



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas
Universidad de Chile

Desarrollo de nanopartículas de ZnO:MgO como potenciales nanocarriers de antraciclinas sensibles al pH tumoral

PATROCINANTE

Prof. Javier O. Morales M.
Laboratorio de *Drug Delivery*
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas.
Prof. Steffen Härtel G.
Laboratory of Scientific Image Analysis (SCIAN-Lab).

DIRECTORES DE MEMORIA

Prof. Javier O. Morales M.
Laboratorio de *Drug Delivery*
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas.
Prof. Steffen Härtel G.
Biomedical Neuroscience Institute (BNI)
Laboratory of Scientific Image Analysis (SCIAN-Lab).
Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
Prof. Jorge Toledo H.
Biomedical Neuroscience Institute (BNI)
Laboratory of Scientific Image Analysis (SCIAN-Lab).
Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Nicolás Matías Navarro Martínez

Santiago de Chile, 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al profesor Javier O. Morales por toda la paciencia que tuvo al contestarme cada vez que golpeaba su puerta, no tan solo para responder preguntas académicas, sino también para darme consejos de vida.

También le doy las gracias a Jorge que logro convencerme de seguir una carrera de investigación y de estar siempre disponible para escucharme. Al profesor Steffen, por tener una visión de que la ciencia se comparte y aceptarme como miembro en sus proyectos y laboratorio.

Les doy las gracias de todo corazón a mis amigos Nicolás, Max, Pancho, Pamela y a mi familia, mamá, papá, hermana y abueli, por ayudarme a que todos estos años en la universidad hayan sido más que estudiar y sacarse buenas notas.

Finalmente agradezco a los profesores que si lograron formarme cómo profesional y a todos aquellos que siempre tuvieron una palabra de ayuda y aliento.

FINANCIAMIENTO

Esta memoria ha sido financiada por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), Chile, a través de proyecto FONDECYT 1181689 y FONDECYT 1181823.

“This is presented as a work of fiction and dedicated to nobody”

-Charles Bukowski.

TABLA DE CONTENIDOS

FINANCIAMIENTO	3
INDICE DE FIGURAS	7
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN.....	13
La nanotecnología en el cáncer	13
Terapia antineoplásica	15
Sistemas de <i>drug delivery</i> basados en nanotecnología	15
Nanopartículas de óxido de zinc	16
Funcionalización de nanopartículas	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIALES	20
MÉTODOS	21
Síntesis de nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio	21
Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio	21
Liofilizado de nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio	22
Disolución de las nanopartículas de ZnO a pH tumoral	22
Cálculo de la concentración de las nanopartículas	22
Ensayos toxicológicos en <i>Danio rerio</i>	24
Funcionalización de las nanopartículas de ZnO	24
Carga y perfil de liberación de curcumina en las nanopartículas de ZnO	25
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS	28
Síntesis y caracterización de nanopartículas de ZnO	28

Espectros de absorción y emisión de las nanopartículas de ZnO.....	30
Efecto del liofilizado sobre el tamaño de las nanopartículas de ZnO.....	34
Toxicología <i>Danio rerio</i>	35
Funcionalización polimérica de nanopartículas de ZnO.....	44
Carga de curcumina.....	47
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	53
LIMITACIONES.....	54
PROYECCIONES.....	54
REFERENCIAS.....	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras <i>Ceto - Enol</i> de la curcumina, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina e idaunorubicina. En verde se marca el sitio esperado en donde se formará el complejo con el zinc.	18
Figura 2. Diagrama de la configuración del ensayo de liberación de curcumina, se representa el estado de equilibrio de solutos.	26
Figura 3. Diámetro hidrodinámico y Pdl promedio de las nanopartículas de ZnO sintetizadas a 2, 3, 4 y 8 horas (diámetro $p = 0.32$, Pdl $p = 0.006$).	29
Figura 4. Potencial zeta de las nanopartículas de ZnO sintetizadas a 2, 3, 4 y 8 horas ($p = 0.439$).	29
Figura 5. (A) Espectro de absorción, (B) espectros de emisión de nanopartículas de ZnO sintetizadas a 2 en azul, 3 en naranja, 4 en gris y 8 horas en amarillo (C) espectro de emisión de nanopartículas de ZnO sintetizadas a 3 horas a pH 7.4 y 5.5.	31
Figura 6. Espectros FTIR de nanopartículas de ZnO sintetizadas a 2 horas en café, 3 horas en amarillo, 4 horas en verde y 8 horas en celeste.	33
Figura 7. Imágenes TEM de (A) ZnO 2 horas de síntesis, (B) ZnO 3 horas de síntesis, (C) 4 horas de síntesis y (D) 8 horas de síntesis.	34
Figura 8. Diámetro hidrodinámico y Pdl promedio de las nanopartículas de ZnO liofilizadas con el crioprotector trehalosa a 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4 y 5 mg/ml (diámetro $p = 0.45$, Pdl $p << 0.05$).	35
Figura 9. Potencial zeta de las nanopartículas de ZnO liofilizadas con el crioprotector trehalosa a 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4 y 5 mg/ml ($p << 0.05$).	35

Figura 10. Mortalidad de <i>Danio rerio</i> a 24 hpf con nanopartículas de ZnO en a concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 250 µg/ml (n = 20) (p = 0.000).	36
Figura 11. Mortalidad de <i>Danio rerio</i> a 96 hpf con nanopartículas de ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26) (p = 0.034).	37
Figura 12. Eclosión de <i>Danio rerio</i> a 96 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26) (p= 0.000).	37
Figura 13. Imágenes representativas de <i>Danio rerio</i> a 96 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26), en la primera columna se presentan a los embriones muertos, en la segunda a los que no eclosionaron y en la tercera a los embriones vivos.	38
Figura 14. Mortalidad de <i>Danio rerio</i> a 120 hpf con nanopartículas de ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26) (p = 0.000).	40
Figura 15. Eclosión de <i>Danio rerio</i> a 120 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26) (p = 0.000).	41
Figura 16. Imágenes representativas de <i>Danio rerio</i> a 120 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26), en la primera columna se presentan a los embriones muertos, en la segunda a los que no eclosionaron y en la tercera a los embriones vivos.	42
Figura 17. Estructuras de los polímeros polialilamina y poliestirensulfonato.	45
Figura 18. Diámetro hidrodinámico y Pdl promedio de las nanopartículas de ZnO funcionalizadas con poli-alilamina hidrocioruro (PAH) 3mg/ml, 2.25 mg/ml, 1.5 mg/ml y 0.75 mg/ml, y sulfonato de poliestireno (PSS) 7.5 mg/ml y APTES (Diámetro p = 0.31, Pdl p = 0.003).....	45

Figura 19. Potencial zeta de las nanopartículas de ZnO funcionalizadas con sulfonato de poliestireno (PSS) 7.5 mg/ml y poli-alilamina hidrocioruro (PAH) 3mg/ml, 2.25 mg/ml, 1.5 mg/ml y 0.75 mg/ml ($p < 0.05$).	46
Figura 20. Imágenes TEM de nanopartículas de ZnO funcionalizadas con (A) 0.75 mg/ml PAH y (B) 7.5 mg/ml PSS.....	46
Figura 21. Espectro de emisión de la nanopartícula funcionalizada con APTES y cargada con curcumina. En negro el espectro de curcumina a 430 nm y en gris de la nanopartícula a 340 nm.....	48
Figura 22. Eficiencia de carga de curcumina en nanopartículas de ZnO a pH 7.4, pH 5.5, ZnO sin funcionalizar con APTES y funcionalizadas con APTES (ZnO-NH ₂) ($p = 0.404$).....	48
Figura 23. Liberación de curcumina con pH fijo a 5.5, 7.4 y con cambio de pH de 7.4 a 5.5 a las cuatro horas en ZnO y ZnO-NH ₂ ($p = 0.891$).	49

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Número total de átomos en el clúster. R_{NPS} es el radio promedio determinado por 20 nanopartículas contenidas en 5 imágenes TEM, $R_{átomo}$ es el radio atómico del zinc.....	23
Ecuación 2. Peso de una nanopartícula promedio. M_{Zn} es la masa atómica relativa de un átomo de zinc	23
Ecuación 3. Número de átomos de zinc. N_A es el número de Avogadro.....	23
Ecuación 4. Número de nanopartículas.	23
Ecuación 5. Moles totales de nanopartículas de ZnO.	24
Ecuación 6. Ecuación utilizada para determinar la eficiencia de carga de CUR en las nanopartículas de ZnO y ZnO funcionalizadas.	26
Ecuación 7. Ecuación química propuesta para la formación de nanopartículas de ZnO, adaptado de Alias <i>et al</i> (39).....	30

RESUMEN

En la actualidad, y en los últimos diez años, la nanotecnología ha entrado en auge, dada su capacidad para resolver problemáticas de distinta índole. En particular, la nanomedicina permite generar distintas plataformas de entrega de fármacos, los cuales pueden ser protegidos y guiados a distintos tejidos y órganos. El objetivo del presente trabajo es desarrollar nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) dopadas con magnesio, que permitan la conjugación a drogas y puedan disolverse a pH tumoral (pH 4.0 – 5.5). Las nanopartículas de ZnO poseen la particularidad de disolverse en condiciones ácidas. De esta forma, al ingresar a la célula por medio de endocitosis, las nanopartículas pueden componer un sistema de entrega de fármaco antitumoral controlado, con disolución de las mismas, liberando Zn^{+2} al medio intracelular de la célula en conjunto con la droga transportada, y con un potencial efecto sinérgico. Para explorar este sistema de entrega de fármacos, la primera parte del trabajo correspondió a la síntesis de las nanopartículas. Para lo cual se empleó el método de precipitación, el que consiste en la reacción de sales de zinc y magnesio con hidróxido de potasio. En la segunda parte del trabajo se evaluó el perfil toxicológico de las nanopartículas de ZnO en embriones de *Danio rerio* para corroborar su potencial toxicidad. Luego, las nanopartículas fueron funcionalizadas con dos polímeros, polialilamina y poliestirensulfonato, y un aminosilano APTES, con el objeto de obtener nanopartículas que puedan conjugarse con distintas drogas. Finalmente, se utilizó curcumina, como droga modelo, conjugada con la nanopartícula desnuda y funcionalizada, con el objeto de evaluar la capacidad de asociación de la droga a la nanopartícula.

Se lograron desarrollar nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio, las cuales tienen gran capacidad de adhesión a drogas que tengan estructura de tipo carbonilo-hidroxilo (por ejemplo, curcumina, doxorubicina y daunorubicina), posiblemente por medio de la formación de compuestos coordinados. En embriones de *Danio rerio*, son tóxicas, sin embargo, el recubrimiento del conjunto nanopartícula-droga, podría disminuir la toxicidad de estas. Así, próximos estudios biológicos podrán explorar estos aspectos en mayor detalle y la mejora del nanosistema.

ABSTRACT

Currently, and in the last ten years, nanotechnology has boomed, given its ability to solve problems of various kinds. In particular, nanomedicine allows generating different drug delivery platforms, which can be protected and guided to different tissues and organs. The objective of this work was to develop zinc oxide nanoparticles (ZnO) doped with magnesium, which allows conjugation to drugs and can dissolve at tumoral pH (pH 4.0 - 5.5). The ZnO nanoparticles have the particularity of dissolving in acidic conditions. In this way, upon entering the cell by means of endocytosis, the nanoparticles can compose a controlled antitumor drug delivery system, with their dissolution, releasing Zn^{+2} in the intracellular medium of the cell in conjunction with the transported drug, and with a potential synergistic effect. To explore this drug delivery system, the first part of the work corresponded to the synthesis of nanoparticles. For this, the precipitation method was used, which consists of the reaction of zinc and magnesium salts with potassium hydroxide. In the second part of the work, the toxicological profile of the ZnO nanoparticles in *Danio rerio* embryos was evaluated to corroborate its potential toxicity. Then, nanoparticles were functionalized with two polymers, polyallylamine and polystyrene sulfonate, and an aminosilane APTES, in order to obtain nanoparticles that could be conjugated with different drugs. Finally, curcumin was used, as a model drug, conjugated with the nude and functionalized nanoparticle, in order to evaluate the association of the drug to the nanoparticle.

ZnO nanoparticles doped with magnesium were developed and have great capacity of adhesion to drugs that have carbonyl-hydroxyl groups in their structure (for example, curcumin, doxorubicin and daunorubicin), possibly through the formation of coordinated compounds. In *Danio rerio* embryos, they are toxic, however, the coating of the nanoparticle-drug set, could diminish the toxicity of these. Thus, next biological studies will be able to explore these aspects in greater detail and the improvement of the nanosystem.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología aplicada en la medicina ha proporcionado una plataforma multifuncional para la entrega de fármacos. Gracias a su desarrollo es posible la direccionalización de fármacos a tejidos específicos (*targeting*) (1,2), lo que permite mejorar las propiedades farmacocinéticas, limitando la acumulación del fármaco en los riñones, el hígado y el bazo, y también puede mejorar sus propiedades farmacodinámicas, su eficacia terapéutica, aumentar la solubilidad en agua y proteger a los medicamentos disueltos en el torrente sanguíneo (3).

La principal ventaja de los vehículos para fármacos desarrollados por nanotecnología es su potencial para la multifuncionalidad, lo que permite el alojamiento de fármacos, ligandos de afinidad y radioisótopos, dentro de un solo sistema para conseguir la administración de fármacos rastreables en tiempo real y con capacidad de *targeting*, es decir tienen un potencial teranóstico (3,4).

La nanotecnología en el cáncer

El cáncer es en la actualidad uno de los problemas de salud más importantes a nivel global, cuyo tratamiento consiste en quimioterapia, radioterapia y cirugía, no obstante, la ausencia de especificidad de estos muchas veces no elimina el 100% de las células tumorales, existiendo reincidencia del cáncer, o ejerce efectos citotóxicos en células no cancerosas (5). La nanotecnología ofrece una amplia gama de nanosistemas de entrega de fármacos con la habilidad de *targeting* de tejido canceroso al ser funcionalizadas, además debido a su tamaño, el que se encuentra en el rango de 1 – 100 nm, pueden extravasarse fácilmente y acumularse en las cercanías del tejido, también tienen la capacidad de encapsular drogas con pobre solubilidad en agua, como es el caso de muchas drogas antineoplásicas, mejorando su biodisponibilidad y farmacocinética (5,6).

No obstante, los mecanismos de resistencia a multi-drogas del cáncer (MDR; del inglés *multiple drug resistance*) deben ser considerados al momento de desarrollar un nanosistema. El mecanismo clásico más conocido es el eflujo mediado por transportadores, ya sea ABC (*ATP binding cassette*) o p-glicoproteína

(P-gp). Esta última, tiene una gran cantidad de dominios transmembrana polimorfos para unirse a drogas, los cuales pueden ser responsables del reconocimiento de los fármacos. P-gp puede proteger a las células activamente, incrementado el eflujo de varias drogas anti-cáncer fuera de la célula, contra un gradiente de concentración, por ende, disminuyen sus niveles intracelulares bajo su concentración tóxica. Para superar la MDR, se han desarrollado distintas estrategias para inhibir a este transportador. Las nanopartículas poliméricas o recubiertas con surfactantes no iónicos (Tween®, Span®, Polietilenglicol o PEG, etc.) han demostrado influenciar la farmacocinética de los anticancerígenos inhibiendo P-gp, modulando la actividad celular del transportador y su expresión (7–9). Sin embargo, la utilización de polímeros, como el PEG, presentan sensibilización en terapias crónicas o prolongadas en el tiempo, perdiendo efecto terapéutico y de invisibilización de las nanopartículas cargadas con la droga, al ser opsonizadas y eliminadas más rápidamente. Si bien, la invisibilidad de la nanopartícula depende de la capacidad del polímero para no ser reconocido por el sistema inmune, esta capacidad está directamente relacionada con la interacción de la capa externa de la nanopartícula con las proteínas presentes en el torrente sanguíneo. Ciertas proteínas plasmáticas ayudan al efecto de invisibilización, reduciendo el tráfico celular no específico de la nanopartícula, tal es el caso de las disopsoninas (10). No obstante, muchas de estas disopsoninas promueven la acumulación de las nanopartículas en el hígado, como la albúmina, por lo que su utilización como recubrimiento de nanopartículas es discutible (11).

Una estrategia para superar la MDR, derivada del incremento de la expresión de P-gp en células tumorales, es lograr una concentración constante del anticancerígeno en el espacio intracelular, de modo que se disminuya la eficiencia del eflujo de los transportadores, por sobresaturación del proceso. Dado que el pH del ambiente tumoral es más ácido que en la sangre y células normales, siendo los endosomas y lisosomas los espacios con menor pH, el uso de nanocarriers que responden a cambios fisiológicos de pH para liberar al fármaco selectivamente en células cancerosas (12), son una alternativa ampliamente utilizada para obtener una liberación controlada en el espacio celular, permitiendo superar la MDR (13).

Terapia antineoplásica

Uno de las quimioterapia más utilizadas a lo largo de la historia han sido las antraciclinas tales como doxorubicina, daunorubicina, epirubicina e idaurubicina, debido a su gran efectividad en contra de una gran cantidad de tipos de cáncer, entre ellos: Linfoma maligno, sarcoma de tejidos blandos y huesos, leucemia linfoblástica aguda, carcinoma de ovario, cáncer de mama, neuroblastoma, carcinoma urotelial, carcinoma de tiroides, carcinoma gástrico, tumor de Wilms, carcinoma broncogénico (células pequeñas) y sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA (14). Sin embargo, su efecto secundario más prominente es la aparición de cardiotoxicidad de manera dosis cumulativa dependiente (15), el mecanismo de acción de este daño a los miocitos no es del todo claro, pero se han propuesto los siguientes: inhibición de la isoforma beta de topoisomerasa-II, sobrecarga de calcio, alteración de la función adrenérgica, metabolitos tóxicos de antraciclina, liberación de aminas vasoactivas, y liberación de citocinas proinflamatorias (16,17).

En los últimos años se ha estudiado el efecto de la curcumina (Cur), el principal curcuminoide derivado de la cúrcuma obtenida de la planta *Curcuma longa* (18), por sus distintas actividades antioxidantes, antiinflamatoria y anticancerígenas, a través de la regulación de vías implicadas en mutagénesis, expresión de oncogenes, regulación del ciclo celular, apoptosis, tumorigénesis y metástasis (19). Siendo un compuesto atractivo en el tratamiento del cáncer por sus casi nulos efectos secundarios a dosis altas como 8 g/día (20) El conjunto de estas propiedades convierte a la curcumina en una droga antitumoral atractiva, no obstante, su baja solubilidad en agua y pobre biodisponibilidad dificulta su uso.

La encapsulación de estos dos tipos de drogas en un *nanocarrier* nos permite disminuir los efectos adversos no deseados y mejorar su biodisponibilidad (15,21).

Sistemas de *drug delivery* basados en nanotecnología

Como se ha discutido, la nanotecnología ofrece muchos sistemas de *nanocarriers* cada uno con sus propias ventajas. Entre ellos se encuentran *nanocarriers* en base a lípidos como los liposomas, a polímeros como las micelas

poliméricas, nanopartículas virales, conjugados de drogas como drogas unidas covalentemente a anticuerpos y nanopartículas inorgánicas como las de óxido de zinc (6). Las nanopartículas metálicas han recibido gran atención durante los últimos años debido a sus aplicaciones en radioterapia, imágenes y *drug delivery* y su capacidad de ser conjugadas fácilmente a anticuerpos, polímeros y drogas (6,22). Dentro de las mismas los óxidos metálicos han sido considerados no tan solo como *nanocarriers* sino que también como coadyuvantes en terapias antitumorales debido a su toxicidad inherente en estas células, entre ellos las nanopartículas de ZnO han demostrado ser un candidato atractivo debido a que cumple con todas las consideraciones ya discutidas (23).

Nanopartículas de óxido de zinc

Las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) han demostrado tener efectos citotóxicos específicos en células cancerosas por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno y desequilibrio en la actividad de proteínas dependientes de zinc. Estos efectos dependen del tamaño de las mismas, siendo las de menor tamaño más tóxicas y las que logran atravesar mejor las barreras biológicas (24). Existen muchos métodos de síntesis de las nanopartículas de ZnO tales como Sol-Gel, solvotermal, hidrotérmico o precipitación (25). Sin embargo, en todos los métodos se obtienen nanopartículas de ZnO capaces de disolverse en condiciones ácidas o básicas (13).

De manera que es posible concebir un sistema sensible a pH que al ingresar a la célula por medio de endocitosis de nanopartículas de ZnO, pueden componer un sistema de entrega de fármaco controlado con disolución de las partículas, liberando Zn^{+2} al medio intracelular de la célula, desde el lisosoma, el cual produce un efecto sinérgico con la terapia antitumoral, dado que tiene la capacidad de inducir muerte celular, por producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

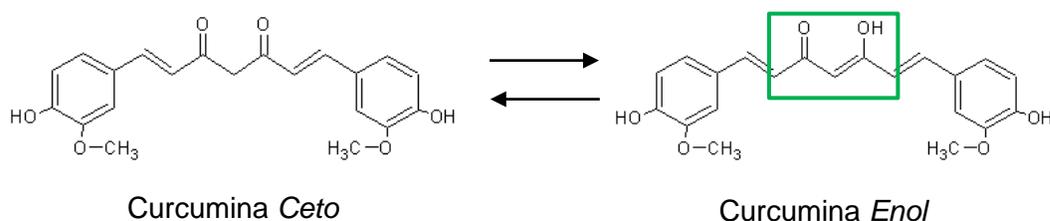
Funcionalización de nanopartículas

La funcionalización de las nanopartículas permite generar una estrategia de entrega de drogas en un sitio específico, aumentar la biodisponibilidad del

nanosistema y mejora la capacidad de retención del mismo, pero también permite la conjugación a drogas al aumentar la cantidad de interacciones entre la superficie del nanosistema y la droga en cuestión (26). Este método de carga de drogas se conoce como método de multicapas o *multilayer* en donde se utilizan polímeros de carga positiva como la PAH o carga negativa como PSS o la superficie de la nanopartícula puede ser conjugada químicamente. Debido a lo anterior es necesario evaluar el efecto de las nanopartículas sin funcionalizar y funcionalizadas respecto a un aumento o disminución de su toxicidad, ya sea en cultivos celulares y su acumulación y toxicidad periférica, en ensayos *in vivo* como los peces cebra (27).

Entendiendo la necesidad de desarrollar nuevas terapias antitumorales y los requisitos que debe cumplir un *nanocarrier* para ser utilizado con este objetivo es que en el presente trabajo se plantea que la curcumina como análogo estructural de antraciclinas (Figura 1) tiene la capacidad de formar compuestos coordinados con cationes divalentes, como el Zn^{+2} (28). Asemejándose a un fragmento de la estructura de la doxorubicina, daunorubicina, epirubicina.

El conjunto de nanopartículas de ZnO cargadas con Curcumina, permite concebir un sistema de entrega, que en conjunto con una molécula o proteína de recubrimiento podría permitir el *targeting* celular con potencial terapéutico.



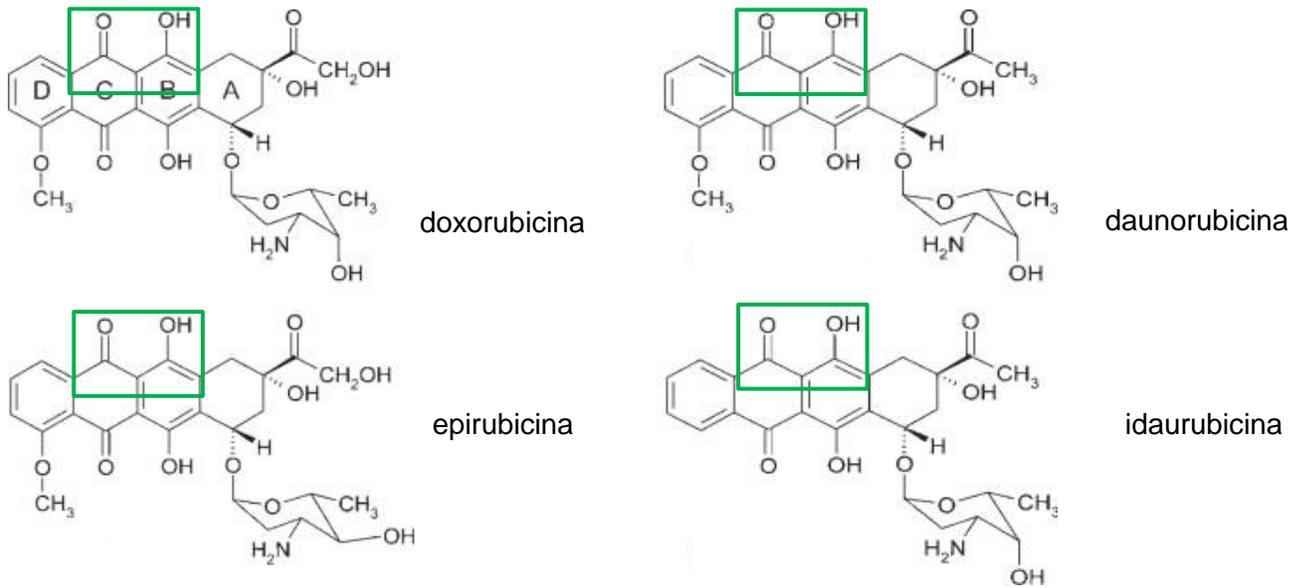


Figura 1. Estructuras *Ceto - Enol* de la curcumina, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina e idaurubicina. En verde se marca el sitio esperado en donde se formará el complejo con el zinc.

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio son tóxicas en embriones de *Danio rerio*. Estas nanopartículas son capaces de vehiculizar curcumina.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio tóxicas en embriones de *Danio rerio*, que permitan la vehiculización de curcumina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio de tamaño menor a diez nm por el método de precipitación, que sean solubles a pH ácido dentro de rangos tumorales (~4–5.5) y caracterizarlas en cuanto a tamaño, polidispersidad y potencial zeta.
2. Evaluar la toxicidad de las nanopartículas de ZnO en embriones de pez cebra *Danio rerio*.
3. Funcionalizar las nanopartículas de ZnO con curcumina utilizando PSS, PAH y APTES, caracterizándolas respecto a su tamaño, polidispersidad y potencial zeta.
4. Evaluar la eficiencia de carga y el perfil de liberación de las nanopartículas de ZnO cargadas con curcumina a pH fisiológico y tumoral.

MATERIALES

Acetato de zinc dihidratado (Merck, Darmstadt, Alemania).

Acetato de magnesio tetrahidratado (Merck, Darmstadt, Alemania).

Hidróxido de potasio (Merck, Darmstadt, Alemania).

Curcumina de *Curcuma longa* (Merck, Darmstadt, Alemania).

Sulfonato de poliestireno (poli(sodio 4-estirensulfonato)) (Merck, Darmstadt, Alemania).

Poli-alilamina hidrocloreto (AK Scientific, Union City, EE.UU.).

(3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) (Merck, Darmstadt, Alemania).

Etanol absoluto

Hexano

Agua milli-Q

Medio E3 (5 mM de NaCl, 0.17 mM de KCl, 0.33 mM de CaCl₂ y 0.33 mM de MgSO₄).

Danio rerio (bioterio BNI)

MÉTODOS

Síntesis de nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio

Se adaptó el método de fabricación por precipitación descrito por Bang *et al* (29). Se realizaron dos soluciones, una de acetato de zinc (2.0 mmol) y acetato de magnesio (0.2 mmol) en 30 ml de etanol a 70 °C y agitación constante, y una segunda de KOH (2.5 mmol) en 10 ml de etanol, bajo agitación y temperatura ambiente. Ambas soluciones fueron enfriadas en un baño de hielo hasta alcanzar 15 °C. Se inyectó la solución de KOH rápidamente a la solución de acetatos, bajo agitación constante. El tiempo de crecimiento de las nanopartículas fue evaluado a 2, 3, 4 y 8 horas. Las nanopartículas obtenidas fueron precipitadas usando hexano como no solvente (12,13), en una proporción 2:1 etanol:hexano. Finalmente, las nanopartículas de ZnO:MgO fueron resuspendidas en agua milli-Q para su caracterización.

Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio

El tamaño de las nanopartículas fue evaluado por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes TEM fueron adquiridas en un STEM Inspect F50 (FEI, Japón). Las nanopartículas de ZnO:MgO se dispersaron en etanol absoluto, luego esta dispersión se colocó en rejillas de cobre de 400 *mesh* las que fueron visualizadas con el microscopio.

El radio hidrodinámico y el índice de polidispersidad (Pdl) se determinaron mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), y el potencial zeta se midió mediante electroforesis de láser Doppler en un Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Royston, RU), con una fuente de luz láser de He- Ne a una longitud de onda de 633 nm con un ángulo de dispersión fijo de 175 °. Las muestras se diluyeron con etanol al 95% y se midieron en una cubeta DTS1070.

La composición de las nanopartículas fue analizada por medio de espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR). Los espectros de FTIR fueron obtenidos en un espectrómetro Interspec 200-X FT-IR (Interspectrum

OU, Toravere, Estonia) con una resolución de 4 cm^{-1} , en el rango de número de onda de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Todos los datos fueron recolectados y extraídos del software Essential FTIR® Spectroscopy Toolbox. Espectros de absorción UV-Vis fueron obtenidos en un espectrofotómetro de arreglo de diodos Agilent 8453 (Agilent, Santa Clara, EE. UU.). Los espectros de emisión se registraron en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent, Santa Clara, EE. UU.). Todas las muestras fueron dispersadas en agua mili – Q.

Liofilizado de nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio

Para evaluar el efecto del liofilizado en las nanopartículas, fue necesario determinar el uso de trehalosa como crioprotector. Las nanopartículas de ZnO:MgO fueron resuspendidas en soluciones al 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4% y 5% de trehalosa en agua. Estas dispersiones se congelaron con nitrógeno líquido y luego fueron secadas en un liofilizador (Mundolab, Santiago, Chile). Una vez liofilizadas las dispersiones, el polvo seco fue resuspendido en agua milli-Q. El radio hidrodinámico y el índice de polidispersidad (Pdl) se determinaron mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), y el potencial zeta se midió mediante electroforesis de láser Doppler en un Zetasizer ZS (como se detalló antes).

Disolución de las nanopartículas de ZnO a pH tumoral

Para determinar la respuesta a diferentes pH, las nanopartículas de ZnO fueron sometidas a un estudio de disolución en buffer fosfato pH 7.0 y buffer acetato pH 5.1. Luego de 30 minutos, sus espectros de emisión se registraron en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent, Santa Clara, EE. UU.).

Cálculo de la concentración de las nanopartículas

La concentración de las nanopartículas fue determinada por una aproximación matemática que utiliza el radio R_{NPS} experimental obtenido por TEM y asume una geometría esférica y un 100% de rendimiento a través de una adaptación del trabajo de Lewis *et al.* (30) (ecuación 1). La principal consideración que hay que tomar en cuenta, es que es muy difícil el calcular la concentración de magnesio en la

nanopartícula dopada, por lo que para facilitar los cálculos asumimos que el magnesio contribuye lo mismo que el zinc, es decir asumimos el mismo radio atómico del zinc para el magnesio.

En la ecuación 1 se determinó el número total de átomos por nanopartícula, el cual es igual a 326924 átomos de zinc.

$$N = \left(\frac{R_{NPS}}{R_{\text{átomo}}} \right)^3$$

Ecuación 1. Número total de átomos en el clúster. R_{NPS} es el radio promedio determinado por 20 nanopartículas contenidas en 5 imágenes TEM, $R_{\text{átomo}}$ es el radio atómico del zinc.

Con la ecuación 2, es posible determinar el peso de una nanopartícula promedio, siendo 22355 KDa.

$$M_w = M_{Zn} \times N$$

Ecuación 2. Peso de una nanopartícula promedio. M_{Zn} es la masa atómica relativa de un átomo de zinc.

Siguiendo con la ecuación 3, fue posible determinar la cantidad de átomos de zinc presentes en la reacción, considerando que un 100% reaccionan y forman las nanopartículas, siendo 1.204×10^{21} .

$$N_{\text{átomos}} = \text{moles de Zn} \times N_A$$

Ecuación 3. Número de átomos de zinc. N_A es el número de Avogadro.

Luego, se determinó el número de nanopartículas que se producen en una reacción a partir del cociente entre el total de átomos de zinc y el número de átomos presentes en una nanopartícula (ecuación 6), obteniendo 3.682×10^{15} .

$$N_{NP} = \frac{N_{\text{átomos}}}{N}$$

Ecuación 4. Número de nanopartículas.

Finalmente, determinamos los moles producidos durante la reacción utilizando el número de Avogadro (ecuación 7). Siendo 6.115×10^{-9} moles.

$$\text{moles}_{\text{NP}} = \frac{N_{\text{NP}}}{N_{\text{A}}}$$

Ecuación 5. Moles totales de nanopartículas de ZnO.

Ensayos toxicológicos en *Danio rerio*

Los embriones de pez cebra de tipo salvaje Tuebingen (WT-TU) fueron mantenidos de acuerdo a métodos estándar (31). Los embriones fueron criados en un sistema de agua a 28°C con ciclos de luz:oscuridad de 12:12 horas y fueron clasificados de acuerdo a sus horas post fecundación (hpf) y morfología (32). Todos los ensayos toxicológicos fueron aprobados por el Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile bajo el proyecto del Dr. Steffen Härtel.

Para el primer ensayo toxicológico embriones de 3.5 a 4 horas post-fecundación (hpf) fueron expuestos a dosis de 10, 25, 50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas de ZnO:MgO, determinadas con el peso de una partícula promedio con la ecuación 2, y fueron evaluadas la mortalidad a 24 hpf, por microscopia de campo claro en un estereomicroscopio Nikon C-DSD230 (Nikon, Japón).

Finalmente, embriones de 3.5 hpf fueron expuestos a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas. La mortalidad y la eclosión fue evaluada a 96 y 120 hpf.

Funcionalización de las nanopartículas de ZnO

Las nanopartículas de ZnO fueron funcionalizadas por dos métodos. Para el primer método de recubrimiento polimérico por multicapa, se estudió la adición de una solución de poli-alilamina hidrocloreto (PAH) a 3 mg/ml, 2.25 mg/ml, 1.5 mg/ml y 0.75 mg/ml sobre una dispersión de quantum dots de ZnO en agua. Se incubó por 20 min en condiciones de oscuridad, las nanopartículas funcionalizadas con PAH (ZnO-PAH) fueron precipitadas por centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos y se lavó dos veces con agua grado milli-Q. Además, se evaluó un segundo

polímero, para el cual se adicionó una solución de sulfonato de poliestireno (PSS) 10 mg/ml, 7.5 mg/ml, 5 mg/ml y 2.5 mg/ml, y se incubó bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se eligieron los mejores candidatos para formar los nanosistema de doble capa polimérica de carga positiva y negativa, ZnO-PSS-PAH y ZnO-PAH-PSS, respectivamente. El método de fabricación es el mismo que se describió más arriba, partiendo desde la nanopartícula polimérica correspondiente e incubando secuencialmente las soluciones poliméricas correspondientes (11,33,34).

Para el segundo método de fabricación, se inyectaron 50 μ L de APTES a una solución de ZnO en etanol (10 ml) bajo reflujo a 80° C por toda la noche, con el objeto de obtener nanopartículas aminadas (ZnO-NH₂). La superficie aminada de las nanopartículas permite tener una plataforma de anclaje a otras moléculas, ya sean proteínas o drogas. Estas fueron separadas por centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos (13).

Carga y perfil de liberación de curcumina en las nanopartículas de ZnO

La curcumina (Cur) fue cargada a la superficie de ZnO y ZnO-NH₂. Para ello, la curcumina fue solubilizada en etanol absoluto y fue añadida a la dispersión de nanopartículas de ZnO (10 ml), de modo que la concentración final de Cur fue de 1 mg/ml. Las nanopartículas fueron dejadas con agitación constante y oscuridad por toda la noche. Las nanopartículas cargadas con Cur (ZnO-Cur) fueron separadas de la Cur libre añadiendo hexano como no solvente, y posteriormente fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 3 minutos. Del mismo modo que antes, el radio hidrodinámico y el Pdl se determinaron mediante DLS, y el potencial zeta se midió mediante electroforesis de láser Doppler.

El sobrenadante de las nanopartículas de ZnO-Cur precipitadas, el cual contiene a la Cur libre, fue utilizado para cuantificar la cantidad de curcumina cargada en las nanopartículas de manera indirecta. Por medio de una curva de calibración, fue obtenida la concentración de Cur libre y la carga de Cur fue calculada por la ecuación 6. La medición fue realizada en un espectrofotómetro de arreglo de diodos Agilent 8453 (Agilent, Santa Clara, EE. UU.) a 430 nm.

$$\% \text{ Eficiencia de carga de CUR} = \frac{\text{moles CUR totales} - \text{moles de CUR libre}}{\text{moles de CUR totales}} * 100$$

Ecuación 6. Ecuación utilizada para determinar la eficiencia de carga de CUR en las nanopartículas de ZnO y ZnO funcionalizadas.

El perfil de liberación de Cur fue realizado a 37°C durante 20 horas a pH 7.4 y 5.5, y a pH 7.4 con cambio de pH a las 4 horas (pH final 5.5). Se utilizó una membrana de diálisis de 10.000 MWCO, la configuración del ensayo se muestra en la Figura 1.

La liberación de Cur fue determinada a las 1, 2, 4, 6, 8 y 20 horas, de la misma manera que la eficiencia de carga de Cur, debido a que la curcumina es insoluble a pH 7.4 un 10% de etanol absoluto fue añadido a las muestras previa medición, la curva de calibración a pH 7.4 también fue realizada con un 10% de etanol absoluto.

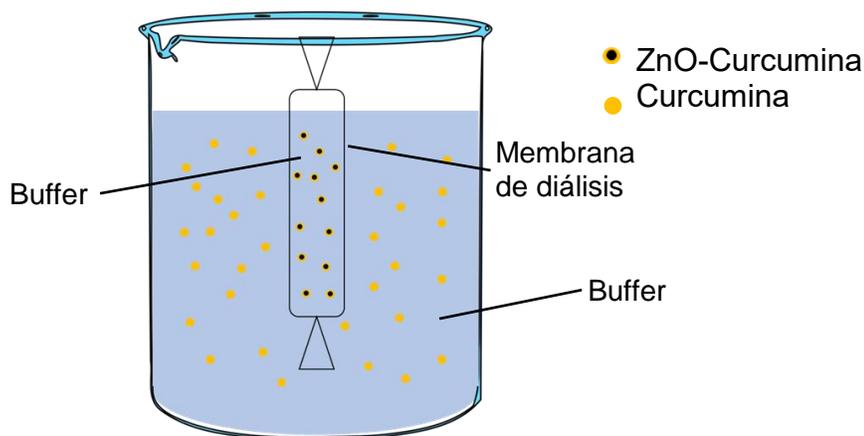


Figura 2. Diagrama de la configuración del ensayo de liberación de curcumina, se representa el estado de equilibrio de solutos.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el software Minitab® 17.1.0. El análisis estadístico del tamaño, Pdl y potencial zeta fue realizado utilizando ANOVA de un factor, con el objeto de estudiar la significancia entre los distintos datos entregados por el diámetro, Pdl y potencial zeta en base al valor P entregado en la comparación grupal con un nivel de significancia del 5% y análisis *post-hoc* Tukey, del cual se utilizaron los valores P para estudiar la significancia entre los distintos pares que componen los grupos evaluados con un nivel de significancia de 5%.

Para los ensayos toxicológicos en *Danio rerio* el análisis estadístico fue realizado utilizando ANOVA de un factor y análisis *post-hoc* de Tukey para estudiar la significancia entre el efecto y dosis de las nanopartículas de ZnO, de la misma manera ya descrita.

RESULTADOS

Síntesis y caracterización de nanopartículas de ZnO

La síntesis de las nanopartículas de óxido de zinc se llevó a cabo siguiendo el método de precipitación de Muhammad *et al.*(12) y Cai *et al.*(13), ambas adaptaciones de Bang *et al.* (29) en las cuales se emplea un tiempo de crecimiento de las nanopartículas de 8 horas. Se evaluaron distintos tiempos de síntesis con el objeto de optimizar el proceso y caracterizar el crecimiento de las nanopartículas de ZnO en solución etanólica. En la Figura 3 se aprecian los resultados promedios del diámetro hidrodinámico, el cual nos permite evaluar el crecimiento de las nanopartículas, y de Pdl, los que otorgan información acerca de las distintas poblaciones existentes respecto a sus diámetros, ambos fueron evaluados en cada uno de los tiempos de síntesis. En el caso del Pdl, valores en el rango de 0.1 a 0.7 de Pdl representan sistemas con una distribución de tamaños estrecha a media (35), como es el caso de las nanopartículas sintetizadas a 2 y 3 horas. Por otro lado, valores mayores a 0.7 de Pdl representan sistemas con una amplia distribución de tamaños macromoleculares en solución (35), lo que sería el caso de las nanopartículas sintetizadas a 4 y 8 horas. Lo anterior sugiere que las nanopartículas de ZnO, durante el proceso de crecimiento, existen en dos estados principalmente, el primero de baja agregación y un segundo de alta agregación, entre las 2 y 3 horas de síntesis ($p = 0.892$) y entre las 4 y 8 horas de síntesis ($p = 0.673$), respectivamente. En el caso del diámetro hidrodinámico promedio, no existen diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto al potencial zeta de las nanopartículas de ZnO (Figura 4), en todos los tiempos de síntesis poseen una carga de ~ -2.0 mV. La información aportada por el potencial zeta puede ser relacionada con estabilidad coloidal de la nanopartícula de ZnO, en este caso (36). En general, valores entre 0-10 mV sugieren estados altamente inestables, no obstante, la teoría DLVO sugiere que la estabilidad coloidal depende de la suma de las fuerzas atractivas de van der Waals y las fuerzas repulsivas electrostáticas debido a la doble capa eléctrica (EDL), el potencial zeta solo entrega información acerca de la segunda (36), por lo que solo entrega una

información parcial. Por otro lado, se ha reportado que el punto isoeléctrico de las nanopartículas de ZnO puede encontrarse a pH 8.0, 9.7, 9.8 o 10.3 dependiendo del método de fabricación empleado (37). El pH utilizado en la síntesis de las nanopartículas es 8.5, lo cual podría explicar el potencial zeta obtenido.

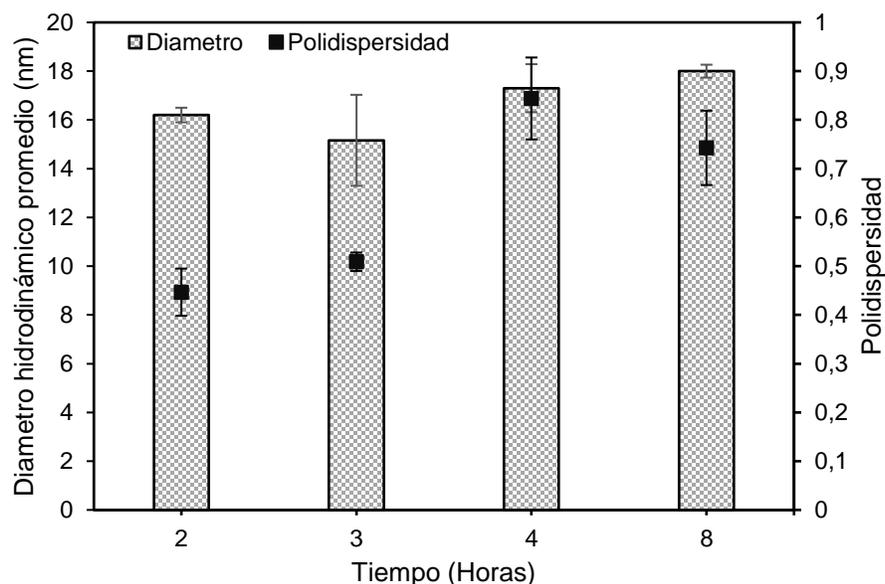


Figura 3. Diámetro hidrodinámico y Pdl promedio de las nanopartículas de ZnO sintetizadas a 2, 3, 4 y 8 horas (diámetro $p = 0.32$, Pdl $p = 0.006$).

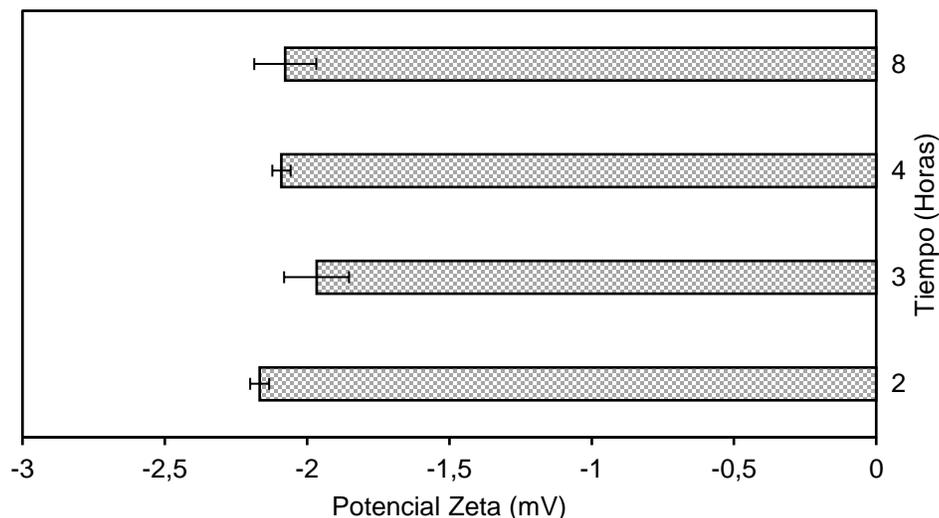
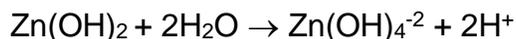
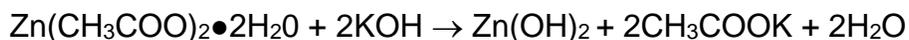


Figura 4. Potencial zeta de las nanopartículas de ZnO sintetizadas a 2, 3, 4 y 8 horas ($p = 0.439$).

Espectros de absorción y emisión de las nanopartículas de ZnO

Estudios previos han demostrado que el dopaje de las nanopartículas de óxido de zinc con magnesio mejora los picos de emisión en azul y de su fluorescencia en verde, observándose como un ensanchamiento de las bandas (38). En la Figura 5 observamos una banda muy amplia entre ~450 - 600 nm, que corresponde a su fluorescencia en verde, existiendo una relación directa con el tiempo de crecimiento. Esto puede deberse a la mayor presencia de Zn(OH)₂ en etapas tempranas de la síntesis, como se puede apreciar en la ecuación 2, adaptada de Alias *et al.* (39), y comprobarse en el espectro FTIR de la Figura 6 con la desaparición de la banda a 3.361 cm⁻¹ progresivamente. Además, se ha descrito la presencia de un pico a ~570 -600 nm en el espectro de fluorescencia de las nanopartículas de ZnO, debido a defectos de oxígeno intersticial (O_i) (40,41). Es probable que el pico de 700 nm de la Figura 5, sea un desplazamiento del pico registrado en la literatura (41), por el dopaje con magnesio, que como ya se dijo, produce un ensanchamiento de la banda en verde.



Ecuación 7. Ecuación química propuesta para la formación de nanopartículas de ZnO, adaptado de Alias *et al* (39).

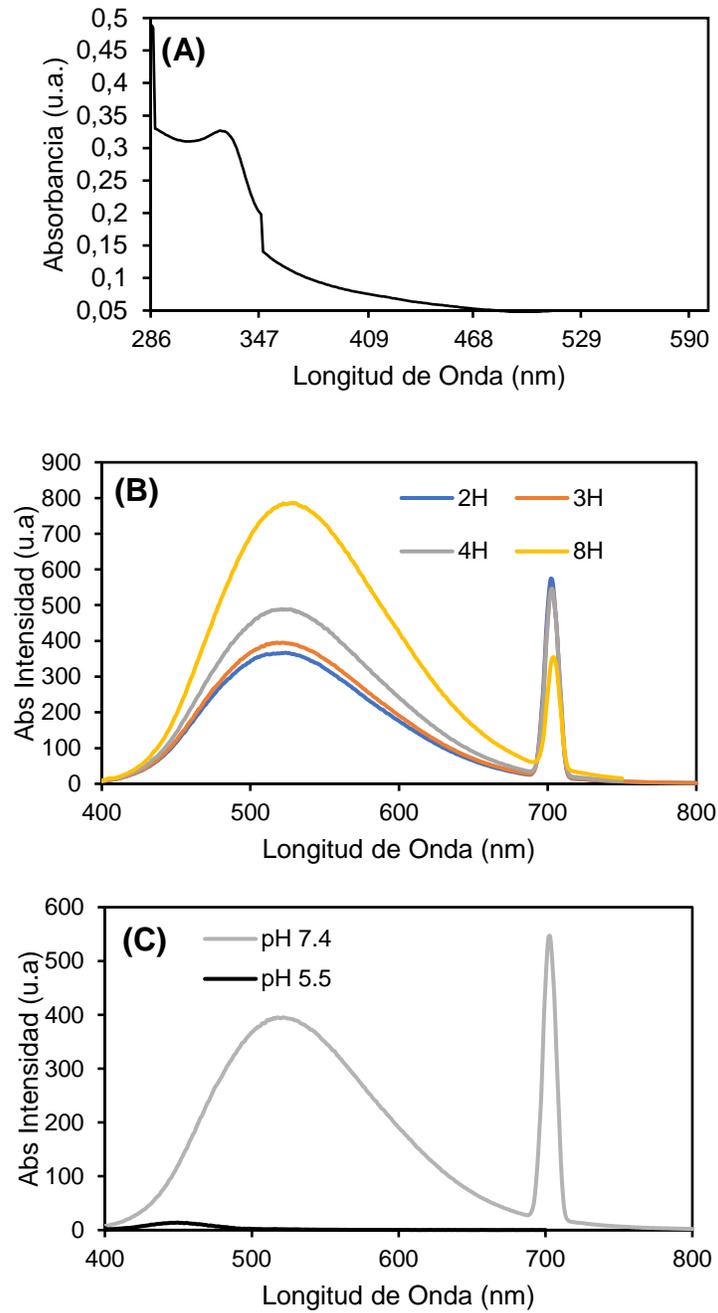


Figura 5. (A) Espectro de absorción, (B) espectros de emisión de nanopartículas de ZnO sintetizadas a 2 en azul, 3 en naranja, 4 en gris y 8 horas en amarillo (C) espectro de emisión de nanopartículas de ZnO sintetizadas a 3 horas a pH 7.4 y 5.5.

El análisis de la espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), Figura 6, en el cual 3.361 cm^{-1} corresponde a una banda de vibración de estiramiento -OH (42), que desaparece a lo largo de la síntesis, como se discutió más arriba. 1.395 , 824 y 581 cm^{-1} corresponden a bandas de vibración de estiramiento Mg-O y 1.395 , 530 y 486 cm^{-1} a bandas de vibración de estiramiento Zn-O (42).

El ZnO es un semiconductor del tipo II-VI, por lo que las nanopartículas de ZnO pueden ser observadas en TEM sin necesidad de tinción. En la Figura 7 se muestran las imágenes obtenidas por TEM de las nanopartículas sintetizadas a las 2, 3, 4 y 8 horas. A las 2 y 3 horas se logra ver a las nanopartículas desagregadas y a las 4 y 8 horas se observan acumulaciones de nanopartículas, lo cual puede ser explicado por el Pdl.

En adelante, se decidió utilizar nanopartículas de ZnO con un tiempo de crecimiento de 3 horas, puesto que están presentes grupos hidroxilos en su superficie, los que facilitan la funcionalización de la nanopartícula. Además, en comparación con la nanopartícula con crecimiento de dos horas, existe un pequeño incremento en la intensidad de su emisión en verde. Por otro lado, en la Figura 5 (C), se observa que a $\text{pH } 5.5$ prácticamente no existe fluorescencia, ya que la nanopartícula se disuelve.

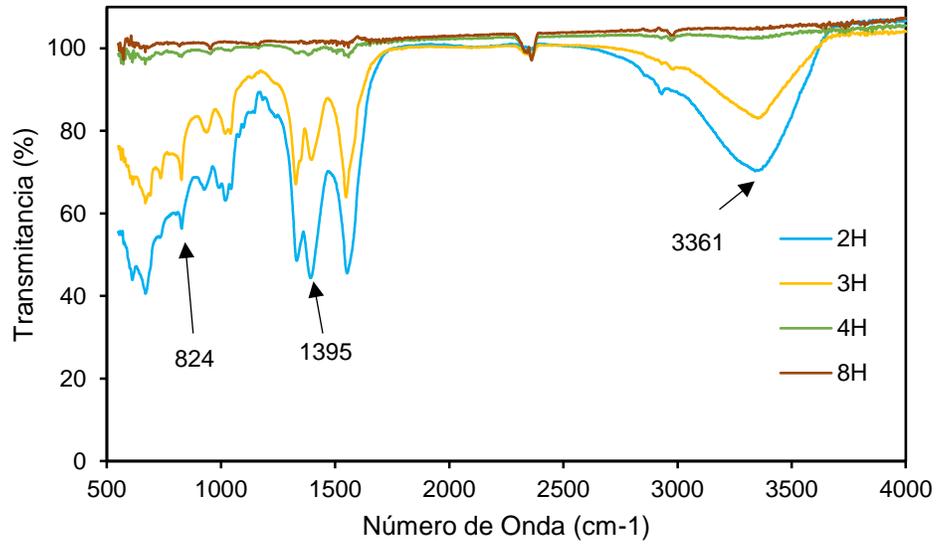


Figura 6. Espectros FTIR de nanopartículas de ZnO sintetizadas a 2 horas en café, 3 horas en amarillo , 4 horas en verde y 8 horas en celeste.

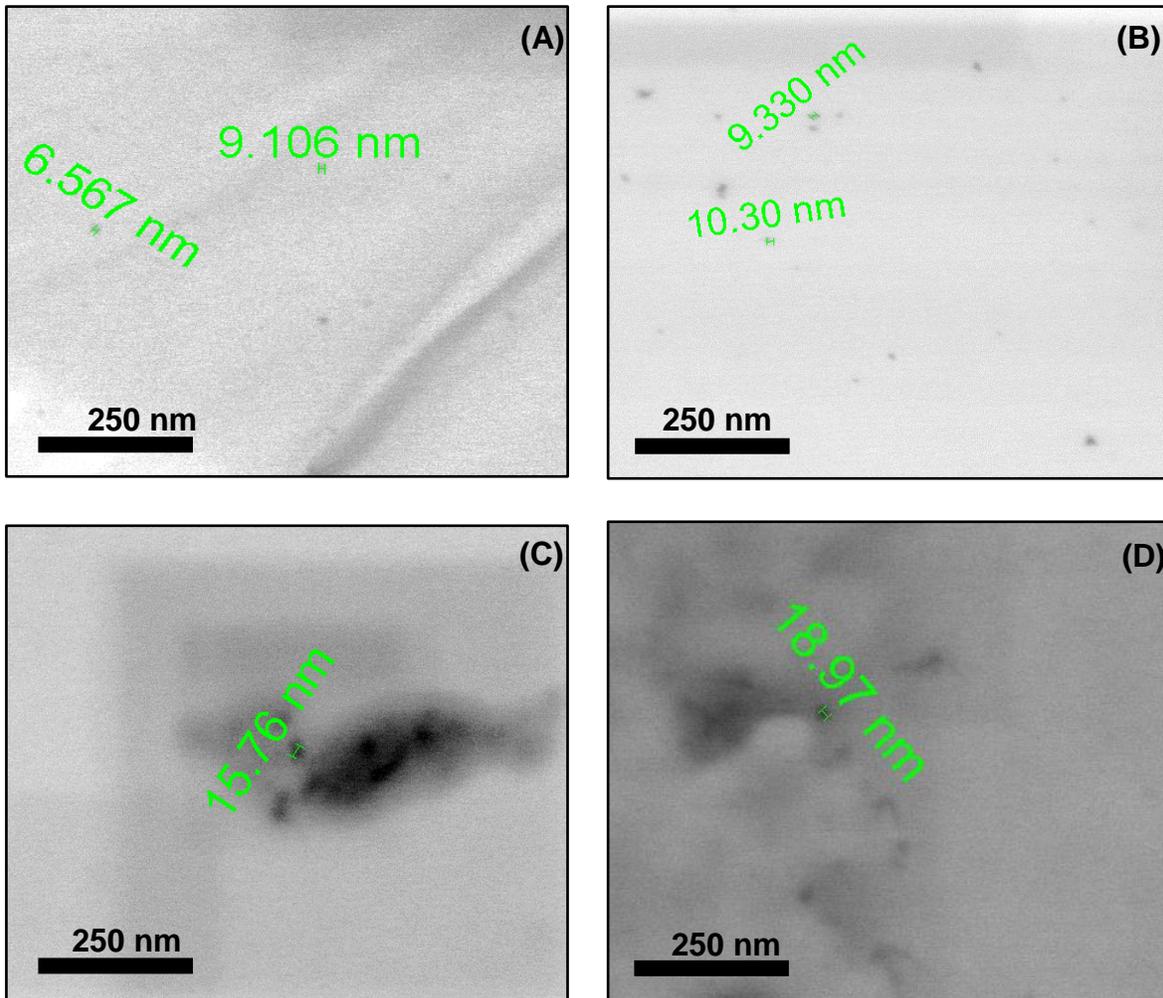


Figura 7. Imágenes TEM de (A) ZnO 2 horas de síntesis, (B) ZnO 3 horas de síntesis, (C) 4 horas de síntesis y (D) 8 horas de síntesis.

Efecto del liofilizado sobre el tamaño de las nanopartículas de ZnO

El liofilizado de las nanopartículas debe asegurar que no se afecta el tamaño ni la identidad de las mismas, luego del proceso (43). Por ello, se evaluó el uso de un crioprotector, trehalosa, en distintas concentraciones. En la Figura 8, se observa una gran variabilidad en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas resuspendidas en agua post – liofilizado, solo con 5 mg/ml de trehalosa se obtiene un diámetro de 40 nm, mas del doble del tamaño obtenido con la nanopartícula sola. En la Figura 9, se observa que el potencial zeta de las nanopartículas es mayor, en comparación con el de la misma sin trehalosa, lo cual puede deberse a la estructura del disacárido. Debido a que no existe un efecto positivo en el tamaño de la

nanopartícula post – liofilizado al usar trehalosa, se decide prescindir de crioprotector.

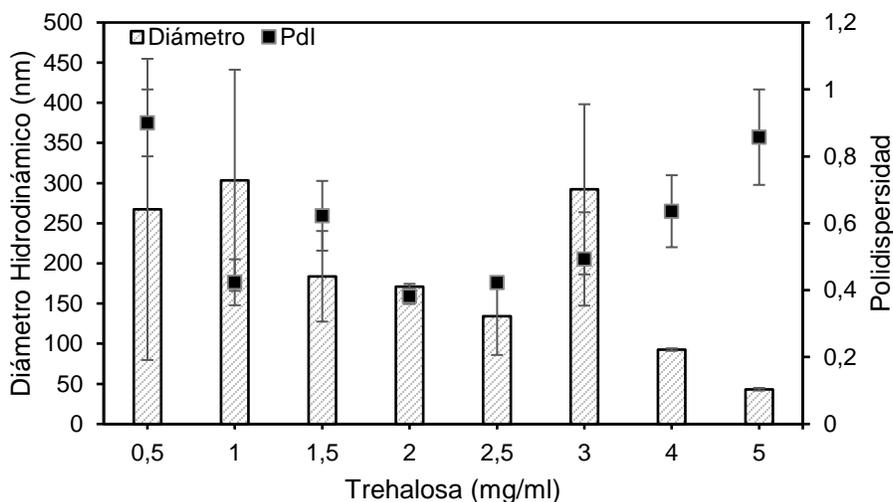


Figura 8. Diámetro hidrodinámico y Pdl promedio de las nanopartículas de ZnO liofilizadas con el crioprotector trehalosa a 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4 y 5 mg/ml (diámetro $p = 0.45$, Pdl $p \ll 0.05$).

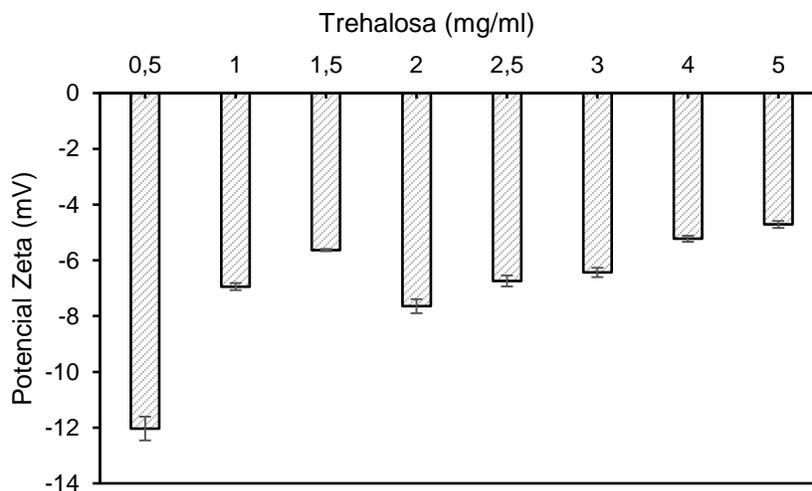


Figura 9. Potencial zeta de las nanopartículas de ZnO liofilizadas con el crioprotector trehalosa a 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4 y 5 mg/ml ($p \ll 0.05$).

Toxicología *Danio rerio*

Sólo el perfil toxicológico de las nanopartículas de ZnO sin funcionalizar fue evaluado en los embriones de *Danio rerio* de 3.5 a 4 hpf. En primera instancia se evaluaron concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 10), obteniendo

un 100% de muerte en todos los casos con un tiempo de incubación de 24 horas. Debido a lo anterior, se realiza un nuevo ensayo toxicológico en embriones de *Danio rerio* de 3.5 hpf. Las concentraciones de nanopartículas fueron disminuidas a 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$. A las 96 horas de exposición se observa que la dosis de 0.3135 $\mu\text{g/ml}$ alcanza un 30% de muerte (Figura 11), resultado que es significativo, respecto al control ($p = 0.022$), no obstante, no hay diferencias significativas entre el efecto de 0.3135 $\mu\text{g/ml}$ y las otras 3 dosis.

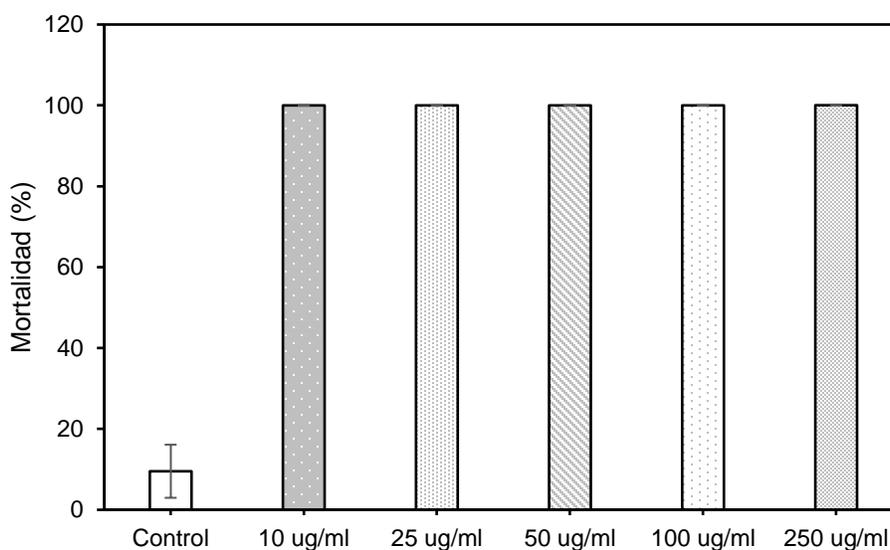


Figura 10. Mortalidad de *Danio rerio* a 24 hpf con nanopartículas de ZnO en a concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 20$) ($p = 0.000$).

En cuanto al porcentaje de eclosión a 96 hpf (Figura 12) 1.25 y 0.625 $\mu\text{g/ml}$ inhiben significativamente la eclosión de los embriones respecto al control (0.000 y 0.001, respectivamente) y respecto 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ (0.029 y 0.003, respectivamente).

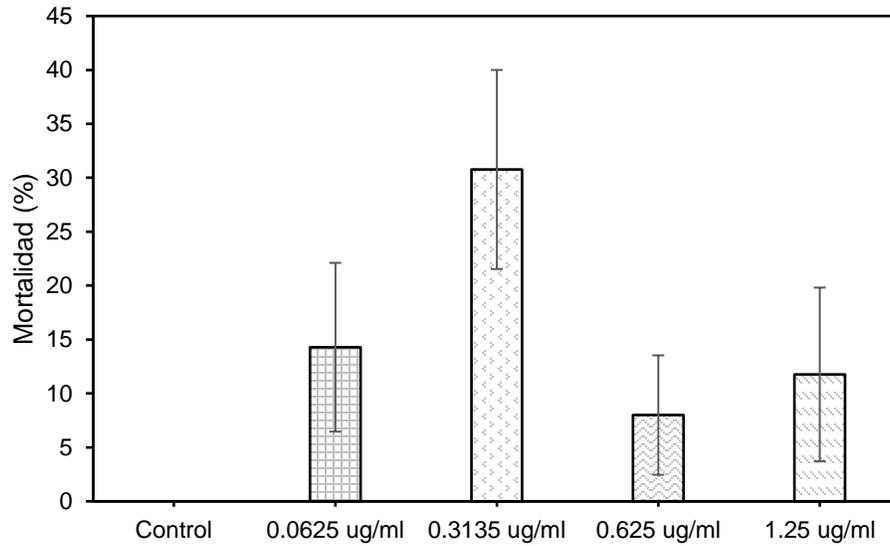


Figura 11. Mortalidad de *Danio rerio* a 96 hpf con nanopartículas de ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26) (p = 0.034).

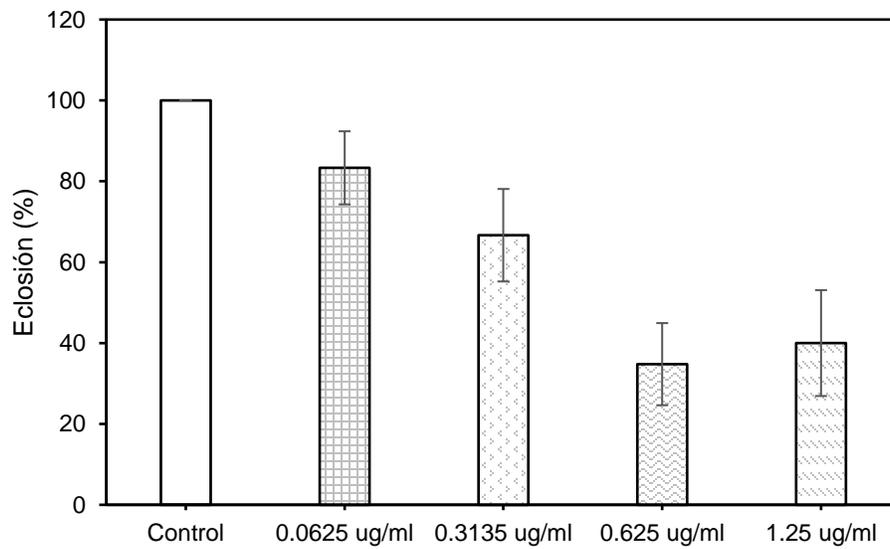


Figura 12. Eclosión de *Danio rerio* a 96 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26) (p= 0.000).



Figura 13. Imágenes representativas de *Danio rerio* a 96 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 26$), en la primera columna se presentan a los embriones muertos, en la segunda a los que no eclosionaron y en la tercera a los embriones vivos.

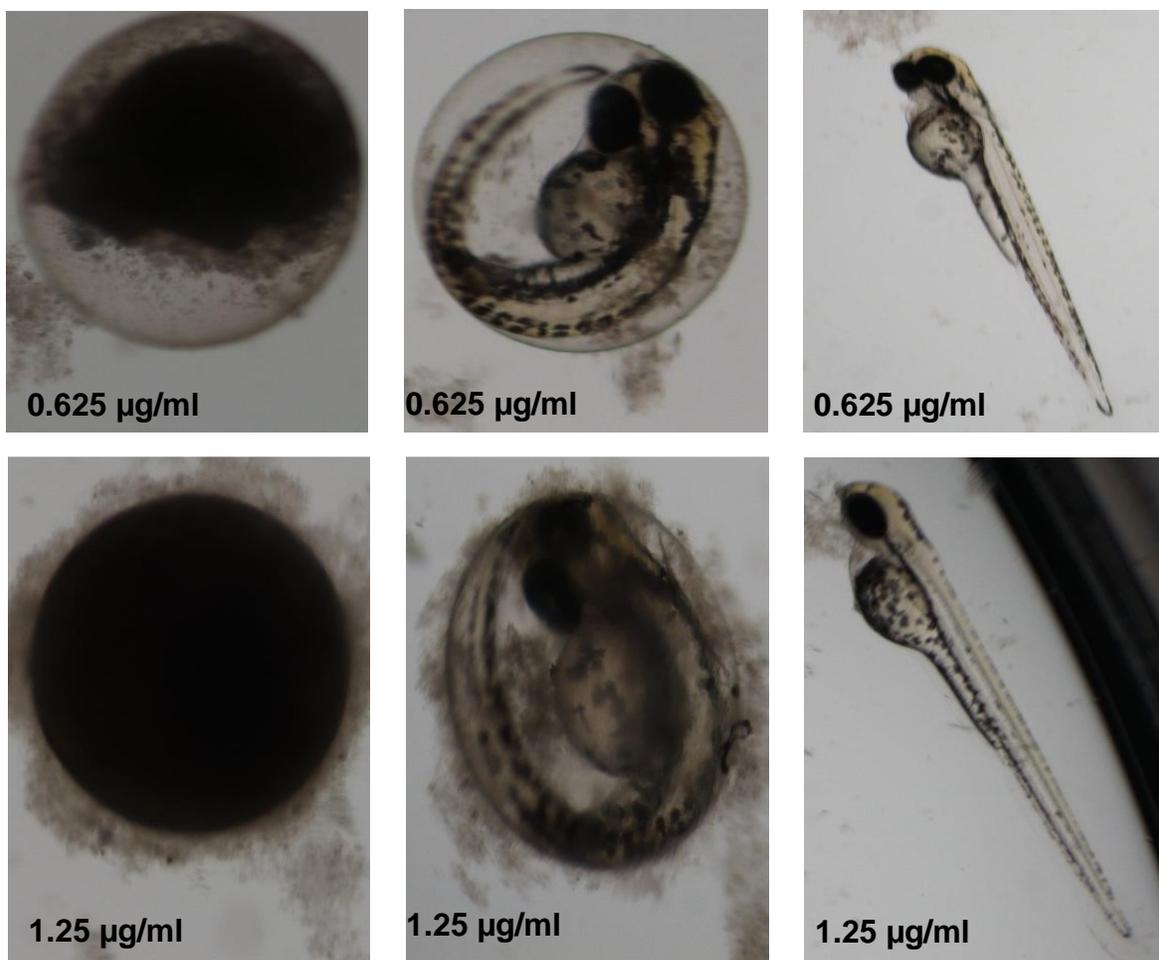


Figura 13 (continuación). Imágenes representativas de *Danio rerio* a 96 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26), en la primera columna se presentan a los embriones muertos, en la segunda a los que no eclosionaron y en la tercera a los embriones vivos.

A las 120 horas de exposición se observa un incremento significativo en la mortalidad (Figura 14) de los embriones respecto a las 96 horas de exposición a 1.25 ($p = 0.006$), 0.625 ($p = 0.003$) y 0.025 ($p = 0.043$) $\mu\text{g/ml}$, a 0.3135 $\mu\text{g/ml}$ no existe un aumento en la mortalidad ($p = 0.398$). La dosis de 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ no es significativamente distinta al control ($p = 0.357$) mientras que 0.3135, 0.625 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$ lo son ($p = 0.000$), no obstante, no existe diferencia entre estas, por lo que el efecto es alcanzado a 0.3135 $\mu\text{g/ml}$ con 96 horas de exposición y a 0.625 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$ a las 120 horas de exposición. Esto podría deberse a que a 0.3135 $\mu\text{g/ml}$ es más probable que las nanopartículas se acumulen en los canales del corion del embrión, los cuales poseen un diámetro de ~ 200 nm (44), siendo el mecanismo de muerte predominante, principalmente en estadios tempranos (45), esto se confirma con la Figura 13 y 16 en donde se observa que las dosis de 1.25 y 0.625 $\mu\text{g/ml}$ a las 120 horas de exposición afecta a peces que se han desarrollado.

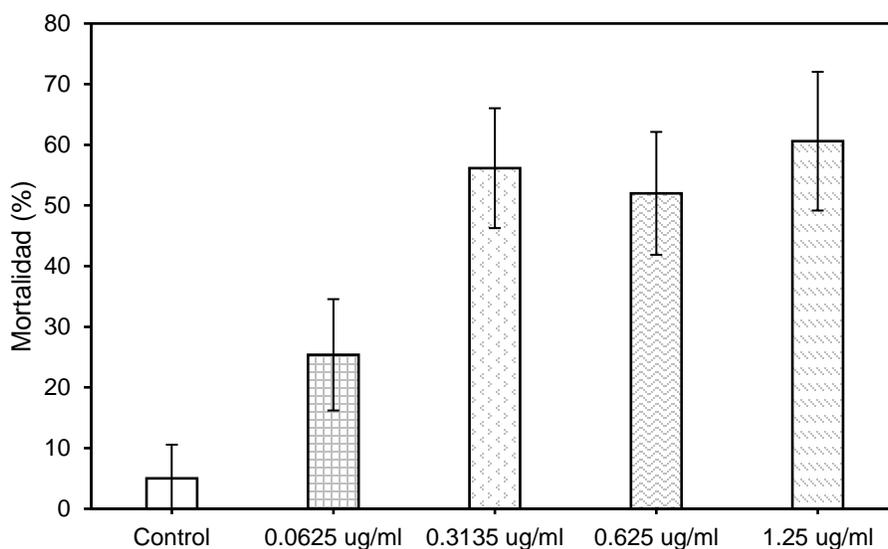


Figura 14. Mortalidad de *Danio rerio* a 120 hpf con nanopartículas de ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 26$) ($p = 0.000$).

En cuanto al porcentaje de eclosión a 120 horas de exposición (figura 15), no existen diferencias significativas con la exposición de 96 horas, se mantiene que 0.625 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$ inhiben significativamente la eclosión de los embriones con respecto al control ($p = 0.000$ para ambos) y 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0.000$ para ambos). No obstante, las dosis de 1.25 y 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ son significativamente distintas a 0.3135 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0.000$ y 0.001, respectivamente).

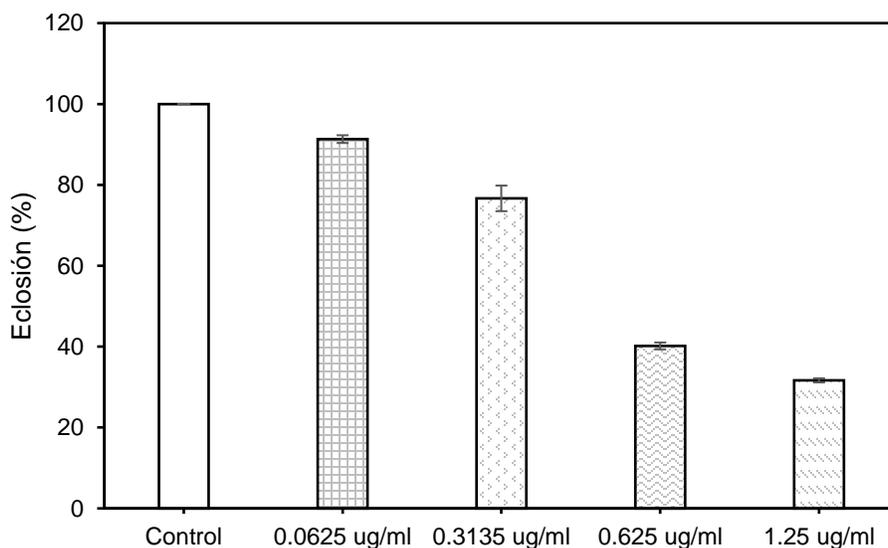


Figura 15. Eclosión de *Danio rerio* a 120 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 26$) ($p = 0.000$).



Figura 16. Imágenes representativas de *Danio rerio* a 120 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26), en la primera columna se presentan a los embriones muertos, en la segunda a los que no eclosionaron y en la tercera a los embriones vivos.

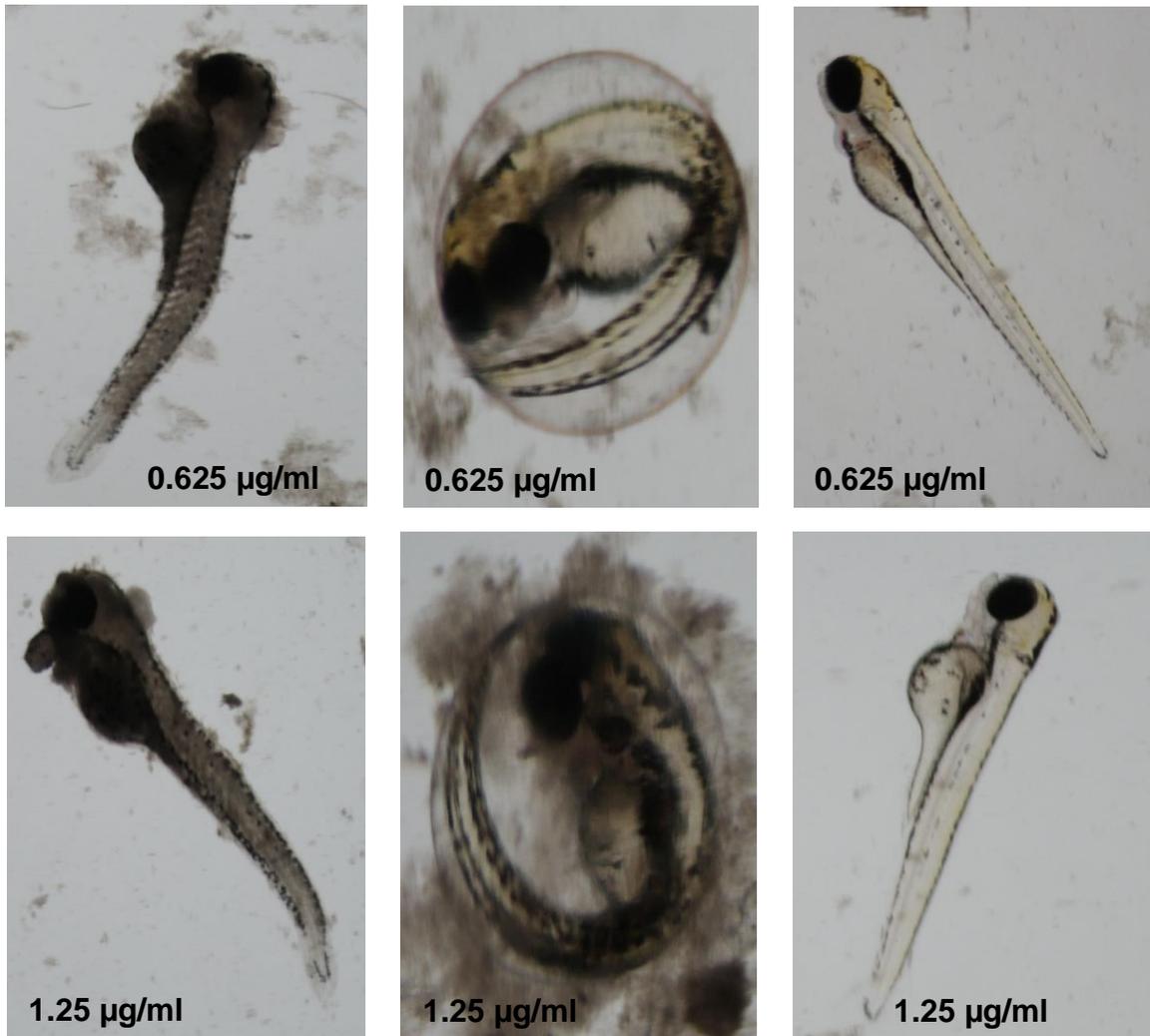


Figura 16 (continuación). Imágenes representativas de *Danio rerio* a 120 hpf con nanopartículas ZnO a concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 µg/ml (n = 26), en la primera columna se presentan a los embriones muertos, en la segunda a los que no eclosionaron y en la tercera a los embriones vivos.

Funcionalización polimérica de nanopartículas de ZnO

La funcionalización de las nanopartículas de ZnO se llevó a cabo adaptando el método de multicapas de Sousa *et al.* (34). En la Figura 18, el diámetro hidrodinámico promedio para las nanopartículas funcionalizadas con PAH es de alrededor de 20 nanómetros, excepto para las nanopartículas que fueron tratadas con una solución de 1.5 mg/ml de PAH, las cuales alcanzaron 38 nm de diámetro. Aunque el Pdl es variable, en el caso del tratamiento de 0.75 mg/ml, el Pdl es muy cercano a la nanopartícula sin funcionalizar, por lo que el recubrimiento con PAH a estas concentraciones sería óptimo. Por otro lado, las condiciones de 3, 2.25 y 1.5 mg/ml de PAH tienen valores de Pdl muy altos, por lo que se están generando agregados macrométricos, lo cual puede atribuirse a la mayor concentración de PAH, donde el exceso de este puede autoagregarse. En cuanto a las nanopartículas funcionalizadas con PSS, las tratadas con 7.5 mg/ml presentaron un diámetro hidrodinámico mayor a 100 nm, mientras que las demás condiciones presentaron tamaños mayores a 500 nm, por lo que no fueron graficadas. Esto podría deberse a que parte de la población de nanopartículas que presentan carga negativa se repelen con el polímero, mientras que la otra parte positiva puede unirse electrostáticamente al PSS, facilitando la formación de grandes agregados macrométricos. En cuanto a las nanopartículas tratadas con APTES, al igual que con PAH a 0.75 mg/ml, se obtuvo un tamaño y un Pdl muy cercano al de la partícula.

En la Figura 20 se observan las imágenes obtenidas por TEM de las nanopartículas recubiertas con 0.75 mg/ml PAH y 7.5 mg/ml PSS. En ambas se observan grandes agregados, los cuales pueden ser de nanopartículas con polímero. Sin embargo, en el caso del PSS debido a su estructura aromática (Figura 17) la densidad electrónica está principalmente localizada en su grupo funcional mientras que en PAH no. Esto podría explicar en principio la diferencia en las imágenes de la Figura 20.

Se decidió utilizar a las nanopartículas funcionalizadas con APTES debido a que el proceso de separación de las mismas es más sencillo y exhaustivo que el de las nanopartículas funcionalizadas con PAH.

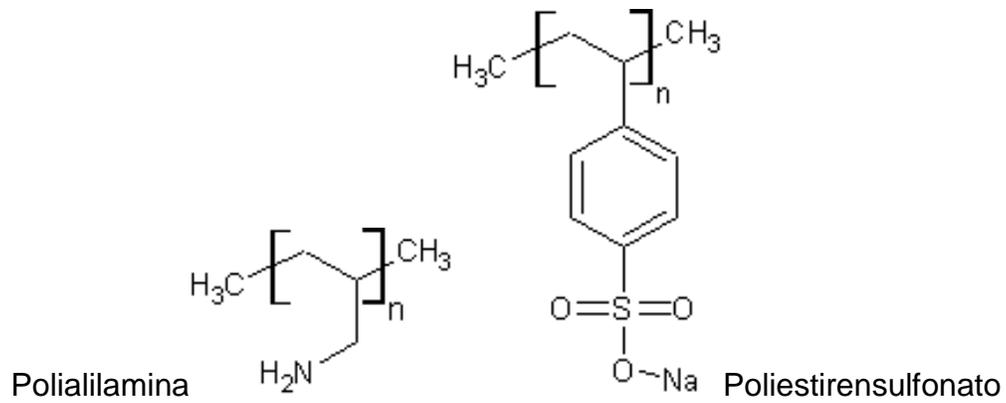


Figura 17. Estructuras de los polímeros polialilamina y poliestirensulfonato.

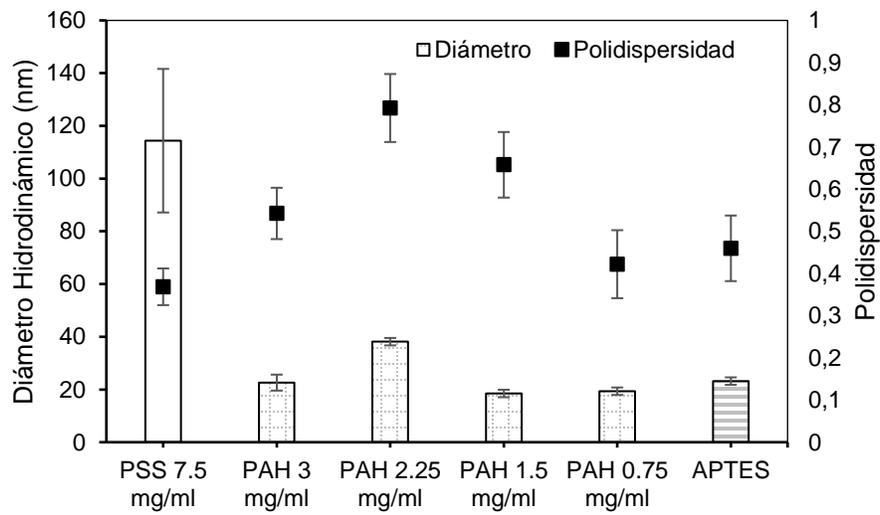


Figura 18. Diámetro hidrodinámico y Pdl promedio de las nanopartículas de ZnO funcionalizadas con poli-alilamina hidrocloreuro (PAH) 3mg/ml, 2.25 mg/ml, 1.5 mg/ml y 0.75 mg/ml, y sulfonato de poliestireno (PSS) 7.5 mg/ml y APTES (Diámetro p = 0.31, Pdl p = 0.003)

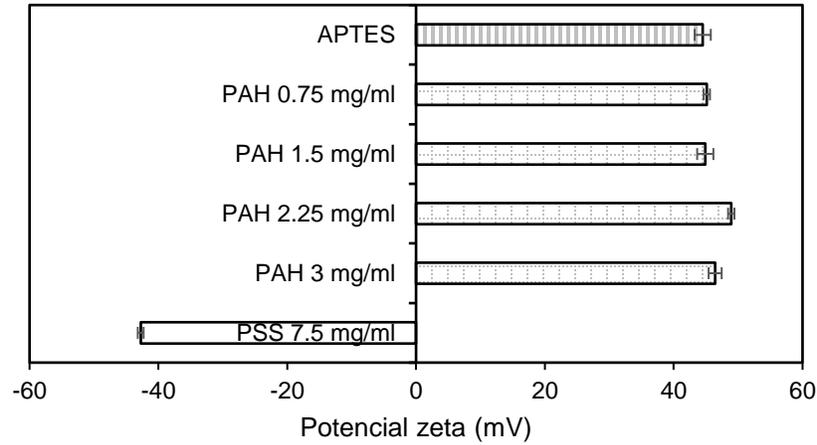


Figura 19. Potencial zeta de las nanopartículas de ZnO funcionalizadas con sulfonato de poliestireno (PSS) 7.5 mg/ml y poli-alilamina hidrocioruro (PAH) 3mg/ml, 2.25 mg/ml, 1.5 mg/ml y 0.75 mg/ml ($p < 0.05$).

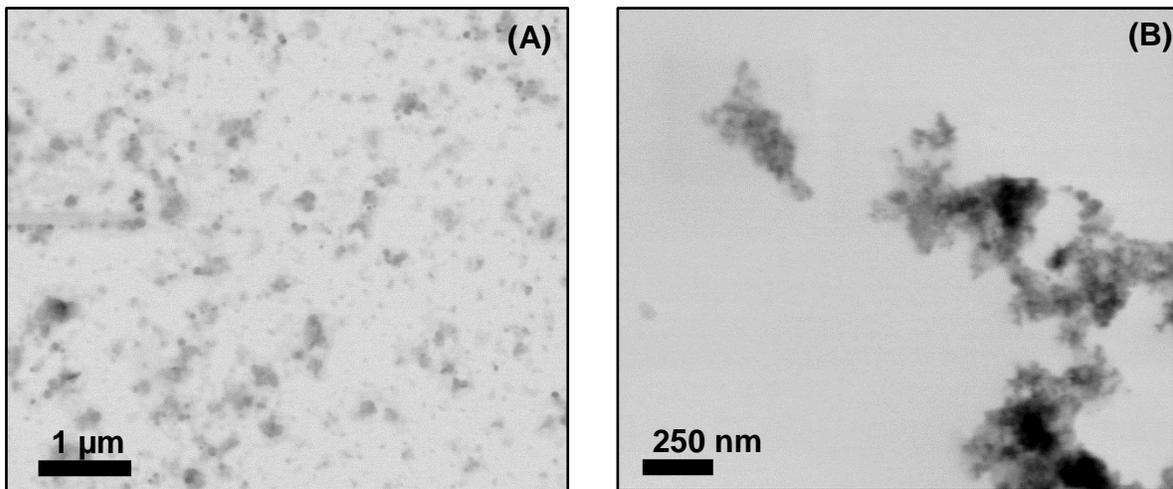


Figura 20. Imágenes TEM de nanopartículas de ZnO funcionalizadas con (A) 0.75 mg/ml PAH y (B) 7.5 mg/ml PSS.

Carga de curcumina

Las nanopartículas de ZnO y las nanopartículas de ZnO funcionalizadas con APTES (ZnO-NH₂) fueron utilizadas para cargar Curcumina a la superficie de la nanopartícula. En la Figura 21 se muestra el espectro de emisión de ZnO-NH₂ cargado con Curcumina, se observa que el pico de intensidad del espectro de la nanopartícula se encuentra disminuido, mientras que el de la curcumina prácticamente no se ve afectado, a este fenómeno se le llama *quenching*.

Se evaluó la eficiencia de carga de la nanopartícula de ZnO, ZnO-NH₂, ZnO a pH 7.4 y 5.5 (Figura 22), sin embargo, no existen diferencias significativas entre todos los grupos. Esto puede deberse a que el complejo formado entre la curcumina y las nanopartículas ayuda a estabilizar y mejora la solubilidad de la droga (28,46). La liberación de curcumina (Figura 23) fue realizada con ZnO sin funcionalizar a pH 5.5, 7.4 y con cambio de pH a las cuatro horas (de 7.4 a 5.5), además se estudiaron ZnO-NH₂ con cambio de pH a las cuatro horas (de 7.4 a 5.5). El estudio con cambio de pH se realizó para asemejar el ingreso del nanosistema al endosoma y posterior lisosoma de la célula tumoral, reservorio en el cual la nanopartícula debe disolverse para liberar a la curcumina al citosol. Se puede observar que ZnO y ZnO-NH₂ comienzan a liberar curcumina a las 4 horas, por lo que existe una respuesta inmediata al cambio de pH. Sin embargo, a las 20 horas en todas las condiciones se logra liberar ~90% de curcumina, sin haber diferencias significativas entre cada condición a tiempo final. Esto es esperable para las condiciones en el pH final que fueron de 5.5 ya que la nanopartícula se disolverá resultando en la liberación de curcumina. A pH 7.4 la curcumina fue liberada de la nanopartícula de a partir de las 6 horas lo que sugiere el complejo ZnO-CUR es de una limitada estabilidad a la temperatura fisiológica y tiempos de exposición prolongados.

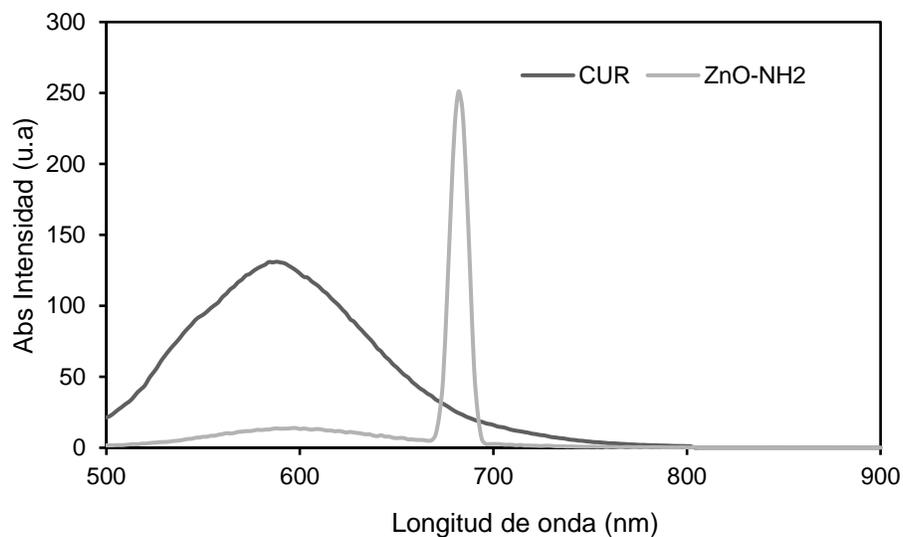


Figura 21. Espectro de emisión de la nanopartícula funcionalizada con APTES y cargada con curcumina. En negro el espectro de curcumina a 430 nm y en gris de la nanopartícula a 340 nm.

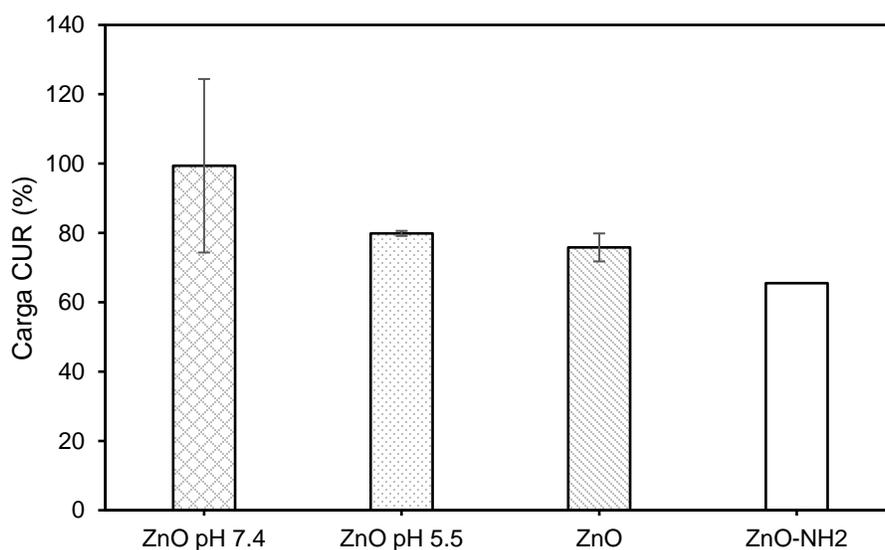


Figura 22. Eficiencia de carga de curcumina en nanopartículas de ZnO a pH 7.4, pH 5.5, ZnO sin funcionalizar con APTES y funcionalizadas con APTES (ZnO-NH₂) ($p = 0.404$).

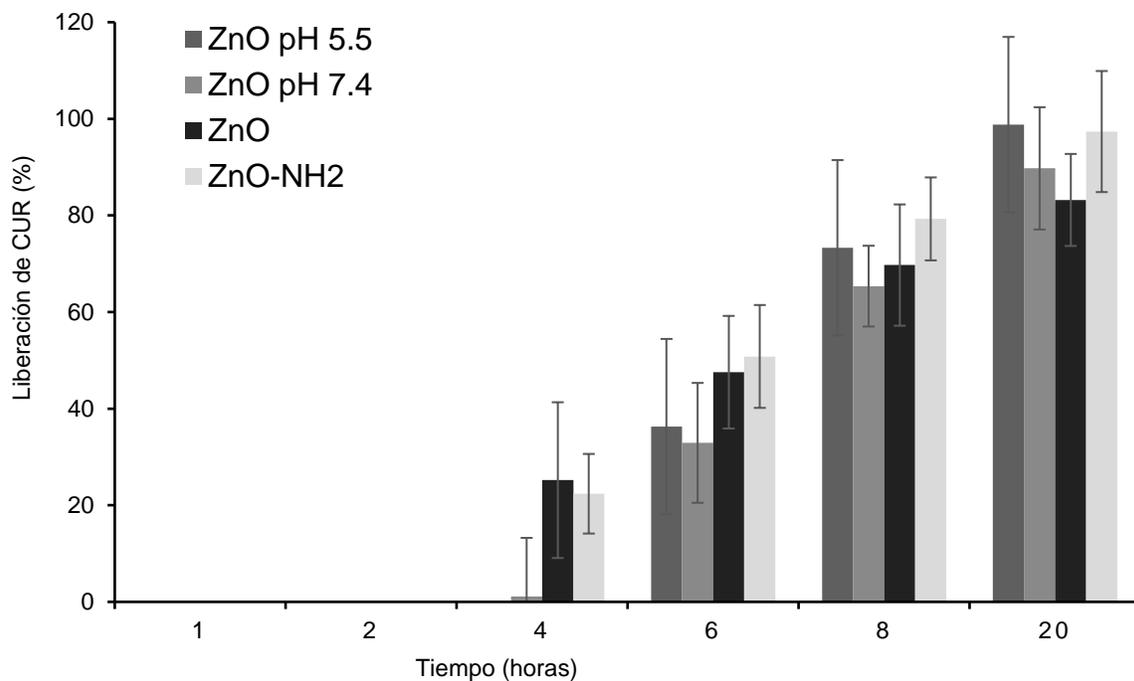


Figura 23. Liberación de curcumina con pH fijo a 5.5, 7.4 y con cambio de pH de 7.4 a 5.5 a las cuatro horas en ZnO y ZnO-NH₂ (p = 0.891).

DISCUSIÓN

El hígado presenta un gran desafío al desarrollar nuevos *nanocarriers*, puesto que su capacidad de retener a las nanopartículas está directamente relacionada con su metabolización y aclaramiento, en detrimento de los efectos terapéuticos. Se ha discutido que el tamaño de las nanopartículas va en relación directa con su eliminación, de esta forma aquellas con un tamaño sobre los 250 nm, son usualmente secuestradas por el bazo y fagocitadas, mientras que aquellas menores a 10 nm son removidas por extravasación y aclarado renal (47,48). No obstante, el principal mecanismo por el cual las nanopartículas son eliminadas por el hígado, es la opsonización de estas en circulación y posterior fagocitación por las células de Kupffer en el sistema retículo endotelial o sistema fagocítico mononuclear en las paredes de los sinusoides hepáticos (48,49).

Al ingresar a la circulación sanguínea o cualquier otro fluido biológico, las nanopartículas, o cualquier otro componente exógeno, son recubiertas por las proteínas presentes en aquel fluido, este recubrimiento se conoce como corona de proteínas (50). La opsonización de las nanopartículas depende de la corona de proteínas, y puede ser influenciada por distintas estrategias de recubrimiento de nanopartículas (49,51). Las partículas neutrales presentan una velocidad de opsonización más lenta que las partículas cargadas (52). Partículas cargadas positivamente, adsorben preferencialmente proteínas con puntos isoeléctricos menores a 5.5 (como la albumina), mientras que las negativas se unen a proteínas con punto isoeléctrico mayor a 5.5 (como IgG) (49). La hidrofobicidad de las nanopartículas también influencia en la velocidad de opsonización y la identidad de las proteínas unidas: las partículas más hidrofóbicas son opsonizadas más rápidamente que las hidrofílicas, debido a un aumento en la adsorbabilidad de las proteínas del plasma a la superficie de partículas hidrófobas (49,53). Entre más hidrofílicos sean los polímeros utilizados para recubrir a la nanopartículas, menor será la cantidad de proteínas adsorbidas (principalmente albúmina); mientras que los polímeros hidrofóbicos resultan en una adsorción preferencialmente por apolipoproteínas, albúmina, fibrinógeno e inmunoglobulinas, en menor medida

(49,54). La adsorción de opsoninas, como fibrinógeno, IgG, factor del complemento, etc. promueven la fagocitosis con remoción de las nanopartículas del flujo sanguíneo, mientras que la unión de disopsoninas, como albumina, apolipoproteínas, etc. promueven tiempos prolongados de circulación en la sangre (55).

Las nanopartículas de óxido de zinc han sido investigadas en las últimas décadas debido a su biocompatibilidad, bajo costo de producción y aplicaciones biomédicas tales como biosensores, *bioimaging* y *drug delivery* (56). En el presente trabajo se logró desarrollar nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio por el método de precipitación adaptado de Bang *et al.* (29). Debido a que no existieron diferencias significativas en el tamaño de las nanopartículas sintetizadas a 2, 3, 4 y 8 horas (Figura 3), las nanopartículas fueron clasificadas por el Pdl obtenido, este permitió reconocer dos poblaciones significativamente distintas: i) 2 y 3 horas de síntesis y ii) 4 y 8 horas de síntesis. El primero de baja agregación y el segundo de alta agregación. No obstante, lo anterior responde al bajo potencial zeta obtenido de ~ -2.0 mV, ya que según la teoría de DLVO la estabilidad de un coloide depende del equilibrio entre las fuerzas atractivas de van der Waals y las fuerzas de repulsión electrostáticas, de manera que un potencial zeta de ± 30 mV es necesario para mantener el sistema estable (36,57). En el caso de las nanopartículas, el potencial obtenido es muy pequeño, por lo que el sistema siempre va a tener a aglomerarse, lo cual explicaría los valores de Pdl obtenidos. La funcionalización de las nanopartículas podría corregir este problema.

Del ensayo toxicológico realizado en embriones de *Danio rerio* con concentraciones de 0.0625, 0.3135, 0.625 y 1.25 $\mu\text{g/ml}$ se desprende que las nanopartículas de ZnO:MgO inhiben la eclosión de los embriones a 1.25 y 0.625 $\mu\text{g/ml}$ a las 120 horas de exposición, por lo que su efecto es dependiente del tiempo, probablemente por acumulación de las nanopartículas en el corion (44,45). A su vez, el 50% de la mortalidad de los embriones es alcanzada a 1.25, 0.635 y 0.3135 $\mu\text{g/ml}$ con 120 horas de exposición, no obstante, a 1.25 y 0.625 $\mu\text{g/ml}$ el mecanismo de muerte de las nanopartículas es presuntamente distinto al de 0.3135 $\mu\text{g/ml}$, debido a que este último mata a los embriones en estadios tempranos por

acumulación en los canales del corion, mientras que las dosis más altas logran matar a embriones ya desarrollados. Debido a lo anterior, es necesario realizar más ensayos toxicológicos en los embriones de *Danio rerio*, para evaluar el efecto de la concentración y acumulación de las nanopartículas en los embriones y su efecto.

Para funcionalizar a las nanopartículas se emplearon dos principios, por interacciones electrostáticas en el caso de los polímeros, y químicamente en el caso de APTES. Debido a que el potencial zeta de las nanopartículas es muy pequeño y de acuerdo al perfil de distribución obtenido por el análisis realizado en el equipo Zetasizer de Malvern (información no mostrada), se asume que existen por lo menos dos poblaciones de nanopartículas, con carga superficial positiva y con carga superficial negativa. Es por lo anterior que se emplearon dos polímeros, PSS de carga negativa y PAH de carga positiva, sólo PAH mostró capacidad de adhesión a la nanopartícula. Sin embargo, la eliminación del polímero sin reaccionar es difícil de lograr por métodos convencionales, ya sea por no solvente o precipitación, es por ello que se decidió utilizar APTES para funcionalizar a las nanopartículas con una estructura de carga positiva. Debido a que la nanopartícula posee grupos hidroxilos superficiales, APTES se adhiere fácilmente a su superficie y las nanopartículas funcionalizadas pueden ser obtenidas fácilmente por centrifugación y lavados con agua, ya que el APTES sin reaccionar es hidrolizado mientras que el adherido a la nanopartícula es estable. La carga de curcumina se logró exitosamente en todas las condiciones en conjunto con la respuesta a pH por parte de ZnO y ZnO-NH₂, no obstante, no existe diferencias entre a las 20 horas, por lo que es necesario realizar más ensayos que determinen la interacción curcumina – ZnO:MgO y la estabilidad del complejo formado antes de continuar con antracilinas.

Finalmente, en el presente trabajo se logró desarrollar nanopartículas de ZnO:MgO funcionalizadas con APTES, las cuales poseen grupos aminos primarias en su superficie, que pueden ser conjugadas a distintas drogas antitumorales. Además, su efecto tóxico podría generar terapias con un efecto sinérgico sensible a pH tumoral.

CONCLUSIONES

Se desarrollaron nanopartículas de ZnO dopadas con magnesio sensibles a pH tumoral. Estas partículas lograron ser funcionalizadas exitosamente con APTES, generando una potencial plataforma de transporte de distintas drogas. Se determinó que las nanopartículas de ZnO:MgO son tóxicas en *Danio rerio*. Esto indicaría que futuros diseños podrían considerar estrategias de recubrimiento que permitan direccionar y proteger al nanosistema, y al mismo tiempo disminuir posibles efectos tóxicos periféricos antes de alcanzar el blanco terapéutico donde puedan exhibir un efecto sinérgico. Se logró cargar curcumina a las nanopartículas funcionalizadas con APTES y desnudas sin existir diferencia alguna incluso a pH 7.4, en donde la curcumina es insoluble, lo que sugiere la formación de un complejo nanopartícula – curcumina el cual mejora la solubilidad de esta última. Además, se logró liberar curcumina de manera dependiente de pH en concordancia con la disolución de las partículas de ZnO:MgO a pH 5.5, lo que es necesario para liberar a la droga en el citosol; no obstante, la cinética de liberación es similar entre todas las condiciones estudiadas. Estudios adicionales son necesarios para determinar la interacción y la formación del complejo entre fármaco y nanopartícula.

LIMITACIONES

La determinación matemática de la concentración de las nanopartículas incurre en aproximaciones inherentes del método, por lo que la relación entre concentración de exposición y el efecto tóxico de las nanopartículas podría estar estimado en un rango incorrecto.

PROYECCIONES

A partir de esta investigación, se podría pensar en el diseño de nanopartículas de ZnO:MgO que tengan un mayor control sobre la liberación de curcumina con el objeto de obtener un nanosistema sensible a pH tumoral y se podría evaluar la toxicidad de estas nuevas nanopartículas en modelos de cáncer de *Danio rerio*.

Por otro lado, en conjunto con el grupo de Paola Scavone y Luciana Robino del Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, hemos determinado que estas nanopartículas poseen una actividad *antibiofilm* en cepas uropatógenas *Proteus mirabilis*. Este hallazgo ha resultado en el diseño de un proyecto de investigación orientado a desarrollar nanopartículas funcionalizadas con fosfomicina y cefuroxima buscando un efecto sinérgico.

REFERENCIAS

1. Mirza AZ, Siddiqui FA. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *Int Nano Lett* [Internet]. marzo de 2014 [citado 3 de junio de 2018];4(1). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s40089-014-0094-7>
2. Rizvi SAA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm J*. enero de 2018;26(1):64–70.
3. Li Z, Tan S, Li S, Shen Q, Wang K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives. *Oncol Rep*. febrero de 2017;38(2):611–24.
4. Santos-Oliveira R, Albernaz M, Szwed M, Iscaife A, Leite K, Junqueira M, et al. Nanoradiopharmaceuticals for breast cancer imaging: development, characterization, and imaging in inducted animals. *OncoTargets Ther*. septiembre de 2016;Volume 9:5847–54.
5. Tran S, DeGiovanni P-J, Piel B, Rai P. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clin Transl Med* [Internet]. diciembre de 2017 [citado 5 de agosto de 2018];6(1). Disponible en: <https://clintransmed.springeropen.com/articles/10.1186/s40169-017-0175-0>
6. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J Controlled Release*. febrero de 2015;200:138–57.
7. Lin G, Mi P, Chu C, Zhang J, Liu G. Inorganic Nanocarriers Overcoming Multidrug Resistance for Cancer Theranostics. *Adv Sci* [Internet]. mayo de 2016 [citado 6 de noviembre de 2016]; Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/advs.201600134>
8. Tian G, Zheng X, Zhang X, Yin W, Yu J, Wang D, et al. TPGS-stabilized NaYbF₄:Er upconversion nanoparticles for dual-modal fluorescent/CT imaging and anticancer drug delivery to overcome multi-drug resistance. *Biomaterials*. febrero de 2015;40:107–16.
9. Zhang Q, Li F. Combating P-glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance Using Therapeutic Nanoparticles. *Curr Pharm Des*. 1 de septiembre de 2013;19(37):6655–66.
10. Schöttler S, Becker G, Winzen S, Steinbach T, Mohr K, Landfester K, et al. Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nat Nanotechnol*. 15 de febrero de 2016;11(4):372–7.

11. Schäffler M, Sousa F, Wenk A, Sitia L, Hirn S, Schleh C, et al. Blood protein coating of gold nanoparticles as potential tool for organ targeting. *Biomaterials*. marzo de 2014;35(10):3455–66.
12. Muhammad F, Guo M, Qi W, Sun F, Wang A, Guo Y, et al. pH-Triggered Controlled Drug Release from Mesoporous Silica Nanoparticles via Intracellular Dissolution of ZnO Nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 15 de junio de 2011;133(23):8778–81.
13. Cai X, Luo Y, Zhang W, Du D, Lin Y. pH-Sensitive ZnO Quantum Dots–Doxorubicin Nanoparticles for Lung Cancer Targeted Drug Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 31 de agosto de 2016;8(34):22442–50.
14. Shee K, Kono AT, D’Anna SP, Seltzer MA, Lu X, Miller TW, et al. Maximizing the Benefit-Cost Ratio of Anthracyclines in Metastatic Breast Cancer: Case Report of a Patient with a Complete Response to High-Dose Doxorubicin. *Case Rep Oncol*. 8 de diciembre de 2016;9(3):840–6.
15. Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine*. diciembre de 2007;2(4):567–83.
16. McGowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther*. febrero de 2017;31(1):63–75.
17. Shee K, Kono AT, D’Anna SP, Seltzer MA, Lu X, Miller TW, et al. Maximizing the Benefit-Cost Ratio of Anthracyclines in Metastatic Breast Cancer: Case Report of a Patient with a Complete Response to High-Dose Doxorubicin. *Case Rep Oncol*. 8 de diciembre de 2016;9(3):840–6.
18. Bar-Sela G, Schaffer RE and M. Curcumin as an Anti-Cancer Agent: Review of the Gap Between Basic and Clinical Applications [Internet]. *Current Medicinal Chemistry*. 2009 [citado 18 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/70722/article>
19. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2011;10(1):12.

20. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS J.* enero de 2013;15(1):195–218.
21. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm.* 2012;2012:1–10.
22. Mody V, Siwale R, Singh A, Mody H. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci.* 2010;2(4):282.
23. Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv.* septiembre de 2010;7(9):1063–77.
24. Bisht G, Rayamajhi S. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine.* 14 de diciembre de 2016;3:9.
25. Kołodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T. Zinc Oxide-From Synthesis to Application: A Review. *Mater Basel Switz.* 9 de abril de 2014;7(4):2833–81.
26. Mout R, Moyano DF, Rana S, Rotello VM. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2539.
27. Jo DH, Kim JH, Lee TG, Kim JH. Assessing Toxicity of Nanoparticles: In Vitro and In Vivo Assays. En: Aliofkhaezrai M, editor. *Handbook of Nanoparticles [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 6 de agosto de 2018]. p. 1–15. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-13188-7_41-1*
28. Sareen R, Jain N, Dhar KL. Curcumin–Zn(II) complex for enhanced solubility and stability: an approach for improved delivery and pharmacodynamic effects. *Pharm Dev Technol.* 29 de abril de 2015;1–6.
29. Bang J, Yang H, Holloway PH. Enhanced and stable green emission of ZnO nanoparticles by surface segregation of Mg. *Nanotechnology.* 28 de febrero de 2006;17(4):973–8.
30. Lewis DJ, Day TM, MacPherson JV, Pikramenou Z. Luminescent nanobeads: attachment of surface reactive Eu(III) complexes to gold nanoparticles. *Chem Commun.* 17 de marzo de 2006;0(13):1433–5.

31. Westerfield M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 3rd Edition. [Internet]. 1995 [citado 1 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://zfin.org/ZDB-PUB-970327-24>
32. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* julio de 1995;203(3):253–310.
33. Mandal S, Bonifacio A, Zanuttin F, Sergo V, Krol S. Synthesis and multidisciplinary characterization of polyelectrolyte multilayer-coated nanogold with improved stability toward aggregation. *Colloid Polym Sci.* 7 de diciembre de 2010;289(3):269–80.
34. Sousa F, Mandal S, Garrovo C, Astolfo A, Bonifacio A, Latawiec D, et al. Functionalized gold nanoparticles: a detailed in vivo multimodal microscopic brain distribution study. *Nanoscale.* 2010;2(12):2826.
35. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.* 6 de octubre de 2016;8(4):409–27.
36. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Controlled Release.* 10 de agosto de 2016;235:337–51.
37. Marsalek R. Particle Size and Zeta Potential of ZnO. *APCBEE Procedia.* 2014;9:13–7.
38. Liu P, Wang H, Chen J, Li X, Zeng H. Rapid and High-Efficiency Laser-Alloying Formation of ZnMgO Nanocrystals. *Sci Rep.* 21 de junio de 2016;6:28131.
39. Alias SS, Ismail AB, Mohamad AA. Effect of pH on ZnO nanoparticle properties synthesized by sol–gel centrifugation. *J Alloys Compd.* junio de 2010;499(2):231–7.
40. Kuznetsov AS, Lu Y-G, Turner S, Shestakov MV, Tikhomirov VK, Kirilenko D, et al. Preparation, structural and optical characterization of nanocrystalline ZnO doped with luminescent Ag-nanoclusters. *Opt Mater Express.* 1 de junio de 2012;2(6):723–34.
41. Sahai A, Goswami N. Probing the dominance of interstitial oxygen defects in ZnO nanoparticles through structural and optical characterizations. *Ceram Int.* 1 de noviembre de 2014;40(9, Part B):14569–78.
42. Kumar R, Gokulakrishnan N, Kumar R, Krishna VM, Saravanan A, Supriya S, et al. Can Be a Bimetal Oxide ZnO—MgO Nanoparticles Anticancer Drug Carrier and Deliver?

Doxorubicin Adsorption/Release Study. *J Nanosci Nanotechnol.* 1 de febrero de 2015;15(2):1543–53.

43. Lee MK, Kim MY, Kim S, Lee J. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: Effect of freezing rate. *J Pharm Sci.* diciembre de 2009;98(12):4808–17.

44. Böhme S, Baccaro M, Schmidt M, Potthoff A, Stärk H-J, Reemtsma T, et al. Metal uptake and distribution in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo: differences between nanoparticles and metal ions. *Environ Sci Nano.* 2017;4(5):1005–15.

45. Lee KJ, Browning LM, Nallathamby PD, Desai T, Cherukuri PK, Xu X-HN. *In Vivo* Quantitative Study of Sized-Dependent Transport and Toxicity of Single Silver Nanoparticles Using Zebrafish Embryos. *Chem Res Toxicol.* 21 de mayo de 2012;25(5):1029–46.

46. Zebib B, Mouloungui Z, Noirot V. Stabilization of Curcumin by Complexation with Divalent Cations in Glycerol/Water System. *Bioinorg Chem Appl.* 2010;2010:1–8.

47. Morales J, Sepulveda-Rivas S, Oyarzun-Ampuero F, Lavandero S, Kogan M. Novel Nanostructured Polymeric Carriers to Enable Drug Delivery for Cardiovascular Diseases. *Curr Pharm Des.* 7 de octubre de 2015;21(29):4276–84.

48. Tsoi KM, MacParland SA, Ma X-Z, Spetzler VN, Echeverri J, Ouyang B, et al. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. *Nat Mater.* 15 de agosto de 2016;15(11):1212–21.

49. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* junio de 2009;61(6):428–37.

50. Nguyen VH, Lee B-J. Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *Int J Nanomedicine.* abril de 2017;Volume 12:3137–51.

51. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci.* 23 de septiembre de 2008;105(38):14265–70.

52. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* junio de 2009;61(6):428–37.

53. Absolom DR. [13] Opsonins and dysopsonins: An overview. En: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1986 [citado 5 de noviembre de 2016]. p. 281–318. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687986320159>
54. Schäffler M, Semmler-Behnke M, Sarioglu H, Takenaka S, Wenk A, Schleh C, et al. Serum protein identification and quantification of the corona of 5, 15 and 80 nm gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 5 de julio de 2013;24(26):265103.
55. Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Baldelli Bombelli F, et al. Physical–Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2 de marzo de 2011;133(8):2525–34.
56. Zhang H-J, Xiong H-M. Biological Applications of ZnO Nanoparticles. *Curr Mol Imaging*. 1 de julio de 2013;2(2):177–92.
57. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop J Pharm Res* [Internet]. 9 de mayo de 2013 [citado 21 de junio de 2018];12(2). Disponible en: <http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/88556>