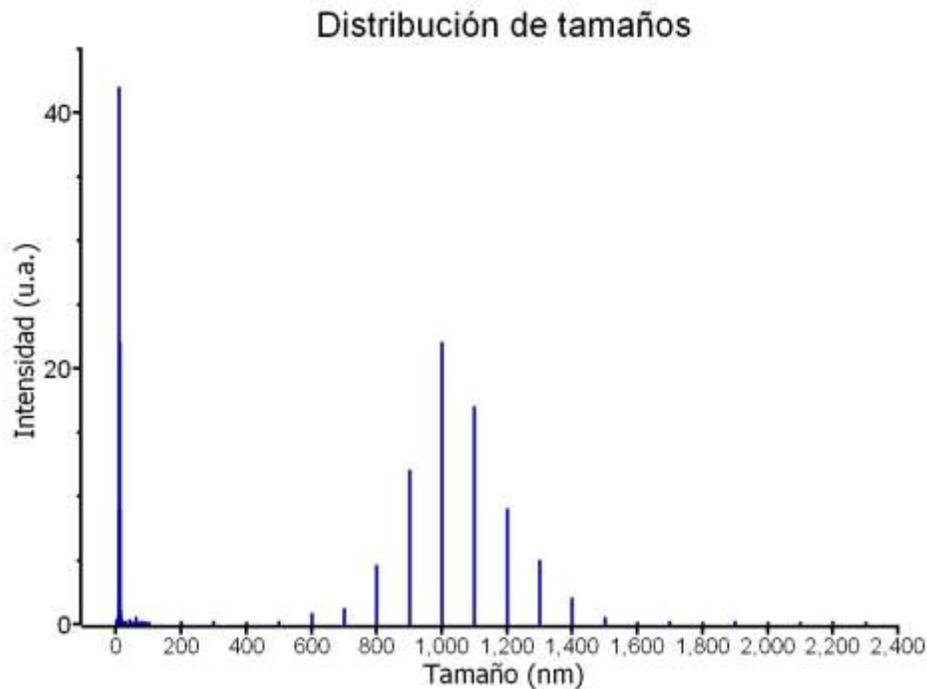
La caracterización de las partículas se llevó a cabo durante distintos días después de la síntesis, con el objetivo de determinar la estabilidad de la forma a lo largo del tiempo. En la mayoría de las partículas pequeñas se observó un cambio en su morfología, específicamente se volvían más ovaladas; no obstante, este efecto fue despreciable en las imágenes de partículas dentro del rango esperado. En contraste, las partículas más grandes presentaron fenómenos de agregación, por lo que fue necesario dispersarlas mediante agitación con vortex y una sonicación ligera. A partir de las imágenes obtenidas, se calculó el tamaño promedio de los motores. Para ello, se tomaron 8 muestras de motores sumando un total de 82 MNMs con núcleo polimérico, los cuales tuvieron un tamaño promedio de  $1.18 \pm 0.1 \mu\text{m}$ . Cabe destacar, que los aglomerados fueron omitidos para este conteo.

Por otra parte, la cantidad de MNMs visibles en la muestra con respecto al número de núcleos observados antes del depósito incrementó de manera consistente en todos los experimentos. Esto se debe a que, al agregar las capas metálicas a las partículas, algunas que antes eran muy pequeñas, ahora podían ser detectadas con mayor facilidad a través el microscopio.

#### 4.4.3.2 Espectroscopía de dispersión dinámica de luz.

Con el objetivo de verificar la distribución de tamaños de las partículas y motores sintetizados, se realizó un análisis espectroscópico de dispersión dinámica de luz. Los resultados se muestran en la **Figura 29**. Al interpretar dicha gráfica se pueden ver dos grupos

con mayor intensidad, por una parte, el grupo de partículas con mayor intensidad ronda los 9 nm, mientras que el otro tiene un tamaño promedio aproximado de 1000 nm.

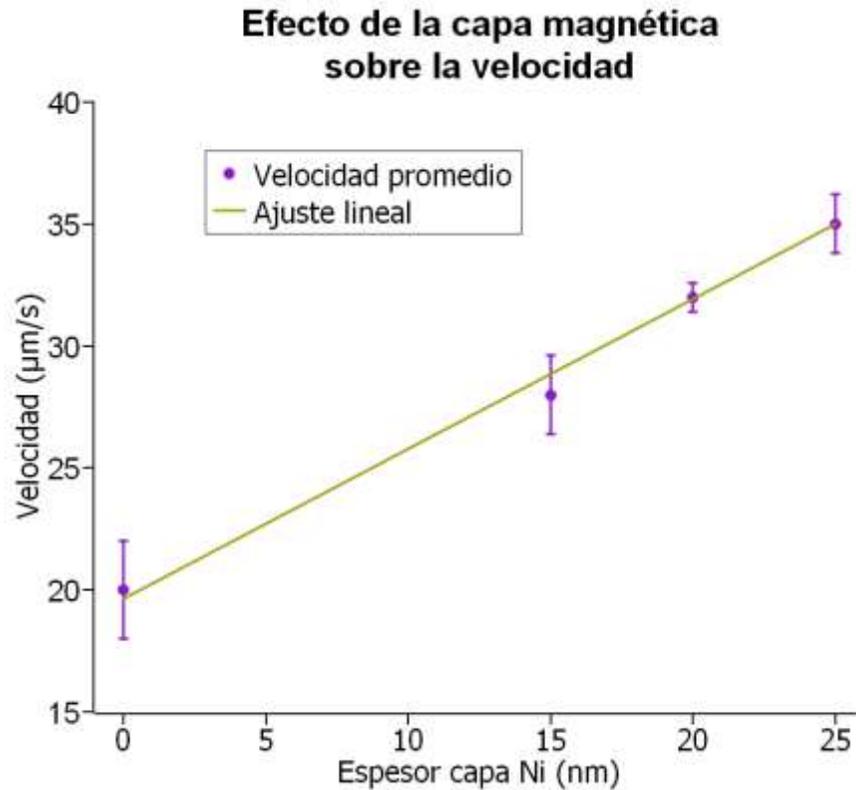


**Figura 29.** Espectro de intensidad por frecuencia de tamaños de partículas PLGA

En el histograma se puede ver que la dispersión de ambos grupos de partículas fue distinta, siendo mayor la dispersión en las partículas de 1000 nm. De igual forma, se muestra la aparición de partículas de hasta 2400 nm, siendo el límite superior de detección del equipo.

#### 4.4.4 Determinación de velocidades

Otro experimento consistió en estudiar el efecto de los distintos componentes sobre la movilidad de los motores, comenzando por motores de núcleo de  $\text{SiO}_2$ . Estos motores presentaron un incremento en sus velocidades al incrementar la capa magnética; sin embargo, las trayectorias fueron de menor longitud conforme se incrementaba el espesor de la capa magnética. Lo anterior se puede observar en la **Figura 30**.



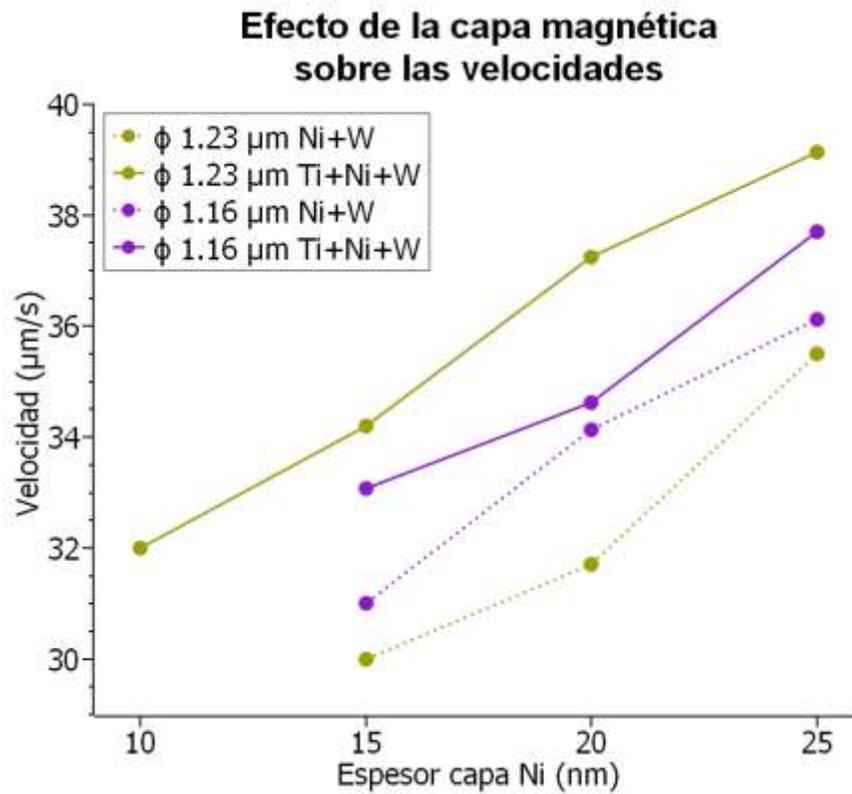
**Figura 30.** Efecto del espesor de la capa magnética sobre la movilidad de motores tipo Janus con núcleo de SiO<sub>2</sub>, con espesores de capas Ti 5 nm, Ni variable y W 60 nm. Ultrasonido de 4.144Mhz con una intensidad de 3.5 Vpp.

Seguido de esto, se examinó el efecto de la capa de titanio sobre el comportamiento de los motores con núcleo polimérico (PLGA). Las muestras se dividieron en dos grupos de acuerdo con el tamaño promedio del núcleo, como se expone en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Registro de control de síntesis de micromotores tipo Janus.

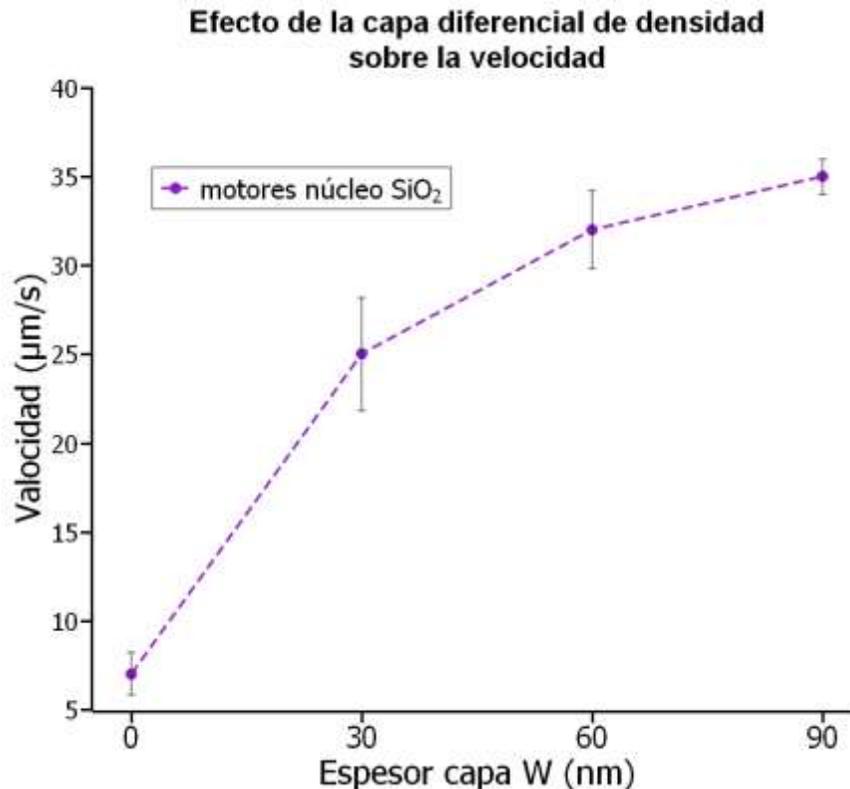
| Muestra | Tamaño promedio del núcleo (µm) | Capa         |             |                | Velocidad (µm/s) |
|---------|---------------------------------|--------------|-------------|----------------|------------------|
|         |                                 | Titanio (nm) | Níquel (nm) | Tungsteno (nm) |                  |
| A11 Ti  | 1.16                            | 5            | 15          | 60             | 33               |
| A12 Ti  | 1.23                            | 5            | 15          | 60             | 34               |
| A11     | 1.16                            | 0            | 15          | 60             | 31               |
| A12     | 1.23                            | 0            | 15          | 60             | 30               |

Se aprecia que las muestras que poseen la capa de Ti (A11 Ti, A12 Ti) tienen velocidades superiores a las que no la poseen, con una diferencia menor al 10% entre las velocidades. Por una parte, el incremento de las velocidades en la **Figura 31** presenta que las muestras que poseen la capa de Ti son más veloces, en comparación con las muestras carentes de esta capa. Por otra parte, la diferencia en velocidades entre muestras que poseen el mismo tamaño de núcleo es mayor en las muestras con un núcleo más grande.



**Figura 31.** Efectos del espesor de la capa magnética sobre la movilidad. Ultrasonido de 4.144Mhz con una intensidad de 3.5 Vpp.

Además, se buscó corroborar la afectación del espesor de la capa diferencial de densidad haciendo variaciones de 30, 60, 90 nm para comparar con los resultados obtenidos por Valdez-Garduño en el 2020. Los resultados en el modelo de prueba con núcleo de SiO<sub>2</sub> se muestran en la **Figura 32**.



**Figura 32.** Efectos del espesor de la capa diferencial de densidad sobre la movilidad.

Debido a la contingencia que ocurrió durante la realización del presente trabajo los experimentos de funcionalización, perfiles de liberación, pruebas de internalización y toxicidad quedaron inconclusos. Por lo que los resultados únicamente serán discutidos con base a lo reportado en la literatura para situar las bases para la finalización de dicha parte experimental.

## 4.5 Discusión de resultados.

### 4.5.1 Síntesis de partículas de PLGA.

En la **Tabla 1** se observa una reducción en el tamaño de partícula por el incremento en la concentración de PVA. Este parámetro tiene efectos en las tres etapas de la nucleación.

Como lo indica la literatura, la cantidad de surfactante modifica la difusión del solvente y afecta directamente el crecimiento de las partículas (Choi *et al.*, 2002).

De la misma forma, el efecto de la reducción en la cantidad de material por núcleo se observa en la **Tabla 2**. De este modo, la reducción en la cantidad de PLGA permite una mayor distribución del material en la solución. Además, una mayor distribución favorece la aparición de más núcleos y evita la aglomeración de semillas durante el crecimiento. Ambos casos resultan en partículas de menor tamaño (Hernández-Giottonini *et al.*, 2020).

Por otra parte, la morfología de las partículas es esférica como se muestra en las micrografías de la **Figura 21**, independientemente de las variaciones en la cantidad de PVA y PLGA. Esto se debe principalmente a que se originan de nucleación homogénea y al largo tiempo de síntesis (24 horas), ya que cuanto mayor es el tiempo, el sistema tiende a adquirir una configuración de menor energía, en este caso, una esfera.

De igual manera, otros factores que pueden afectar el tamaño resultante de las partículas se observan en las **Figuras 22 y 23**. El aumento del tiempo entre gotas tiene como consecuencia una mayor dispersión de las semillas de nucleación formadas al entrar en contacto con la fase acuosa. Como resultado, el tamaño de partícula disminuye (Figuroa *et al.*, 2020).

Acompañado de esto, la formación de nuevos núcleos es menor con cada gota aplicada, debido a que la separación entre núcleos se reduce y tienden a aglomerarse. Por consiguiente, disminuye la diferencia entre las etapas de crecimiento y se obtiene un mayor número de partículas con una distribución de tamaños más uniforme.

Otra de las observaciones realizadas durante las síntesis fue el efecto del tamaño de la gota sobre la dispersión de tamaños. Al incrementar el tamaño de las gotas, su volumen

crece más rápido que su área superficial, esta diferencia en órdenes de magnitud se ve reflejada en la forma en la que decae el tamaño de partícula. El incremento en el volumen de la gota tiene como consecuencia la aparición de pocos centros de nucleación con respecto al total de material contenido en ella y una dispersión pobre de dichos centros. De esta forma, se obtiene una reducción en la cantidad de partículas, una distribución de tamaños irregular y la formación de agregados de gran tamaño (Figueroa *et al.*, 2020).

#### 4.5.1.1 Síntesis de partículas de PLGA+TAM.

Por otra parte, la adición de TAM incrementó los tamaños promedio de partícula entre 0.1 y 0.2  $\mu\text{m}$ , como se muestra en la **Figura 23**. El TAM actúa como centro de nucleación para las moléculas de PLGA (Miladi *et al.*, 2014), lo cual propicia que se potencie el efecto de agentes que actúan sobre la dispersión de los núcleos. Al igual que con las partículas de PLGA, entre mayor es el número de los centros de nucleación, menor es la cantidad de material aglomerado en cada uno. Cabe destacar que el TAM al ser partícipe en la etapa de nucleación, da origen a un número de núcleos proporcional a su concentración y ayuda a reducir la dispersión de tamaños.

#### 4.5.1.2 Síntesis de partículas de PLGA+FITC.

La adición de moléculas distintas puede actuar como agente de nucleación, el tamaño y composición de la molécula de FITC podría estabilizar de manera más rápida la formación de núcleos si es comparada con el TAM, ya que su masa molecular es mayor (Ronco *et al.*, 2015).

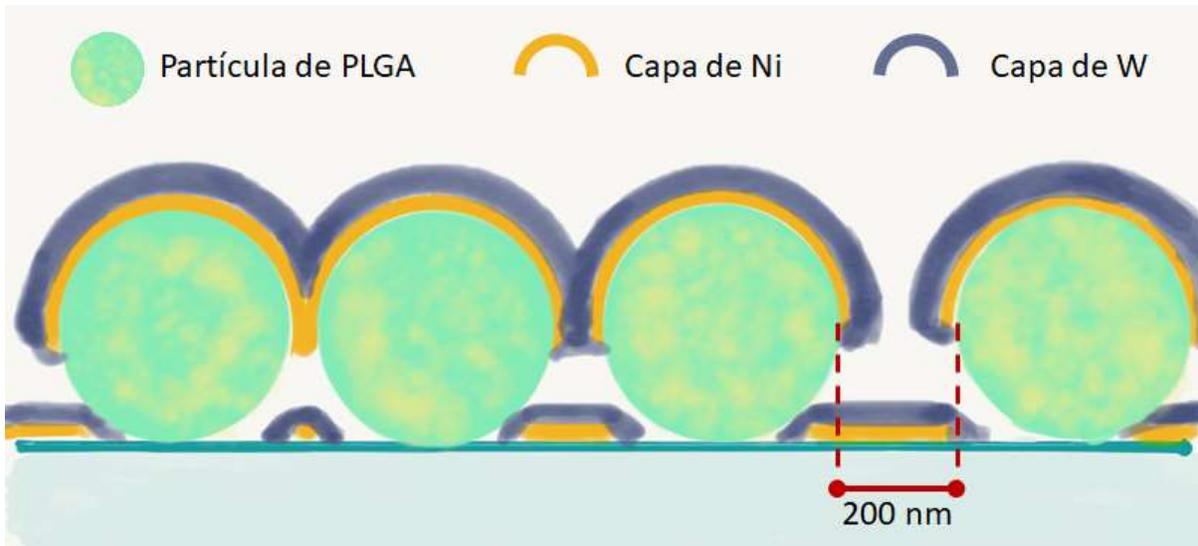
Adicionalmente, se espera un comportamiento similar a la adición de PLGA con la adición de FITC; sin embargo, su interacción con el TAM podría presentar un fenómeno de nucleación heterogénea incrementando la dispersión de tamaños. Por la presencia de dos moléculas distintas que actúan como agente de nucleación. Se espera que los núcleos formados por FITC presenten un comportamiento similar al mostrado en la **Figura 30** donde los núcleos tienen un tamaño de hasta 12 nm propiciado por las moléculas de TAM.

#### 4.5.2 Síntesis de motores tipo Janus.

La preparación previa al proceso de depósito de películas delgadas tuvo repercusiones en la formación de aglomerados de motores. Esto se debe a que el espaciado mínimo requerido entre partículas es de 200 nm, dado el tamaño promedio de núcleo y la suma de los espesores esperados con un error estándar del 10% asociado a las mediciones de calibración para el depósito de películas delgadas; en caso de no cumplirlo, el recubrimiento metálico forma un puente entre las estructuras y da lugar a un aglomerado, en cuyo puente los metales como el Ni o Ti están expuestos (**Figura 33**). Lo anterior tiene implicaciones en cuanto a la aglomeración como puede ser que las estructuras en solución busquen un acomodo más estable y formen aglomerados, en especial cuando los metales se encuentran expuestos (Der Want, 1998).

La dilución de la solución de motores ayudó a reducir la concentración de aglomerados. Además, se determinó que la dilución 20:1 era la que se adecuaba a los parámetros buscados. Por otra parte, al incrementar el espesor de los depósitos los aglomerados incrementaron, ya que el espacio requerido entre núcleos era mayor, entonces

se formaban puentes metálicos entre los motores. Esto a su vez evitó un correcto depósito y por ende la formación de motores funcionales.



**Figura 33.** Representación de la formación de aglomerados de motores por uniones metálicas durante el proceso de depósito de películas delgadas.

#### 4.5.2.1 Calibración de la cámara de pulverización catódica.

De la calibración se puede inferir que 60 W es la potencia óptima de trabajo, ya que en esta potencia (**Figura 24**) la temperatura de trabajo es lo suficientemente baja y por lo tanto, existe una baja probabilidad de una liberación repentina de moléculas para relajar el sistema de las fluctuaciones térmicas. Por otra parte, las tasas de depósito pueden considerarse lineales debido a una regresión lineal con un alto coeficiente de correlación. Por ello se utilizaron las curvas mostradas en las **Figura 25** para determinar los tiempos de depósito. Finalmente, se observa que las pendientes asociadas al depósito de cada blanco son distintas, esto se debe a las propiedades de los materiales como lo son: coeficiente de expansión térmica, punto de fusión y magnetización.

Comenzando con el tungsteno, que al tener un calor específico elevado tiende a disipar su energía con vibraciones en su estructura y así facilitar el desprendimiento de las

partículas conforme mayor es el tiempo de exposición al potencial aplicado. Asimismo, la película de níquel tuvo un crecimiento de manera más paulatina, esto debido a sus propiedades magnéticas; sus partículas se veían constantemente atraídas hacia el magnetrón, lo que genera una curvatura en la trayectoria del haz y disminuye el depósito esperado. Por otra parte, la tasa de depósito del titanio fue la menos variable porque es un material muy estable.

#### 4.5.2.2 Variación en la capa de adhesión.

La morfología sufrió cambios posteriores al depósito, ya que se volvió asimétrica, las características de la capa exterior se encuentran descritas en la **Tabla 5**. Las dos síntesis (A11 y A12) fueron realizadas con el mismo método en recipientes separados para corroborar la replicabilidad del método. Para ambas se obtuvieron mediciones similares, la dispersión de los tamaños fue del 3%, lo cual se asocia a las variaciones en los equipos utilizados en cada una de las síntesis. Por lo tanto, al agregar la capa de adhesión, se incrementa la tasa de replicabilidad del método. Al comparar ambas muestras se observó que aquella con la capa de Ti, tenía un menor desprendimiento durante la manipulación como se aprecia en la **Tabla 3**. Esto coincide con lo descrito por Gibbons en 1996, donde se trabajaban películas de adhesión sobre superficies poliméricas.

Es importante observar que la aglomeración de los motores es promovida por la presencia de titanio (**Figura 27**); ya que el tamaño de los aglomerados crece de manera lenta en las muestras que no poseen la capa de adhesión. En contraparte, cuando la capa de adhesión se encuentra presente, el tamaño de los aglomerados incrementa de manera acelerada después de un espesor crítico de la capa magnética. Principalmente por una

reducción de la respuesta magnética de las partículas y en las fuerzas de atracción magnética entre los motores. Esto se debe a la interfaz Ti/Ni en la cual se pueden formar estructuras no magnéticas como lo son TiNi, TiNi<sub>3</sub> y Ti<sub>2</sub>Ni (Bhatt *et al.*, 2006).

En el caso de las partículas con un núcleo de diámetro 1.23  $\mu\text{m}$ , el tamaño de los aglomerados es mayor que para las partículas de diámetro menor. Debido a que, al tener un área superficial más grande, la cantidad de Ti es mayor y por ende existe una mayor interacción con la capa de Ni. Lo anterior propicia que los efectos en la interfaz Ni/Ti afecten en mayor medida a los dominios magnéticos de Ni; aumentan tanto su magnitud como el área con la que pueden interactuar con las partículas.

Cabe enfatizar que el comportamiento que se muestra en la **Tabla 5** indica que la capa de adhesión tiene una contribución en la asimetría de densidad, lo cual eleva la velocidad de propulsión, como lo indica Valdez-Garduño *et al.* (2020). Sin embargo, ambos casos mostraron movimiento con velocidades similares. Por lo antes mencionado, se requiere de una muestra más robusta para modelar la relación entre la velocidad y la capa de adhesión.

#### 4.5.2.3 Variación en la capa magnética.

Es necesario mencionar a los efectos en el comportamiento de los micromotores que supone la presencia de una región magnética y sobre todo, el efecto dado por el incremento de tamaño de dicha región. Los efectos pueden observarse en las **Figuras 27, 30 y 31**. Por una parte, se observa el crecimiento en el tamaño de las aglomeraciones en la **Figura 26 y 27**; mientras que en las **Figuras 30 y 31**, se muestra el incremento de las velocidades. Ambos

efectos tienen un origen en común, la tendencia a minimizar la energía al interior del sistema (solución acuosa de motores).

Al hablar de materiales con respuesta magnética es importante considerar la existencia de dominios porque son regiones espaciales con una magnetización intrínseca uniforme en una sola dirección, capaces de retener la magnetización aún cuando ya no exista un estímulo externo (Thiavilleb, n.d.). Los dominios se forman para buscar reducir la energía al interior del material en el que se encuentran.

El Ni posee dominios con una susceptibilidad magnética baja comparada con el hierro. Tal que, los efectos del ferromagnetismo son mayores al incrementar el volumen del material (Slater, 1936); por ende, al aumentar el espesor de la capa de Ni, supondría que los efectos de atracción magnética fueran mayores. Sin embargo, al hablar de una película delgada con dimensiones nanométricas se debe considerar un fenómeno de disminución en la respuesta ferromagnética al incrementar el espesor de la película; principalmente por el acomodo y tamaño de los dominios magnéticos (Allenspach, 1994). Fenómeno que podría ser observado si se incrementa aún más el espesor de la capa magnética, pero se sugiere realizar un mayor número de pruebas sobre la respuesta magnética como lazos de histéresis magnética y microscopía de fuerza magnética atómica (MFFM).

No obstante, la literatura muestra que una vez magnetizada una partícula con material ferromagnético, esta conserva su magnetización generando un campo magnético externo. EL arreglo experimental hace que se encuentren varios motores bajo la influencia de un campo magnético externo; es decir, varios motores con una magnetización intrínseca que por el fenómeno de magnetoforesis se ven atraídos entre sí, como lo estudió Marimón-Bolívar y Gonzáles (2018). Este efecto es más claro cuando se analizan las trayectorias de los

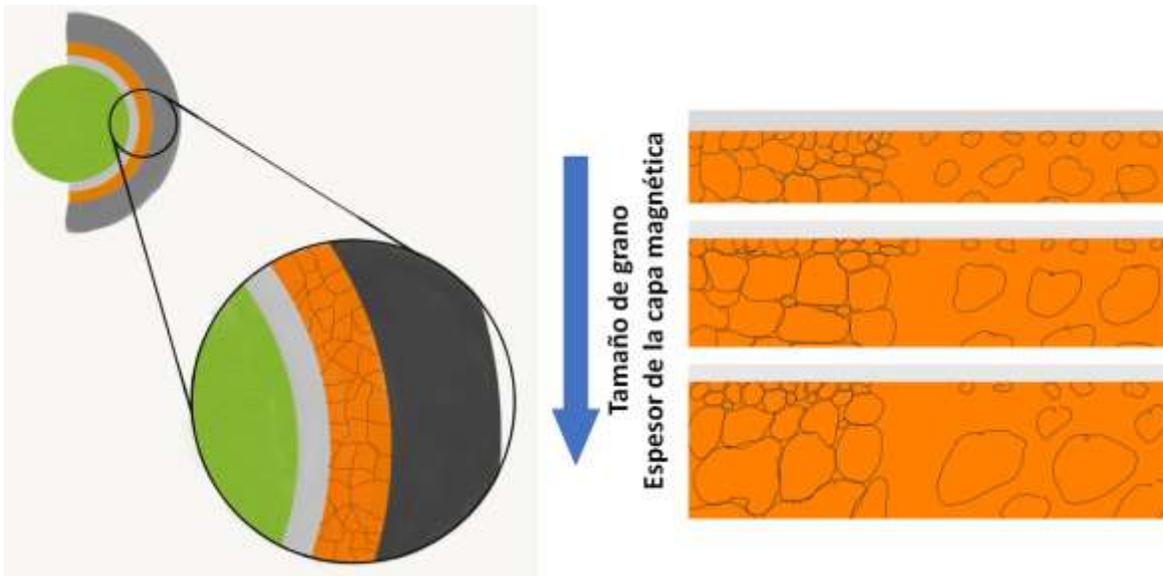
motores, ya que la atracción magnética es dependiente de la distancia entre los objetos; de manera que, cuando se encuentran cercanos los motores presentan una aceleración. Siendo el motor menos másico el que se ve acelerado con mayor facilidad y termina por aglomerarse.

Así pues, al incrementar el espesor de la capa magnética y estimular el material con un campo magnético externo, la magnetización existente al interior de cada motor aumenta, ya que existe una mayor cantidad de material que puede magnetizarse. Lo que a su vez, incrementa la atracción entre las regiones magnetizadas de los motores y termina por provocar que los motores se atraigan entre sí, resultando en una mayor aglomeración, tal y como se observa el crecimiento en las gráficas de las **Figuras 27** y **26**. Es importante mencionar, que la aglomeración es una forma de reducir la energía del sistema de motores, ya que éstos actúan como dipolos magnéticos y buscan acomodarse con otros a manera de cancelar sus momentos magnéticos (Long *et al.*, 2020). De tal manera que un incremento en la aglomeración puede asociarse a la búsqueda de una configuración más estable y debe estudiarse con mayor profundidad para garantizar que pueden permanecer en una solución sin aglomerarse.

En la **Figura 27**, se aprecian distintas pendientes en el crecimiento del tamaño de los aglomerados, cuando se posee Ti, las curvas tienen una región de lento crecimiento debido a que el crecimiento de los dominios magnéticos en el Ni se ve limitado por la interacción con la capa de Ti (Kyanitsia, 2019) como se muestra en **Figura 34**. El efecto de la capa de Ti se puede clarificar con los motores que no poseen la capa de adhesión, porque su aglomeración incrementa de manera menos acelerada como se muestra en la **Figura 27**. Esto se explica porque no se limita el crecimiento de los dominios magnéticos (**Figura 34**) gracias a la

inexistencia de la capa de titanio. Por ende, el sistema disminuye su energía desplazando las paredes de dominio sin la necesidad de aglomerarse y por otra parte los dominios crecen libremente sin el confinamiento en la interfaz Ti/Ni.

En la interfaz Ti/Ni, los granos en la película de Ni tienden a ser más pequeños sin importar el espesor de dicha película, pero los granos externos a la interfaz crecen conforme el espesor de la capa magnética incrementa (Reza *et al.*, 2006 Febrero). Lo anterior tiene repercusiones en la magnetización de la película de Ni, debido a que al ser mayor el tamaño de grano, la energía requerida para desplazar una pared de dominio disminuye de manera global (Kent y Gee, 1994; Li *et al.*, 2017b). Por lo tanto, es más fácil magnetizar el material cuando la capa de Ni es más gruesa y propicia que el material magnético actúa como imán permanente y por el efecto ferromagnético los dominios magnéticos se unen para reducir la energía de las líneas de campo saliente de cada motor (Wang *et al.*, 2018; Long *et al.*, 2020).



**Figura 34.** Representación del crecimiento del tamaño de grano en la capa de níquel conforme incrementa su espesor y el confinamiento en tamaños existentes en la interfaz.

Al ser más fácil magnetizar la sección de Ni conforme su espesor aumenta y teniendo el mismo estímulo externo, la magnetización resultante de la capa de Ni es mayor. A partir

de cierto espesor, el efecto de la capa de Ti sobre el tamaño de grano es pobre en comparación con la magnetización de la capa de Ni. Además, podemos inferir que, a partir de cierto espesor de la capa magnética, el efecto de confinamiento del tamaño de grano de la capa de Ti favorece la magnetización del Ni. Puesto que, una vez que los dominios de la capa de Ni desplazan su pared de dominio hacia la interfaz Ni/Ti, ésta permite que permanezcan con su magnetización. Al ser mayor la retención de magnetización, la atracción entre motores incrementa; lo que favorece la aglomeración y se encuentra representado en la pendiente de las curvas de las **Figuras 26 y 27**, así como en la reducción de las trayectorias de la **Tabla 4**.

Como se mencionó anteriormente, existe una relación entre el crecimiento en el tamaño de los aglomerados y la cantidad de material; esta última está directamente relacionada con la geometría de la película de Ni y por consiguiente con el diámetro del núcleo sobre el que se depositan las películas. La relación con el diámetro puede ser observada con las gráficas de motores con núcleos de distinto tamaño (**Figura 27**). En esta figura las curvas de motores de mayor diámetro tienden a tener un crecimiento acelerado con un espesor menor de la capa magnética en comparación con los motores de un diámetro menor. Esto se atribuye principalmente al crecimiento del volumen con respecto al radio de las partículas, pues se tiene una mayor cantidad de material magnético con un espesor menor de la capa de Ni. También debe considerarse el carácter ferromagnético del material, ya que su magnetización incrementa con la cantidad de material.

Por otra parte, al hablar de las repercusiones de la aglomeración de los motores durante su aplicación; se observa que, si el espesor de la capa de material magnético supera los 20 nm, la aglomeración es demasiado pronunciada y puede ser contraproducente. Por lo

que la capa debe mantenerse con espesores reducidos para evitar entorpecer el comportamiento de enjambre de los MNMs. Acompañado de esto, es necesario mantener un buen desempeño en su movimiento para aplicaciones de entrega de fármacos ya que se necesita controlar una gran cantidad de MNMs de manera simultánea.

Ahora bien, al hablar de los efectos sobre la movilidad de los motores, al controlarlos, se observó que eran más responsivos al cambio del campo magnético externo cuando el espesor de su capa magnética era más grande. Además, la velocidad de los motores fue mayor al aumentar el espesor de la capa de Ni, independientemente del material en el núcleo, SiO<sub>2</sub> (**Figura 30**) o PLGA (**Figura 31**). Esto puede atribuirse a dos aspectos en general, la atracción entre motores y el confinamiento de las vibraciones y oscilaciones que llevan a la propulsión en una dirección preferencial (Valdez-Garduño *et al.*, 2020). Cabe destacar que las velocidades reportadas en la **Figura 30** para el grupo control (sin capa magnética), presentan una alta variabilidad y carecen de un control de la dirección; por lo que no son aptos para una aplicación. Además, presentaron fenómenos de rotación u oscilación no observados en las muestras que contaban con la capa magnética.

De la misma forma, los motores con capa de Ni eran más veloces cuando contaban con la capa de Ti, como se muestra en la **Figura 31** y en la **Tabla 5**. Lo anterior, como en el caso de la aglomeración, nos muestra que la capa de Ti eleva la energía necesaria para mover las paredes de dominio cercanas a la interfaz Ti/Ni y con ello los dominios de la capa de Ni no se desplazan. No obstante, sí ayudan a confinar el movimiento al alinearse con el campo magnético externo y en menor medida, la capa de Ti genera una mayor asimetría en la forma y la distribución de densidades (Nadal y Lauga, 2014; Valdez-Garduño *et al.*, 2020). Por otro lado, las trayectorias de los motores eran cortas y finalizaban con la agregación de

los motores en aglomerados cuando su capa magnética poseía un mayor espesor, sin importar la presencia de la capa de Ti, como se observa en la **Tabla 4**.

En la **Figura 31** se observa que las velocidades de los motores con un núcleo promedio menor ( $1.16 \mu\text{m}$ ) presentan una menor variación al contar con la capa de Ti comparado con las de núcleo promedio mayor ( $1.23 \mu\text{m}$ ). Lo descrito anteriormente, se puede asociar a la diferencia en los números de Reynolds entre ambos casos, pues la contribución de fuerzas inerciales aumenta cuando el núcleo tiene un mayor tamaño y con una pequeña activación, como la atracción magnética, pueden llegar a desplazarse fácilmente. Adicionalmente, al añadir la capa de adhesión, ésta sirve como pared de dominio como lo describe Kyianytsia en el 2019, lo cual permite que la autopropulsión sea la fuerza dominante.

A pesar de esto, en ambos casos, la diferencia de velocidades es mayor en un intervalo. Dicho comportamiento se debe a la magnitud de la respuesta magnética, la cual al ser demasiado grande supera a la fuerza de autopropulsión y domina el movimiento si se acerca a elementos que resulten atractivos (Ku *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2020). De ahí que al ser dominante establezca la respuesta de las fuerzas que mueven al motor; por lo que se espera una reducción en los cambios de velocidades una vez alcanzado el punto donde las fuerzas magnéticas rigen el movimiento; sin embargo, esto sale de la llamada autopropulsión y sería llamado arrastre, por lo que el espesor de la capa magnética debe permanecer dentro de los parámetros en los que su contribución no interfiera con la propulsión.

Asimismo, las trayectorias cortas mostradas en la **Tabla 4** fueron consecuencia de la atracción por otros cuerpos con respuesta magnética alta, ya que la unión de ambos minimiza la energía requerida para conformar el sistema de los motores en solución. Esto resultó en

una dependencia de orientación en las velocidades, donde las trayectorias que se dirigen hacia otros cuerpos con respuesta magnética aportaron una mayor fuerza al desplazamiento del motor. El fenómeno antes descrito impactó directamente en la formación de aglomerados y es observable en la **Figura 27**. Esto último puede comprobarse porque se da un movimiento espontáneo de los motores aún sin campo magnético, que finaliza con la agregación de los mismos. Puesto que la autopropulsión está dada por la composición del sistema y la presencia del campo magnético únicamente incrementa la eficiencia del movimiento al confinarlo en una dirección.

#### 4.5.2.4 Variación en la capa diferencial de densidad.

En esta exploración los resultados indican una mejoría con respecto a los motores del trabajo de Valdez-Garduño (2020) que poseen un arreglo similar, las diferencias son que su capa externa era de oro, cuya densidad es de  $19.32 \text{ g/cm}^3$  y el espesor de esta capa era de 100 nm. Estos motores alcanzan velocidades de alrededor de  $30 \text{ }\mu\text{m/s}$ , mientras que los motores del presente trabajo obtienen esa velocidad con una capa menor a 60 nm, como se muestra en la **Figura 32**. Esta diferencia está asociada al cambio en el centro polimérico que promueve la atenuación; además, incrementa el gradiente de vibraciones y como resultado, se mejora la propulsión. Lo anterior, se muestra en trabajos como el de García (2018), donde las partículas de PLGA tienen un recubrimiento similar, pero con una capa exterior de platino de 44 nm.

Por lo tanto, esto indica que se incrementa su eficiencia en el movimiento con la reducción del tamaño. No obstante, se requiere de un mayor número de pruebas y una resolución mayor en los microscopios para determinar los efectos a escalas menores a una

micra. Valdez-Garduño *et al.* (2020) describen dicho fenómeno como una relación entre las densidades en un modelo de dímeros; la diferencia en las oscilaciones propicia turbulencias en la frontera de los motores y al ser mayores en la frontera metálica, se dicta una dirección preferencial en la propulsión.

La estabilidad térmica observada es considerablemente mayor a las descritas en la literatura, esto se debe a la selección de materiales. En la mayoría de los trabajos reportados como el de Oliveros (2017) y Wang (2012), se trabajó con metales que, aunque poseen una densidad alta, su coeficiente de expansión térmica es bajo comparado con el del tungsteno, lo cual se asocia a un cambio en las propiedades del material y la forma en que las ondas ultrasónicas que interactúan con él. En consecuencia, se genera una mayor disipación de energía y la eficiencia del movimiento disminuye, como lo menciona Malischewsky y Tuan (2009). En el caso del tungsteno, el coeficiente de expansión térmica es mayor, por esta razón mantiene sus propiedades mecánicas aún en usos prolongados. Dicha característica es especialmente beneficiosa en caso de que se desee trabajar con frecuencias más altas o se busque reducir el tamaño del diseño.

Adicionalmente, no es tan clara la relación entre la aglomeración y la capa de tungsteno, ya que las mediciones tienen una alta variabilidad. La aglomeración puede deberse a una mala dispersión durante la preparación del sustrato. Además, al incrementar el espesor de la capa de tungsteno el requerimiento de espacio mínimo entre motores es mayor y por ello, al ser la misma dispersión de núcleos en todas las muestras, aquellas con una capa de W más gruesa tienden a aglomerarse más. Sin embargo, puede mejorarse al diluirse más la solución para muestras con un mayor espesor. Por otro lado, la aglomeración es atribuible, en menor medida, a la atracción entre cuerpos, ya que entre mayor es la capa

de tungsteno, las corrientes acústicas en la superficie del motor son mayores. Éstas hacen que se atraigan los motores entre sí, de manera análoga a los torbellinos que atraen a objetos cercanos, pero no modifican la longitud de las trayectorias y no llevan a la aglomeración de los motores aun cuando poseen una capa de Ni de 15 nm.

La discusión anterior es importante porque puede ayudar a diseñar los MNMs de acuerdo con las necesidades y el lugar de aplicación. Lo cual sienta las bases para el diseño y siguiente generación de motores y permite que éstos sean evaluados posteriormente para su implementación en el tratamiento de cáncer en modelos de estudio animal.

### 4.5.3 Determinación de tamaños.

#### 4.5.3.1 Conteo estadístico.

Es importante añadir que, las partículas de escala micrométrica sufren desgaste localizado debido a la forma del recipiente que los contiene y los efectos en la dinámica de fluidos de la solución en la que están suspendidas.

Se comprobó que el efecto de desgaste localizado fue menor al reducirse el tamaño de las partículas y se puede predecir que es casi nulo en la escala nanométrica en concordancia con el trabajo de Bennett *et al.* en el 2016. El efecto de desgaste localizado se debe a las colisiones de las moléculas de la solución con las partículas sintetizadas. Visto que existe un mayor número de colisiones en regiones cercanas a las paredes del recipiente, un tubo eppendorf de diámetro reducido propicia un ovalamiento sobre las partículas. Esto se debe a que el tubo posee una dirección (longitudinal), en la cual las colisiones son menos probables y otra, en la que se incrementan (diametral). Para una partícula pequeña esta

diferencia en las direcciones no es significativa; por lo tanto, este efecto es casi nulo en las dimensiones nanométricas.

#### 4.5.3.2 Espectroscopía de dispersión dinámica de luz.

De los conteos se observa que las micropartículas tienen una dispersión de tamaños de 0.2  $\mu\text{m}$  y se encuentran situadas en 1  $\mu\text{m}$  como tamaño promedio en concordancia con las observaciones realizadas en la microscopía óptica. En adición, los análisis por espectroscopía de dispersión dinámica de luz permitieron determinar que una gran cantidad de partículas se encontraban en el rango nanométrico entre 6-12 nm (**Figura 29**). La presencia de partículas en la escala nanométrica se atribuye a las etapas tempranas de nucleación durante el proceso de nanoprecipitación, que deben ser generadas por las últimas gotas en ingresar a la solución. Dicho grupo es el que genera la visualización de más motores que la cantidad de núcleos observados con la microscopía óptica.

En experimentos posteriores se sugiere estudiar si la composición en ambos grupos de micro y nanopartículas es similar, en cuanto a contenido de PLGA y TAM. Las pruebas de liberación de fármaco podrían ayudar a inferir si varía su contenido de TAM.

Es importante resaltar, que se espera que estas partículas posean una mayor motilidad debido a su número de Reynolds y a los factores de difusión que presenten; además, las fuerzas inerciales que se oponen al movimiento son menores y el diseño es más hidrodinámico como lo menciona Lee *et al.* (2014). Por otra parte, también se proyecta un mejor desempeño en las aplicaciones al interior del cuerpo por los efectos de retención y permanencia asociados al tamaño. En especial porque tienen una mayor facilidad para internalizarse en las células. Sin embargo, se deben ajustar los tamaños de los depósitos

metálicos, ya que al reducir el tamaño del núcleo existe un límite en el cual ya no se daría propulsión.

#### 4.5.4 Determinación de velocidades.

Las velocidades obtenidas pueden ser comparadas con los trabajos de Oliveros (2017), García (2018) y Valdez *et al.* (2020), ya que ambos utilizaron estructuras Janus y las propulsaron bajo las mismas condiciones.

Oliveros y Valdez *et al.* utilizaron una partícula de óxido de silicio recubierta con una película de 5 nm de Ti, 15 nm de Ni y 60 nm de Pt que alcanzaron una velocidad de  $\sim 27$   $\mu\text{m/s}$ . Mientras que los motores sintetizados por García consistieron en una partícula de PLGA con una película de 5 nm de Ti, 33 nm de Ni y 44 nm de Pt, cuya velocidad fue de  $\sim 45$   $\mu\text{m/s}$ . Estos datos son comparables con las 33  $\mu\text{m/s}$  obtenidas por el modelo propuesto en este trabajo, que cuenta con una capa de 5 nm de Ti, 15 nm de Ni y 60 nm de W.

A grandes rasgos, las velocidades de los motores con núcleo de PLGA fueron mayores gracias a que este polímero atenúa más las ondas que el óxido de silicio, como lo menciona Canavese *et al.* (2018). Por otro lado, hay que tomar en cuenta las densidades, mientras que el W posee un valor de  $19.3 \text{ g/cm}^3$ , el Pt es mayor con  $21.45 \text{ g/cm}^3$ . Por esta razón y por la diferencia en los espesores de la capa de Ni, los motores reportados por García obtuvieron una mayor velocidad.

#### 4.5.5 Eficiencia de encapsulamiento.

De acuerdo con lo reportado en el estudio de Maji *et al.* en 2014, al utilizar la misma concentración de tamoxifeno que de PLGA en la solución orgánica obtuvieron la máxima

eficiencia de encapsulamiento siendo ésta de 27%, por lo tanto, se espera obtener al menos esa eficiencia. Debido a que otros estudios han reportado eficiencias de hasta aproximadamente 60% utilizando la técnica de nanoprecipitación (Rezvantab *et al.* 2018).

#### 4.5.6 Perfil de liberación

En general, con base a la literatura, se espera que las partículas de PLGA liberen una mayor cantidad de fármaco durante el primer día y después tienda a estabilizarse (Maji *et al.*, 2014; Sahana *et al.*, 2010; Betancourt *et al.*, 2007). No obstante, es difícil predecir cuál será el perfil de liberación, ya que depende de factores como los parámetros y el método de síntesis.

#### 4.5.7 Funcionalización de motores.

Se ha reportado que una manera de examinar si se ha realizado una funcionalización efectiva con anticuerpos es midiendo el potencial zeta de las partículas antes y después del proceso. Se ha observado que cuando la superficie de nanopartículas de PLGA es modificada con anticuerpos, su carga superficial se vuelve más positiva (Sun *et al.*, 2008).

#### 4.5.8 Cultivo de células.

##### 4.5.8.1 Pruebas de internalización.

La evaluación de los MNMs en operación permitirá verificar su utilidad al entrar en contacto con las células objetivo. Debido a las características de tamaño y forma, se espera que los micromotores cuyas velocidades fueron caracterizadas, no puedan internalizarse en las células tan fácilmente; sin embargo, sus contrapartes nanométricas sí lo harán. En

consecuencia, los micromotores demuestran el concepto de movimiento y se espera que, si se reduce la escala, se incrementen las velocidades como lo reporta Lee *et al.* (2014).

Por otra parte, es pertinente mencionar que sí existe una posibilidad de internalización a pesar del tamaño, ya que en estudios como el de Patiño *et al.* (2015), se ha observado que existe internalización de partículas de 3  $\mu\text{m}$  a través de macropinocitosis en células de cáncer de mama.

Cabe mencionar que debido a que los motores se encontrarán funcionalizados con anticuerpos anti-ER, se espera que exista una alta selectividad y por lo tanto, una mayor interacción con las células MCF-7, ya que son ER+. En otras palabras, esta línea expresa el receptor de nuestro anticuerpo. Esta alta especificidad ya se ha demostrado en otros trabajos en los que las nanopartículas únicamente se internalizan en las células ER+ (Chauhan *et al.*, 2018).

De acuerdo con lo propuesto en otros estudios, si se aplica ultrasonido durante la fase de internalización, la intensidad de fluorescencia detectada es mayor; es decir, existe una mayor cantidad de MNMs internalizados (Fernández de Ávila *et al.*, 2015, Qualliotine *et al.*, 2019).

De cualquier forma, lo que se obtenga de las pruebas de internalización y toxicidad, permitirá conocer la viabilidad de este arreglo para el tratamiento de cáncer de mama y consolidará las bases de un nuevo diseño de MNMs para el acarreamiento de fármacos. Ante todo, brindará nueva información para un mejor entendimiento de los parámetros de funcionamiento de este tipo de motores.

#### 4.5.8.2 Ensayo de citotoxicidad.

En los estudios se ha demostrado que al encapsular al fármaco aumenta la efectividad, ya que se requiere suplementar una menor dosis para alcanzar la máxima concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ). Según lo reportado por Maji *et al.* (2014) la concentración de tamoxifeno necesaria para alcanzar la  $IC_{50}$  en las células MCF-7 disminuyó más de 70% al estar encapsulado, además de que sólo se requeriría una dosis al tener una liberación sostenida.

Mientras que el estudio realizado por Khuroo *et al.* en 2014, en el que se combinó al tamoxifeno con el fármaco topotecan, se demostró que al encapsularlos en partículas de PLGA la  $IC_{50}$  disminuyó alrededor del 80% comparado con el fármaco libre. Este estudio sirve de referencia pues también utilizaron la misma línea celular antes mencionada. Por lo tanto, se espera obtener resultados similares para nuestro sistema.

# Capítulo 5: Conclusiones.

## 5.1 Trabajo actual.

En este trabajo se logró sintetizar motores tipo Janus, comenzando por un núcleo de PLGA cargado con TAM recubierto parcialmente por una tricapa de Ti-Ni-W con espesores de 5, 15 y 60 nm, respectivamente. De acuerdo con las observaciones realizadas, el tamaño de las partículas poliméricas se incrementa junto con el volumen de gota y la concentración de PLGA, mientras que se ve disminuido al aumentar el tiempo entre goteo y la concentración de surfactante (PVA). Por otra parte, durante la síntesis, una alta dilución de la solución de partículas evita la aglomeración de motores. En cuanto al diseño, utilizar un diseño bicapa (Ni-W) o tricapa (Ti-Ni-W) no presenta una diferencia significativa en la propulsión, pero la participación de la capa de adhesión es importante en la respuesta magnética y se debe estudiar más este fenómeno con el fin de optimizar el movimiento al entender la relación entre la interfaz Ni/Ti y la respuesta magnética del diseño. Sin embargo, un incremento en el espesor de la capa magnética tiene como consecuencia una mayor aglomeración de las estructuras, reduciendo a su vez la longitud promedio de las trayectorias de los motores. Por otra parte, la participación del núcleo polimérico incrementa la propulsión en concordancia con los trabajos de Oliveros (2017) y García (2018). De la misma forma, el comportamiento de aglomeración está relacionado con la capa magnética, por lo que la capa de 15 nm presenta la mayor estabilidad y permite mantener el control sobre el movimiento. Además, se espera verificar que el diseño presentado en este trabajo consolida las bases para un nuevo esquema de diseño de micro y nanomotores que complemente el modelo dimérico de asimetrías vibratorias descrito por Valdez-Garduño *et al.* (2020).

## 5.2 Trabajo a futuro.

Finalmente, la evaluación de los motores presentados en un medio biológico es inminente para comprobar la viabilidad de su aplicación en el tratamiento de cáncer de mama. Si bien para ello es necesario realizar más pruebas que las planteadas previamente, éstas establecen los primeros pasos para verificarlo como vehículo de fármacos viable.

A grandes rasgos, se espera observar una alta selectividad del sistema hacia células de cáncer ER+ una vez que los motores sean funcionalizados con anticuerpos. De igual forma, se predice que los motores serán capaces de internalizarse en las células y que este proceso se verá potenciado al aplicar ultrasonido.

## Referencias.

- Abdalla, A. M. E., Xiao, L., Ullah, M. W., Yu, M., Ouyang, C. y Yang, G. (2018). Current Challenges of Cancer Anti-angiogenic Therapy and the Promise of Nanotherapeutics. *Theranostics*, 8(2), 533-548.
- Abdelmohsen, L. K., Peng, F., Tu, Y., y Wilson, D. A. (2014). Micro-and nano-motors for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(17), 2395-2408.
- Ahmed, S., Gentekos, D. T., Fink, C. A., & Mallouk, T. E. (2014). Self-assembly of nanorod motors into geometrically regular multimers and their propulsion by ultrasound. *ACS nano*, 8(11), 11053-11060.
- Akiyama, Y., Kimura, Y., Enatsu, R., Mikami, T., Wanibuchi, M., y Mikuni, N. (2018). Advantages and disadvantages of combined chemotherapy with carmustine wafer and bevacizumab in patients with newly diagnosed glioblastoma: a single-institutional experience. *World neurosurgery*, 113, e508-e514.
- Albanese, A., Tang, P. S., and Chan, W. W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 1-16.
- Allenspach, R. (1994). Ultrathin films: magnetism on the microscopic scale. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 129(2-3), 160-185.
- Al-Naggar, R. A. (2014). *Principles and Practice of Cancer Prevention and Control*. Estados Unidos: OMICS Group eBooks.
- American Cancer Society. (2019). *About Breast Cancer*. Recuperado de <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8577.00.pdf>
- American Cancer Society. (2019). *Endometrial Cancer Risk Factors*. Recuperado de <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
- Anderson, J. M. (2012). 9.19 - Biocompatibility. En K. Matyjaszewski y M. Möller (Eds.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (pp. 363-383). Estados Unidos: Elsevier Science.
- Attia, M. F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z. y Vandamme, T. F. (2019). An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(8), 1185-1198.

- Bae, Y. H., & Park, K. (2011). Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *Journal of controlled release*, 153(3), 198.
- Bala, I., Hariharan, S., y Kumar, M. R. (2004). PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21(5).
- Baraban, L., Makarov, D., Schmidt, O. G., Cuniberti, G., Leiderer, P., y Erbe, A. (2013). Control over Janus micromotors by the strength of a magnetic field. *Nanoscale*, 5(4), 1332-1336.
- Barreras-Urbina, C. G., Ramírez-Wong, B., López-Ahumada, G. A., Burruel-Ibarra, S. E., Martínez-Cruz, O., Tapia-Hernández, J. A. y Rodríguez-Felix, F. (2016). Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries. *International Journal of Food Properties*, 19(9), 1912-1923.
- Bekele, R. T., Venkatraman, G., Liu, R. Z., Tang, X., Mi, S., Benesch, M. G. K., Macket, J. R., Godbout, R., Curtis, J. M., McMullen, T. P. W. y Brindley, D. N. (2016). Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance. *Scientific Reports*, 6, 21164.
- Bennett, S. M., Arumugam, M., Wilberforce, S., Enea, D., Rushton, N., Zhang, X. C., ... y Brooks, R. A. (2016). The effect of particle size on the in vivo degradation of poly (d, l-lactide-co-glycolide)/ $\alpha$ -tricalcium phosphate micro-and nanocomposites. *Acta biomaterialia*, 45, 340-348.
- Bertin, N., Spelman, T. A., Stephan, O., Gredy, L., Bouriau, M., Lauga, E., y Marmottant, P. (2015). Propulsion of bubble-based acoustic microswimmers. *Physical Review Applied*, 4(6), 064012.
- Betancourt, T., Brown, B. y Brannon-Peppas, L. (2007). Betancourt, T., Brown, B., y Brannon-Peppas, L. (2007). Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomedicine*, 2(2), 219–232.
- Bhatia, S. K. (2010). *Biomaterials for Clinical Applications*. Nueva York: Springer, 183-208.
- Bhatt, P., Ganeshan, V., Reddy, V. R., y Chaudhari, S. M. (2006). High temperature annealing effect on structural and magnetic properties of Ti/Ni multilayers. *Applied Surface Science*, 253(5), 2572-2580.
- Binhi, V. N., & Savin, A. V. (2003). Effects of weak magnetic fields on biological systems: physical aspects. *Physics-Uspexhi*, 46(3), 259.
- Blanco, E., Shen, H. y Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*, 33(9), 941-951.

- Burroughs, A. M., Iyer, L. M., y Aravind, L. (2007). Comparative genomics and evolutionary trajectories of viral ATP dependent DNA-packaging systems. In *Gene and protein evolution* (Vol. 3, pp. 48-65). Karger Publishers.
- Canavese, G., Ancona, A., Racca, L., Canta, M., Dumontel, B., Barbaresco, F., ... y Cauda, V. (2018). Nanoparticle-assisted ultrasound: a special focus on sonodynamic therapy against cancer. *Chemical Engineering Journal*, 340, 155-172.
- Cancer Research UK. (2019). *What is cancer?* Recuperado de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>
- Cañas-Carrell, J. E., Li S., Parra, A. M. y Shrestha, B. (2014). *Metal oxide nanomaterials: health and environmental effects. In Health and Environmental Safety of Nanomaterials.* Estados Unidos: Woodhead Publishing. 200-221.
- Chaisri, W., Hannink, W. E. y Okonogi, S. (2009). Preparation and Characterization of Cephalexin Loaded PLGA Micro-spheres. *Current Drug Delivery*, 6(1), 69-75.
- Chauhan, K., Hernandez-Meza, J.M., Rodríguez-Hernández, A.G., Juárez-Moreno, K., Sengar, P. y Vazquez-Duhalt, R. (2018). Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(17).
- Chinde, S. y Grover, P. (2017). Toxicological assessment of nano and micron-sized tungsten oxide after 28 days repeated oral administration to Wistar rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 819, 1-13.
- Choi, S. W., Kwon, H. Y., Kim, W. S., y Kim, J. H. (2002). Thermodynamic parameters on poly (d, l-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification–diffusion process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 201(1-3), 283-289.
- Corn, M. (1965). Statistical reliability of particle size distributions determined by microscopic techniques. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 26(1), 8-16.
- Dedavid, B. A., Gomes, C. I., y Machado, G. (2007). *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.* EdIPUCRS.
- Der Want, V. (1998). A comparative study of thin coatings of Au/Pd, Pt and Cr produced by magnetron sputtering for FE-SEM. *Journal of Microscopy*, 189(1), 79-89.
- Dewidar, M. M., Yoon, H. C. y Lim, J. K. (2006). Mechanical properties of metals for biomedical applications using powder metallurgy process: a review. *Metals and Materials International*, 12(3), 193.

- Di Gianfrancesco, A. (2017). Technologies for chemical analyses, microstructural and inspection investigations. En A. Di Gianfrancesco (Ed.), *Materials for Ultra-Supercritical and Advanced Ultra-Supercritical Power Plants* (pp. 197-245). Duxford, Inglaterra: Woodhead Publishing.
- Drasler, B., Vanhecke, D., Rodríguez-Lorenzo, L., Petri-Fink, A. y Rothen-Rutishauser, B. (2017). Quantifying nanoparticle cellular uptake: which method is best? *Nanomedicine*, 12(10), 1095-1099.
- D'Souza, S. (2014). A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 2-12.
- Ebbens, S., Howse, J., Archer, R., Gregory, D., Campbell, A., y Dunderdale, G. (2017). Soft, Hard, and Hybrid Janus Structures: Synthesis, Self-Assembly, and Applications—Catalytic Janus Swimmers. *Soft, Hard, and Hybrid Janus Structures*, 315-403.
- Enemark, E. J., y Joshua-Tor, L. (2006). Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature*, 442(7100), 270-275.
- Erni, R., Rossell, M. D., Kisielowski, C., y Dahmen, U. (2009). Atomic-resolution imaging with a sub-50-pm electron probe. *Physical review letters*, 102(9), 096101.
- Esteban-Fernández de Ávila, B., Angsantikul, P., Li, J., Gao, W., Zhang, L., y Wang, J. (2018a). Micromotors go in vivo: from test tubes to live animals. *Advanced Functional Materials*, 28(25), 1705640.
- Esteban-Fernández de Ávila, B., Gao, W., Karshalev, E., Zhang, L., y Wang, J. (2018b). Cell-like micromotors. *Accounts of Chemical Research*, 51(9), 1901-1910.
- Fernández de Ávila, B. E., Martín, A., Soto, F., López-Ramírez, M. A., Campuzano, S., Vásquez-Machado, G. M., Gao, W., Zhang, L. y Wang, J. (2015). Single Cell Real-Time miRNAs Sensing Based on Nanomotors. *ACS Nano*, 9(7), 6756-6764.
- Figueroa, S. M., Fleischmann, D., Beck, S., y Goepferich, A. (2020). Thermodynamic, spatial and methodological considerations for the manufacturing of therapeutic polymer nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 37(3), 1-11.
- Finch, D. S., Oreskovic, T., Ramadurai, K., Herrmann, C. F., George, S. M. y Mahajan, R. L. (2008). Biocompatibility of atomic layer-deposited alumina thin films. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 87(1), 100-106.

- Fu, Y., Du, H., Huang, W., Zhang, S. y Hu, M. (2004). TiNi-based thin films in MEMS applications: a review. *Sensors and Actuators A: Physical*, 112(2-3), 395-408.
- Gao, W., Dong, R., Thamphiwatana, S., Li, J., Gao, W., Zhang, L. y Wang, J. (2015). Artificial Micromotors in the Mouse's Stomach: A Step toward in Vivo Use of Synthetic Motors. *ACS Nano*, 9(1), 117-123.
- Gao, W., Feng, X., Pei, A., Gu, Y., Li, J., y Wang, J. (2013). Seawater-driven magnesium based Janus micromotors for environmental remediation. *Nanoscale*, 5(11), 4696-4700.
- Gao, W., Feng, X., Pei, A., Kane, C. R., Tam, R., Hennessy, C., y Wang, J. (2014). Bioinspired helical microswimmers based on vascular plants. *Nano letters*, 14(1), 305-310.
- Gao, W., Kagan, D., Pak, O. S., Clawson, C., Campuzano, S., Chuluun-Erdene, E., ... y Wang, J. (2012). Cargo-towing fuel-free magnetic nanoswimmers for targeted drug delivery. *small*, 8(3), 460-467.
- Gao, W., Sattayasamitsathit, S. y Wang, J. (2012). Catalytically propelled micro-/nanomotors: how fast can they move? *The Chemical Record*, 12(1), 224-231.
- Gao, W., y Wang, J. (2014). Synthetic micro/nanomotors in drug delivery. *Nanoscale*, 6(18), 10486-10494.
- Gao, Y., Mou, F., Feng, Y., Che, S., Li, W., Xu, L. y Guan, J. (2017). Dynamic Colloidal Molecules Maneuvered by Light-Controlled Janus Micromotors. *ACS Applied Materials y Interfaces*, 9(27), 22704–22712.
- García, A. (2018). Nanomotor de PLGA tipo Janus propulsado por ultrasonido. Tesis de licenciatura. México: Universidad Autónoma de México, Centro de Nanociencias y Nanotecnología.
- Garcia-Gradilla, V., Orozco, J., Sattayasamitsathit, S., Soto, F., Kuralay, F., Pourazary, A., Katzenberg, A., Gao, W., Shen, Y. y Wang J. (2013). Functionalized Ultrasound-Propelled Magnetically Guided Nanomotors: Toward Practical Biomedical Applications. *ACS Nano*, 7(10), 9232–9240.
- Garcia-Gradilla, V., Sattayasamitsathit, S., Soto, F., Kuralay, F., Yardımcı, C., Wiitala, D., ... y Wang, J. (2014). Ultrasound-propelled nanoporous gold wire for efficient drug loading and release. *Small*, 10(20), 4154-4159.
- Garreau, J. R., DeLaMelena, T., Walts, D., Karamlou, K., y Johnson, N. (2006). Side effects of aromatase inhibitors versus tamoxifen: the patients' perspective. *The American journal of surgery*, 192(4), 496-498.

- Genovesio, A., Zhang, B., y Olivo-Marin, J. C. (2003, September). Tracking of multiple fluorescent biological objects in three dimensional video microscopy. In *Proceedings 2003 International Conference on Image Processing (Cat. No. 03CH37429)* (Vol. 1, pp. I-1105). IEEE.
- Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American family physician*, 77(3), 311-319.
- Gibbons, K. P., Lau, L. C., y Woodard, F. E. (1996). *U.S. Patent No. 5,589,280*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Gómez Castaño, Mayte. "FALSIFICANDO MONEDAS (UN CAMPAMENTO DIFERENTE)." *ANOTHER DAY IN THE LAB*, 19 Aug. 2015, [dayinlab.com/2015/08/19/falsificando-monedas-un-campamento-diferente/](http://dayinlab.com/2015/08/19/falsificando-monedas-un-campamento-diferente/).
- Gorey, K. M., Haji-Jama, S., Bartfay, E., Luginaah, I. N., Wright, F. C., y Kanjeeal, S. M. (2014). Lack of access to chemotherapy for colon cancer: multiplicative disadvantage of being extremely poor, inadequately insured and African American. *BMC health services research*, 14(1), 133.
- Gross, J. M. y Yee, D. (2002). How does the estrogen receptor work? *Breast Cancer Research*, 4, 62.
- Guo, P., Noji, H., Yengo, C. M., Zhao, Z., y Grainge, I. (2016). Biological nanomotors with a revolution, linear, or rotation motion mechanism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 161-186.
- Hermawan, H., Ramdan, D., y Djuansjah, J. R. (2011). Metals for biomedical applications. *Biomedical engineering-from theory to applications*, 411-430.
- Hernández-Giottonini, K. Y., Rodríguez-Córdova, R. J., Gutiérrez-Valenzuela, C. A., Peñuñuri-Miranda, O., Zavala-Riviera, P., Guerrero-Germán, P. y Lucero-Acuña, A. (2020). PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters. *RSC Advances*, 10(8), 4218-4231.
- Honek, J. (2017). Preclinical research in drug development. *Medical Writing*, 26(4), 5-8.
- Hoo, C. M., Starostin, N., West, P., y Mecartney, M. L. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(1), 89-96.
- Hu, S., Shao, S., Chen, H., Sun, J., Zhai, J., Zheng, H., Wan, M., Liu, Y., Mao, C. y Zhao, J. (2018). Preparation and Properties of Janus Heparin-Loaded Ammoniated-Hollow

- Mesoporous Silica Nanomotors. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(17), 9680–9687.
- Idil, A. S., y Donaldson, N. (2018). The use of tungsten as a chronically implanted material. *Journal of neural engineering*, 15(2), 021006.
- Jahan, S. T., Haddadi, A. (2015). Investigation and optimization of formulation parameters on preparation of targeted anti-CD205 tailored PLGA nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 7371-7384.
- Johns Hopkins University. (2019). *Types of Breast Cancer*. Recuperado de <https://pathology.jhu.edu/breast/types-of-breast-cancer/>
- Juang, P. A., y Tsai, C. C. (2010). Analysis and measurement of lateral elliptic motion effect for an asymmetric disc-type ultrasonic motor. *Mechanical systems and signal processing*, 24(1), 312-322.
- Kanchan, C., Hernandez-Meza, J. M., Rodríguez-Hernández, A. G., Juárez-Moreno, K., Sengar, P. y Vazquez-Duhalt, R. (2018). Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, 17.
- Kagan, D., Laocharoensuk, R., Zimmerman, M., Clawson, C., Balasubramanian, S., Kang, D., ... y Wang, J. (2010). Rapid delivery of drug carriers propelled and navigated by catalytic nanoshuttles. *Small*, 6(23), 2741-2747.
- Katuri, J., Ma, X., Stanton, M. M., y Sánchez, S. (2017). Designing micro-and nanoswimmers for specific applications. *Accounts of chemical research*, 50(1), 2-11.
- Kelly, P. J., y Arnell, R. D. (2000). Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications. *Vacuum*, 56(3), 159-172.
- Kennedy, A. J., Johnson, D. R., Seiter, J. M., Lindsay, J. H., Boyd, R. E., Bednar, A. J. y Allison, P. G. (2012). Tungsten toxicity, bioaccumulation, and compartmentalization into organisms representing two trophic levels. *Environmental science y technology*, 46(17), 9646-9652.
- Kent, D. V., & Gee, J. (1994). Grain size—dependent alteration and the magnetization of oceanic basalts. *Science*, 265(5178), 1561-1563.
- Khuroo, T., Verma, D., Talegaonkar, S., Padhi, S., Panda, A. K. y Iqbal, Z. (2014). Topotecan–tamoxifen duple PLGA polymeric nanoparticles: Investigation of in vitro, in vivo and cellular uptake potential. *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1-2), 384–394.

- Kondyurin, A., Kondyurina, I. y Bilek, M. (2011). Biodegradable drug eluting coating of cardiovascular stents dewets and can cause thrombosis. *Cornell University*. Recuperado de <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/1101/1101.0659.pdf>
- Ku, J., Chen, H., He, K., Xu, L., & Yan, Q. (2014). *Numerical simulation of agglomeration process dynamics of ferromagnetic mineral particles in a weak magnetic field. International Journal of Mineral Processing*, 133, 46–51. doi:10.1016/j.minpro.2014.09.017
- Kufe, D.W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., et al. (2003). *Holland-Frei Cancer*
- Kumar, P. (2010). Magnetic behavior of surface nanostructured 50-nm nickel thin films. *Nanoscale research letters*, 5(10), 1596.
- Kyianytsia, A. (2019) Magnetic and magnetoelastic properties of NiTi shape memory alloy and NiTi/Ni bilayer. Physics [physics]. Université de Lorraine. English. ffNNT : 2019LORR0299ff. fftel02559546f
- Leal-Estrada, M., Valdez-Garduño, M., Soto, F., Garcia-Gradilla, V. (2020). Engineering ultrasound fields to power medical micro/nanorobots. *Current Robotics Reports Springer*, (Submitted)
- Lee, K. C., Ray, G. T., Hunkeler, E. M., y Finley, P. R. (2007). Tamoxifen treatment and new-onset depression in breast cancer patients. *Psychosomatics*, 48(3), 205-210.
- Lee, T. C., Alarcón-Correa, M., Miksch, C., Hahn, K., Gibbs, J. G., y Fischer, P. (2014). Self-propelling nanomotors in the presence of strong Brownian forces. *Nano letters*, 14(5), 2407-2412.
- Li, H., LaBean, T. H., y Leong, K. W. (2011). Nucleic acid-based nanoengineering: novel structures for biomedical applications. *Interface Focus*, 1(5), 702-724.
- Li, H., Zheng, Y., Pei, Y. T., y De Hosson, J. T. M. (2014). TiNi shape memory alloy coated with tungsten: a novel approach for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(5), 1249-1255.
- Li, J., de Ávila, B. E. F., Gao, W., Zhang, L., y Wang, J. (2017a). Micro/nanorobots for *Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker.biomedicine: Delivery, surgery, sensing, and detoxification. *Science Robotics*, 2(4), eaam6431.
- Li, Q., Kartikowati, C. W., Horie, S., Ogi, T., Iwaki, T., & Okuyama, K. (2017b). Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Scientific reports*, 7(1), 1-7.

- Liu, M., Pan, L., Piao, H., Sun, H., Huang, X., Peng, C., y Liu, Y. (2015). Magnetically actuated wormlike nanomotors for controlled cargo release. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 7(47), 26017-26021.
- Long, J., Miao, Z., Chen, H., Deng, R., Zuo, W., Guo, B., & Ku, J. (2020). Analysis of Magnetic Particle Agglomeration Structure and Interaction Forces Between Magnetic Particles. *Journal of Magnetism*, 25(1), 15-21.
- López-Huerta, F., Cervantes, B., González, O., Hernández-Torres, J., García-González, L., Vega, R., Herrera-May, A. L. y Soto, E. (2014). Biocompatibility and surface properties of TiO<sub>2</sub> thin films deposited by DC magnetron sputtering. *Materials*, 7(6), 4105-4117.
- Lu, X. Y., Wu, D. C., Li, Z. J. y Chen, G. Q. (2011). Chapter 7 - Polymer Nanoparticles. En A. Villaverde. (Ed.), *Nanoparticles in Translational Science and Medicine* (pp. 299-323). California, Estados Unidos: Elsevier Inc.
- Lumachi, F., Brunello, A., Maruzzo, M., Basso, U. y Basso, S. M. M. (2013). Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 596-604.
- Ma, X., Jannasch, A., Albrecht, U. R., Hahn, K., Miguel-López, A., Schäffer, E., y Sánchez, S. (2015). Enzyme-powered hollow mesoporous Janus nanomotors. *Nano letters*, 15(10), 7043-7050.
- Makadia, H. K. y Siegel, S. J. (2005). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397.
- Maji, R., Dey, N. S., Satapathy, B. S., Mukherjee, B. y Mondal, S. (2014). Preparation and characterization of Tamoxifen citrate loaded nanoparticles for breast cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3107-3118.
- Malischewsky, P. G. y Tuan, T. T. (2009). A special relation between Young's modulus, Rayleigh-wave velocity, and Poisson's ratio. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 126(6), 2851-2853
- Marimón-Bolívar, W., & González, E. E. (2018). Study of agglomeration and magnetic sedimentation of Glutathione@ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in water medium. *Dyna*, 85(205), 19-26.
- Mario Villela-Martinez, L., Karen Velez-Ayala, A., del Carmen Lopez-Sanchez, R., Martinez-Cardona, J. A., y Hernandez-Hernandez, J. A. (2017). Advantages of drug selective distribution in cancer treatment: Brentuximab vedotin. *International Journal of Pharmacology*, 13(7), 785-807.

- McCrackin, F. L., Passaglia, E., Stromberg, R. R., y Steinberg, H. L. (1963). Measurement of the thickness and refractive index of very thin films and the optical properties of surfaces by ellipsometry. *Journal of Research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and Chemistry*, 67(4), 363.
- Miladi, K., Ibraheem, D., Iqbal, M., Sfar, S., Fessi, H., y Elaissari, A. (2014). Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *EXCLI journal*, 13, 28.
- Miller, D. L., Smith, N. B., Bailey, M. R., Czarnota, G. J., Hynynen, K., Makin, I. R. S., & Bioeffects Committee of the American Institute of Ultrasound in Medicine. (2012). Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *Journal of ultrasound in medicine*, 31(4), 623-634.
- Misaridis, T., & Jensen, J. A. (2005). Use of modulated excitation signals in medical ultrasound. Part II: Design and performance for medical imaging applications. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 52(2), 192-207.
- Mou, F., Chen, C., Zhong, Q., Yin, Y., Ma, H., y Guan, J. (2014). Autonomous motion and temperature-controlled drug delivery of Mg/Pt-poly (N-isopropylacrylamide) Janus micromotors driven by simulated body fluid and blood plasma. *ACS applied materials y interfaces*, 6(12), 9897-9903.
- Myers, R., Coviello, C., Erbs, P., Foloppe, J., Rowe, C., Kwan, J., Crake, C., Finn, S., Jackson, E., Bolloul, J. M., Story, C., Coussios, C. y Carlisle, R. (2016). Polymeric Cups for Cavitation-mediated Delivery of Oncolytic Vaccinia Virus. *Molecular Therapy*, 24(9), 1627-1633.
- Nadal, F., y Lauga, E. (2014). Asymmetric steady streaming as a mechanism for acoustic propulsion of rigid bodies. *Physics of Fluids*, 26(8), 082001.
- Nan, J., Guo, X., Xiao, J., Li, X., Chen, W., Wu, W., ... y Wang, G. (2019). Nanoengineering of 2D MXene-based materials for energy storage applications. *Small*, 1902085.
- National Cancer Institute. (2015). *What is Cancer?* Recuperado de <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- National Cancer Institute. (2019). *Breast Cancer Treatment (Adult) (PDQ®)–Patient Version*. Recuperado de [https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#\\_185](https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#_185)
- National Cancer Institute. (2019). *Metastatic Colorectal Cancer May Spread Early in the Disease, Study Finds*. Recuperado de <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2019/early-metastasis-colorectal-cancer>

- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 23964, Tungsten. Retrieved October 21, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tungsten>.
- Nguyen, T. D. T., Marasini, R., Rayamajhi, S., Aparicio, C., Biller, D., & Aryal, S. (2020). Erythrocyte membrane concealed paramagnetic polymeric nanoparticle for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Nanoscale*, 12(6), 4137-4149.
- Niles, A. L., Moravec, R. A., y Riss, T. L. (2008). Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3(6), 655–669.
- Nin, G. V. (2000). *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. UNAM.
- Nistor, M. T., y Rusu, A. G. (2019). Nanorobots with Applications in Medicine. In *Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics* (pp. 123-149). Elsevier.
- Ogundipe, A., Greenberg, B., Braida, W., Christodoulatos, C. y Dermatas, D. (2006). Morphological characterisation and spectroscopic studies of the corrosion behaviour of tungsten heavy alloys. *Corrosion science*, 48(10), 3281-3297.
- Oliveros, E. S. (2017). Síntesis de nanomotores tipo *Janus* propulsados por ultrasonido. *Tesis de licenciatura*. México: Universidad Autónoma de México, Centro de Nanociencias y Nanotecnología.
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *Cáncer*. Recuperado de <https://www.who.int/topics/cancer/es/>
- O'Brien Jr, W. D. (2007). Ultrasound–biophysics mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3), 212-255.
- Pacheco, M., Jurado-Sánchez, B., y Escarpa, A. (2019). Visible-Light-Driven Janus Microvehicles in Biological Media. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(50), 18017-18024.
- Parmar, J., Ma, X., Katuri, J., Simmchen, J., Stanton, M. M., Trichet-Paredes, C., Soler, L. y Sanchez, S. (2015). Nano and micro architectures for self-propelled motors. *Science and technology of advanced materials*, 16(1), 014802.
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A. y Minutolo, F. (2014). Estrogen Receptors Alpha (ER $\alpha$ ) and Beta (ER $\beta$ ): Subtype Selective Ligands and Clinical Potential. *Steroids*, 90, 13-29.

- Patiño, T., Soriano, J., Barrios, L., Ibáñez, R. y Nogués, C. (2015). Surface modification of microparticles causes differential uptake responses in normal and tumoral human breast epithelial cells. *Scientific Reports*, 5(11371).
- Peng, F., Tu, Y., Men, Y., van Hest, J. C., y Wilson, D. A. (2017). Supramolecular adaptive nanomotors with magnetotaxis behavior. *Advanced Materials*, 29(6), 1604996.
- Peuster, M., Fink, C., Wohlsein, P., Bruegmann, M., Günther, A., Kaese, V., Niemeyer, M., Haferkamp, H. y Schnakenburg, C. V. (2003). Degradation of tungsten coils implanted into the subclavian artery of New Zealand white rabbits is not associated with local or systemic toxicity. *Biomaterials*, 24(3), 393-399.
- Price, Bob. (2002). Electron Microscopy, Second Edition, John J. Bozzola and Lonnie D. Russell. Jones and Bartlett Publishers, Inc., Sudbury, MA, 1999, 670 pages (hardback, \$56.25). ISBN 0-7637-0192-0. Microscopy and Microanalysis - MICROSC MICROANAL. 8. 365-366. 10.1017/S1431927602029975.
- Qualliotine, J.R., Bolat, G., Beltrán-Gastélum, M., Esteban-Fernández de Ávila, B., Wang, J. y Califano, J.A. (2019). Acoustic Nanomotors for Detection of Human Papillomavirus–Associated Head and Neck Cancer. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 161(5), 814-822.
- Remes, A., y Williams, D. F. (1992). Immune response in biocompatibility. *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, 79-91.
- Repacholi, M. H., Gandolfo, M., & Rindi, A. (2012). *Ultrasound: medical applications, biological effects, and hazard potential*. Springer Science & Business Media.
- Reza, M., Sajuri, Z., Yunas, J., & Syarif, J. (2016, Febrero). Effect of sputtering target's grain size on the sputtering yield, particle size and coercivity (Hc) of Ni and Ni<sub>20</sub>Al thin films. In *IOP Conference Series. Materials Science and Engineering (Online)* (Vol. 114, No. 1).
- Rezvantalab, S., Drude, N. I., Moraveji, M. K., Güvener, N., Koons, E. K., Shi, Y., Lammers, T. y Kiessling, F. (2018). PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1260.
- Roberts, A. J., Kon, T., Knight, P. J., Sutoh, K., y Burgess, S. A. (2013). Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(11), 713-726.

- Ronco, L. I., Minari, R. J., y Gugliotta, L. M. (2015). Particle nucleation using different initiators in the miniemulsion polymerization of styrene. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(1), 191-200.
- Safdar, M., Khan, S. U., y Jänis, J. (2018). Progress toward Catalytic Micro-and Nanomotors for Biomedical and Environmental Applications. *Advanced Materials*, 30(24), 1703660.
- Sahana, B., Santra, K., Basu, S. y Mukherjee, B. (2010). Development of biodegradable polymer based tamoxifen citrate loaded nanoparticles and effect of some manufacturing process parameters on them: a physicochemical and in-vitro evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 621-630.
- Sattayasamitsathit, S., Kou, H., Gao, W., Thavarajah, W., Kaufmann, K., Zhang, L., y Wang, J. (2014). Fully loaded micromotors for combinatorial delivery and autonomous release of cargoes. *Small*, 10(14), 2830-2833.
- Schattling, P. S., Ramos-Docampo, M. A., Salgueiriño, V., & Städler, B. (2017). Double-fueled Janus swimmers with magnetotactic behavior. *ACS nano*, 11(4), 3973-3983.
- Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S. and Maiti, P. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(7).
- Servant, A., Qiu, F., Mazza, M., Kostarelos, K. y Nelson, B. J. (2015). Controlled In Vivo Swimming of a Swarm of Bacteria-Like Microrobotic Flagella. *Advanced Materials*, 27(19), 2981-2988.
- Slater, J. C. (1936). The ferromagnetism of nickel. *Physical Review*, 49(7), 537.
- Stojanovic, B. (2018). Magnetic, Ferroelectric, and Multiferroic Metal Oxides. Elsevier.
- Su, H., Hurd Price, C. A., Jing, L., Tian, Q., Liu J. y Qian, K. (2019). Janus particles: design, preparation, and biomedical applications. *Materials Today Bio*, 4, 100033.
- Sun, B., Ranganathan, B. y Feng, S. S. (2008). Multifunctional poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. *Biomaterials*, 29(4), 475–486.
- Swider, E., Koshkina, O., Tel, J., Cruz, L. J., de Vries, I. J. M. y Srinivas, M. (2018). Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 73, 38-51.
- Thiavilleb, O. F. A. Magnetism in reduced dimensions Magnétisme en dimensions réduites. *arXiv preprint cond-mat/0511362*.

- Thorley, J. A., Pike, J. y Rappoport, J. Z. (2014). Super-resolution Microscopy: A Comparison of Commercially Available Options. En A. Cornea y P. M. Conn (Eds.), *Fluorescence Microscopy: Super-Resolution and other Novel Techniques* (pp. 199-210). California, Estados Unidos: Academic Press.
- Tian, H., Liang, J., y Liu, J. (2019). Nanoengineering carbon spheres as nanoreactors for sustainable energy applications. *Advanced Materials*, 31(50), 1903886.
- Tolosa, L., Donato, M. T., y Gómez-Lechón, M. J. (2014). General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, 1250, 333–348.
- Torchilin, V. P. (2010). Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 197, 3-53.
- Tu, Y., Peng, F. y Wilson, D. A. (2017). Motion Manipulation of Micro-and Nanomotors. *Advanced Materials*, 29(39), 1701970.
- Valdez-Garduño, M., Leal-Estrada, M., Oliveros-Mata, E. S., Sandoval-Bojorquez, D. I., Soto, F., Wang, J., y Garcia-Gradilla, V. (2020). Density Asymmetry Driven Propulsion of Ultrasound-Powered Janus Micromotors. *Advanced Functional Materials*, 2004043.
- Vedotin, B. (2017). *Advantages of Drug Selective Distribution in Cancer Treatment*.
- Vincenti, B., Ramos, G., Cordero, M. L., Douarche, C., Soto, R., & Clement, E. (2019). Rotary motor self-assembly in a drop: putting magnetotactic bacteria to work. *arXiv preprint arXiv:1903.00993*.
- Wang, B., Chan, K. F., Yu, J., Wang, Q., Yang, L., Chiu, P. W. Y., & Zhang, L. (2018). Reconfigurable swarms of ferromagnetic colloids for enhanced local hyperthermia. *Advanced Functional Materials*, 28(25), 1705701.
- Wang, H., y Pumera, M. (2015). Fabrication of micro/nanoscale motors. *Chemical reviews*, 115(16), 8704-8735.
- Wang, H. y Pumera, M. (2017). Emerging materials for the fabrication of micro/nanomotors. *Nanoscale*, 9(6), 2109-2116.
- Wang, W., Castro, L.A., Hoyos, M. y Mallouk, T.E. (2012). Autonomous motion of metallic microrods propelled by ultrasound. *ACS Nano*, 6(7), 6122-6132.
- Williams, C. y Lin, C. Y. (2013). Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. *ecancer*, 7, 370.
- Witten, M. L., Sheppard, P. R. y Witten, B. L. (2012). Tungsten toxicity. *Chemico-biological interactions*, 196(3), 87-88.

- Wollan, J.A., (2019), *What is ellipsometry?*, Retrieved from: <https://www.jawoollam.com/resources/ellipsometry-tutorial/what-is-ellipsometry> on Oct 10 2020.
- Wu, T., Bur, A., Hockel, J. L., Wong, K., Chung, T. K., & Carman, G. P. (2011). Electrical and mechanical manipulation of ferromagnetic properties in polycrystalline nickel thin film. *IEEE Magnetics Letters*, 2, 6000104-6000104.
- Wu, Y., Lin, X., Wu, Z., Möhwald, H., & He, Q. (2014). Self-propelled polymer multilayer Janus capsules for effective drug delivery and light-triggered release. *ACS applied materials & interfaces*, 6(13), 10476-10481.
- Wu, Z., Esteban-Fernández de Ávila, B., Martín, A., Christianson, C., Gao, W., Thamphiwatana, S. K., Escarpa, A., He, Q., Zhang, L. y Wang, J. (2015a). RBC micromotors carrying multiple cargos towards potential theranostic applications. *Nanoscale*, 7(32), 13680–13686.
- Wu, Z., Li, J., de Ávila, B. E. F., Li, T., Gao, W., He, Q., ... & Wang, J. (2015b). Water-Powered Cell-Mimicking Janus Micromotor. *Advanced Functional Materials*, 25(48), 7497-7501.
- Wu, Z., Li, T., Gao, W., Xu, T., Jurado-Sánchez, B., Li, J., Gao, W., He, Q., Zhang, L. y Wang, J. (2015c). Cell-Membrane-Coated Synthetic Nanomotors for Effective Biodetoxification. *Advanced Functional Materials*, 25(25), 3881–3887.
- Xu, T., Soto, F., Gao, W., Garcia-Gradilla, V., Li, J., Zhang, X., y Wang, J. (2014). Ultrasound-Modulated Bubble Propulsion of Chemically Powered Microengines. *Journal of the American Chemical Society*, 136(24), 8552–8555.
- Xu, T., Xu, L. P., y Zhang, X. (2017). Ultrasound propulsion of micro-/nanomotors. *Applied Materials Today*, 9, 493-503.
- Ye, Y., Luan, J., Wang, M., Chen, Y., Wilson, D. A., Peng, F., y Tu, Y. (2019). Fabrication of Self-Propelled Micro-and Nanomotors Based on Janus Structures. *Chemistry–A European Journal*, 25(37), 8663-8680.
- Zhiqun, L., y Bo, L. (Eds.). (2017). *Soft, Hard, and Hybrid Janus Structures: Synthesis, Self-assembly, and Applications*. World Scientific.