



FORMULACIÓN DE NANOMEDICINAS MULTIFUNCIONALES PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

**Departamento de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica
Universidad de Granada**

**Tesis doctoral
Eva Sáez Fernández
Granada 2011**



FORMULACIÓN DE
NANOMEDICINAS
MULTIFUNCIONALES PARA EL
TRATAMIENTO DEL CÁNCER

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

Tesis Doctoral

Eva A. Sáez Fernández

Granada, noviembre de 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Eva A. Sáez Fernández
D.L.: GR 1556-2012
ISBN: 978-84-9028-010-2

Agradecimientos

Aunque pueda parecer que dos años son poco, la verdad es que los he vivido con gran intensidad y me han permitido conocer gran parte de los entresijos de la investigación y trabajar codo con codo con grandísimos investigadores, sin duda se han convertido en una aventura maravillosa. Pero sobre todo me ha servido para saber que con trabajo y esfuerzo se pueden conseguir grandes resultados.

Entre las muchas satisfacciones que me ha aportado la realización de este trabajo destacaría el comprobar cómo aquello en lo que has estado trabajando muy duro puede llegar a tener una gran aplicación. Resulta sorprendente descubrir como un imán es capaz de atraer todas las nanopartículas presentes en un medio, y que en pocos segundos quede completamente transparente. La magia existe...

Y tras días de poco dormir, de dudas, de calentamientos de cabeza, de agobios y de mucha organización he llegado a la meta, y el resultado de ello ha sido la publicación de esta tesis doctoral.

El desarrollo de este trabajo no habría sido posible sin la ayuda incondicional de mis maestros, de mi familia, mis amigos y mis compañeros, a los que debo agradecer todo el apoyo y conocimiento que me han aportado a lo largo de esta etapa.

En primer lugar a mi maestro y gran amigo el Dr. José Luis Arias Mediano. Con él he aprendido muchísimo, me he reído y mutuamente nos hemos agobiado. Me ha ayudado día a día y me ha enseñado a tener una gran visión como investigadora. Gracias a él, comencé esta aventura, y la verdad es que te agradezco muchísimo la gran oportunidad que me has dado. Me ha demostrado como con trabajo y dedicación se pueden llegar hasta donde uno se proponga, y como un mal resultado, nunca es malo sino que refuerza el bueno que se obtiene a continuación. Muchísimas gracias por haberme aportado parte de tu sabiduría, por la ayuda y la paciencia que has demostrado, y por haber sido un gran maestro para mí.

A mi directora la Dra. Visitación Gallardo Lara, por haberme acogido con los brazos abiertos en este gran grupo de investigación, por su continua ayuda, seguimiento y orientación, que han sido también fundamentales en este periodo de formación. Muchísimas gracias por el apoyo constante y por haber estado cerca siempre que te he necesitado, y haber contado conmigo en multitud de proyectos.

A mi director el Dr. Ángel V. Delgado Mora, porque gracias a él he conseguido introducirme en el complejo mundo de la física y de las cinéticas, consiguiendo entender procesos que a priori presentaban gran complejidad, y que han sido mucho más sencillos gracias a su ayuda. Por estar siempre dispuesto a echarme una mano, aunque no fuese el momento más adecuada y la noche ya estuviese bien adentrada, por su paciencia y su ayuda incansable. Muchísimas gracias por todo.

No puedo olvidar a la Dra. Adolfinia Ruiz Martínez, por su cercanía a lo largo de este trabajo de investigación. Por acogirme sin reparo en el grupo de investigación, por la gran confianza depositada en mi desde

el comienzo. La ayuda incondicional, haber contado conmigo para los grandes proyectos y por haberme ayudado siempre que la he necesitado. Muchísimas gracias.

A la Dra. María Victoria Margarit por su gran ayuda en los ensayos de liberación de fármaco.

A las Dras. Margarita López-Viota, M^a Encarnación Morales y Beatriz Clares, por su desinteresada ayuda siempre que las he necesitado.

Por supuesto, no puedo olvidar a mis compañeros de viaje. A M^a José por acompañarme en las largas tardes de ensayos, por las risas y los grandes días de estrés minimizado; A Hermi por amenizar los días con sus risas; A Maca por los buenos momentos y enamoramientos; y el canal fiesta radio mañanero; A Rafa por haberse convertido en un magnifico compañero de viaje a lo largo de este último año y haberme dejado formar parte del maravilloso mundo de los liposomas, muchas gracias; a Rita, Begoña, Paula, Laura, Alfonso, Daniela, Bea, Cristina e Inma por haber formado parte de esta aventura. Gracias a todos por haber compartido conmigo estos momentos tan especiales.

A mis compañeros del Departamento de Física aplicada Julián, Raúl, Laura, Kasha... por amenizar las largas tardes de trabajo en Ciencias, y por estar siempre dispuestos a echarme una mano.

A Jesús, mi gran amigo y compañero, que me ayudó, apoyó y animó en el comienzo de este gran viaje, e hizo que los largos días de laboratorio fuesen mucho más llevaderos y al que he echado mucho de menos en esta parte final del recorrido.

A mi gran amigo Rafa, por haber sufrido conmigo cada uno de los momentos de esta aventura. Por estar siempre ahí cuando lo he necesitado, por ser una magnífica persona y un amigo excepcional, y animarme día a día. Muchísimas gracias.

A Andrea y a Luis, por haber compartido este último año de agobios envueltos entre cuadros, esquemas y diversión. Muchas gracias.

A mi prima Marina, por ayudarme con el diseño de la tesis.

Por último y no por ello menos importante, a mi familia. A mis padres, por haberme formado como persona, por el apoyo que me han dado siempre en todas mis decisiones, por enseñarme lo importante que es el trabajo y la constancia, y por haber sido unos padres excelentes. A mi hermano Manolo, por ser mi ejemplo a seguir, por ser un apoyo incondicional y saber que pase lo que pase siempre está y estará el primero, muchas gracias por todo. A mi hermana y a mi abuela, por todo vuestro apoyo y cariño. También a Trini y Kiko por haberme acogido en su familia como una hija más y haberme aconsejado siempre que les he dejado. Y a Guille por ponerle calma a los últimos meses de estrés.

A Alejandro, por haberme acompañado en los buenos y no tan buenos momentos de esta maravillosa aventura. Por haberme animado en los días de bajón y de estrés, por darme ánimo e intentar sacarme siempre una sonrisa que a veces se resiste. Por estar siempre a mi lado y haberme aconsejado en cada momento. Muchísimas gracias peque.

Esto es solo un pequeño homenaje a todos aquellos que en mayor o menor medida han aportado su granito de arena durante la realización de

esta tesis doctoral. Todos ellos han conseguido con su sabiduría, apoyo y confianza, darme las fuerzas suficientes para llevar a cabo esta tesis doctoral. Muchísimas gracias de todo corazón, por haber hecho estos dos últimos años inolvidables.

“Lo más importante es no dejar de interrogarse. La curiosidad tiene su propia razón de existir. Uno no puede evitar asombrarse cuando contempla los misterios de la eternidad, de la vida, de la maravillosa estructura de la realidad. Es suficiente si uno trata simplemente de comprender un poco de este misterio cada día. No hay que perder jamás la sagrada curiosidad.”

Albert Einstein

A mis padres Manolo y Alejandra
A mis hermanos Manolo y M^a del Mar
A Alejandro

ÍNDICE

| | |
|--|---------------|
| CAPÍTULO 1: Introducción | 1 |
| 1.1. Estrategias para el transporte selectivo de fármacos al lugar de acción..... | 4 |
| 1.1.1. Estrategias de transporte pasivo de fármacos..... | 5 |
| 1.1.2. Estrategias de transporte activo de fármacos..... | 8 |
| 1.1.3. Estrategias de transporte de fármacos a células tumorales resistentes | 29 |
| 1.1.4. Nanotoxicidad asociada al uso de nanoplataformas transportadoras de agentes antitumorales..... | 33 |
| 1.2. Coloides magnéticos y transporte de fármacos..... | 34 |
| CAPÍTULO 2: Contribución y objetivos del trabajo de investigación | 45 |
| 2.1. Contribución del trabajo propuesto..... | 45 |
| 2.2. Objetivos..... | 46 |
| CAPÍTULO 3: Formulación de nanoplataformas magnéticas multifuncionales | 51 |
| 3.1. Síntesis y estudio morfológico..... | 53 |
| 3.1.1. Magnetita | 53 |
| 3.1.2. Poli(ϵ -caprolactona)..... | 61 |
| 3.1.3. Nanopartículas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona)..... | 66 |
| 3.2. Estructura y composición química..... | 73 |
| 3.2.1. Difractometría de rayos X..... | 73 |
| 3.2.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier..... | 76 |

CAPÍTULO 4: Propiedades eléctricas superficiales 81

| | |
|--|-----|
| 4.1. Descripción clásica de la doble capa eléctrica..... | 84 |
| 4.2. Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta | 93 |
| 4.2.1. Electroforesis: teoría elemental..... | 94 |
| 4.2.2. Electroforesis: tratamientos más elaborados..... | 98 |
| 4.3. Metodología experimental..... | 100 |
| 4.4. Efecto del pH y de la fuerza iónica sobre la movilidad electroforética | 102 |
| 4.5. Mecanismo de formación del recubrimiento polimérico sobre los núcleos magnéticos..... | 107 |
| 4.6. Análisis electrocinético de la estabilidad del recubrimiento polimérico..... | 107 |

CAPÍTULO 5: Termodinámica superficial 111

| | |
|--|-----|
| 5.1. Interacciones superficiales..... | 114 |
| 5.1.1. Interacciones dispersivas..... | 114 |
| 5.1.2. Interacciones no-DLVO | 116 |
| 5.1.3. Contribuciones a la energía libre superficial. Teoría de van Oss, Good y cols. | 118 |
| 5.2. Metodología experimental..... | 123 |
| 5.3. Componentes de la energía libre superficial de las nanopartículas | 128 |
| 5.4. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba..... | 131 |

CAPÍTULO 6: Propiedades magnéticas 135

| | |
|-----------------------------------|-----|
| 6.1. Propiedades magnéticas..... | 137 |
| 6.2. Ciclo de histéresis | 139 |
| 6.3. Prueba <i>in vitro</i> | 146 |

CAPÍTULO 7: Capacidad de vehiculización de fármacos..... 151

| | |
|---|-----|
| 7.1. Principales características de los fármacos estudiados | 156 |
| 7.1.1. Agentes antitumorales: Doxorubicina y 5-fluorouracilo | 156 |
| 7.1.2. Agente antiinflamatorio: Diclofenaco sódico..... | 164 |
| 7.2. Espectrofotometría UV-Vis de las disoluciones de fármaco..... | 167 |
| 7.2.1. Absorbancia óptica de las disoluciones..... | 167 |
| 7.2.2. Factores experimentales condicionantes..... | 177 |
| 7.2.3. Validación del método espectrofotométrico..... | 190 |
| 7.2.4. Metodología espectrofotométrica para la determinación de la incorporación de fármaco en las nanopartículas..... | 203 |
| 7.3. Incorporación superficial de los fármacos en los coloides..... | 204 |
| 7.3.1. Determinación espectrofotométrica | 204 |
| 7.3.2. Análisis electrocinético | 210 |
| 7.4. Incorporación en matriz de fármaco | 214 |
| 7.4. Liberación de fármaco..... | 219 |

CAPÍTULO 8: Conclusiones 243

CAPÍTULO 9: Bibliografía 255

Capítulo 1.

Introducción

La necesidad de encontrar tratamientos eficaces contra el cáncer ha hecho que se incrementen las líneas de investigación oncológica. Esto ha permitido un mayor conocimiento de sus orígenes moleculares, con la consiguiente identificación de novedosas líneas terapéuticas y el desarrollo de un amplio arsenal de agentes farmacológicos. También estas nuevas moléculas son incapaces de llegar en cantidad suficiente al lugar donde se localiza el tumor y, por ello, no son suficientemente eficaces en la masa tumoral. Por estos motivos, el fracaso del tratamiento quimioterápico es muy frecuente incluso en los cánceres que son más sensibles a estos agentes. Un claro ejemplo lo constituye el uso del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado, con una respuesta global $\approx 10\%$. Además, la combinación de esta molécula con otros antitumorales sólo consigue mejorar la eficacia anticancerosa como mucho un 45 % más [Zhang y cols., 2008].

Uno de los principales factores responsables del fracaso de la quimioterapia es la propia fisiología del tumor. En concreto, la distribución heterogénea e ineficaz de estos fármacos en la masa tumoral es consecuencia de un aporte sanguíneo heterogéneo debido a la gran presión hidrostática intersticial. De esta manera queda impedida la distribución homogénea de los agentes antitumorales en el lugar de acción. Además, el sistema linfático a nivel tumoral no funciona bien, lo que facilita la rápida salida del fármaco del interior de la región tumoral y su dilución en tejidos sanos circundantes [Arias, 2011; Jain, 2001]. Otros factores relacionados con el fármaco que claramente contribuyen al fracaso del tratamiento farmacológico son [Allen y Cullis, 2004; Arias, 2008, 2011; Durán y cols., 2008; Pankhurst y cols., 2003]: *i*) una farmacocinética desfavorable (caracterizada por un rápido aclaramiento y una rápida biodegradación, es decir, una corta vida plasmática), que determina el uso de dosis altamente tóxicas y una rigurosa pauta de tratamiento para conseguir el efecto terapéutico deseado; *ii*) una extensa biodistribución, extravasación y acumulación del agente quimioterapéutico en

tejidos y órganos sanos, lo que determina una elevada toxicidad; *iii*) pobre selectividad de acción sobre las células tumorales; *iv*) la susceptibilidad de desarrollar resistencia a los anticancerosos por parte de las células tumorales; y, *v*) las propiedades fisicoquímicas desfavorables de los agentes antitumorales, por ejemplo, su hidrofobia, contribuyen también a la escasa acumulación en la región diana.

1.1. ESTRATEGIAS PARA EL TRANSPORTE SELECTIVO DE FÁRMACOS AL LUGAR DE ACCIÓN

Con el objetivo de solucionar estos problemas se han asociado antitumorales con sistemas coloidales para el tratamiento del cáncer [Arias, 2011; Reddy, 2005]. Esta asociación pretende aumentar la acumulación específica del fármaco en la zona tumoral e incrementar el tiempo de exposición de las células cancerosa a estos principios activos. Otros beneficios asociados a la vehiculización de los fármacos en sistemas coloidales son la mejora de su perfil farmacocinético y la disminución de la toxicidad asociada a éstos por inespecificidad de acción. Además, pueden lograr una protección adecuada de estas moléculas *in vitro* (en almacenamiento) e *in vivo* (frente a fenómenos de biodegradación), lo que reducirá la formación de productos de degradación potencialmente tóxicos [Arias, 2008; Davis y cols., 2008]. Es por ello que se están concentrando numerosos esfuerzos en el desarrollo de coloides, basados principalmente en sistemas vesiculares (liposomas y niosomas) o polímeros, para conseguir el transporte eficaz de cualquier antitumoral a la zona diana [Arias, 2011; Cho y cols., 2008]. Sin embargo, recientes investigaciones han probado que esta simple asociación no siempre resulta suficiente para lograr dirigir específicamente un fármaco a cualquier zona del organismo, más allá de los órganos pertenecientes al sistema retículo-endotelial [Couvreur y Vauthier, 2006; Reddy, 2005]. Es por todo esto que actualmente se están

realizando grandes esfuerzos de investigación (con resultados muy prometedores) para el desarrollo de sistemas transportadores de fármacos según novedosas estrategias de pasivo y activo [Arias, 2011].

1.1.1. ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE PASIVO DE FÁRMACOS

Nada más administrar un sistema coloidal, éste interacciona intensamente con el sistema retículo-endotelial (SRE) que determinará su retirada de la circulación sanguínea, a una velocidad que dependerá de su tamaño y de sus características superficiales. Los órganos del SRE son lugares importantes pero desfavorables para la acción de la mayoría de los agentes antitumorales, pudiendo generarse reacciones de citotoxicidad severa [Moghimi y cols., 2001]. En cualquier caso, el perfil de seguridad de un fármaco vehiculizado en un coloide suele ser mucho mayor que el correspondiente a su administración en solución intravenosa [Blagoeva y cols., 1992]. Sin embargo, debido a la corta vida media del coloide ($t_{1/2} \approx 5$ min), el acceso a tumores localizados en otras zonas del organismo no es posible. De esta manera, la utilidad de estos sistemas en la terapia del cáncer queda restringida a los tumores localizados en el SRE [Brigger y cols., 2002].

Sin embargo, recientes investigaciones han descrito el desarrollo de estrategias novedosas para el diseño de nanosistemas transportadores de fármacos, los cuales comienzan a posibilitar que las moléculas antitumorales alcancen localizaciones cancerosas más específicas [Arias 2011]. Entre ellas, las estrategias de transporte pasivo de moléculas anticancerosas se basan en las peculiaridades del intersticio tumoral [Gu y cols., 2007]. Estas son: *a*) un sistema de drenaje linfático afuncional, lo que origina una mayor retención de líquidos en el espacio intersticial; y, *b*) la mayor permeabilidad vascular de estos tejidos en comparación con los tejidos sanos.

Como se ha mencionado, el destino biológico de los sistemas coloidales inyectados se puede controlar ajustando su tamaño y sus características superficiales, a fin de lograr su acumulación específica en el tumor [Maeda y cols., 2009; Mitra y cols., 2001]. El

tamaño debe ser lo suficientemente grande como para que no haya extravasación a través de capilares sanos, pero lo suficientemente pequeño como para escapar del SRE. Esto permitirá que el coloide llegue al tejido tumoral (tamaño de poro entre células endoteliales de los capilares que lo irrigan: 100 – 600 nm). En cuanto a las características superficiales, cualquier vehículo transportador de principio activo debe tener una superficie lo más hidrófila posible para retardar su identificación por el SRE, mediante procesos de opsonización (adsorción superficial de opsoninas, un tipo de proteínas plasmáticas) y consiguiente captura por los macrófagos. Esto puede lograrse principalmente de dos maneras: *i*) recubriendo la superficie del coloide hidrófobo con un polímero hidrófilo (principalmente polietilenglicol, PEG); o, alternativamente, *ii*) el sistema transportador puede estar constituido por copolímeros con dominios hidrófilos e hidrófobos [Cho y cols., 2008; Couvreur y Vauthier, 2006; Patil y cols., 2009a]. Los sistemas transportadores que poseen ambas propiedades (tamaño nanométrico e hidrofilia), presentan un elevado valor de $t_{1/2}$, por lo que puede sufrir un proceso de extravasación selectivo o específico en aquellas zonas del organismo alteradas por una inflamación, una infección o un fenómeno de crecimiento tumoral. Esto permitirá dirigir el fármaco directamente a los tumores localizados fuera de las regiones del SRE. Este fenómeno se conoce con el nombre de efecto de permeabilidad y retención aumentada (*EPR*) y está basado, en el caso del cáncer, en la mayor permeabilidad de los capilares sanguíneos que irrigan el tumor, consecuencia de un crecimiento acelerado y defectuoso (figura 1) [Cho y cols., 2008; Decuzzi y cols., 2009; Maeda y cols., 2009; Moghimi y cols., 2001; Rapoport, 2007].

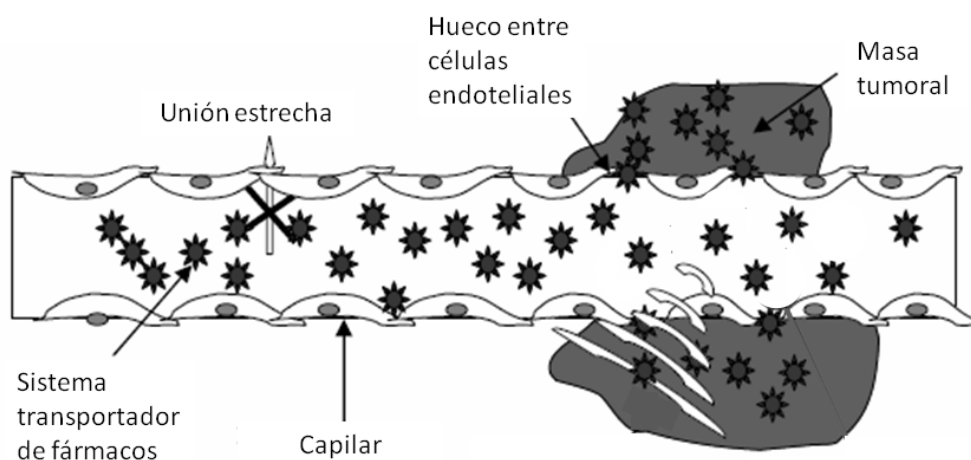


Figura 1. Extravasación selectiva de los nanosistemas transportadores de fármaco a través de los defectos existentes en la microvasculatura tumoral. El coloide sólo abandona la circulación sanguínea cuando alcanza esta zona capilar alterada. Adaptado de Rapoport, 2007. Copyright Elsevier (2007).

Puede decirse, por tanto, que los sistemas transportadores de fármacos anticancerosos cuya superficie está recubierta por cadenas hidrófilas exhibirán una marcada acumulación en la zona tumoral. La cadena hidrófila se dispone en la superficie de las partículas, principalmente por adsorción física o conjugación química, y será capaz de repeler a las opsoninas, retrasando así el proceso de opsonización [Cho y cols., 2008; Decuzzi y cols., 2009]. De hecho, recientes investigaciones han puesto de manifiesto que la incorporación de polímeros hidrófilos en la superficie de nanopartículas lipídicas permite prolongar significativamente su permanencia en el organismo ($t_{1/2} > 48$ horas) [Moghimi y Szebeni, 2003; Park, 2002]. La incorporación de restos de cadenas de PEG-2000 en la superficie de nanopartículas sólidas lipídicas cargadas con doxorrubicina (diámetro ≈ 100 nm) permite incrementar notablemente la $t_{1/2}$ del antitumoral en comparación con este fármaco administrado libre y con respecto a su vehiculización en nanopartículas que carecen de PEG-2000 en su superficie [Zara y

cols., 2002]. El incremento de $t_{1/2}$ también puede lograrse mediante el uso de fosfolípidos sintéticos (conjugados con gangliósidos) [Huwyler y cols., 2008]. Los liposomas que presentan cadenas de PEG en su superficie tienen un aclaramiento plasmático significativamente inferior a los convencionales (0.1 L/h frente a 22 L/h), una mayor área bajo la curva (AUC) (casi 100 veces más) y, debido a su escasa interacción con tejidos sanos tras su administración sistémica, un volumen de distribución 50 veces menor (de 200 L a 4.5 L) [Allen, 1994]. Esta estrategia de transporte de fármacos ha permitido incluso optimizar claramente la biodistribución y las propiedades farmacocinéticas de la doxorubicina en pacientes con gliomas [Hau y cols., 2004].

Se han desarrollado también sistemas transportadores de naturaleza polimérica para la administración selectiva de anticancerígenos. Por ejemplo, se han formulado nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) modificadas superficialmente con cadenas de óxido de polietileno (p. ej., pluronic[®] F-68 o pluronic[®] F-108), para el transporte de moléculas de Tamoxifeno hasta el tejido canceroso [Shenoy y Amiji, 2005]. Tras su administración intravenosa a ratones con tumores subcutáneos (línea de cáncer de mama humano MDA-MB-231), se observó una mayor acumulación del fármaco en el tumor (26 % más, 6 horas después de la inyección) en comparación con el fármaco administrado en solución.

1.1.2. ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE ACTIVO DE FÁRMACOS

Si bien las estrategias de transporte pasivo contribuyen al logro de una mayor localización de los fármacos en el lugar de acción, la especificidad por la masa tumoral puede no estar totalmente asegurada. De esta manera, se ha desarrollado un nuevo tipo de estrategias para lograr que sistemas transportadores *convencionales* se concentren selectivamente en la región cancerosa. Las estrategias de transporte activo persiguen que cualquier tipo de coloide incorpore en su superficie ligandos específicos de receptores propios de la superficie de las células tumorales. De forma alternativa, este tipo de estrategias también está basado en el diseño de nanopartículas de diferente

naturaleza pero con capacidad para responder a estímulos externos aplicados exclusivamente en el lugar de acción. En ambos casos, el nanosistema transportador logrará concentrarse totalmente en la región deseada y sólo allí liberará el fármaco antitumoral [Cho y cols., 2008; Couvreur y Vauthier, 2006; Önyüksel y cols., 2009; Reddy, 2005].

ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACO BASADAS EN INTERACCIONES LIGANDO-RECEPTOR

Los nanotransportadores diseñados según este tipo de estrategia cuentan en su superficie con biomoléculas que pretenden la unión de las nanopartículas a la célula y su posterior internalización por esta. Así se consigue la liberación selectiva del fármaco en la región deseada [Arias, 2011]. La unión específica del sistema coloidal a la célula diana (p. ej., célula tumoral, célula endotelial de los capilares sanguíneos que irrigan el tumor) se logra eficientemente mediante mecanismos de reconocimiento molecular (unión ligando-receptor, interacción antígeno-anticuerpo) [Brigger y cols., 2002; Decuzzi y cols., 2009]. Para ello, la superficie de la nanopartícula debe ser modificada mediante la adsorción química o física de anticuerpos monoclonales [Park y cols., 2001, 2002], integrinas [Hood y cols., 2002] o restos de folato [Lu y Low, 2002], por citar algunos ejemplos.

a.- Transporte mediado por anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son moléculas (para nuestros objetivos, aprobadas por la FDA) diseñadas para su interacción específica y unión con antígenos y receptores de las células cancerosas [Imai y Takaoka, 2006]. Un ejemplo muy representativo de nanopartículas modificadas superficialmente con anticuerpos lo constituyen los inmunoliposomas. Estos sistemas son liposomas conjugados con anticuerpos monoclonales mediante unión química de estos últimos con grupos polares del coloide (p. ej., restos de fosfolípidos o cadenas de PEG) [Maruyama y cols., 1995; Sapra y Allen, 2003]. Se ha propuesto recientemente el diseño de inmunoliposomas específicos

del factor de crecimiento epidérmico-2 (HER-2) presente en la superficie de muchas líneas de células tumorales. La utilización de estos liposomas con cadenas de PEG y moléculas de anticuerpos anti-HER-2 a nivel superficial, permite el tratamiento eficaz de fármacos antitumorales, mejorando claramente la eficacia terapéutica en diversos tipos de cáncer en comparación con los tratamientos control (fármaco en solución y liposomas con cadenas de PEG en su superficie) [Gao y cols., 2009; Park y cols., 2001, 2002]. Otro tipo de anticuerpo monoclonal ensayado es el 8D3, específico de los receptores de transferrina que algunas células tumorales presentan en su superficie, y que también se encuentra en gran cantidad a nivel de la barrera hematoencefálica (gen 83-14, específico de los receptores de insulina humana). Los liposomas diseñados con este tipo de anticuerpo han sido utilizados para el transporte de plásmido de ADN capaz de silenciar la expresión del gen oncogénico que codifica la síntesis del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR). En el estudio realizado se logró obtener un incremento de la tasa de supervivencia de ratones con glioma avanzado $\approx 90\%$, en comparación con los grupos controles [Zhang y cols., 2003].

Se ha propuesto también el diseño de nanoplataformas poliméricas con moléculas de anticuerpos monoclonales incorporados en su superficie para el transporte activo de fármacos antitumorales. En un reciente estudio se han diseñado nanopartículas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) con citoqueratina incorporada superficialmente, para el transporte de cistina en el tratamiento del cáncer de mama invasivo y metastásico [Kos y cols., 2009]. La citoqueratina es un anticuerpo monoclonal específico de las células epiteliales de cáncer de mama que, además, evita la formación de plasmina (proteína extracelular que contribuye al crecimiento de la masa tumoral). La cistina es un inhibidor de las proteasas extracelulares que neutraliza el exceso de la actividad proteolítica característica de las células de cáncer de mama.

b.- Transporte mediado por péptidos

La existencia de la secuencia RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) en determinados péptidos y macromoléculas peptidomiméticas constituye un sistema de reconocimiento importante para la adhesión celular, permitiendo que estas biomoléculas tengan una alta afinidad para la unión a las integrinas que se encuentran sobreexpresadas en la neovasculatura tumoral [Sun y cols., 2008]. Por lo tanto, es de esperar que al unir estas macromoléculas a un sistema transportador coloidal, se incremente la acumulación específica de éste en los vasos sanguíneos que irrigan la masa cancerosa [Schiffelers y cols., 2003].

El tipo de péptido a utilizar dependerá de la clase de integrina que se encuentre en la superficie de la célula tumoral. Por ejemplo, un reciente estudio ha demostrado que puede acrecentarse significativamente la actividad antitumoral de la doxorubicina mediante su vehiculización en nanopartículas del polímero inmulina-multi-metacrilato (IMMA) cuya superficie está modificada con péptidos de secuencia arginina-glicina-ácido aspártico- D-fenilalanina-cisteína [Bibby y cols., 2005]. Por otro lado, la modificación superficial de nanopartículas de albúmina con los péptidos CREKA y Lyp-1 ha permitido obtener una prometedora mejora en la actividad anticancerosa de paclitaxel en ratones con tumores subcutáneos inducidos en la línea celular MDA-MB-435 [Karmali y cols., 2009]. Se ha propuesto también el diseño de liposomas con cadenas de PEG y la secuencia peptídica PR_b localizadas a nivel superficial para el transporte de 5-fluorouracilo. La secuencia PR_b imita el dominio de adhesión de la fibronectina, lo que facilita la acumulación selectiva del coloide en las células de cáncer de colon que expresan a nivel superficial la integrina $\alpha_5\beta_1$ (p. ej., células tumorales TC-26). Esta interacción coloide-célula tumoral se traduce en un proceso de endocitosis de la nanopartícula y, así, una mayor acción citotóxica por parte del principio activo [Garg y cols., 2009].

Otro ejemplo muy interesante es la formulación de liposomas modificados superficialmente con el péptido PH1, el cual presenta una gran especificidad de unión

por las integrinas Tie2 [Mai y cols., 2009]. En este trabajo puede comprobarse que la vehiculización del antitumoral cisplatino en estas estructuras liposomales incrementa la actividad citotóxica de este principio activo sobre las células tumorales que presentan en su superficie la biomacromolécula Tie2. En otros trabajos se demostró que el diseño de nanopartículas de ácido poliglutámico modificadas superficialmente con el péptido H2009.1 (biomolécula que presenta una gran afinidad por los receptores de integrinas $\alpha_v\beta_6$) permite el transporte específico de doxorubicina a las células cancerosas que presentan abundantemente receptor en su superficie [Guan y cols., 2008]. Así, estos nanosistemas aumentan claramente la selectividad de la acción antitumoral de la doxorubicina, minimizando las reacciones adversas asociadas a su administración.

Las grandes posibilidades que ofrece esta estrategia de transporte activo han determinado su aplicación en terapia génica contra el cáncer. Numerosos estudios han demostrado que la utilización de sistemas coloidales modificados superficialmente con macromoléculas de tipo peptídico permite aumentar la eficiencia del proceso de transfección a células cancerosas de genes, secuencias de oligonucleótidos o porciones de ARN y ADN [Taratula y cols., 2009; Veisheh y cols., 2009]. Por ejemplo, una reciente investigación ha demostrado que la transfección del gen mutante RAF a células de nucleosoma (m21) mediante su vehiculización en liposomas poliméricos catiónicos modificados superficialmente con péptidos específicos de los receptores de integrinas $\alpha_v\beta_6$, que presentan estas células cancerosas a nivel superficial. Como resultado de esto se logra inhibir los procesos de angiogénesis que incrementan el aporte de nutrientes a la masa tumoral [Önyüksel y cols., 2009].

c.- Transporte mediado por aptámeros.

Los aptámeros son secuencias de ácidos nucleicos (oligonucleótidos de ADN o ARN), capaces de unirse selectivamente a determinados antígenos que se localizan en la superficie de las células tumorales. Estas biomoléculas se caracterizan por poder sintetizarse químicamente de forma muy sencilla y por presentar un pequeño tamaño. En oncología, los aptámeros pueden ser utilizados por sí mismos como agentes

antitumorales [Willis y cols., 1998], pero también pueden acoplarse a nanosistemas de transporte de fármacos para aumentar su especificidad por las células cancerosas [Levy-Nissenbaum y cols., 2008].

Por ejemplo, se ha comprobado que la eficacia de acción del antitumoral docetaxel puede mejorarse significativamente mediante su vehiculización en nanopartículas de PLGA modificadas con cadenas de PEG y con el aptámero A10 2'-fluoropiridina. Este aptámero de ARN es específico del antígeno PSMA muy presente en la superficie de las células de cáncer de próstata. En este estudio [Farokhzad y cols., 2006] se observó un incremento muy significativo en la citotoxicidad inducida en células LNCaP de cáncer de próstata, en comparación con la actividad desarrollada por las nanopartículas que carecían de este aptámero en su superficie ($p < 0.0004$). Además, todos los ratones con este tipo de tumor inducido y tratados con la formulación desarrollada estaban vivos al final del estudio (109 días), frente al 57 % de supervivencia señalada en los ratones tratados con las nanopartículas control, y al 14 % de supervivencia de los ratones tratados con una solución de docetaxel.

d.- Transporte mediado por receptores de ácido fólico y derivados.

Los receptores de folato son abundantes sobre la superficie de las células cancerígenas como consecuencia del incremento de sus necesidades de ácido fólico para la síntesis de ADN. La interacción de las moléculas de ácido fólico con el receptor de folato de las células tumorales conduce generalmente a un proceso de endocitosis que desemboca en una acumulación citosólica de estas moléculas [Lu y Low, 2002]. Este tipo de estrategias se ha propuesto no solo para el transporte activo de fármacos a la región tumoral, sino también para aumentar la eficacia de la fototerapia contra el cáncer y para mejorar la eficiencia de las formulaciones diseñadas para el diagnóstico del cáncer [Lai y Lee, 2009; Low y Kularatne, 2009; Pan y Feng, 2009]. Diversos estudios demuestran que los liposomas recubiertos de moléculas de folato logran aumentar la captación de los agentes quimioterápicos en diversos tipos de células tumorales, incrementando así la citotoxicidad de éstos [Esmaeili y cols., 2008; Gabizon y cols.,

2004; Kim y cols., 2005; Pan y Lee, 2005; Shmeeda y cols., 2006]. Además, se ha puesto de manifiesto la eficacia de esta estrategia de transporte incluso ante los fenómenos de resistencia a fármacos que desarrollan las células tumorales [Goren y cols., 2000].

Se ha comprobado que la vehiculización de doxorubicina en liposomas recubiertos de folato permite su mejor captación *in vitro* por células KB de carcinoma humano y por células HeLa de cáncer cervix [Gerasimov y cols., 1999]. Otro ejemplo lo encontramos en la vehiculización del profármaco antitumoral paclitaxel-2-caronilcolesterol en nanopartículas poliméricas [Stevens y cols., 2004], consiguiendo de esta forma un aumento de la eficacia del profármaco. También se ha utilizado en el diseño de nanopartículas de poli(etilenimina) para la terapia génica de gliomas [Liang y cols., 2009], así como en el diseño de nanopartículas de poli(alquilocianoacrilato) con moléculas de folato en superficie (en concreto, glucosilfosfatilinositol), para la mejora de actividad antitumoral de los agentes quimioterápicos en el tratamiento de gliomas [Stella y cols., 2000]. Para el transporte de paclitaxel se han diseñado: *a*) nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) modificadas superficialmente con moléculas de folato y cadenas de metoxi-PEG [Park y cols., 2005]; *b*) nanopartículas de poli(D,L-lactida) (PLA) que presentan en su superficie cadenas de PEG y ácido fólico (o biotina). Permitiendo una mayor acumulación *in vivo* en la masa tumoral (figura 2) [Patil y cols., 2009a].

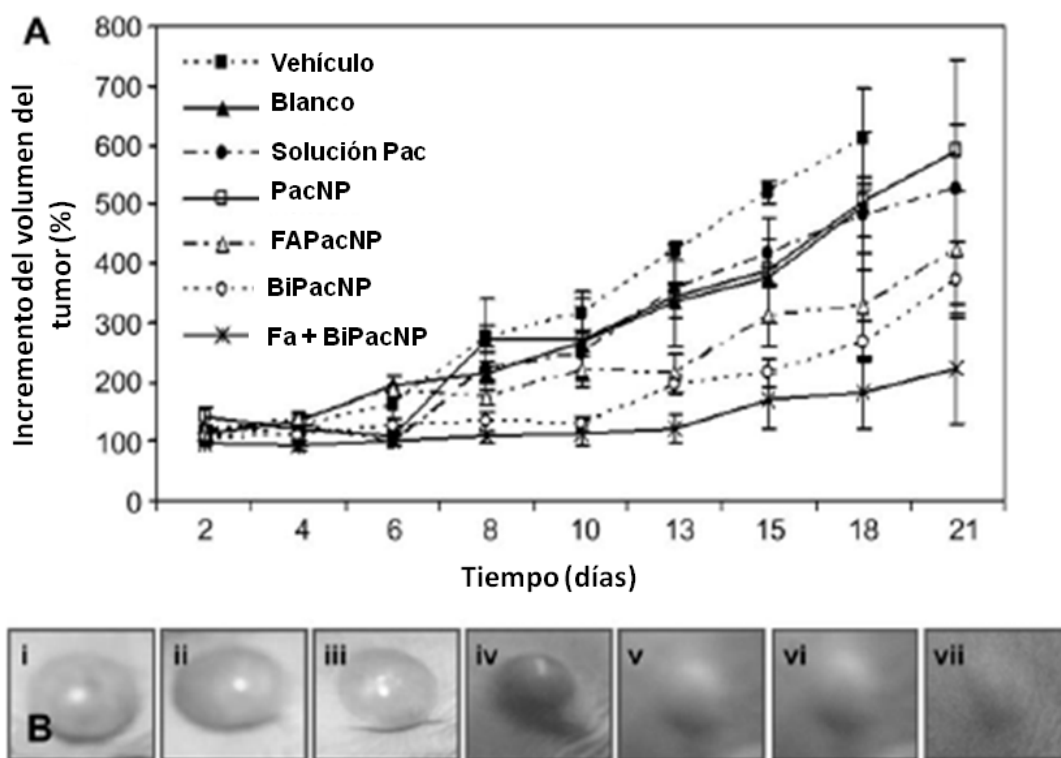


Figura 2. Eficacia antitumoral de nanopartículas de PLA cargadas con paclitaxel (Pac) y modificadas superficialmente con PEG y ácido fólico (FA), y/o con PEG y biotina (BI). Se trataron ratones NCR-UN con tumor subcutáneo inducido con células MCF-7 con una solución de Pac (solución Pac), las nanopartículas sin fármaco (blanco), agua bidestilada (vehículo), nanopartículas con fármaco (PacNP), nanopartículas con fármaco y modificadas con PEG y ácido fólico (FA Pac NP), nanopartículas con fármaco modificadas con PEG y biotina (BiPacNP), y nanopartículas cargadas con fármacos y modificadas con PEG, ácido fólico y biotina (FA + BiPac NP). En todos los casos la dosis de paclitaxel administrada es 20 mg/kg. (A) Evolución del volumen del tumor en función del tiempo (media \pm desviación estándar, $n = 6$). (B) Fotografía de la masa tumoral de un ratón de cada grupo de tratamiento: *i* vehículo, *ii* blanco, *iii* solución Pac, *iv* PacNP, *v* FAPacNP, *vi* BiPacNP, y *vii* FA + BiPacNP. Reproducido de Patil y cols., 2009a. Copyright Elsevier (2009).

e.- Transporte mediado por receptores de transferrina.

Los receptores de transferrina se localizan en gran cantidad en la superficie de una amplia gama de células cancerosas. Debido a la posibilidad de saturación de estos receptores como consecuencia de la existencia de transferrina endógena en plasma, se ha sugerido la administración de las nanopartículas modificadas superficialmente con esta biomolécula directamente en el interior de la región diana [Derycke y cols., 2004] o la incorporación de anticuerpos mononucleares específicos de estos receptores (p. ej., OX26 y TfRscFv) en la superficie de las nanopartículas [Hwang y cols., 2008]. La transferrina ha demostrado una actividad muy prometedora ante un tipo de mecanismo de resistencia a fármacos desarrollado por muchas células cancerosas y que está relacionado con la glicoproteína-P [Lemieux y Page, 1994]. La transferrina ha sido conjugada directamente con fármacos anticancerosos asegurando una mayor focalización de la acción de éstos [Singh y cols., 1998], y también con sistemas coloidales transportadores de fármacos para mejorar la biodistribución del fármaco transportado y lograr así una mayor acumulación de éste en el tumor y su liberación controlada [Sahoo y cols., 2004].

Un reciente estudio *in vitro* ha demostrado que la conjugación de transferrina con nanopartículas de PLGA cargadas con paclitaxel, origina una captación tres veces mayor de este fármaco por células de cáncer de próstata humano (PC3) en comparación con las nanopartículas poliméricas sin esta modificación superficial. Una simple inyección intratumoral de nanopartículas (dosis de paclitaxel: 24 mg/Kg) en animales con tumores subcutáneos inducidos con esta línea celular permite la completa regresión del tumor. Este tipo de nanopartículas también ha demostrado ser muy eficaz frente a la línea de células de cáncer de mama MCF-7 [Sahoo y cols., 2004; Sahoo y Labhasetwar, 2005]. Este tipo de estrategias también ha sido propuesto para el tratamiento de tumores localizados a nivel cerebral, ya que las nanopartículas así diseñadas atraviesan muy fácilmente la barrera hematoencefálica mediante transcitosis [Pardridge, 2002].

Finalmente ha permitido incluso mejorar la fototerapia antitumoral y el diagnóstico del cáncer mediante resonancia magnética de imagen [Li y cols., 2009a].

ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE ACTIVO DE FÁRMACOS BASADAS EN EL DISEÑO DE COLOIDES SENSIBLES A ESTÍMULOS DE DIFERENTE NATURALEZA

Los sistemas transportadores sensibles a estímulos tienen un diseño esencialmente polimérico o liposomal, que pretende sensibilizarlos frente a pequeñas modificaciones en su entorno, lo que provoca principalmente cambios muy rápidos en su estructura y propiedades físicas (p. ej., descomposición, hinchamiento, etc.) Estos cambios son reversibles y, por lo tanto, el material puede volver a su estado inicial tan pronto como desaparece el estímulo. Los estímulos responsables de este proceso pueden generarse en el interior del organismo (p. ej., cambios de pH en determinadas zonas del organismo o como consecuencia de procesos patológicos, cambios de temperatura, interacción con determinados sistemas enzimáticos, etc.). El estímulo responsable de la alteración de la nanopartícula puede tener también un origen externo (p. ej., gradientes magnéticos, campos eléctricos, luz, ultrasonidos, etc.). Esta estrategia de transporte activo de fármacos está basada en la interacción del coloide transportador con el estímulo debe producirse en la región diana, para que sea sólo aquí donde ocurra la liberación de las moléculas de fármaco. De esta manera, este se acumulará selectivamente en el tejido diana y podrá reducirse la incidencia y la severidad de las reacciones adversas asociadas a la extensa biodistribución del principio activo (figura 3). Con esta estrategia puede conseguir también la modulación de la duración e intensidad del efecto farmacológico [Arias 2011; Bawa y cols., 2009; Rapoport, 2007; Ulbrich y Šubr, 2004].

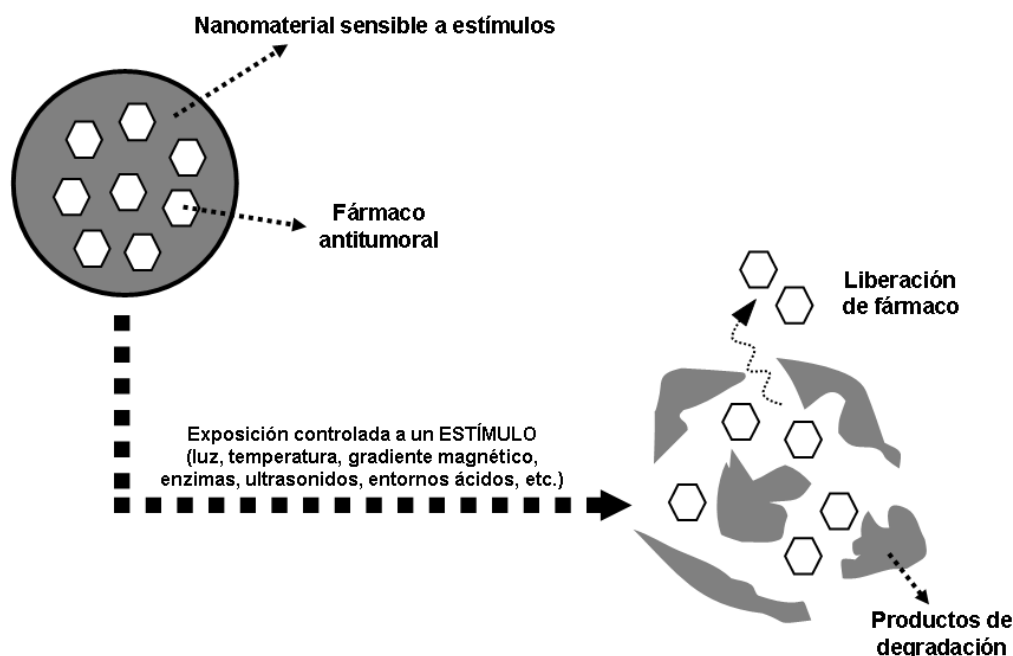


Figura 3. Liberación de un fármaco antitumoral activada por la exposición de la nanopartícula a un estímulo externo. La destrucción de la nanopartícula facilita la cesión de la dosis de fármaco vehiculado en el intersticio tumoral.

a.- Control del proceso de liberación de fármaco mediante cambios en el pH

Esta es, quizás, una de las estrategias más prometedoras para el transporte de fármacos hasta el tejido tumoral. Está basada en la utilización de materiales para la formulación de coloides que sean extremadamente sensibles a pequeños cambios de pH con respecto al sanguíneo ($\text{pH} = 7.4$). En la región tumoral existen alteraciones en el flujo sanguíneo y de tipo metabólico (p. ej., glicolisis aeróbica y anaeróbica), que provocan que el pH del intersticio tumoral sea ≈ 6.6 . De esta manera, el sistema transportador se enfrentará a un entorno ligeramente ácido al que es muy sensible, descomponiéndose y liberando al mismo tiempo el principio activo vehiculado. Cabe

esperar que este tipo de nanopartículas se distribuyan extensamente por el organismo y que sólo cuando alcancen la región de pH al que son sensibles, se destruyan, controlándose así la liberación de la dosis de fármaco vehiculizado [Hilgenbrink y Low, 2005; Jeong y cols., 2003; Lo y cols., 2005]. Una posibilidad alternativa dentro de esta estrategia es la utilización de sistemas transportadores (p. ej., liposomas) sensibles a un pH entre 4.5 y 5.0. Estos coloides tras su internalización por la célula tumoral mediante endocitosis, se degradarán en el interior de los lisosomas bajo la acción de este entorno ácido y de enzimas hidrolíticas como la catepsina B [Bawa y cols., 2009; Jain, 2001; Rapoport, 2007; Stubbs y cols., 2000;].

De forma general, los materiales poliméricos que son sensibles a pHs ácidos contienen grupos carboxílicos o sulfónicos, mientras que los sensibles a pHs básicos contienen en su estructura química sales de amonio. Todos estos grupos químicos son capaces de captar o ceder protones ante un cambio de pH determinado, lo que genera en la estructura de la nanopartícula cambios conformacionales que afectan a su solubilidad o inducen su hinchamiento y, finalmente, su destrucción. Los materiales de tipo iónico más ampliamente investigados en el diseño de sistemas transportadores sensibles al pH son polímeros del ácido metacrílico, del metacrilato de dietilaminaetil, del ácido acrílico y del metacrilato de (dimetilamina) etilo [Bawa y cols., 2009; Han y cols., 2003; Na y cols., 2003; Rapoport, 2007].

Por ejemplo, en un reciente estudio se ha utilizado un polímero basado en la polivinilpirrolidona y el anhídrido dimetilmaleico para desarrollar un sistema transportador del agente antitumoral adriamicina. La unión entre ambas estructuras químicas es muy sensible a ligeros descensos en los valores de de pH (de 7.4 a 6.6). Se ha descrito que la utilización de este coloide permite un notable incremento de la actividad antitumoral de la molécula en ratones con sarcoma 180, en comparación con la administración del fármaco en solución [Kamada y cols., 2004]. Por otro lado, la utilización de partículas de poli(L-histidina) modificadas con cadenas de PEG y restos de ácido fólico han permitido el transporte específico de doxorubicina *in vivo*. En

concreto, esta formulación permite solventar los fenómenos de resistencia a fármacos típicos de la línea celular A2780/DOX(R) y los problemas de toxicidad asociados al tratamiento con doxorubicina. En este trabajo se demostró que las nanopartículas se unen a las células tumorales a través de sus receptores de folato, lo que desencadena procesos de endocitosis y la subsiguiente degradación lisosomal, liberándose intracelularmente el fármaco transportado [Kim y cols., 2008a].

Otro tipo de copolímeros sensibles a cambios en el pH es el constituido por la poli (*N*-isopropilacrilamida) y el quitosán. Este material ha sido utilizado como sistema de transporte activo de paclitaxel, permitiendo una gran liberación de esta molécula cuando la nanopartícula entra en contacto con $\text{pH} < 6.9$ (típico de la región tumoral). La utilización de esta formulación en el tratamiento de ratones con tumores inducidos con células S-180-KM generó la regresión completa de la enfermedad en el 50 % de los casos [Li y cols., 2009b].

Por último, diversas investigaciones han demostrado que los sistemas liposomales sensibles a variaciones de pH permiten un mejor transporte de fármacos antitumorales hasta la zona diana, en comparación con liposomas convencionales y liposomas de liberación prolongada, gracias a sus propiedades fusogénicas [Cho y cols., 2008; Karanth y Murthy, 2007; Kim y cols., 2008b]. Este tipo de formulaciones (tamaño de partícula ≈ 150 nm) pueden ser también modificadas superficialmente con anticuerpos monoclonales del factor de crecimiento epidérmico, para ser utilizadas en la vehiculización del anticanceroso gemcitabina en el tratamiento de ratones con tumores inducidos mediante células A549 BALB/c-nu/un [Kim y cols., 2009]. Recientemente, se ha propuesto la formulación de inmunoliposomas sensibles a pequeñas reducciones del pH propio del entorno tumoral. Su estructura liposómica se encuentra conjugada con cadenas de *N*-isopropilacrilamida, que además se modifica a nivel superficial con anticuerpos monoclonales anti-CD33 específicos de líneas celulares de leucemia. Esta nanoplataforma presenta interesantes posibilidades en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda [Simard y Leroux, 2009].

b.- Control de los procesos de liberación de fármacos mediante cambios en la temperatura.

Los coloides elaborados con materiales termosensibles se caracterizan por sufrir un proceso de desestabilización/destrucción ante un ligero aumento de temperatura. Este comportamiento es típico de polímeros o hidrogeles que presentan grupos hidrófobos (p. ej., metilo, etilo y propilo). Se caracterizan por una temperatura crítica de disolución que, al superarse, determina su disolución y la consiguiente liberación del fármaco transportado. La poli(*N*-isopropilacrilamida) es quizás el polímero más estudiado para el diseño de este tipo de nanosistemas transportadores de fármaco, pues su temperatura crítica de disolución se encuentra muy próxima a la fisiológica. Es más, puede ajustarse fácilmente a ≈ 42 °C mediante la incorporación del monómero hidrófilo *N,N*-dimetilacrilamida. También se han estudiado otros polímeros termosensibles como la poli(*N*-(*I*)-1-hidroximetil-propilmetacrilamida), la poli(2-carboxi-isopropilacrilamida), la poli(*N*-acril-*N'*-alquilpiperacina), o la poli(*N,N'*-dietilacrilamida) [Bawa y cols., 2009; Rapoport, 2007].

En la terapéutica del cáncer, la hipertermia es una técnica muy interesante ya que permite aumentar la permeabilidad de la masa tumoral, facilitándose así la absorción de biomacromoléculas y coloides [Gaber y cols., 1996; Hauck y cols., 1997]. Incluso esta técnica ha demostrado cierta toxicidad *per se* sobre las células cancerosas [Dewhirst y cols., 1997]. La principal limitación de la hipertermia es la focalización de su acción exclusivamente a nivel de la masa tumoral sobre todo si se desconoce su ubicación [Kong y Dewhirst, 1999]. La técnica implica el calentamiento exclusivo de la masa tumoral, lo que induce un incremento del tamaño de poro en el endotelio de la microvasculatura que irriga el tumor e incluso un aumento del flujo sanguíneo en esta zona. Esto permite que el sistema transportador coloidal extravase de forma muy significativa y selectiva en esta zona. A una temperatura de 42 °C se observa el efecto máximo de esta estrategia: el tamaño de poro entre las células endoteliales que componen la pared de estos vasos sanguíneos pasa de ≈ 7 a 20 nm a más de 400 nm. De

esta forma, la hipertermia pretende lograr de forma simultánea el aumento de la permeabilidad de la microvasculatura tumoral a las nanopartículas, junto con la inducción de la liberación del agente quimioterápico por destrucción del coloide [Kong y cols., 2001]. Para ello, es muy importante definir la temperatura a utilizar y el tiempo de calentamiento.

En el tratamiento del cáncer mediante esta estrategia, las nanopartículas transportadoras de fármacos deben caracterizarse por una temperatura crítica de disolución por encima de la temperatura corporal (37 °C), en torno a 42 °C. Por ejemplo, se ha logrado diseñar liposomas capaces de alterar la estructura de su membrana lipídica ante un ligero incremento de la temperatura, lo que permite la liberación del principio activo vehiculizado de forma controlada y selectiva [Kong y cols., 2000; Needham y Dewhirst, 2001]. Se ha demostrado que la utilización de liposomas termosensibles estabilizados estéricamente con cadenas de PEG logran aumentar la acumulación de principio activo en el tumor, liberando más del 60 % de la dosis vehiculizada si se calienta la zona diana a 42 °C durante 30 minutos [Gaber y cols., 1996]. Una estrategia muy interesante para aumentar la termosensibilidad de los liposomas es la introducción de polímeros termosensibles en su estructura, p. ej., la poli(*N*-isopropilacrilamida) [Kono, 2001; Purushotham y Ramanujan, 2009; Shen y cols., 2008].

Uno de los tipos de coloides que más importantes aplicaciones presenta en hipertermia son las nanopartículas magnéticas. Su capacidad de respuesta a gradientes magnéticos facilita su acumulación selectiva en el lugar de acción. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas constituidas por un núcleo de magnetita (Fe_3O_4) recubiertas por dextrano-*g*-poli(*N*-isopropilacrilamida-*N,N'* dimetilacrilamida) logran aumentar claramente la liberación selectiva de doxorubicina en el tumor. En concreto, el calentamiento específico de este nanomaterial provoca la degradación del polímero y la liberación del agente antitumoral [Zhang y Misra, 2007]. Los geles magnéticos de poli(*N*-isopropilacrilamida) permiten la acumulación específica y la liberación controlada de fármaco mediante hipertermia [Ang y cols., 2007]. Se han formulado

también magnetoliposomas (magnetosomas) termosensibles para el transporte de metotrexato. La membrana lipídica de estos sistemas está constituida por 1,2 dipalmitoilglicero-3-fosfolina y colesterol y el procedimiento para su formulación es el método de evaporación con inversión de fases. Este trabajo señala que más del 80 % del fármaco vehiculizado era liberado cuando se incrementaba la temperatura de 37 °C a 41 °C. Además, describe un aumento significativo de la acumulación de metotrexato en el músculo esquelético de ratones, si se aplica un gradiente magnético y se calienta la zona a 41 °C [Zhu y cols., 2009].

Sin embargo, las aplicaciones de los óxidos de hierro superparamagnéticos en este campo no finalizan aquí ya que por sí mismos inducen la muerte de las células tumorales al generar calor en el interior del intersticio tumoral [Chan y cols., 1993; Kallumadil y cols., 2009; Tashjian y cols., 2008]. Cuando estos coloides entran bajo la acción de un campo magnético alterno de gran frecuencia (≈ 1 MHz), los rápidos cambios de orientación del momento magnético del nanomaterial, provocados por el campo alterno determina un fenómeno de calentamiento. Se ha descrito que este fenómeno es consecuencia de la pérdida de histéresis magnética de las nanopartículas [Gupta y Gupta, 2005; Huber, 2005; Ito y cols., 2005; Laurent y cols., 2008]. Los experimentos indican específicamente que la temperatura del espacio intersticial tumoral aumenta hasta $\approx 41 - 45$ °C, provocando daños irreversibles en las células cancerosas, lo que induce su destrucción [Glöckl y cols., 2006; Hergt y cols., 2006; Huber, 2005; Tanaka y cols., 2005]. Adicionalmente, el incremento de la temperatura en esta zona también provocará la desorganización de la estructura de la nanopartícula y, de esta forma, se producirá la liberación controlada del fármaco en la región tumoral [Steinkea y cols., 2007].

c.- Transporte de fármaco mediante la utilización de gradientes magnéticos

Por su capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados, los coloides magnéticos son capaces de llevar a los agentes quimioterápicos de manera específica al lugar de acción. Así, mediante un gradiente magnético se puede conducir un coloide

hasta el tumor diana, manteniéndolo concentrado en este lugar durante el tiempo preciso para que todo el fármaco vehiculizado sea liberado [Ciofani y cols., 2009]. Podríamos pensar que en la formulación de un sistema transportador magnético sólo es precisa la utilización de nanopartículas magnéticas, por ejemplo, óxidos de hierro (principalmente, magnetita o maghemita). Sin embargo, este tipo de materiales se caracteriza por una muy limitada capacidad de incorporación de principios activos, junto con una liberación de éstos excesivamente rápida [Arias, 2008; Arias y cols., 2001; Durán y cols., 2008]. A diferencia de éstos, los polímeros biodegradables y los liposomas tienen una notable capacidad para el transporte de fármacos (gran vehiculización, junto con una liberación lenta y controlable de fármaco gracias a su biodegradación). De esta forma, todas las investigaciones se centran en el desarrollo de nanoplataformas constituidas por un núcleo magnético, y por un recubrimiento biodegradable de origen polimérico o liposomal. El núcleo magnético facilitará la acumulación del coloide en el lugar diana en respuesta al gradiente magnético aplicado. Mientras que el material de recubrimiento [p. ej., liposoma, quitosán, poli(D,L-lactida-*co*-glicolida), poli(ϵ -caprolactona) o poli(alquilocianoacrilato)] mejorará la biodegradabilidad y biocompatibilidad de la nanoplataforma, y permitirá el transporte de principios activos [Durán y cols., 2008; Závřšová y cols., 2009]. Dado que el gradiente magnético disminuye con la distancia, la principal limitación de esta estrategia es asegurar la intensidad adecuada de éste para controlar la permanencia del coloide magnético en el lugar diana, o para activar la liberación del fármaco.

Para solventar este problema, se ha propuesto la implantación de pequeños imanes en el interior o las proximidades del lugar diana mediante cirugía menor [Arias, 2011; Fernández-Pacheco y cols., 2007]. El uso de implantes magnéticos en combinación con un gradiente magnético externo podría acrecentar aún más si cabe la acumulación de las nanoplataformas magnéticas en la zona tumoral [Fernández-Pacheco y cols., 2007; Rosengart y cols., 2005; Yellen y cols., 2005]. Una aproximación al problema propuesta recientemente pretende prolongar la permanencia del coloide magnético en el organismo y una mayor acumulación en la región diana. En concreto, consiste en

modificar la superficie de la nanopartícula magnética con ligandos específicos de receptores presentes en la superficie de las células tumorales [Lin y cols., 2009]. También se han propuesto este tipo de modificaciones para aumentar la selectividad de las nanopartículas magnéticas por la neovascularización tumoral [Reddy y cols., 2006; Tietze y cols., 2009; Zhang y cols., 2007].

d.- Control del proceso de liberación mediante la luz.

El diseño de materiales capaces de responder a estímulos luminosos (luz ultravioleta o visible) ha suscitado poco interés en los últimos años. Sin embargo, los sistemas transportadores de fármacos capaces de degradarse ante este tipo de estímulo (principalmente luz visible), liberando así el fármaco transportado, son realmente interesantes por su seguridad, bajo coste y fácil manipulación. Además, el estímulo luminoso puede ser administrado en cantidades bien definidas y de forma muy precisa [Bawa y cols., 2009; Bisby y cols., 2000; Rapoport, 2007; Shum y cols., 2001]. Sin embargo, a pesar de las interesantes posibilidades que ofrece esta estrategia, son necesarias más investigaciones para demostrar su eficacia en el transporte y la liberación controlada de fármacos quimioterápicos.

e.- Control mediante ultrasonidos

Esta estrategia está basada en que al exponer la región tumoral a la acción de los ultrasonidos, se logra la localización del coloide en esta región y, además, la liberación total de la dosis del antineoplásico en el espacio intersticial del tumor [Rapoport y cols., 2004]. Se considera que la utilización de ultrasonidos en esta estrategia de transporte de fármacos no es invasiva, ya que éstos tienen una muy adecuada capacidad de penetración corporal. El control de la localización de la acción de los ultrasonidos en el lugar deseado se logra ajustando parámetros como la frecuencia, la potencia o el tiempo de aplicación. La aplicación de ultrasonidos en la región tumoral provoca un incremento en la permeabilidad de los capilares sanguíneos que irrigan las células cancerosas, la

generación de energía térmica y la alteración de las membranas de estas células [Bawa y cols., 2009].

De forma general, se puede decir que el sistema transportador llega a la región tumoral gracias al efecto de EPR característico de la masa cancerosa (estrategias de transporte pasivo). Una vez localizado en esta zona, la captación del coloide por las células cancerosas se garantiza mediante la alteración con ultrasonidos de la permeabilidad de la membrana celular. Además, la nanopartícula también se degrada bajo la acción de éstos, liberando el principio activo [Gao y cols., 2004]. Esta técnica ha sido utilizada con gran éxito en el tratamiento de ratones con cáncer de colon resistente inducido por la implantación de células KM20. En este caso el sistema coloidal utilizado para el transporte de 5-fluorouracilo estaba constituido por nanopartículas de poliestireno [Larina y cols., 2005].

En un estudio recientemente publicado se investigó la utilización de liposomas cargados con cisplatino y modificados superficialmente con cadenas de PEG, en combinación con ultrasonidos de baja frecuencia (≈ 20 kHz). Esta estrategia se utilizó en el tratamiento de ratones con tumores inducidos en la cavidad intraperitoneal con células de linfoma C26. Las nanopartículas fueron administradas en el lugar diana y, una hora después, se sumergía la zona tumoral en un dispositivo lleno de agua donde se encontraba una sonda de ultrasonidos. En el caso del tratamiento de los mismos ratones pero con el tumor localizado en una extremidad posterior, 24 horas después de la administración del coloide, el tumor era sumergido en un baño termostatzado a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se aplicaban los ultrasonidos de baja frecuencia. En ambos casos, los ultrasonidos tenían una intensidad de 5.0 W/cm^2 y se aplicaban de 60 a 120 segundos de forma continuada, según las características de la piel. Así, se observó que $\approx 70\%$ de la cantidad de cisplatino vehiculizada por los liposomas se acumulaba selectivamente en el tumor gracias a la acción de los ultrasonidos, a diferencia de la casi nula ($< 3\%$) acumulación de fármaco obtenida en ausencia de este estímulo. Como consecuencia de todo esto, se obtuvieron mejores resultados terapéuticos en el grupo de ratones que se benefició de

esta estrategia: regresión del tumor en un menor periodo de tiempo (figura 4). Puede concluirse que los ultrasonidos de baja frecuencia están especialmente indicados en el tratamiento de tumores superficiales (p. ej., piel, cabeza, cuello y cánceres ginecológicos). Sin embargo, los ultrasonidos de elevada frecuencia son más adecuados en el caso de tumores localizados en estructuras más internas del organismo [Schröder y cols., 2009].

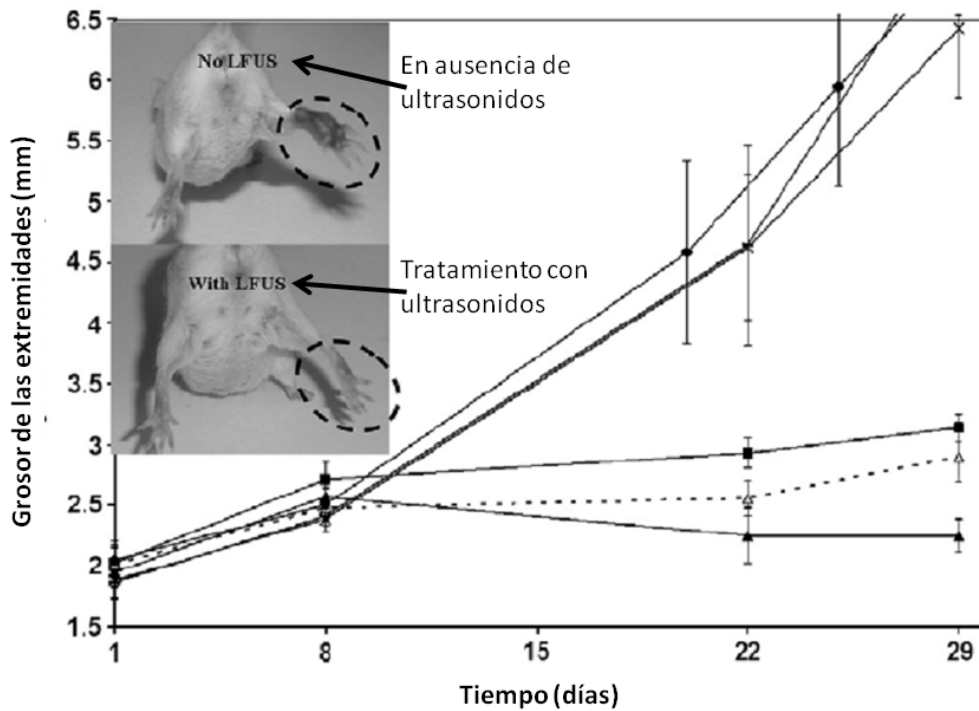


Figura 4. Actividad antitumoral (grosor de la extremidad en mm: media \pm desviación estándar) de diferentes tratamientos en ratones BALB/c con tumor subcutáneo C26: (i) grupo control (imagen superior izquierda de la figura, \blacklozenge); (ii) grupo placebo: solución salina + ultrasonidos de baja frecuencia (5.9 W/cm^2 , 60 segundos, -); (iii) grupo tratado con cisplatino vehiculizado en liposomas y sin aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia (\times); (iv) grupo tratado con cisplatino vehiculizado y con aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia (imagen inferior izquierda de la figura, \blacktriangle); (v) grupo tratado con una solución de cisplatino y sin la administración de ultrasonidos de baja frecuencia ($-\Delta-$); grupo tratado con una solución de cisplatino + ultrasonidos de baja frecuencia (\blacksquare). Imágenes insertadas: extremidad posterior de un ratón tratado con liposomas cargados con cisplatino sin (arriba) y con (abajo) la utilización de ultrasonidos de baja frecuencia. Tras 29 días, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.006$) entre la actividad antitumoral lograda en los ratones pertenecientes al grupo (iv) y los alcanzados en el resto de grupos de tratamiento. Reproducido de Schroeder y cols., 2009. Copyright Elsevier (2009).

f.- Control del proceso de liberación de fármaco mediante la utilización de enzimas

Esta estrategia está basada en que las enzimas presentes de forma natural en la región tumoral pueden provocar la liberación del fármaco vehiculizado desde el sistema transportador. En concreto, si el coloide es degradable por las enzimas que se encuentran en la región tumoral, al llegar al espacio intersticial del tumor será detenido por las enzimas y liberará específicamente al agente quimioterápico en la zona diana [Meers, 2001]. Una de las principales aplicaciones de esta estrategia es el transporte activo de fármacos antitumorales en el cáncer de colon [Bawa y cols., 2009].

En un reciente estudio se ha comprobado que nanopartículas de albúmina logran transportar eficientemente el antitumoral doxorubicina hasta la masa cancerosa, lugar donde son degradadas por 2-metaloproteasa, liberando el principio activo [Cho y cols., 2008].

Se ha propuesto también la utilización de liposomas en este tipo de estrategia de transporte activo por su susceptibilidad a la fosfolipasa A2. Esta enzima se encuentra en gran cantidad en el intersticio tumoral y es capaz de hidrolizar los lípidos de la membrana de los liposomas [Andresen y cols., 2004; Andresen y cols., 2005]. En el momento en que los liposomas se extravasan desde la circulación sanguínea al espacio intersticial de la zona tumoral, estas enzimas las degradan y activan la liberación específica del fármaco en la región diana. Otras enzimas que han sido propuestas para esta estrategia son la fosfatasa alcalina [Davis y Szoka, 1998], la transglutaminasa [Zhang y cols., 2002] y la fosfatidilinositol-fosfolipasa C [Villar y cols., 2000].

1.1.3. ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS A CÉLULAS TUMORALES RESISTENTES

Uno de los obstáculos principales que limitan la eficacia de los agentes quimioterápicos es el desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia por las células cancerosas, a pesar de las altas dosis utilizadas. Para que la quimioterapia sea eficaz, es

preciso que la estrategia de tratamiento sea capaz de sobreponerse a los mecanismos de resistencia de tipo celular y fisiológico característicos de la masa tumoral. No debe olvidarse que todo esto se suma a los problemas farmacocinéticos de la mayoría de los fármacos antitumorales.

La masa cancerosa se caracteriza por un flujo sanguíneo muy irregular y una alta presión hidrostática, factores que dificultan una adecuada difusión de los agentes quimioterápicos en el espacio intersticial. Además, el entorno ligeramente ácido del intersticio tumoral dificulta la actividad de fármacos eminentemente básicos (los cuales se encontrarían ionizados, impidiéndose su extravasación desde la circulación sanguínea). En cuanto a los mecanismos de resistencia a fármacos desarrollados por las células malignas, éstos son principalmente la inhibición de los fenómenos de apoptosis celular, el aumento de los mecanismos de expulsión de fármaco desde el espacio intracelular, la reducción de la absorción celular de fármacos y el aumento en los mecanismos de reparación del ADN y de desintoxicación celular. Se puede decir que el fenotipo celular de resistencia a fármacos antitumorales es generalmente el resultado sinérgico de la combinación de diferentes mecanismos de resistencia [Brigger y cols., 2002; Gottesman y cols., 2002; Jabr-Milane y cols., 2008].

En un intento de solventar estas limitaciones, se ha propuesto la vehiculización de agentes antitumorales en coloides [Kim y cols., 2008b]. Se pretende así evitar que el fármaco quede expuesto a los diferentes mecanismos de resistencia que minimizan su entrada en la célula cancerosa, prolongando además su residencia a nivel intracelular. Un buen diseño de la nanopartícula podrá combatir de forma simultánea cada uno de los mecanismos de resistencia expresada por la célula cancerosa (p. ej., la utilización del fármaco como falso sustrato de la glicoproteína-P, principal mecanismo de expulsión) mientras asegura un transporte eficaz de la dosis de agente anticanceroso al interior celular. Para ello, el sistema transportador diseñado debe: *i*) evitar una rápida eliminación por el SRE, mediante la modificación de su superficie con moléculas que le aporten una protección estérica (p. ej., cadenas de PEG); *ii*) vehiculizar diferentes tipos

de agentes quimioterápicos en grandes dosis; y *iii*) garantizar la máxima concentración posible de fármaco en el intersticio tumoral y la mayor absorción intracelular [Jabr-Milane y cols., 2008].

Uno de las principales materiales para el diseño de nanoplataformas con capacidad para vencer los mecanismos de resistencia desarrollados por las células cancerosas son los copolímeros anfifílicos. Estos materiales están constituidos por un polímero hidrófilo conjugado con otro hidrófobo, y tienen la capacidad de interaccionar con la membrana celular para alterar diferentes funciones celulares. En concreto, se ha sugerido que estas micelas poliméricas son capaces de alterar la respiración mitocondrial, la síntesis de ATP, los mecanismos de expulsión de fármacos como la glicoproteína-P, la transducción de señales de apoptosis y la expresión génica [Batrakova y Kabanov, 2008]. Incluso se ha propuesto que este tipo de copolímeros puede facilitar el transporte de fármacos anticancerosos a través de la barrera hematoencefálica y de las membranas de absorción intestinales, así como la activación de procesos de transcripción durante la expresión génica. Por ejemplo, la actividad antitumoral de la doxorubicina puede acrecentarse de forma muy significativa en el tratamiento de pacientes con cáncer de esófago avanzado, si se vehiculiza en estas micelas copoliméricas. Esta interesante acción podría ser consecuencia de su capacidad para inhibir la glicoproteína-P y de mejorar la señalización proapoptótica en las células cancerosas [Sharma y cols., 2008].

Recientemente, se han diseñado liposomas modificados superficialmente con moléculas de transferrina y cargados con doxorubicina y el fármaco inhibidor de la glicoproteína-P verapamilo. Esta nanoplataforma es capaz de aumentar la concentración de doxorubicina en el interior de células cancerosas resistentes, aumentando así la actividad antitumoral de esta molécula [Wu y cols., 2007]. Otra aproximación muy interesante es el diseño de nanopartículas de PLGA modificadas superficialmente con cadenas de PEG y biotina, para el transporte de paclitaxel y del inhibidor de tercera generación de la glicoproteína-P tariquidar. Esta nanoplataforma permite incrementar de

forma muy marcada la actividad antitumoral de paclitaxel en células malignas resistentes [Patil y cols., 2009b]. Otra forma de inhibir las bombas de expulsión de fármacos antitumorales (principalmente la glicoproteína-P) es utilizando oligonucleótidos antisentido en el diseño de estas nanoplataformas [Pakunlu y cols., 2006].

El diseño de inmunoliposomas permite dirigir de forma muy eficaz la dosis de principio activo hasta la membrana plasmática de las células cancerosas, y promoviendo la endocitosis celular de la nanopartícula [Suzuki y cols., 1997]. Incluso se ha investigado el diseño de inmunoliposomas dirigidos contra la glicoproteína-P [Mamot y cols., 2003; Matsuo y cols., 2001]. Por ejemplo, se han formulado liposomas modificados superficialmente con el anticuerpo monoclonal MRK-16 (específico de la glicoproteína-P) para el transporte de vincristina. En este estudio, se observó que la citotoxicidad ejercida por el agente antitumoral en una línea de células de leucemia mieloide era muy superior a la desarrollada cuando este fármaco era vehiculizado en liposomas sin esta modificación superficial. Se comprobó que esto era debido a la inhibición ejercida de la glicoproteína-P por el anticuerpo monoclonal MRK-16 [Matsuo y cols., 2001]. Otros estudios demuestran que la vehiculización de paclitaxel en nanopartículas de PLGA modificadas superficialmente con cadenas de PEG y moléculas de transferrina, incrementa marcadamente la acción antitumoral de este principio activo en células BT4C de glioma. La actividad anticancerosa es muy superior a la obtenida con las mismas nanopartículas sin modificación superficial y a la obtenida con Taxol[®] (solución de paclitaxel) [Pulkkinen y cols., 2008].

Como hemos comentado previamente, la vehiculización de fármacos antineoplásicos y agentes moduladores del umbral de apoptosis en el mismo coloide ofrece posibilidades muy interesantes en el tratamiento de algunos tipos de cáncer resistentes. Por ejemplo, se han diseñado nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) modificadas superficialmente con cadenas de PEG como sistemas transportadores de paclitaxel y de ceramida. Estas nanoplataformas multifuncionales son capaces de

incrementar significativamente la actividad antineoplásica de paclitaxel en líneas resistentes de células de cáncer de ovario [van Verklen y cols., 2007].

Otra estrategia muy interesante contra líneas celulares resistentes es el desarrollo de coloides sensibles a pHs ligeramente ácidos. Por ejemplo, se han formulado copolímeros de poli(L-histidina)- β -PEG-folato y poli(D,L-lactida)- β -PEG-folato como sistemas para el transporte de doxorubicina. Una vez que el coloide se fija a la superficie de la célula cancerosa mediante interacciones entre los restos de folato de su superficie y los receptores de estos ligandos localizados en la membrana celular, se produce la internalización de las micelas y su degradación en el medio ligeramente ácido intracelular (pH = 6.8). Así, los valores de viabilidad celular son mucho menores ($\approx 20\%$) en comparación con la administración del fármaco en solución ($\approx 85\%$) [Lee y cols., 2005].

1.1.4. TOXICIDAD ASOCIADA AL USO DE NANOPLATAFORMAS TRANSPORTADORAS DE AGENTES ANTITUMORALES

Uno de los aspectos más importantes en el diseño de una nanoplataforma antitumoral es garantizar su biocompatibilidad. Para ello, son necesarios numerosos estudios sobre la toxicidad de los materiales empleados en su formulación, la compatibilidad de las partículas con la sangre, y la interacción de los productos de biodegradación de la nanoplataforma con el sistema inmune [Dash y cols., 2010; Kunzmann y cols., 2011; Lynch y Dawson, 2008].

Los sistemas coloidales biocompatibles deben presentar unas propiedades físicoquímicas adecuadas en cuanto a geometría (forma y tamaño), y estructura y composición química [Maaßen y cols., 1993; Schütt y cols., 1997]. La biocompatibilidad de estos nanosistemas depende también de la cantidad administrada (masa por célula o cm^3), de la cantidad interiorizada por las células (masa por célula), de la vía de administración, y de la biodegradabilidad, farmacocinética y biodistribución

del coloide [Arias y cols., 2001; Fischer y Chan, 2007; Grainger, 2009; Shubayev y cols., 2009].

Los productos de biodegradación deben ser eliminados del organismo en el menor tiempo posible. Debe vigilarse también que estos productos no estimulen la liberación de mediadores de la inflamación en el organismo [Arruebo y cols., 2007; Karlsson y cols., 2009]. La realización de ensayos preclínicos y clínicos debe poner de manifiesto la baja toxicidad de la formulación coloidal [Ibrahim y cols., 1983; Lübbe y cols., 1996a, b; Müller y cols., 1996; Sunderland y cols., 2006].

Sin embargo, la mayoría de los estudios que se realizan tienen como principal objetivo el análisis de la actividad antitumoral de estas nanoplataformas. Muy pocos prestan atención a las reacciones de toxicidad asociadas a estos nanosistemas en el organismo. Por lo tanto, puede afirmarse claramente que son necesarios estudios exhaustivos para poder aclarar la relación existente entre las características físicoquímicas de los nanotransportadores y su comportamiento *in vivo*. Solo así se podría evaluar la respuesta tóxica provocada por las nanopartículas, y establecer modelos experimentales para definir la toxicidad de los coloides transportadores de fármacos [Fischer y Chan, 2007; Grainger, 2009; Lynch y Dawson, 2008; Shubayev y cols., 2009].

1.2. COLOIDES MAGNÉTICOS Y TRANSPORTE DE FÁRMACOS

La variedad y versatilidad de los métodos de síntesis de coloides para el transporte de fármacos determinan un gran potencial para el diseño de nuevas formas de dosificación que mejoren la farmacoterapia actual. Cada vez son más los materiales propuestos y las estrategias que permiten su modificación para mejorar el transporte y la liberación controlada de principios activos [Arias, 2011; Arruebo y cols., 2007; Fischer

y Chan, 2007; Grainger, 2009; Lynch y Dawson, 2008; Service, 2005; Shubayev y cols., 2009]. Los coloides magnéticos son probablemente los sistemas que más interesantes posibilidades ofrecen con estos fines. De forma general, este tipo de nanopartículas está constituido por un núcleo magnético (principalmente de óxido de hierro) englobado en una matriz orgánica (p. ej., polímero, polisacárido o almidón) o inorgánicos (p. ej., sílice). Las características del coloide pueden modificarse fácilmente mediante un procedimiento de síntesis adecuado, para así controlar su geometría, capacidad de humectación (hidrofilia/hidrofobia), carga eléctrica superficial, composición química, unión a receptores específicos de la región diana, capacidad para absorber/adsorber fármaco, cinética de liberación del mismo, biodegradación y eliminación, estabilidad en almacenamiento e *in vivo*, y capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados.

Los coloides magnéticos basados en nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro presentan numerosas posibilidades en biomedicina, ya que pueden: *i*) ser visualizados mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y, por lo tanto, ser utilizados como agentes de contraste por su capacidad para reducir los tiempos de relajación T_1^* y T_2^* ; *ii*) transportar y acumular el fármaco vehiculizado en el lugar diana mediante la utilización de un gradiente magnético apropiado; y, *iii*) generar un efecto de hipertermia en el lugar deseado bajo la influencia de un campo magnético alterno. En referencia a la segunda aplicación enumerada de los coloides magnéticos, podemos añadir que diversos estudios demuestran que estos nanosistemas modifican eficientemente las propiedades farmacocinéticas de los principios activos y su biodistribución en el organismo. De esta manera, la nanoplataforma magnética logra localizar toda la dosis administrada en el lugar de acción e incrementar la exposición de las células diana a la actividad farmacológica de los principios activos [Allen y Cullis, 2004; Arruebo y cols., 2007; Pankhurst y cols., 2003;].

Las primeras investigaciones sobre el uso de los coloides magnéticos como transportadores de fármacos en animales se remontan a la década de los 80 [Gallo y cols., 1989; Poore y Senyei, 1983; Widder y cols., 1983]. En estos primeros estudios se

Capítulo 1. Introducción

demonstró cómo la vehiculización de adriamicina en microesferas magnéticas de albúmina permite mejorar su actividad antitumoral en ratas con sarcoma de Yoshida. Estas investigaciones demostraron que el agente anticanceroso se acumulaba en mayor cantidad en el lugar diana gracias a este sistema transportador, circunscribiendo sus efectos adversos a órganos del SRE (principalmente, hígado y bazo). Un poco más tarde se estudió la eficacia de los coloides magnéticos en la potenciación de la acción antitumoral de epirubicina en ratas con carcinoma de colon e hipernefronas (figura 5). El coloide magnético diseñado tenía un tamaño entre 50 y 150 nm, y para su guiado se utilizaban imanes de tierras raras de hasta 500 mT [Lübbe y cols., 1996b].

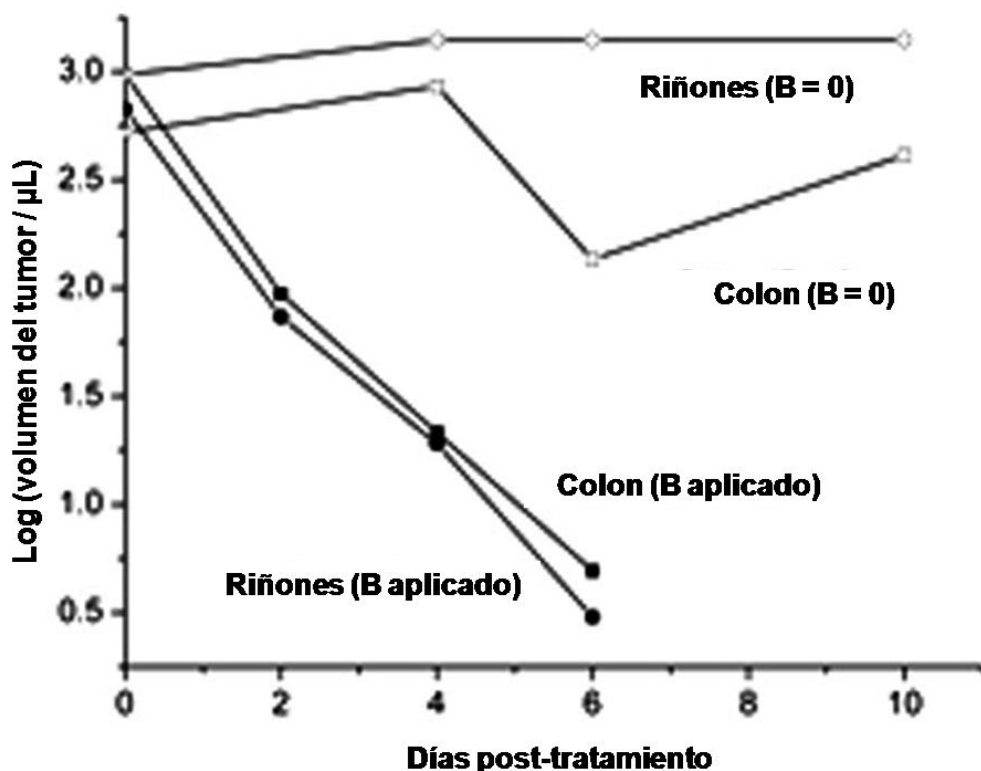


Figura 5. Evolución temporal del volumen de la masa tumoral (μL) en ratas Sprague-Dawley con adenocarcinoma de colon y renal. El coloide magnético utilizado como sistema transportador de epirubicina (dosis: 1mg/Kg) fue administrado 20 minutos después de la implantación del tumor. El volumen de fluido magnético administrado (un 0.5 % del volumen de sangre corporal) fue concentrado en el lugar de acción mediante la aplicación de un campo magnético B apropiado. Adaptado de Lübbe y cols., 1996b. American Association for Cancer Research, Copyright (1996).

El primer ensayo en fase I con este tipo de materiales fue realizado en pacientes con procesos oncológicos avanzados y sin respuesta a la quimioterapia estándar [Lübbe y cols., 1996a]. Esta investigación fue pionera en su campo y demostró que el uso de estas suspensiones magnéticas como vehículo de agentes antitumorales parecía ser seguro. De hecho, se conseguía concentrar de forma exclusiva el fármaco en la región tumoral, minimizando su biodistribución sistémica. Este estudio puso de manifiesto la necesidad

Capítulo 1. Introducción

de aplicar campos magnéticos suficientemente intensos sobre el lugar de acción de forma constante, para así lograr la completa acumulación del coloide en esta región. El resultado más interesante de este trabajo fue la observación de una reducción significativa en el volumen del tumor en 4 de los 14 pacientes incluidos en el ensayo. A partir de este momento, numerosas investigaciones se centraron en establecer una “prueba de concepto” de la acumulación del coloide magnético en la masa cancerosa (figuras 6 y 7) [Alexiou y cols., 2000, 2001; Fernández-Pacheco y cols., 2007; Lübbe y cols., 1999]. Con respecto a la seguridad asociada a la utilización de gradientes magnéticos en humanos, la FDA señala que no pueden utilizarse campos superiores a 7 T.

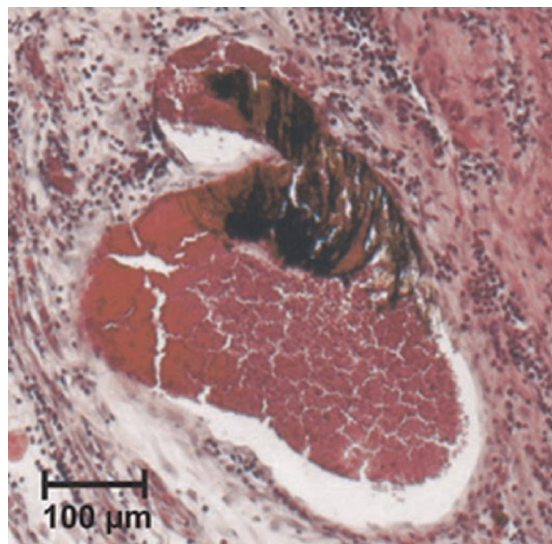


Figura 6. Microfotografía de un corte histológico de carcinoma de células cancerosas de conejo, tras la administración intraarterial del coloide magnético y su guiado y concentración en esta región con la ayuda de un imán. La zona oscura de la sección del tumor corresponde a las nanopartículas magnéticas. Reproducida de Alexiou y cols., 2000. Copyright American Association for Cancer Research, (2000).

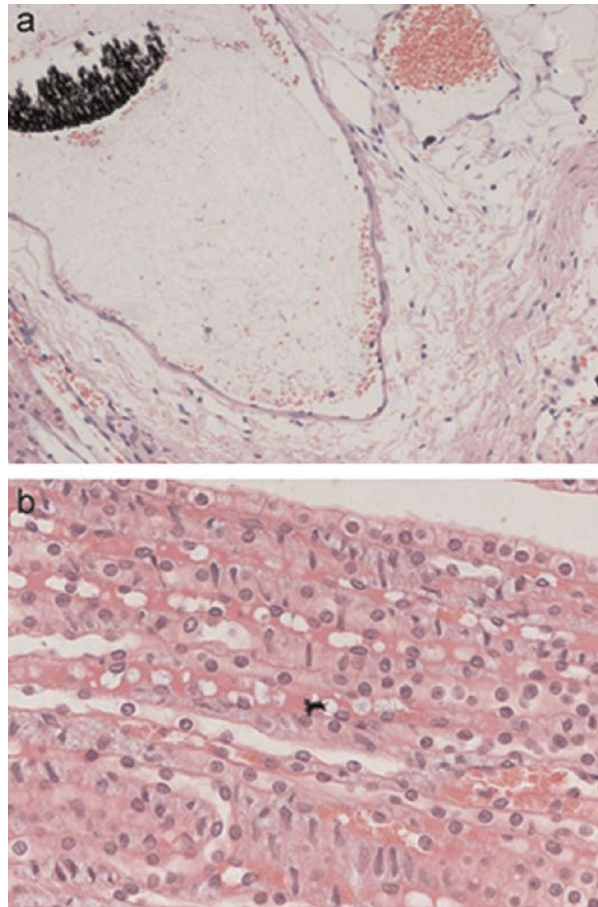


Figura 7. (a) Microfotografía de un corte histológico del riñón izquierdo de un animal, donde se localizó un imán mediante cirugía menor (aumento: 200x). En la imagen pueden observarse las nanopartículas magnéticas orientadas en la dirección del gradiente de campo magnético. (b) Microfotografía de un corte histológico del riñón derecho (aumento: 400x) donde es complicado observar esas nanopartículas magnéticas de hierro recubiertas de carbono y cargadas con doxorubicina. Reproducido de Fernández-Pacheco y cols., 2007. Copyright Elsevier Science BV (2007).

Finalmente, parece interesante insistir en la versatilidad de estos coloides para el transporte y la liberación controlada de fármacos. De hecho, este tipo de nanomateriales no sólo permite la vehiculización de un amplio abanico de agentes antitumorales, sino que también tienen un gran potencial para el transporte de fármacos antiinflamatorios

(como el diclofenaco sódico) [Arias y cols., 2009a], plasminógeno recombinante [Ma y cols., 2007], etc. En este último caso, se utilizó nanomagnetita recubierta con dextrano (Nanomag[®]-D) para el transporte y la liberación controlada de este plasminógeno en los trombos de los vasos sanguíneos, mejorándose así el efecto trombolítico de este tipo de principios activos.

Podemos justificar la selectividad de acción del fármaco vehiculizado teniendo en cuenta que éste no se encontrará biodisponible mientras siga incorporado en la nanopartícula magnética. Así, cuando el coloide magnético llegue al lugar de acción dirigido por el gradiente magnético aplicado, liberará el fármaco transportado justo en la región donde debe actuar. Por lo tanto, una cinética de liberación demasiado rápida producirá un efecto farmacológico similar al obtenido con una dosis de fármaco en solución, mientras que una cinética de liberación demasiado lenta podría limitar seriamente la actividad farmacológica en el lugar diana. El transporte de fármaco guiado magnéticamente generará siempre una concentración de fármaco en el lugar de acción muy superior a la lograda cuando el principio activo se administra en solución [Durán y cols., 2008].

La biodistribución de los coloides magnéticos puede verse también beneficiada por el efecto EPR de la región tumoral [Allen y Cullis, 2004; Arruebo y cols., 2007; Edens y cols., 2002; Hashizume y cols., 2000; Maeda y cols., 2000; Pankhurst y cols., 2003; Schiffelers y cols., 2001]. Si además el diseño de la nanopartícula observa las estrategias de transporte activo anteriormente comentadas, la acumulación del coloide y la potencia y especificidad de su acción farmacológica serán mucho mayores. De esta forma, se alcanzará un efecto farmacológico óptimo, sin la necesidad de utilizar grandes dosis de principio activo. Por todo esto, se ha propuesto el diseño de coloides magnéticos con capacidad de respuesta a estímulos físicos de muy diverso origen (cambio de temperatura, pH, luz, etc.) y con modificaciones a nivel superficial (introducción de cadenas de PEG, péptidos, proteínas, etc.) [Brigger y cols., 2002; Bogdanov y cols., 1997; Némati y cols., 1996; Vauthier y cols., 2003].

La utilización de campos magnéticos alternos permite, además de generar el efecto de hipertermia ya comentado, provocar una liberación controlada del principio activo vehiculizado [Guo y Szoka, 2003; LaVan y cols., 2003]. El coloide magnético provocará el calentamiento específico de la masa tumoral hasta una temperatura ≈ 42 °C, que de ser mantenida durante ≈ 30 minutos inducirá la muerte de las células tumorales [Glöckl y cols., 2006; Hergt y cols., 2006; Hilger y cols., 2006; Moroz y cols., 2002; Pankhurst y cols., 2003]. Además, este calentamiento alterará/destruirá el recubrimiento de los núcleos magnéticos, permitiendo el comienzo de la liberación del fármaco [Liburdy y cols., 1986; Steinke y cols., 2007; Wagner, 2007].

Si bien algunos estudios apuntan la posibilidad de administrar los coloides magnéticos por vía intratumoral [Brigger y cols., 2002; Fernández-Pacheco y cols., 2007], la mayoría de los trabajos científicos investigan la vía de administración intravenosa. Esta vía de administración determina que las nanopartículas magnéticas entren en contacto rápidamente con fluidos fisiológicos de un pH ligeramente básico (7.4) y con una fuerza iónica relativamente alta (130-150 meq/L). Bajo estas condiciones fisiológicas, las nanopartículas tienden a agregarse para quedar estabilizadas termodinámicamente. Esta agregación se verá aún más acrecentada si el coloide presenta una magnetización remanente tras la retirada del campo magnético aplicado. Para evitar esta inestabilidad *in vivo*, la cual puede comprometer la llegada de las nanopartículas magnéticas hasta el lugar de acción, el sistema transportador debe reunir las siguientes características [Durán y cols., 2008]: *i*) densidad de carga eléctrica superficial suficiente para asegurar una repulsión electrostática entre las partículas que evite su agregación; *ii*) hidrofilia (mojabilidad), para asegurar la distribución de las nanopartículas en el plasma de forma individualizada y que no aparezcan agregados hidrófobos; y, *iii*) superficie modificada con cadenas poliméricas hidrófilas que retrasan/minimizan los fenómenos de floculación y de opsonización previos a la fagocitosis por macrófagos. En este último caso, las cadenas de polímero (generalmente PEG) generan una protección por impedimento estérico de la nanopartícula magnética, o electro-estérico si la cadena de polímero está cargada. En la actualidad, la

introducción en clínica de los coloides magnéticos como sistemas transportadores de fármacos podría considerarse limitada por [Dobson, 2006; Durán y cols., 2008; Lübbe y cols., 1996a]:

- ❖ La necesidad de utilizar intensos campos magnéticos para asegurar la perfecta acumulación del coloide magnético en el lugar diana.
- ❖ No hay suficientes estudios que aseguren su fácil producción a gran escala, su estabilidad y los beneficios económicos asociados a este tipo de terapia.
- ❖ No hay certeza absoluta de que los más que prometedores resultados logrados en animales pequeños (ratones, ratas, conejos, etc.) sean extrapolables al ser humano.
- ❖ El destino biológico del fármaco debe todavía asegurarse completamente mediante el perfecto control de los procesos de liberación.
- ❖ Las nanopartículas magnéticas podrían agregarse en el torrente sanguíneo, generando una embolia y efectos secundarios en los órganos donde quedan atrapadas (principalmente, a nivel hepático). Sin embargo, este fenómeno podría transformarse en una ventaja si se pretende el tratamiento selectivo de tumores localizados en alguno de esos órganos.

Capítulo 2.

Contribución y objetivos del trabajo de investigación

2.1. CONTRIBUCIÓN

Dentro del amplio campo de investigación sobre las aplicaciones de los sistemas coloidales en farmacoterapia, la principal contribución de la presente *Tesis Doctoral* es el desarrollo de una nanoplataforma biodegradable útil en la vehiculización de fármacos hasta el lugar de acción. El diseño del coloide está pensado para que la llegada de la dosis de principio activo hasta la masa tumoral quede garantizada mediante la utilización de un campo magnético (estrategia de transporte activo de fármacos). La nanoplataforma estará constituida por núcleos de óxido de hierro superparamagnéticos (magnetita) embebidos en una matriz de poli(ϵ -caprolactona). Su utilización permitirá guiar y concentrar el agente quimioterápico en el tejido tumoral. Cabe esperar que su utilización clínica permita minimizar las reacciones adversas derivadas de la extensa biodistribución y escasa especificidad de acción de este tipo de principios activos. Así, serán precisas dosis de fármaco netamente inferiores para conseguir un efecto farmacológico óptimo. Por otro lado, el carácter superparamagnético de los núcleos de magnetita permite intuir la utilidad *in vivo* del coloide como agente inductor de hipertermia y como agente de contraste en imagen por resonancia magnética.

Este campo de investigación es extenso y se encuentra en constante crecimiento por lo que el trabajo que proponemos se centra en algunos aspectos muy concretos del mismo. Especialmente, pensamos que nuestra investigación podría contribuir en los siguientes aspectos:

- ❖ Desarrollo de un procedimiento sencillo y económico de síntesis de nanocompuestos magnéticos. La modificación introducida en el método de disposición interfacial desarrollado por otros autores simplifica notablemente la metodología de síntesis del nanosistema óxido de hierro (superparamagnético) – poli(ϵ -caprolactona).

- ❖ Utilización de métodos de análisis fisicoquímico de superficies muy sensibles a las transformaciones experimentadas por los núcleos magnéticos al quedar recubiertos por el polímero biodegradable. La información obtenida puede ser especialmente útil en la identificación de los mecanismos de formación de las nanopartículas magnéticas compuestas.
- ❖ Investigación de la capacidad de respuesta de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) a campos magnéticos aplicados: de forma cuantitativa mediante la determinación de su ciclo de histéresis, y de forma cualitativa mediante la observación de suspensiones acuosas de la nanoplataforma.
- ❖ En estrecha relación con la contribución anterior, se pretende desarrollar una prueba de concepto sobre las posibilidades reales de este tipo de estrategia de transporte de fármacos al tejido canceroso diana. Consideramos que esta contribución es especialmente original e importante, ya que este tipo de estudio no está muy extendido en el desarrollo de estos nanomateriales.
- ❖ Análisis de la capacidad de este nanosistema mixto como sistema transportador de fármacos. En este sentido, la versatilidad del coloide se investigó con los fármacos antitumorales doxorubicina y 5-fluorouracilo, y con el fármaco antiinflamatorio no esteroideo diclofenaco sódico.

2.2. OBJETIVOS

La presente *Tesis Doctoral* se engloba dentro de la línea de investigación *Aplicaciones Biomédicas de los Fluidos Magneto-reológicos* del grupo de investigación *Farmacia Práctica* (CTS-205, Junta de Andalucía). Su objetivo principal es el diseño de un nanosistema transportador de fármacos con capacidad de respuesta a campos

magnéticos aplicados y actividad adecuada en el tratamiento del cáncer. Con ese fin, se ha realizado un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas de formulación de nanopartículas biodegradables constituidas por un núcleo magnético (óxido de hierro: magnetita) y un recubrimiento polimérico [poli(ϵ -caprolactona)]. La capacidad de vehiculización de fármacos (transporte y liberación controlada en la región diana) se ha ejemplificado utilizando las moléculas antitumorales doxorubicina y 5-fluorouracilo, y el fármaco antiinflamatorio diclofenaco sódico.

La eficacia del recubrimiento y las ventajas que aporta a la capacidad de las partículas para transportar un principio activo se determinarán mediante el análisis comparativo de la estructura y la composición química de los tres tipos de nanomateriales [magnetita, poli(ϵ -caprolactona) y nanopartículas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona)], así como la caracterización de las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales de éstos.

El análisis de las propiedades magnéticas del coloide magnetita/poli(ϵ -caprolactona) permitirá determinar el grado de influencia del recubrimiento polimérico sobre estas propiedades. En este sentido, hemos realizado una prueba de concepto *in vivo* sobre la capacidad real que ofrece la utilización de gradientes de campo magnético en el guiado y acumulación de la nanoplataforma magnetita/poli(ϵ -caprolactona) en la masa tumoral. El ensayo investiga la influencia que tiene un gradiente magnético aplicado sobre la biodistribución de las nanopartículas en un modelo experimental animal.

Una parte esencial de la investigación es la determinación de la capacidad de vehiculización de fármacos que tienen las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) formuladas. Para ello, se investigarán extensamente dos métodos convencionales de incorporación de fármacos en este tipo de nanosistemas: adsorción superficial y absorción en matriz. Se utilizarán técnicas cuantitativas (espectrofotometría UV-visible) y cualitativas (electroforesis) para estudiar los factores condicionantes de la vehiculización de los agentes quimioterápicos y el antiinflamatorio en los

nanocompuestos magnetita/poli(ϵ -caprolactona). Otro objetivo básico ha sido el análisis *in vitro* del proceso de liberación de los tres tipos de fármaco desde las nanopartículas, determinando espectrofotométricamente la cantidad liberada y los factores que condicionan este proceso, en concreto, el tipo de vehiculización en las nanopartículas.

En términos más concretos, este trabajo de investigación pretende alcanzar los siguientes objetivos:

- 1- Síntesis de nanopartículas biodegradables constituidas por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico [poli(ϵ -caprolactona)]. Nos basaremos en un procedimiento modificado de disposición interfacial del polímero que simplifica la metodología previamente desarrollada para la formulación de este tipo de nanoplataformas. Caracterización de la geometría, composición y estructura química.
- 2- Estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de nanomateriales [magnetita, poli(ϵ -caprolactona), y nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona)] mediante electroforesis. Uso de modelos teóricos para evaluar el potencial eléctrico superficial de las nanopartículas. Control del mismo en función de las características del medio de dispersión (pH y fuerza iónica).
- 3- Análisis comparativo de las propiedades termodinámicas superficiales de las nanopartículas mediante la determinación del ángulo de contacto de líquidos seleccionados. Uso de modelos teóricos para evaluar dichas propiedades. Estudio de la naturaleza hidrófila/hidrófoba de las nanopartículas.
- 4- Caracterización de las propiedades magnéticas de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona).

- 5- Prueba de concepto *in vivo* del efecto que un gradiente magnético aplicado puede ejercer en la biodistribución de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona).
- 6- Determinación de la capacidad de vehiculización de fármacos de diversa naturaleza por las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) mediante métodos espectrofotométricos y electrocinéticos. Estudio de los principales factores que condicionan este proceso (procedimiento de incorporación y cantidad de fármaco utilizada), para así identificar las condiciones óptimas de vehiculización.
- 7- Evaluación de la liberación de fármaco desde las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona). Análisis del efecto del método de incorporación (absorción/adsorción) sobre la liberación. Estudio cinético.

Capítulo 3.

Formulación de nanoplataformas magnéticas multifuncionales

3.1. SINTESIS Y ESTUDIO MORFOLÓGICO

3.1.1. MAGNETITA

La magnetita (óxido ferroso-ferrico Fe_3O_4) es un mineral que se encuentra en diversos entornos geológicos y en algunos depósitos en cantidad suficiente como para constituir un mineral de hierro importante [Gaines y cols., 1997]. La magnetita es un ejemplo de material ferrimagnético, cuyo comportamiento está esencialmente asociado a su estructura cristalina (del tipo espinela inversa). En ella, los iones Fe^{3+} se acoplan antiferromagnéticamente y no contribuyen a la imanación. Por el contrario, los iones Fe^{2+} de cada celda tienen orientación paralela y son responsables del momento magnético de dicha celda y, por tanto, del comportamiento magnético de la magnetita. En organismos vivos como las abejas, los delfines, las palomas o ciertos microorganismos se han encontrado pequeños agregados de este óxido magnético [Okon y cols., 1994].

Se ha comprobado que la toxicidad de este óxido de hierro es muy baja [dosis letal 50 (DL_{50}) en ratas: 400 mg/Kg] [Iannone y cols., 1991], por lo que es bien tolerada por el cuerpo humano [Müller y cols., 1996]. En cuanto a su biodegradabilidad, numerosos estudios han demostrado que en el caso de nanopartículas superparamagnéticas (tamaño < 20 nm), su degradación puede ocurrir en los lisosomas de células del SRE (p. ej., macrófagos). En este proceso de biodegradación se genera hierro libre, el cual puede utilizarse en la síntesis de transferrina y ferritina. Si, por el contrario, las partículas de magnetita presentan un tamaño mayor, su eliminación del organismo suele tener lugar mediante filtración renal [Okon y cols., 1994].

Desde mediados del siglo pasado se han desarrollado numerosos métodos para la preparación de partículas de magnetita con tamaño micrométrico o nanométrico [Laurent y cols., 2008]. Es muy interesante comprobar cómo muchos de ellos permiten

incluso modificar las características de la superficie de estas partículas en función de la aplicación deseada [Charles, 2003; Elaissari y cols., 2003; Rosenweig, 1997; Tartaj y cols., 2003]. Si bien es muy difícil establecer una clasificación que abarque todos los métodos de formulación desarrollados hasta la fecha, consideramos que podrían establecerse 5 categorías generales [Durán y cols., 2008; Laurent y cols., 2008]:

- ♦ *Método de microemulsión.* está basado en la formulación de microemulsiones de fase externa oleosa que permite el crecimiento de los núcleos magnéticos. Una modificación de esta técnica permite la preparación de nanopartículas compuestas por aleaciones de hierro y cobalto con un tamaño inferior a 10 nm [Feltin y Pileni, 1997; Pileni, 1997, 2001]. También se ha usado este método para formular partículas de hierro recubiertas de capas de metales, para ralentizar la oxidación de estos núcleos y facilitar otras modificaciones superficiales con fines biomédicos (figura 8) [Carpenter, 2001; López-Pérez y cols., 1997; Rivas y cols., 1994].

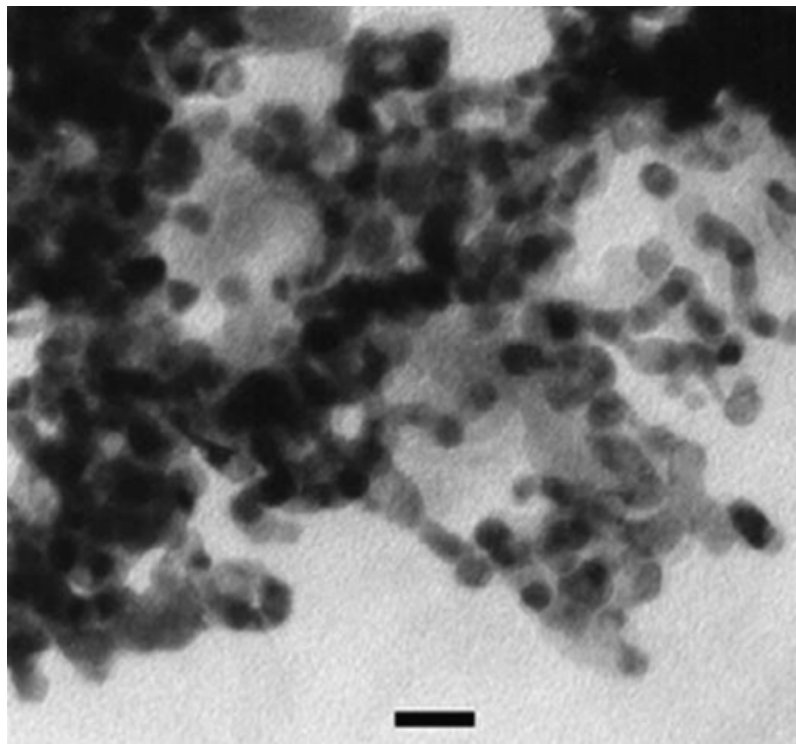


Figura 8. Microfotografía electrónica de transmisión de nanopartículas de hierro recubiertas por oro, obtenidas mediante el método de microemulsión. Longitud de la barra: 25 nm. Reproducido de Carpener, 2001. Copyright Elsevier (2001).

- ◆ *Método de los polioles.* Método basado en una reducción forzada de iones metálicos en presencia de polioles (de etileno, propileno, etc.). Este método es muy versátil pues permite conseguir una amplia gama de tamaños de partícula (desde 10 nm a 1 μm) y una composición química muy variable (hierro, aleaciones de cobalto y níquel e, incluso, aleaciones de hierro, cobalto y níquel) (figura 9). La formación de las partículas se produce por nucleación espontánea o heterogénea [Fiévet, 2000; Toneguzzo y cols., 1998; Toshima y Lu, 1996; Viau y cols., 1996].

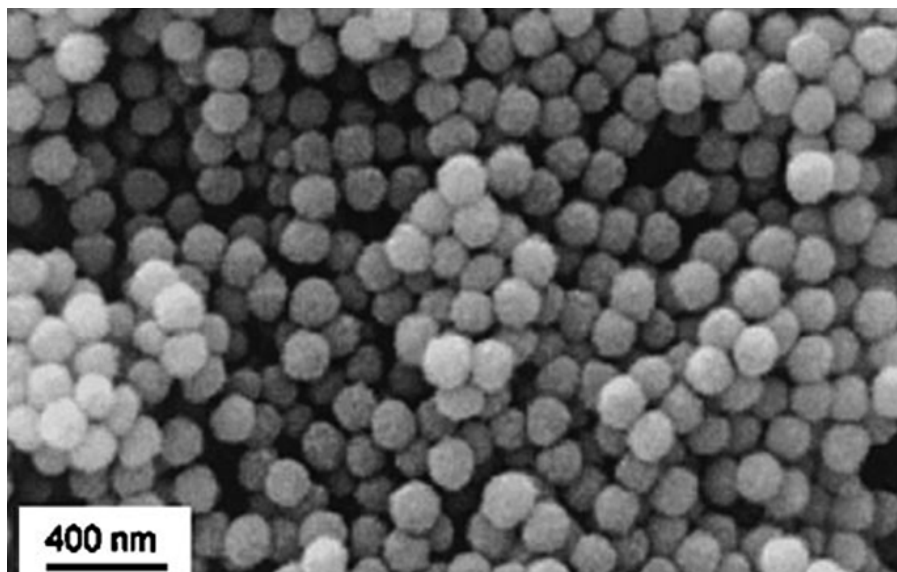


Figura 9. Microfotografía electrónica de barrido de nanopartículas constituidas por una aleación de hierro, cobalto y níquel, y obtenidas mediante el método de los polioles.

Reproducido de Toneguzzo y cols., 1998. Copyright Wiley-VCH (1998).

- ♦ *Método de descomposición de compuestos organometálicos.* Se utiliza ampliamente para la síntesis de partículas superparamagnéticas de hierro, de cobalto y de aleaciones de hierro [Behrens y cols., 2006; Charles, 2003; Hess y Parker, 1966; Puntos y cols., 2001; Rosenweig, 1997; van Worterghem y cols., 1986]. Básicamente el procedimiento consiste en la descomposición térmica de precursores organometálicos de las nanopartículas en una disolución de hidrocarburo. La geometría de las partículas depende de la velocidad de calentamiento, de la temperatura de la reacción y de la composición del medio de síntesis. Las partículas así obtenidas se caracterizan por una distribución de tamaños muy estrecha (figura 10) [Hyeon y cols., 2001; Rockenberger y cols., 1999; Sun y Zeng, 2002].

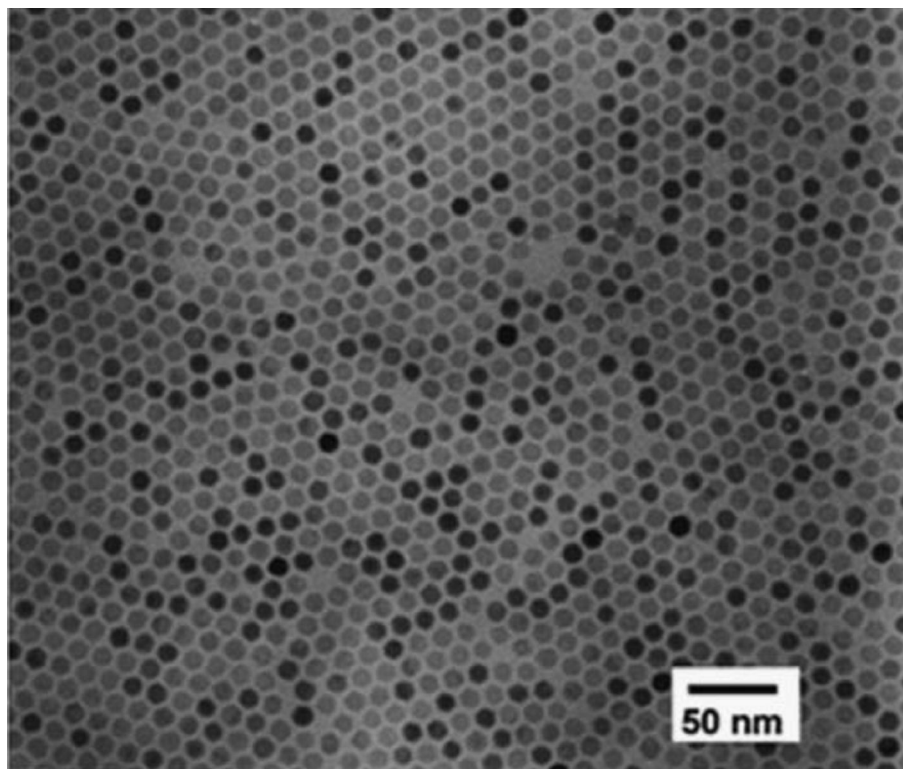


Figura 10. Microfotografía electrónica de transmisión de nanocristales de maghemita obtenidos mediante descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$. Reproducido de Hyeon y cols., 2001. Copyright American Chemical Society (2001).

- ◆ *Método de los aerosoles.* La reacción química que determina la formación de nanopartículas de óxido de hierro transcurre de forma controlada en las nanogotículas que constituyen la fase interna de este sistema disperso (figura 11). La geometría de las gotículas determina la forma y el tamaño de las partículas obtenidas. Este método se caracteriza por un gran rendimiento y por una gran versatilidad en la modificación de la superficie del material obtenido con polímeros y compuestos inorgánicos [Matijević y Partch, 2000; Tarjaj y cols., 2003]. Se han desarrollado dos variantes a esta técnica: aspersion y pirolisis mediante láser [Cannon y cols., 1982; González-Carreño y cols., 1993; LaMer y Dinegar, 1950; Morales y cols., 1999; Ocaña y cols., 1995].

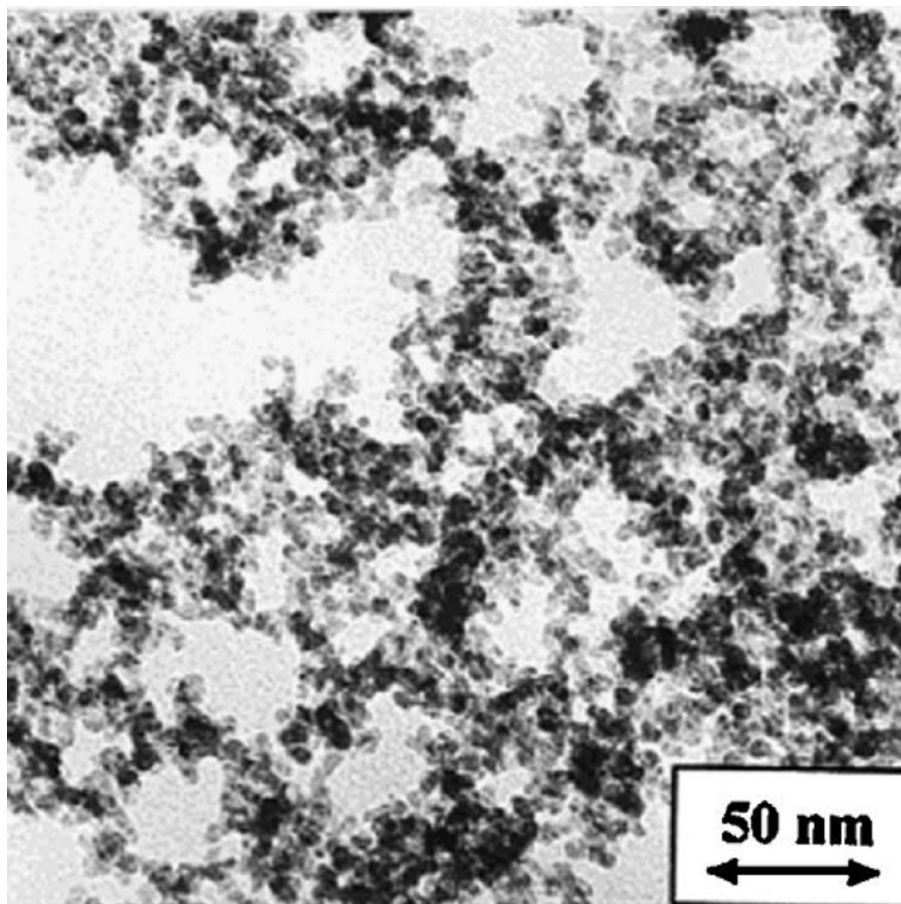


Figura 11. Microfotografía electrónica de transmisión de nanopartículas de maghemita formuladas según el método de los aerosoles con pirolisis mediante láser. Reproducida de Morales y cols., 1999. Copyright American Chemical Society (1999).

- ◆ *Método de co-precipitación en solución.* Permite la síntesis de coloides inorgánicos de geometría uniforme mediante la precipitación de precursores químicos en disolución [Arias y cols., 2001; Bee y Massart, 1995; LaMer y Dinegar, 1950; Sugimoto y Matijević, 1980]. Este método se basa en la separación, la nucleación y el crecimiento de partículas de hidróxido de hierro. El subsiguiente proceso de envejecimiento u oxidación en la solución determina la formación de nanopartículas de magnetita u otras ferritas. La

cinética de esta reacción ha sido ampliamente investigada [Matijevic y Sapieszko, 2000; Ocaña y cols., 1995]. La variante más ampliamente utilizada por su versatilidad y sencillez es la propuesta por Massart (figura 12) [Massart, 1981; Viota y cols., 2007].

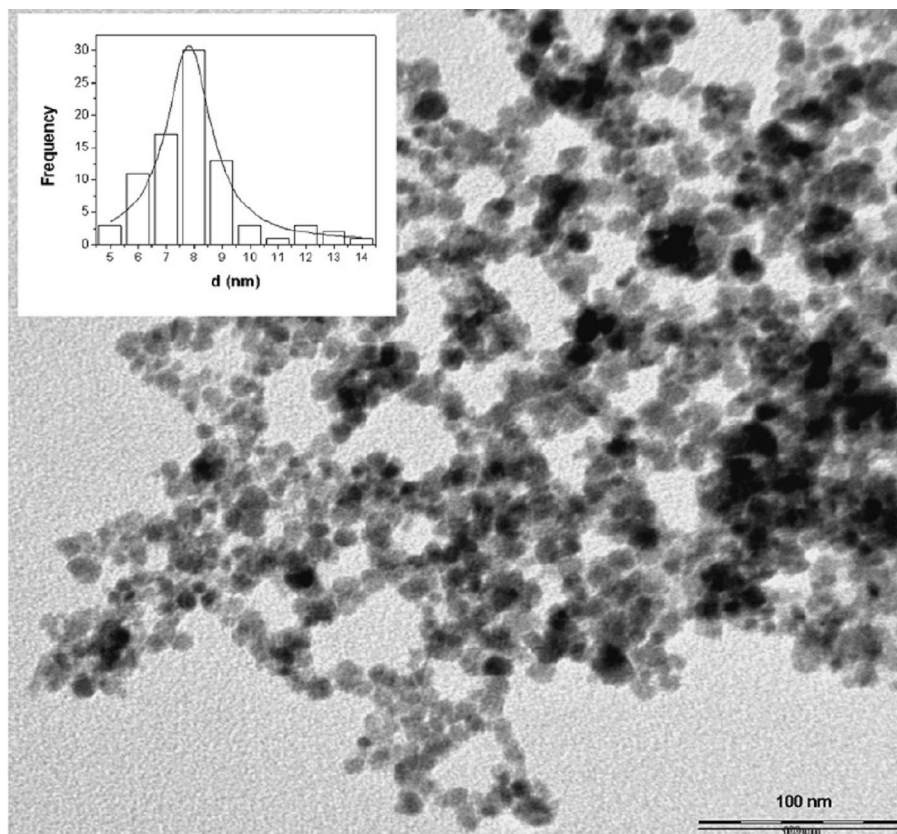


Figura 12. Microfotografía electrónica de transmisión de nanopartículas de magnetita obtenidas mediante co-precipitación en solución. Figura insertada: Histograma de tamaños de las nanopartículas. Reproducido de Viota y cols., 2007. Copyright Elsevier (2007).

En este trabajo de investigación hemos seguido el método de co-precipitación en solución [Massart, 1981]. La experiencia de nuestro grupo de investigación en esta metodología nos permite afirmar que pueden obtenerse nanopartículas de magnetita de morfología cúbica y tamaño muy pequeño (< 20 nm) y con una distribución estrecha de tamaños [Arias y cols., 2011a; Viota y cols., 2007]. En concreto, la metodología de

síntesis seguida comienza con la adición a una solución acuosa de amoníaco (500 mL, 0.7 M), a temperatura ambiente y gota a gota, de una solución acuosa de cloruro férrico (40 mL, 1 M) y una solución acuosa de cloruro ferroso (10 mL, 2M; que contiene una concentración 2M de HCl). Bajo estas condiciones, se produce la formación espontánea de las nanopartículas de magnetita, las cuáles son recogidas en el fondo del recipiente de la reacción mediante sedimentación magnética (imán de 400 mT). A continuación, se elimina el medio donde ha transcurrido la reacción. La última fase del procedimiento de síntesis consiste en la estabilización de las nanopartículas de magnetita en una disolución acuosa de ácido perclórico 2 M durante 12 horas. De esta manera, aseguramos que las partículas de este óxido de hierro se mantengan aisladas en el medio de dispersión, no formándose agregados de mayor tamaño por inestabilidad termodinámica. En el caso de que estas nanopartículas no fueran utilizadas inmediatamente, se desecaban en una estufa de desecación [P-Selecta, España] a 40.0 ± 0.5 °C, conservándolas en estado seco hasta su utilización.

La geometría (forma y tamaño) de las partículas de magnetita fue estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) [STEM PHILIPS CM20, Holanda] y mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución (FeSEM) [Zeiss DSM 950, Alemania]. En la figura 13 puede apreciarse que las partículas de magnetita presentan una morfología cúbica, una superficie aparentemente lisa y un tamaño inferior a 20 nm.

La determinación del tamaño medio de partícula se obtuvo mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS) [Malvern 4700 analyzer, Malvern Instruments, Inglaterra]. Esta técnica se basa en el análisis de la función de autocorrelación de la luz láser dispersada por la suspensión de partículas en movimiento térmico. La determinación es independiente de factores externos, salvo la viscosidad y la temperatura del medio y, como hace que las orientaciones de las partículas sean aleatorias, minimiza cualquier posible efecto de su forma. La muestra analizada fue una suspensión acuosa diluida de magnetita (≈ 0.1 %, p/v), la cual fue sonicada previamente

durante 5 minutos. El ángulo de scattering se fijó en 60° . El tamaño medio determinado de las partículas de magnetita fue 12 ± 2 nm, por lo que puede considerarse superparamagnéticas [López-López y cols., 2005].

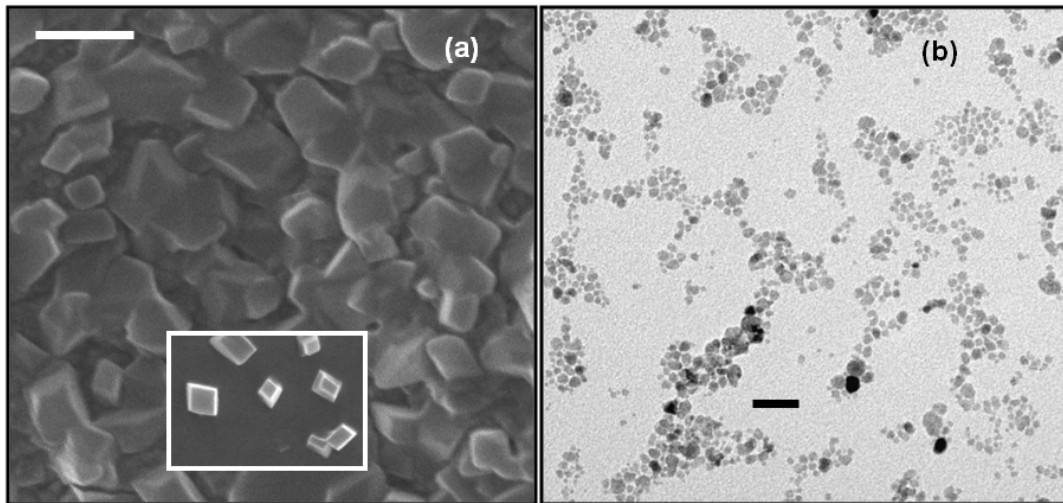


Figura 13. (a) Microfotografía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y (b) microfotografía electrónica de barrido de alta resolución (FeSEM) de partículas de magnetita.

Figura insertada: detalle de las nanopartículas visualizadas mediante HRTEM. Longitud de barra: 20 nm (a) y 100 nm (b).

3.1.2. POLI(ϵ -CAPROLACTONA)

El polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL) es un poliéster alifático sintético, caracterizado por ser biodegradable, biocompatible, de escasa toxicidad y una alta hidrofobia [Luo y cols., 2003; Pitt, 1990; Sáez-Fernández y cols., 2009]. De forma general, se sintetiza por polimerización tras la apertura del anillo del monómero ϵ -caprolactona (figura 14). El peso molecular medio de la PCL puede variar desde 10.000 hasta 42.500 Da. La PCL es soluble a temperatura ambiente en cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, benceno, tolueno, ciclohexano y 2-

nitropropano. Además, a esta temperatura es poco soluble en acetona, 2-butanona, etilacetato, y no es soluble en agua, alcohol, petróleo, éter y dietil éter [Kuo-Yung y Yu-Der, 2009; Ponsart y cols., 2000; Sáez-Fernández y cols., 2009]. La PCL se ha estudiado ampliamente con diferentes fines biomédicos, tales como: *i*) el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos, debido a su lenta biodegradación, y *ii*) la ingeniería tisular [Kuo-Yung y Yu-Der, 2009; Ponsart y cols., 2000]. La combinación química de PCL con otros polímeros, como PLGA o PLA, permite obtener copolímeros de mayor resistencia y bioadhesividad, e incluso, con una mayor capacidad para el transporte y la liberación sostenida de fármacos [Chang y cols., 1986; Sáez-Fernández y cols., 2009; Sinha y cols., 2004].

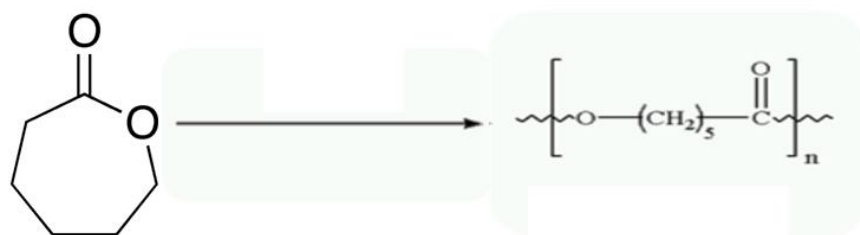


Figura 14. Rotura del anillo del monómero de ϵ -caprolactona y formación del polímero PCL.

La degradación de la PCL es un proceso autocatalítico, mediante el cual los grupos carboxílicos de la macromolécula inducen el desarrollo de una reacción de autohidrólisis. De esta manera, se produce la escisión o rotura de los restos éster de la estructura química [Pitt, 1990]. El proceso de degradación *in vivo* se encuentra enormemente facilitado por los fenómenos de fagocitosis [Sinha y cols., 2004].

El principal procedimiento seguido en la síntesis de nanopartículas de PCL es el de dispersión interfacial del polímero [Arias y cols., 2010a; Fessi y cols., 1989]. El disolvente orgánico utilizado como base de la fase orgánica de la síntesis fue seleccionado entre tres posibilidades: acetona, diclorometano y etilacetato. En concreto,

se estudió la cantidad máxima de polímero que podía disolverse en sólo 10 mL de disolvente y el tiempo empleado para ello (tabla 1). No se consideró la utilización de mayores volúmenes de disolvente debido a la toxicidad de éstos. De igual forma, en esta fase del estudio se determinó la cantidad máxima a utilizar de PCL en la síntesis de las nanopartículas. El análisis de esta permite concluir que el disolvente a utilizar en la preparación de las nanopartículas de PCL es el diclorometano. En este disolvente fue más fácil la disolución de la máxima cantidad que se utilizará de polímero. Finalmente, como se aprecia en la tabla, por encima de una concentración del 3 % (p/v) de PCL, no es posible disolver más polímero.

| PCL (% p/v) | Tiempo de disolución (minutos) | | |
|-------------|--------------------------------|---------------|-------------|
| | Acetona | Diclorometano | Etilacetato |
| 0.2 | 4.0 | 0.2 | 5.0 |
| 0.5 | 4.4 | 0.5 | 5.0 |
| 1 | 5.0 | 0.8 | 7.5 |
| 2 | 7.3 | 1.2 | 9.0 |
| 3 | 7.5 | 2.0 | 9.5 |
| 5 | Límite de solubilidad superado | | |

Tabla 1. Tiempo necesario para la disolución de diferentes cantidades de PCL en 10 mL de acetona, diclorometano o etilacetato.

Una vez definida la concentración de polímero y el tipo de disolvente que se utilizará, procedimos a realizar la síntesis de las nanopartículas de PCL según la metodología de disposición interfacial del polímero. Brevemente, se preparó una

solución acuosa (50 mL) de pluronic[®] F-68 al 2 % (p/v). A continuación, se disolvió PCL en 10 mL de diclorometano hasta una concentración del 0.3 % (p/v). Finalmente, se añadió gota a gota y a temperatura ambiente la fase orgánica sobre la acuosa bajo agitación mecánica a 1200 rpm (agitador Euro-STPCU, Alemania). La agitación se mantuvo durante 1 hora, obteniéndose casi desde el principio una suspensión acuosa blanquecina. Finalmente, la limpieza de la suspensión de partículas de PCL permitió la eliminación total del disolvente orgánico. En concreto, las nanopartículas fueron sometidas a repetidos ciclos de centrifugación (11000 rpm, 40 minutos) (Sppendorf AG, Alemania) y redispersión en agua bidestilada hasta que se comprobó que la conductividad del sobrenadante era inferior a 10 μ S/cm (Crison microcm 2202, España).

La geometría (forma y tamaño) de las nanopartículas de PCL fue determinada a partir de microfotografías de HRTEM y FeSEM. Asimismo, se realizaron medidas de PCS para obtener el tamaño medio (\pm desviación estándar) de las partículas poliméricas. Bajo las condiciones de formulación indicadas, las partículas de PCL obtenidas presentaron una morfología esférica y una superficie lisa (figura 15). Además, el tamaño de partícula medio es de 97 ± 7 nm, muy apropiado para la vía de administración parenteral [Arias y cols., 2010a].

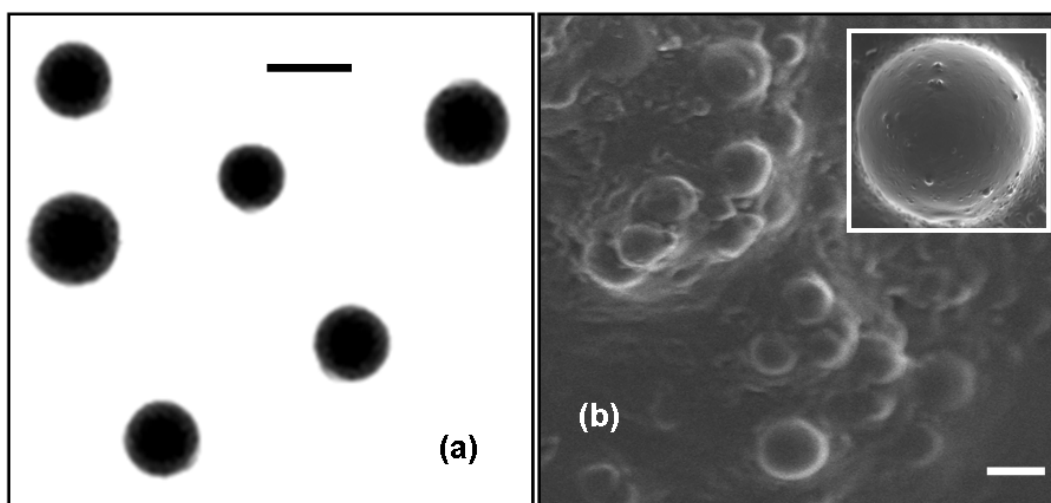


Figura 15. Microfotografía HRTEM (a) y FeSEM (b) de nanopartículas de PCL. Figura insertada: Detalle de las nanopartículas poliméricas. Longitud de barra: 100 nm.

Con objeto de confirmar que la cantidad de agente tensioactivo utilizada es la óptima para la formulación de las nanopartículas de PCL, investigamos cómo influía la relación entre las concentraciones de pluronic® F-68 y PCL en las principales características de las suspensiones de polímero obtenidas. El rendimiento del procedimiento de síntesis se calculó:

$$\frac{\text{masa total obtenida de nanopartículas (mg)}}{\text{masa total utilizada de material (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

Un primer análisis de los datos recogidos en la tabla 2 revela que es necesaria la utilización de agente tensioactivo para que se formen nanopartículas de PCL. Además, puede comprobarse cómo al aumentar la concentración de pluronic® F-68, se evita la formación de residuos sólidos (incrementándose el rendimiento de la reacción) y se logra una ligera reducción en el tamaño de las nanopartículas. Este efecto ya ha sido descrito por otros autores [Arias y cols., 2010a; Llovet y cols., 1995; McCarron y cols.,

2000; Stolnik y cols., 1995]. En todos los casos, las nanopartículas formadas tenían una morfología esférica.

| [Pluronic® F-68] (%, p/v)/[PCL] (%, p/v) | Apariencia de la suspensión | Peso de los residuos sólidos (g) | Rendimiento de la síntesis (%) | Tamaño medio (nm) |
|---|---|---|---|------------------------------|
| 0 / 1 | No hay formación de nanopartículas de PCL | | | |
| 1 / 1 | Blanquecino con sólidos | 0.05 | 50 | ≈ 125 |
| 1 / 3 | Blanquecino con sólidos | 0.19 | 35 | ≈ 116 |
| 2 / 1 | Blanquecino | No hay sólidos | 100 | ≈ 145 |
| 2 / 3 | Blanquecino | No hay sólidos | 100 | ≈ 97 |

Tabla 2. Efecto de la concentración de pluronic® F-68 y de polímero sobre las características de las suspensiones de nanopartículas de PCL.

3.1.3. NANOPARTÍCULAS COMPUESTAS MAGNETITA/POLI(ε-CAPROLACTONA)

De forma general, los coloides magnéticos constituidos por un núcleo magnético y por un recubrimiento biodegradable (polimérico o lipídico, principalmente) se sintetizan mediante un proceso que finalmente implica la inclusión de los núcleos magnéticos en el interior de la matriz biodegradable. Por otro lado, es menos frecuente encontrar coloides constituidos por un nanomaterial polimérico o lipídico con incrustaciones de

partículas magnéticas a nivel superficial [Arruebo y cols., 2007; Elaissari y cols., 2003; Pankhurst y cols., 2003; Tartaj y cols., 2003]. Numerosas investigaciones describen estos nanosistemas, su formulación y sus principales características. Como ejemplo, podemos citar:

- a) Nanopartículas de magnetita recubiertas por almidón y modificadas superficialmente con iones de fosfato para facilitar la incorporación del fármaco antitumoral [Alexiou y cols., 2000, 2001, 2006; Jurgons y cols., 2006].
- b) Nanopartículas de óxido de hierro (magnetita) o hierro embebidas en una matriz polimérica biodegradable, que se forma tras una reacción de polimerización [poli(alquilocianocrilato)] [Arias y cols., 2006] o de precipitación (etilcelulosa, PLA) [Arias y cols., 2007a; Gómez-Lopera y cols., 2006]. La incorporación del agente antitumoral en la matriz polimérica se produce eficazmente durante su formación.
- c) Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por carbono o sílice que permiten el transporte de agentes anticancerosos con la ayuda de pequeños implantes magnéticos localizados en el lugar de acción mediante cirugía menor, o mediante gradientes magnéticos aplicados externamente [Arruebo y cols., 2006a,b; Behrens y cols., 2006; Fernández-Pacheco y cols., 2006; Tartaj y cols., 2001, 2002].

El método de síntesis que proponemos se basa en el utilizado para las nanopartículas de PCL (método de disposición interfacial del polímero). En definitiva, se trata de provocar la precipitación del polímero bajo idénticas condiciones a las descritas anteriormente, pero en un medio de polimerización en el que se encuentran los núcleos magnéticos en suspensión. De esta manera, pretendemos que la PCL recubra los núcleos de magnetita cuando se produzca su precipitación. Brevemente, el proceso de síntesis comenzó con la adición de 10 mL de una solución al 0.3 % (p/v) de polímero en diclorometano sobre 50 mL de una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita

(0.3 %, p/v) con una concentración de pluronic[®] F-68 del 2 % (p/v). La adición de la fase orgánica sobre la fase acuosa se realizó bajo agitación mecánica (1200 rpm), mantenida durante 1 hora. Finalmente, la limpieza de las nanopartículas compuestas Fe₃O₄/PCL se realizó mediante sedimentación magnética, sometiendo la suspensión a ciclos consecutivos de exposición a un imán de 400 mT durante 5 minutos, procediendo a continuación a la eliminación del sobrenadante y a la redispersión del precipitado de nanopartículas en agua bidestilada, como se ha descrito.

En estas condiciones de formulación, y tal y como recoge la figura 16c, se obtuvieron nanopartículas Fe₃O₄/PCL en las que el recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos es completo y patente. Como puede establecerse por comparación con la figura 16b, los núcleos de magnetita quedan recubiertos por un halo blanco/grisáceo que coincide con el aspecto de las nanopartículas puras de polímero. Es más, las microfotografías de FeSEM (figura 17) muestran cómo externamente las partículas puras de PCL y las partículas compuestas Fe₃O₄/PCL son indistinguibles, y claramente diferentes a las partículas de Fe₃O₄. Estas microfotografías definen la gran eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos por el polímero biodegradable.

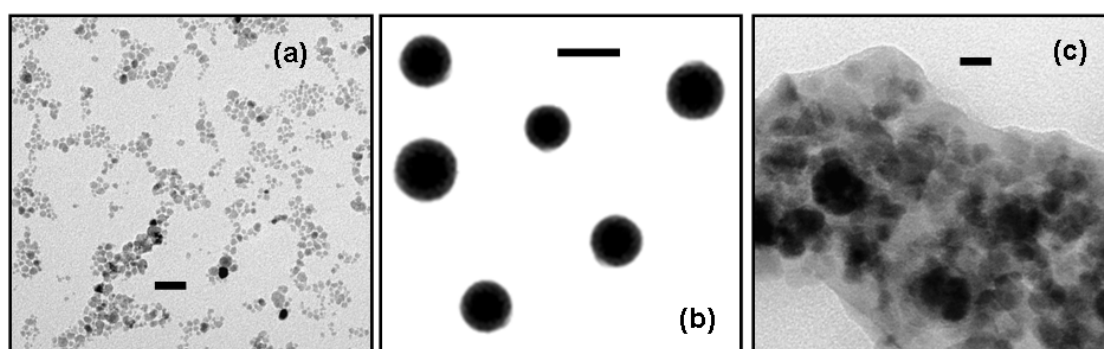


Figura 16. Microfotografía de HRTEM de partículas de Fe₃O₄ (a), PCL (b), y Fe₃O₄/PCL (c). Longitud de barra: 100 nm (a y b), y 20 nm (c).

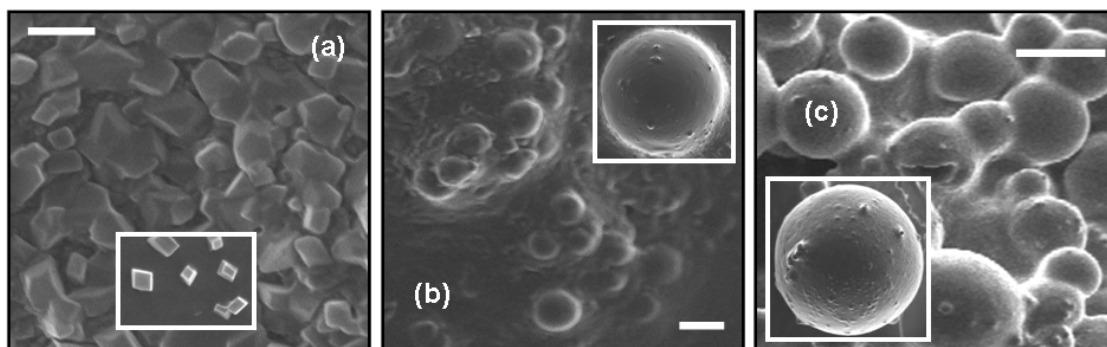


Figura 17. Microfotografía de FeSEM de partículas de Fe_3O_4 (a), PCL (b), y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (c). Figuras insertadas: detalle de las muestra. Longitud de barra: 20 nm (a), y 100 nm (b y c).

Finalmente, el análisis PCS de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ permitió confirmar el pequeño tamaño de éstas observado en microscopía electrónica. El tamaño medio y desviación estandar determinado es 86 ± 12 nm, muy adecuado para la vía de administración parenteral. El procedimiento de síntesis que hemos desarrollado simplifica considerablemente otras metodologías propuestas previamente [Gang y cols., 2007; Hamoudeh y Fessi, 2006; Yang y cols., 2006]. En concreto, se evita un paso intermedio que conduce a la obtención de partículas de magnetita hidrófoba, material que complica las etapas siguientes del proceso (muy difícil manipulación de estas partículas hidrófobas por su extremada tendencia a formar agregados) y que encarece la obtención de la nanoformulación final y podemos afirmar, por tanto, que con la técnica desarrollada mejoramos la metodología existente.

Además, el tamaño obtenido es sensiblemente inferior al descrito en trabajos previos. En concreto, y en función de las condiciones de formulación, diversos autores han obtenido nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con un tamaño entre 3 y 20 μm , cuando la

velocidad de agitación varía entre 2000 y 500 rpm [Hamoudeh y Fessi, 2006], de 160 ± 5 nm [Yang y cols., 2006], y de 164 ± 3 nm [Gang y cols., 2007].

El menor tamaño de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ que hemos sintetizado es realmente interesante en el transporte de fármacos al lugar de acción (masa tumoral, tejido inflamado, etc.) ya que permite estimar una mayor acumulación de las nanopartículas al minimizarse los fenómenos de reconocimiento y retirada por el SRE [Decuzzi y cols., 2009].

Si bien las condiciones de síntesis ya descritas son las que posibilitan el mayor rendimiento en la obtención de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, para llegar a esta conclusión fue necesario el análisis del efecto que tienen las diferentes proporciones de masa $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ sobre el resultado de la síntesis. En concreto, variamos las proporciones de $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ desde 1:4 a 4:1, manteniendo el resto de la metodología como ya se ha indicado. La figura 18 recoge las microfotografías HRTEM de las nanopartículas compuestas obtenidas según todas estas variantes del procedimiento de síntesis. Las diferencias más significativas se observaron entre las nanopartículas obtenidas utilizando una relación $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ 1:4 y 4:1, en comparación con las otras posibilidades investigadas. Si la relación inicial entre las masas es 4:1, el recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos es prácticamente inexistente. Como mucho llegó a apreciarse ocasionalmente en las zonas de contacto entre los núcleos magnéticos (figura 18a). En el caso contrario, cuando la relación es 1:4, las partículas de Fe_3O_4 quedaban totalmente englobadas por una enorme matriz de polímero. Incluso se apreció la formación de una excesiva cantidad de partículas de polímero puro (figura 18c).

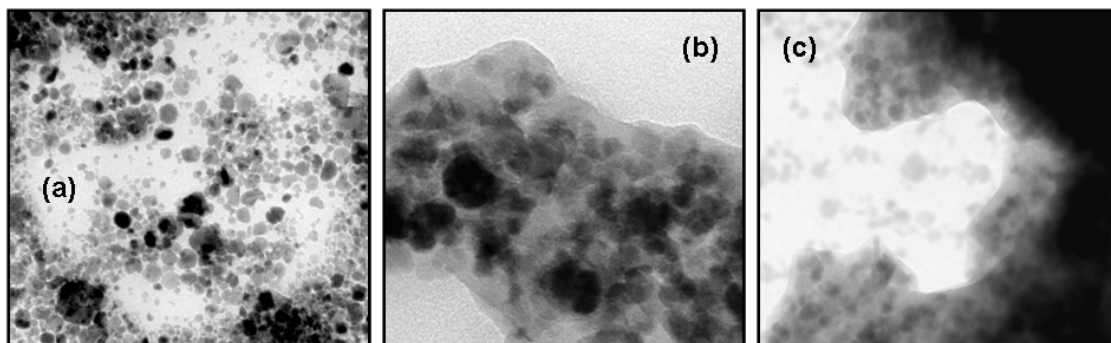


Figura 18. Microfotografías HRTEM de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ obtenidas partiendo de una relación de masas inicial $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ de 4:1 (a), 2:4 (b) y 1:4 (c).

El análisis de la influencia de esta relación de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ sobre el rendimiento de la síntesis, permitió comprobar que éste era máximo para una proporción 2:4 ($\approx 90\%$), seguido de la proporción 4:3 ($\approx 84\%$) (tabla 3). El rendimiento de la reacción de síntesis fue calculado mediante la ecuación 2:

$$\frac{\text{masa total obtenida de nanopartículas } \text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL} \text{ (mg)}}{\text{masa total utilizada de material (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

| Proporción de masas iniciales Fe ₃ O ₄ :PCL | Rendimiento (%) | Apariencia del sobrenadante no magnético |
|---|-----------------|--|
| 4:1 | 8 | Anaranjado oscuro |
| 4:2 | 12 | Anaranjado claro |
| 4:3 | 84 | Amarillento |
| 4:4 | 42 | Blanquecino/amarillento |
| 3:4 | 51 | Blanquecino/amarillento claro |
| 2:4 | 90 | Transparente |
| 1:4 | 40 | Blanco |

Tabla 3. Rendimiento (%) de la reacción de síntesis de Fe₃O₄/PCL para cada una de las proporciones de masas iniciales Fe₃O₄:PCL. Desde 1:4, hasta 4:1.

Como ha sido puesto de manifiesto en estudios anteriores [Arias y cols., 2001, 2006, 2008a], cuando hay un exceso en la cantidad de núcleos magnéticos utilizada sobre la masa de material de recubrimiento, puede esperarse que un gran número de partículas de Fe₃O₄ quede sin recubrir (no formando parte de las partículas compuestas) y, por su particular carácter superparamagnético, permanecerán en el sobrenadante de la suspensión en lugar de formar parte del sedimento magnético atraído por el imán. En estas condiciones, el sobrenadante no magnético presenta un característico color anaranjado (indicativo de la presencia de estos núcleos superparamagnéticos). Por el contrario, si la relación es 1:4 el sobrenadante no

magnético obtenido es totalmente blanco, consecuencia de la formación de nanopartículas de polímero puro en exceso. Además, de acuerdo con lo observado en estudios anteriores [Arias y cols., 2001, 2006, 2008a], a medida que se incrementa la cantidad de material de recubrimiento con respecto a la masa de Fe_3O_4 , el grosor del recubrimiento de los núcleos magnéticos tiende a ser algo mayor. Esto podría tener como consecuencia interesante que la cantidad de fármaco vehiculizada por las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ sea mayor, al aumentar el grosor (o, lo que es lo mismo, la cuantía) del polímero que forma parte de éstas. El hecho de que el sobrenadante de las nanopartículas compuestas obtenidas con la relación 2:4 sea totalmente transparente, hace pensar que todo el material utilizado en la formulación de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ se ha transformado en estas nanopartículas compuestas. De hecho, el rendimiento es $\approx 90\%$ (tabla 3). Por último, pensamos que cuando hay un exceso de Fe_3O_4 sobre PCL (en concreto, en la relación 4:3) todo el polímero utilizado pasa a formar parte de los recubrimientos de los núcleos magnéticos. Sin embargo, este exceso en Fe_3O_4 hace que haya núcleos magnéticos no recubiertos que permanecerán aislados en suspensión, haciendo que el rendimiento de la síntesis sea inferior al obtenido con la relación de masas 2:4. Por ello, estas fueron las condiciones utilizadas en todo el resto del trabajo de síntesis de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$.

3.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA

3.2.1. DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X

En nuestra investigación, utilizamos la difracción de rayos X para la comparación cualitativa de los tres tipos de coloides que hemos sintetizado [Billmeyer, 1975; Suryanarayanan, 1995]. Nuestro objetivo es confirmar que el difractograma de rayos X de las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ recoge las peculiaridades de los dos tipos de

materiales que las componen. Esto sería una prueba evidente de la eficacia del método de formulación desarrollado. Además, pretendemos comprobar que la estructura cristalina de los núcleos de magnetita no sufre alteración alguna al ser englobada en la matriz de poli(ϵ -caprolactona). Esto es muy importante ya que una alteración de este tipo podría llegar a condicionar las propiedades magnéticas del coloide compuesto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$.

En este tipo de trabajo experimental debe cuidarse muy bien la preparación de la muestra, para así conseguir datos reproducibles y fiables. Los puntos críticos son el tamaño cristalino, la orientación preferida de la muestra en el soporte y, la coplanaridad de la muestra y el soporte superficial. Al depositar una muestra pulverizada en un soporte de rayos X, la distribución del cristal puede no ser al azar, produciéndose lo que se llama orientación preferida de la muestra. Esto puede afectar a la orientación de los cristalitos y, de esta forma, ejercer un efecto negativo en el análisis del material. Para minimizar en lo posible la aleatoriedad con la que se produce este fenómeno, los soportes que se utilizan comúnmente son platos rectangulares de aluminio o vidrio, que contienen una ventana rectangular en la que se empaqueta el polvo.

Los difractogramas de rayos X de los tres tipos de materiales (Fe_3O_4 , PCL y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$) se realizaron mediante el método de Debye-Scherrer, gracias a la colaboración del profesor Dr. José Daniel Martín Ramos del Departamento de Mineralogía y Petrología de la Universidad de Granada. El dispositivo empleado fue un difractómetro Philips PW1710 (Holanda), utilizando una longitud de onda de 1.5405 \AA (Cu-K_α). La masa utilizada en el análisis fue la misma para todos los materiales ($\approx 0.5 \text{ g}$). En la figura 19 se recogen los difractogramas obtenidos. Al comparar los difractogramas de la magnetita y de las partículas compuestas con el patrón de la *American Society for Testing and Materials* (patrón ASTM) de la magnetita (ver el detalle de la figura 19), se comprueba la perfecta coincidencia de las líneas del difractograma con las del patrón, lo que permite identificar la muestra como magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta (tamaño de gramo $\approx 300 \text{ \AA}$), incluso tras ser

recubierta por el polímero. El carácter semicristalino de la PCL también se observa en los difractogramas [Sáez-Fernández y cols., 2009]. Es muy interesante comprobar cómo los picos característicos de la PCL se encuentran presentes en el difractograma de rayos X de las nanopartículas compuestas, aunque con una menor intensidad. Esto es lógico si consideramos que a igualdad de masa utilizada en el análisis, la cantidad de polímero presente en la muestra de partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ debe ser menor. Consideramos también que los resultados ofrecen una nueva prueba de la eficacia de la metodología de formulación de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$.

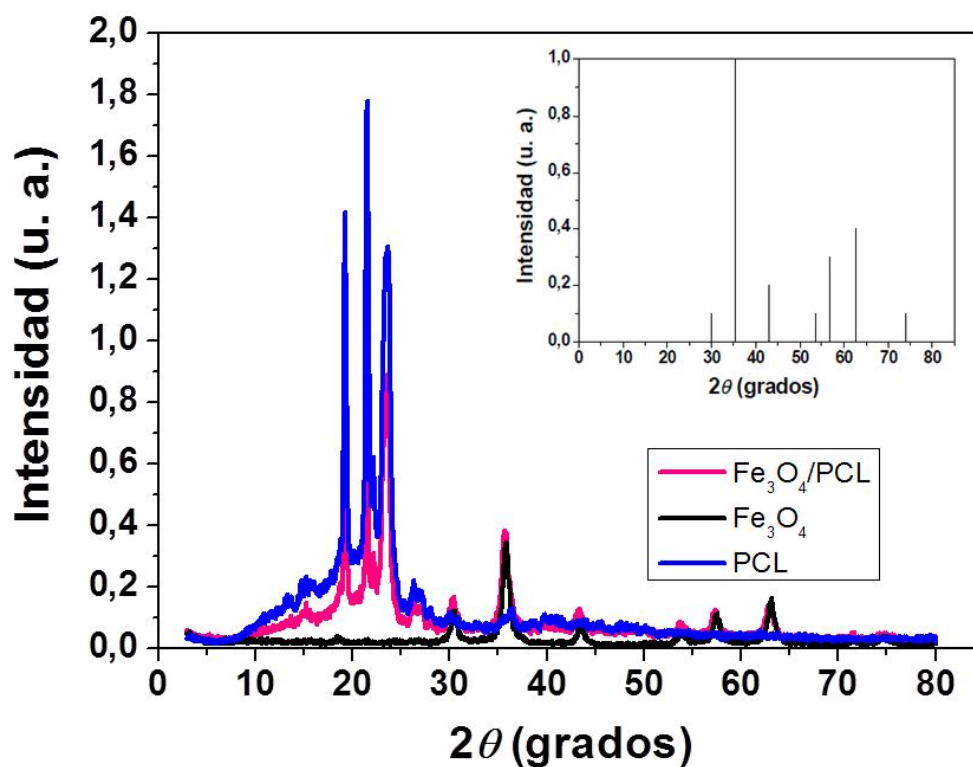


Figura 19. Difractogramas de rayos X de las nanopartículas de Fe_3O_4 (línea negra), PCL (línea azul) y de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (línea magenta). Figura insertada: patrón ASTM de difracción de rayos X de la Fe_3O_4 . La intensidad está expresada en unidades arbitrarias (u.a.).

3.2.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER

El objetivo que pretendemos con el análisis de las partículas coloidales en el infrarrojos es dotar a nuestro estudio de una nueva prueba de la eficacia de la metodología de síntesis de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. En concreto, las nanopartículas compuestas deben tener un espectro de infrarrojos en el que aparezcan las bandas características de la PCL, junto con la banda propia de la Fe_3O_4 . De ser esto así, quedará demostrado que las partículas magnéticas compuestas están constituidas por Fe_3O_4 y PCL. Para la preparación de las muestras a analizar tomamos una pequeña cantidad de material sólido (0.5 – 1.0 mg) y la mezclamos con aproximadamente 100 mg de bromuro potásico pulverizado y seco. Realizamos la mezcla en un mortero de ágata y lo prensamos entre 10000 – 15000 kPa para obtener un disco transparente. Como consecuencia de esta manipulación, es de esperar la aparición de bandas en el espectro de infrarrojos a 3448 cm^{-1} y 1639 cm^{-1} debida a la humedad [Silverstein y Webster, 1998]. La obtención del interferograma se realizó utilizando un espectrofotómetro de infrarrojos (Nicolet 20 SXB, EE.UU.), con una resolución de 2 cm^{-1} . La técnica implica la división de una radiación que contiene todas las longitudes de onda (en nuestro caso: $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$) en dos rayos [Silverstein y Webster, 1998]. Uno tiene un camino óptico fijo y el otro variable (a través de un espejo móvil). La superposición de los rayos dará lugar a un patrón de interferencias que por transformada de Fourier se convierte en un punto en el dominio de la frecuencia. Esto permitirá obtener un espectro de infrarrojos completo cuando la radiación pasa a través de la muestra, lo que hace que el material a analizar quede expuesto a una banda amplia de energía.

Como hemos comentado previamente, nuestro objetivo es confirmar cualitativamente la formación de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. No pretendemos una caracterización exhaustiva de los materiales estudiados, ya que para ello sería necesario utilizar esta técnica analítica junto con la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear. Como es bien sabido, sólo con el análisis de todos

estos resultados es posible determinar la estructura molecular de un material. En referencia a la interpretación de un espectro de infrarrojos, no hay reglas establecidas para ello. Sin embargo, sí existen ciertos requisitos previos para la interpretación del espectro [Silverstein y Webster, 1998]:

- El espectro debe tener una resolución y una intensidad adecuada, y será el de un compuesto razonablemente puro.
- El espectrofotómetro debe estar calibrado.
- El método de manipulación de la muestra debe especificarse.

La frecuencia o longitud de onda de absorción depende de las masas relativas de los átomos de la molécula, de las constantes de fuerza de los enlaces entre éstos, de la geometría de los átomos y del entorno químico de cada átomo. Una molécula por simple que sea puede generar un espectro extremadamente complejo, que es característico de la molécula entera (excepto en el caso de los enantiómeros). Es muy difícil realizar un tratamiento preciso de las vibraciones de una molécula compleja, por lo que el espectro de infrarrojos se interpreta a partir de la comparación empírica y la extrapolación a estudios de moléculas sencillas. Esto es posible gracias a que determinados grupos de átomos dan lugar a bandas de igual o similar frecuencia independientemente de la estructura del resto de la molécula. La persistencia de estas bandas características permite la obtención de información estructural, mediante simple inspección y comparación con tablas de referencias que recogen la absorción característica de los grupos funcionales. Sin embargo, debe tenerse claro que toda conclusión alcanzada tras interpretar una banda debería confirmarse mediante el examen de otras zonas del espectro.

En un espectro de infrarrojos se diferencian tres zonas características [Silverstein y Webster, 1998]:

- La región de los grupos funcionales de la molécula (de 4000 a 1300 cm^{-1}). De forma general, si no hay absorción en esta zona puede considerarse que la molécula carece de grupos funcionales.
- La zona de la *huella dactilar* (1300 a 900 cm^{-1}). La absorción en esta región es única para toda especie molecular.
- En la región entre 900 y 650 cm^{-1} no suelen aparecer bandas de absorción. Esto es indicativo de que la molécula tiene una estructura no aromática.

En la figura 20 se recoge el espectro de infrarrojos de nuestros tres tipos de nanopartículas (Fe_3O_4 , PCL y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$). Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento ya que permite la identificación de los grupos funcionales del polímero en las nanopartículas compuestas. En concreto, las bandas observadas son:

- A: banda debida a la humedad que adquieren las muestras como consecuencia de su proceso de manipulación. Se localiza a 3388 cm^{-1} .
- B: grupo de dos bandas que corresponden a la vibración de estiramiento del enlace C-H de la molécula. En el polímero, a 2937 cm^{-1} se localiza la banda característica de la vibración de elongación asimétrica del grupo CH_2 ($\nu_{\text{AS}} \text{CH}_2$) y a 2888 cm^{-1} observamos la perteneciente a la vibración de elongación simétrica del CH_2 ($\nu_{\text{AS}} \text{CH}_2$).
- C: banda que corresponde a la vibración molecular del enlace C=O del polímero (aparece a 1727 cm^{-1}).
- D: banda que corresponde a la vibración de flexión asimétrica del CH_2 ($\nu_{\text{AS}} \text{CH}_2$). En las partículas poliméricas se localiza a 1469 cm^{-1} .
- E: grupo de dos bandas correspondientes a la vibración de flexión del enlace O-H (1345 cm^{-1}) y a la vibración de elongación del enlace C-O (1281 cm^{-1}) del ácido carboxílico de la molécula.

- F: banda perteneciente a la vibración de elongación del enlace C-O del alcohol primario del polímero (1242 cm^{-1}).
- G: grupo de tres bandas que aparecen a 1150 , 1111 y 1061 cm^{-1} , corresponden a la vibración de elongación y flexión del grupo C-CO-C, y que resulta de la vibración de elongación y flexión de la cadena C-C-C presente en este grupo químico.
- H: en las muestras que contienen polímero, a 961 cm^{-1} aparece una banda media característica de un alcano.
- I: banda permanente a la vibración de oscilación del CH_2 (ρCH_2), se observa a 840 cm^{-1} y es propia de una cadena larga de CH_2 .
- J: ausente en el espectro de las partículas de polímero. Aparece a 581 cm^{-1} y es una banda ancha e intensa característica de la absorción en la magnetita [Lyon, 1967]. Se trata de la frecuencia “Restrahl” (o rayo residual), de máxima absorbancia de cristales iónicos (o parcialmente iónico) en el infrarrojo [Gartstein y cols., 1986].

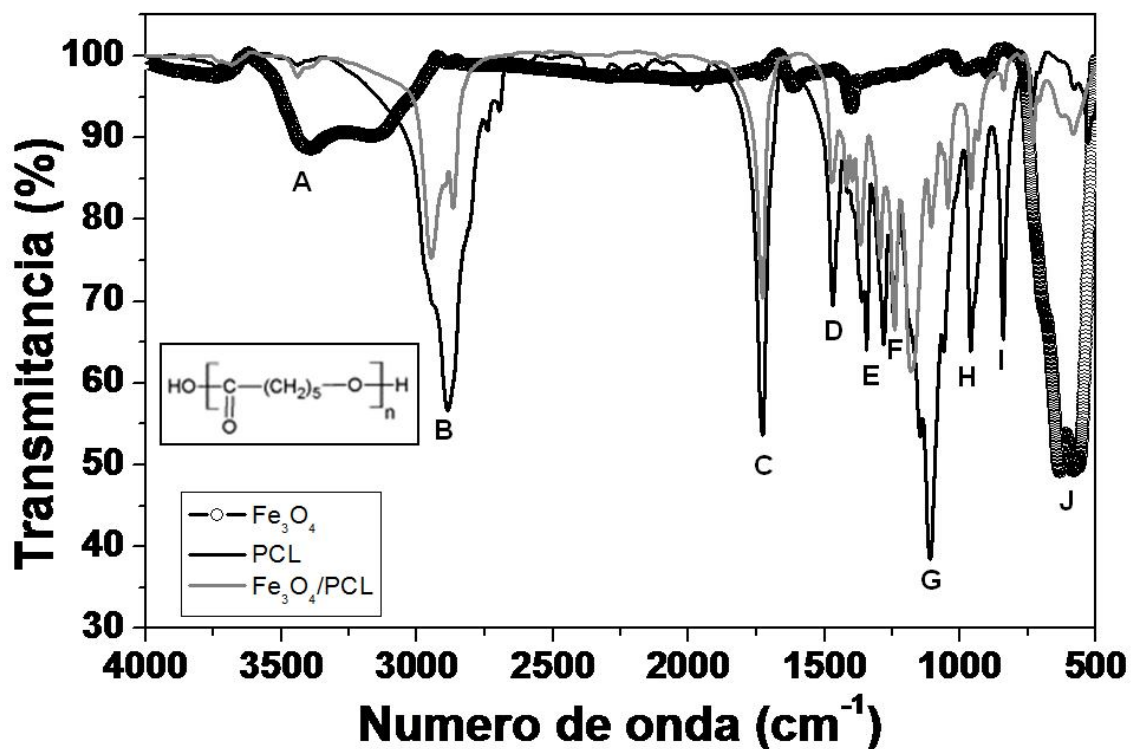


Figura 20. Espectro de infrarrojos de las nanopartículas de Fe₃O₄ (-o-), PCL (—) y Fe₃O₄/PCL (—). Figura insertada: estructura química de la PCL.

Capítulo 4.

Propiedades eléctricas superficiales

Consideremos una partícula sólida esférica de 1 cm de diámetro. Su superficie S y su volumen V son, respectivamente, $3.14 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ y $5.24 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3$, y la relación superficie/volumen es $S/V \approx 600 \text{ m}^{-1}$. La división de la partícula en N partículas esféricas de radio 100 nm tal que su volumen total sea igual al de la esfera original, sin embargo, provocará que la superficie sea de 15.7 m^2 y la relación $S/V \approx 3 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$. Este sencillo ejemplo explica que la principal contribución a las propiedades de un sistema, formado mediante la dispersión de esas N partículas en 1 L de agua, vendrá dada por las superficies e interfases de las partículas. En particular, el estado eléctrico de la superficie de las partículas puede ser determinante: si cada una de ellas tiene un potencial superficial de 100 mV (en torno al orden de magnitud típico de las partículas coloidales en medio acuoso), la fuerza electrostática repulsiva entre dos de estas partículas dispersas en agua y localizadas a una distancia entre superficies de 10 nm es $2.12 \cdot 10^{-12} \text{ N}$. Esta fuerza tiene que compararse con la fuerza de otras interacciones que deben o pueden existir entre ellas. Así, su atracción gravitatoria a la misma distancia será $6.3 \cdot 10^{-15} \text{ N}$, si su densidad es 10^3 Kg/m^3 ; y la fuerza de van der Waals $8 \cdot 10^{-13} \text{ N}$, utilizando los valores típicos de la constante de Hamaker [Hunter, 1987]. Estos ejemplos muestran que, en la mayoría de los casos, las interacciones electrostáticas son las principales responsables de las propiedades macroscópicas de las suspensiones.

En este contexto, los fenómenos electrocinéticos y las técnicas asociadas a ellos demuestran su importancia. Son manifestaciones de las propiedades eléctricas de la interfase, y de aquí que merezcan atención por sí mismas. Además, son una fuente de información importante, única en muchos casos, de estas propiedades eléctricas por poder ser determinadas experimentalmente. Como describiremos, la electroforesis (como los demás fenómenos electrocinéticos) constituye una poderosa técnica para obtener información directa sobre el estado eléctrico de la interfase [Delgado, 2002]. En este trabajo hemos investigado la movilidad electroforética (u_e) de los tres tipos de

nanopartículas, como método de evaluación de la calidad y eficiencia del recubrimiento para las diferentes proporciones de masa iniciales Fe_3O_4 :PCL (1:4 a 4:1). Esto es posible dado que los comportamientos eléctricos superficiales de la magnetita y del polímero poli(ϵ -caprolactona) son claramente diferentes, como veremos. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que los núcleos de óxido de hierro adecuadamente recubiertos de polímero se puedan diferenciar de los no recubiertos, analizando su comportamiento electroforético. Idealmente, la nanopartícula compuesta debería incluso mostrar un potencial zeta idéntico al del polímero.

Dada la sensibilidad de la electroforesis a las características de la interfase, esta técnica puede ser útil para analizar el proceso de degradación del polímero que recubre a la magnetita en las nanopartículas compuestas sintetizadas [Arias y cols., 2001; Delgado, 2002]. Para ello, analizaremos la evolución temporal de la movilidad electroforética de éstas últimas, como método de seguimiento de la degradación del recubrimiento polimérico.

4.1. DESCRIPCIÓN CLÁSICA DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA

Admitiremos como un hecho experimental que la mayoría de los sólidos adquieren carga eléctrica superficial cuando se dispersan en un disolvente polar, en particular, en una disolución de electrolito. Los orígenes de esta carga son diversos y, generalmente, comprenden algunos de los siguientes procesos [Hunter, 1981, 1987; Lyklema, 1987, 1995; van Olphen, 1977]: adsorción/desorción de iones de la red, disociación o ionización de grupos superficiales o sustitución isomórfica. Un caso característico de la adsorción preferente de iones en disolución es la adsorción de tensioactivos iónicos. En este caso, las entidades cargadas deben tener una elevada afinidad por la superficie, para evitar la repulsión electrostática por los iones ya adsorbidos. La disociación o ionización

de grupos superficiales es el mecanismo mediante el cual la mayoría de los coloides poliméricos de látex adquieren carga. Así, los grupos ácidos como el sulfato o el carboxilo son responsables de la carga negativa de los polímeros aniónicos. Cuando el pH está por encima del pK_a de disociación de estos grupos, la mayoría de ellos estarán ionizados, generando la carga negativa. En el caso de los óxidos, los grupos superficiales anfóteros MOH pueden generar carga positiva o negativa, dependiendo del pH; los iones H^+ y OH^- serán, por lo tanto, los *iones determinantes del potencial* para los óxidos. Por último, la red de carga incompleta (o sustitución isomórfica) es el mecanismo típico, casi exclusivo, de adquisición de carga por los minerales de arcilla. En ellos, parte de los cationes Si^{4+} y Al^{3+} de la estructura ideal son sustituidos por otros iones de menor carga y, prácticamente, el mismo tamaño. Como consecuencia de esto, el cristal podrá estar cargado negativamente y esta carga estructural habrá de ser compensada por cationes superficiales, fácilmente intercambiables en disolución.

Cualquiera que sea el mecanismo (y hay situaciones en las que participa más de uno de ellos), la carga neta superficial debe estar compensada por iones en torno a la partícula de modo que se mantenga la electroneutralidad del sistema. La carga superficial y su contracarga compensadora en disolución forman la doble capa eléctrica (DCE). A pesar de utilizarse la palabra *doble*, la estructura de esta capa puede ser muy compleja, no totalmente resuelta en la mayoría de los casos, y puede contener tres o más capas, que se extienden a lo largo de distancias variables desde la superficie del sólido. Cerca de la superficie del sólido o sobre ella, se pueden encontrar cargas responsables de la carga superficial σ_0 . En su proximidad inmediata, podrían localizarse los iones capaces de sufrir adsorción específica: la distancia al sólido será del orden de un radio iónico, dado que se puede suponer que han perdido su capa de hidratación, al menos en la dirección de la superficie del sólido. Llamemos σ_i a la carga superficial en un determinado plano de átomos, localizados a una distancia β_i desde el sólido (figura 21). Si aceptamos que la interfase tiene una geometría plana, y que x es la distancia externa normal a esta, podemos decir que la región entre $x = 0$ y $x = \beta_i$ está libre de carga, y

podemos identificar un condensador cuyas placas son la superficie y el plano β_i . Si C_i es su capacidad específica (por unidad de área):

$$\Psi_0 - \Psi_i = \frac{\sigma_0}{C_i} \quad (3)$$

donde ψ_0 es el potencial en la superficie del sólido. Los iones responsables de ψ_i no sólo desarrollarán interacciones electrostáticas con la superficie. De hecho, a menudo superan la repulsión eléctrica y son capaces, por ejemplo, de aumentar la carga positiva de una superficie de carácter ya positivo. Es habitual decir que las interacciones desconocidas son de naturaleza química, a pesar de que este no es, estrictamente hablando, siempre el caso. Hay una amplia variedad de situaciones, desde la formación de uniones químicas (covalentes) a interacciones más débiles como la atracción de van der Waals, los enlaces por puentes de hidrógeno, las fuerzas hidrófobas-hidrófilas, etc. [Lyklema, 1987]. Debido a la ausencia habitual de información sobre la parte más interna de la atmósfera iónica, el tratamiento a menudo no está exento de hipótesis y suposiciones más o menos realistas.

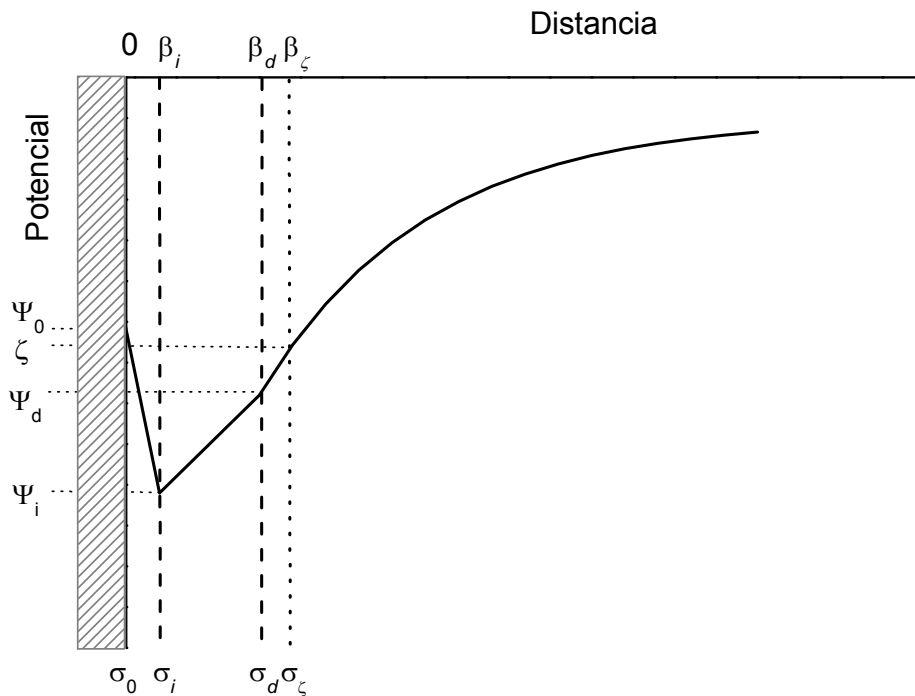


Figura 21. Distribución del potencial en una interfase sólido-líquido cargada negativamente.

A partir del plano $x = \beta_d$ se localizan los iones que sólo poseen interacciones electrostáticas con la superficie y además están sujetos a colisiones con las moléculas del disolvente. Estos iones están distribuidos en un cierto volumen cuya densidad de carga es $\rho(x)$, aunque en la práctica se introduce una densidad superficial de carga difusa σ_d , localizada en $x = \beta_d$, de acuerdo con la expresión:

$$\sigma_d = \int_{\beta_d}^{\infty} \rho(x) dx \quad (4)$$

para una interfase plana, o:

$$\sigma_d = \frac{1}{(a + \beta_d)^2} \int_{\beta_d}^{\infty} r^2 \rho(r) dr \quad (5)$$

para una interfase esférica de radio a , siendo r la coordenada radial con origen en el centro de la partícula.

Debido a la electroneutralidad:

$$\sigma_0 = -\sigma_i - \sigma_d \quad (6)$$

Con respecto a la descripción de la doble capa eléctrica, de forma general se acepta la siguiente nomenclatura:

- La distribución volúmica de carga que se extiende desde $x = \beta_d$ se denomina *capa difusa* o *parte difusa de la doble capa*.
- La región entre $x = 0$ y $x = \beta_d$ se denomina a menudo *capa de Stern*, *parte interna de la doble capa* o *parte densa de la doble capa*.
- El plano $x = \beta_i$ es el *plano interior de Helmholtz* (PIH) y a $x = \beta_d$ se le llama *plano exterior de Helmholtz* (PEH). El PEH identifica el comienzo de la capa difusa.

La capa difusa puede definirse matemáticamente de una manera simple. La condición de equilibrio para los iones en esta capa puede escribirse [Lyklema, 1995]:

$$-ez_i \nabla \psi - k_B T \nabla \ln n_i = 0, \quad i = 1, \dots, N \quad (7)$$

donde el primer término corresponde a la fuerza electrostática sobre los iones i (carga ez_i , concentración n_i) y el segundo es la fuerza termodinámica. La integración de la ecuación 7 bajo la condición $n_i = n_i^0(\infty)$ para $\psi = 0$, da lugar a la distribución de Boltzmann:

$$n_i(\vec{r}) = n_i^0(\infty) \exp[-ez_i\psi(\vec{r})/k_B T], \quad i = 1, \dots, N \quad (8)$$

donde $n_i^0(\infty)$ es la concentración de los iones i lejos de la partícula, k_B es la constante de Boltzmann, y T es la temperatura absoluta. Finalmente, la ecuación de Poisson determina la relación entre el potencial y las concentraciones iónicas:

$$\nabla^2 \psi(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0} \rho(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0} \sum_{i=1}^N ez_i n_i^0(\infty) \exp\left[-\frac{ez_i\psi(\vec{r})}{k_B T}\right] \quad (9)$$

siendo $\epsilon_{rs}\epsilon_0$ la permisividad eléctrica del medio de dispersión. La ecuación 9 (ecuación de Poisson-Boltzmann) es el punto de partida de la descripción de Gouy-Chapman de la capa difusa.

En la práctica, no hay una solución general a esta ecuación en derivadas parciales, excepto en los siguientes casos [Dukhin, 1974; Russel y cols., 1989]:

❖ Una interfase plana con potencial bajo. Donde:

$$\psi = \psi_d e^{-\kappa x} \quad (10)$$

donde κ^{-1} es la longitud de Debye, y claramente es una medida del espesor de la capa difusa. Su valor es:

$$\kappa^{-1} = \left\{ \frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0 k_B T}{\sum_{i=1}^N e^2 z_i^2 n_i^0(\infty)} \right\}^{1/2} \quad (11)$$

Para hacerse una idea de los valores típicos de κ^{-1} , es útil la siguiente fórmula práctica para un electrolito 1:1 ($N = 2$, $z_1 = 1$, $z_2 = -1$) en agua como disolvente a 25 °C: $\kappa^{-1} = 0.308 c^{-1/2}$ nm, si c es la concentración molar de electrolito; $n_1 = n_2 = 10^3 N_{Ac}$ para un electrolito 1:1.

- ❖ Una interfase plana en un electrolito simétrico z -valente ($z_1 = -z_2 = z$) para un potencial arbitrario ψ_d :

$$y(x) = 2 \ln \left[\frac{1 + e^{-\kappa x} \tanh(y_d / 4)}{1 - e^{-\kappa x} \tanh(y_d / 4)} \right] \quad (12)$$

donde y es el potencial adimensional:

$$y = \frac{ze\psi}{k_B T} \quad (13)$$

y puede darse una expresión similar para y_d .

- ❖ Una interfase esférica de radio a , a potenciales bajos (aproximación de Debye):

$$\psi(r) = \psi_d \left(\frac{a}{r} \right) e^{-\kappa(r-a)} \quad (14)$$

mientras que deben aplicarse soluciones numéricas o expresiones analíticas aproximadas en otros casos. Esto se ilustra en la figura 22, donde se comparan las ecuaciones 10 y 12 para la interfase plana; y en la figura 23, donde la solución aproximada (ecuación 12), se representa junto a resultados numéricos [López-García y cols., 1996].

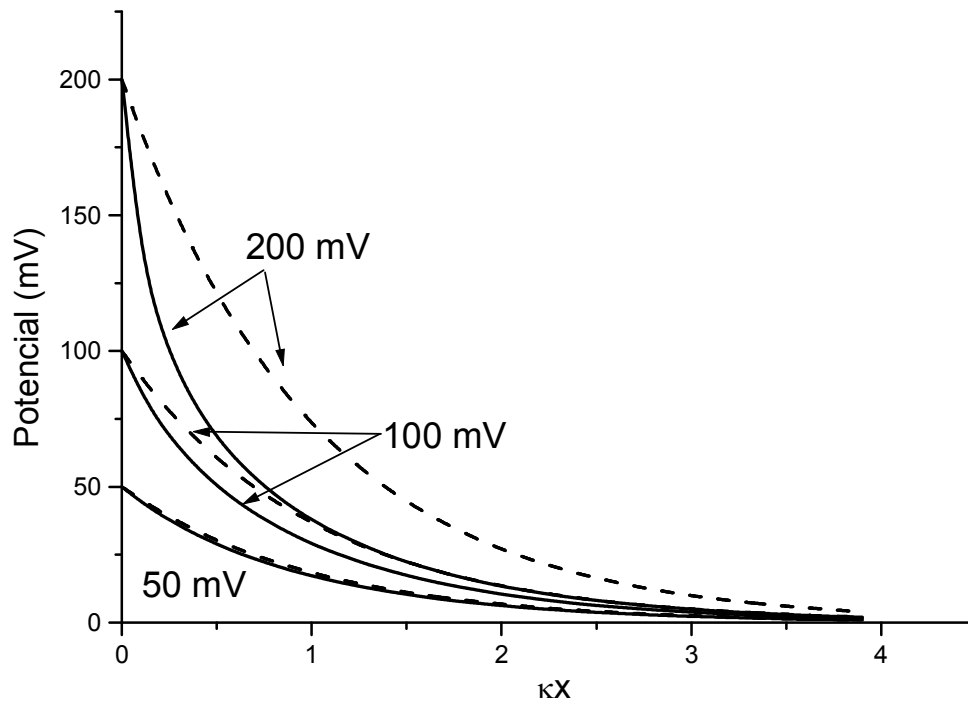


Figura 22. Distribución del potencial en una interfase plana para electrolitos monovalentes calculado mediante la fórmula aproximada de Debye-Hückel (ecuación 10, ---) y el cálculo completo (ecuación 12, -) para los valores de ψ_d indicados.

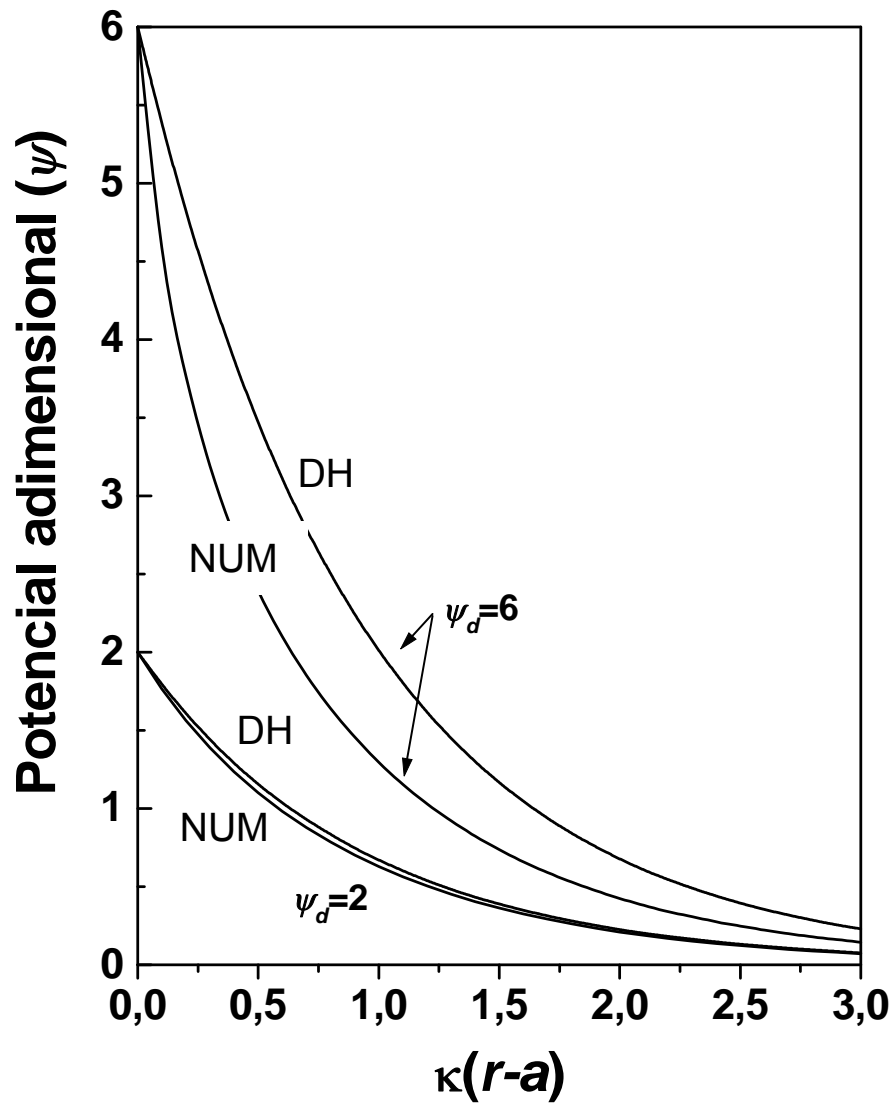


Figura 23. Potencial adimensional (ψ) en torno a una partícula esférica en función de la distancia reducida a la superficie para electrolitos monovalentes. *DH*: aproximación de Debye-Hückel; *NUM*: cálculo totalmente numérico [Russel y cols., 1989].

4.2. FENÓMENOS ELECTROKINÉTICOS.

POTENCIAL ZETA

Supongamos que se aplica un campo eléctrico paralelamente a la interfase sólido/disolución de la figura 21, y que la superficie sólida está fija en nuestro sistema de coordenadas. De lo expuesto anteriormente, se deduce que el líquido adyacente al sólido tiene una carga eléctrica neta, opuesta a la de la superficie de éste. De forma general, parte de los iones de este líquido están unidos fuertemente a la superficie mediante fuerzas atractivas de corto alcance y pueden considerarse inmóviles. Lo mismo se admitirá con respecto al líquido en esta región. Sin embargo, esto es una aproximación, ya que tales iones pueden ser móviles y, en ese caso, no es raro que su movilidad tenga un valor próximo a la del núcleo de la disolución. En las condiciones generales comentadas, los iones y el líquido externo pueden ser desplazados por el campo externo. De hecho, la fuerza eléctrica actuará sobre los iones (principalmente, contraiones) y arrastrará líquido en su movimiento. De esta manera, se producirá un movimiento relativo entre el sólido y el líquido; lo que constituye el fundamento del fenómeno electrocinético.

El potencial existente en el límite entre las fases móvil e inmóvil es conocido como *potencial electrocinético* o *potencial zeta* (ζ). La localización exacta (distancia β_ζ en la figura 21) del también llamado *plano de cizalladura* o *plano de deslizamiento* es un aspecto ampliamente investigado. De hecho, incluso la existencia de este plano y del mismo potencial zeta son estrictamente una abstracción [Lyklema, 1977], ya que se basan en la aceptación de que la viscosidad del medio líquido varía discontinuamente desde infinito en la capa de Stern a un valor finito en la atmósfera difusa. Una posible forma de salvar, al menos formalmente, esta incertidumbre es suponer una variación gradual de la viscosidad η desde la superficie hasta el inicio de la parte difusa [Dukhin, 1974; López García y cols., 1996; Lyklema, 1977], pero la verificación experimental cuantitativa de tal

variación no es accesible. Como todos los tratamientos del fenómeno electrocinético se basan en la existencia del potencial zeta, admitiremos el modelo de la variación de la viscosidad como razonablemente aceptable. Esto significa que las técnicas electrocinéticas nos darán información sobre el potencial zeta, allá donde quiera que esté localizado. Tratar de obtener más información es difícil y muy dependiente del modelo de doble capa elegido [Dukhin, 1974].

Los numerosos avances en la teoría de los fenómenos electrocinéticos [Dukhin y Derjaguin, 1974; Lyklema, 1998; Mangelsdorf y White, 1990, 1998a, b; Zukoski y Saville, 1986] nos han permitido relacionar los efectos electrocinéticos observados no sólo con el potencial zeta, sino también con otros parámetros de la doble capa y con la existencia de una capa de Stern con iones capaces de moverse bajo la acción de campos externos. Este número creciente de parámetros a determinar requiere una investigación experimental bien planificada y, a menudo, utilizando diferentes técnicas electrocinéticas.

4.2.1. ELECTROFORESIS: TEORÍA ELEMENTAL

Los diferentes fenómenos electrocinéticos pueden distinguirse mediante la fase móvil-inmóvil, la naturaleza del campo aplicado y la magnitud que debe determinarse experimentalmente. Comentaremos brevemente la técnica de la electroforesis por ser la que hemos empleado en nuestra investigación.

Sea una partícula esférica de radio a en presencia de un campo eléctrico que, lejos de la partícula, es \vec{E}_∞ . Se considera que la partícula no es conductora y tiene una permisividad eléctrica mucho menor que la del medio de dispersión. Por el momento, también aceptaremos que la concentración de electrolito es muy baja y que a es también muy pequeño, por lo que se da la siguiente desigualdad entre el grosor de la doble capa (ecuación 11) y el radio:

$$\kappa^{-1} \gg a \quad \text{o} \quad \kappa a \ll 1 \quad (15)$$

es decir, estamos en la aproximación de la doble capa gruesa (o de Hückel). Debido a que la atmósfera de iones se extiende a lo largo de estas grandes distancias, la densidad de carga en su interior será muy pequeña y, por lo tanto, el campo aplicado no provocará casi ningún movimiento de líquido en torno a la partícula. Como resultado, las únicas fuerzas que actuarán sobre ésta son las fuerzas de arrastre de Stokes (\vec{F}_S) y la electrostática (\vec{F}_E). Como la partícula se mueve a velocidad constante (velocidad electroforética, \vec{v}_e), la fuerza neta debe ser nula:

$$\begin{aligned}\vec{F}_S &= -6\pi\eta a\vec{v}_e \\ \vec{F}_E &= Q\vec{E}_\infty \\ \vec{F}_S + \vec{F}_E &= 0\end{aligned}\tag{16}$$

En estas ecuaciones, η es la viscosidad del medio de dispersión, y Q es la carga total superficial de la partícula. De la ecuación 16:

$$\vec{v}_e = \frac{Q}{6\pi\eta a}\vec{E}_\infty\tag{17}$$

Si recordamos que el potencial en la superficie [Panofski y Phillips, 1975], bajo la condición de la ecuación 15, es:

$$V(a) = \frac{1}{4\pi\epsilon_{rs}\epsilon_0} \frac{Q}{a}\tag{18}$$

la identificación de $V(a)$ con el potencial zeta (ζ), da lugar a:

$$\vec{v}_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} \zeta \vec{E}_\infty\tag{19}$$

o la movilidad electroforética (u_e):

$$u_e = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{\eta} \zeta \quad (20)$$

lo que se conoce como fórmula de Hückel.

Consideremos la situación opuesta, para la que también existe una solución analítica, correspondiente a la doble capa delgada:

$$\kappa^{-1} \ll a \quad \text{o} \quad \kappa a \gg 1 \quad (21)$$

En este caso, los iones de la doble capa apantallan la carga superficial en una distancia corta, lo que significa que, como hemos descrito antes, se pierde la electroneutralidad en esta región. El campo provocará, por lo tanto, movimientos del líquido cargado que afectarán al propio movimiento de la partícula. La solución en este caso es más complicada pero es posible cualitativamente.

Para ello se ha de suponer que el potencial ζ no es muy elevado, lo que permite admitir que la doble capa no se deforma por acción del campo aplicado. Por ello, la distribución de potencial eléctrico es la simple superposición del potencial debido al campo más el inducido en la interfase (figura 24). Específicamente [Ohshima, 1998; Panofski y Phillips, 1975]:

$$\psi(F) \Big|_{r=a} = -E_\infty a \cos\theta - \frac{1}{2} E_\infty a \cos\theta = -\frac{3}{2} E_\infty a \cos\theta \quad (22)$$

Que se puede interpretar como si la polarización diese lugar a un campo aumentado en un factor 3/2, lo que modifica la ecuación (20) para dar la de Smoluchowski:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{\eta} \zeta \quad (23)$$

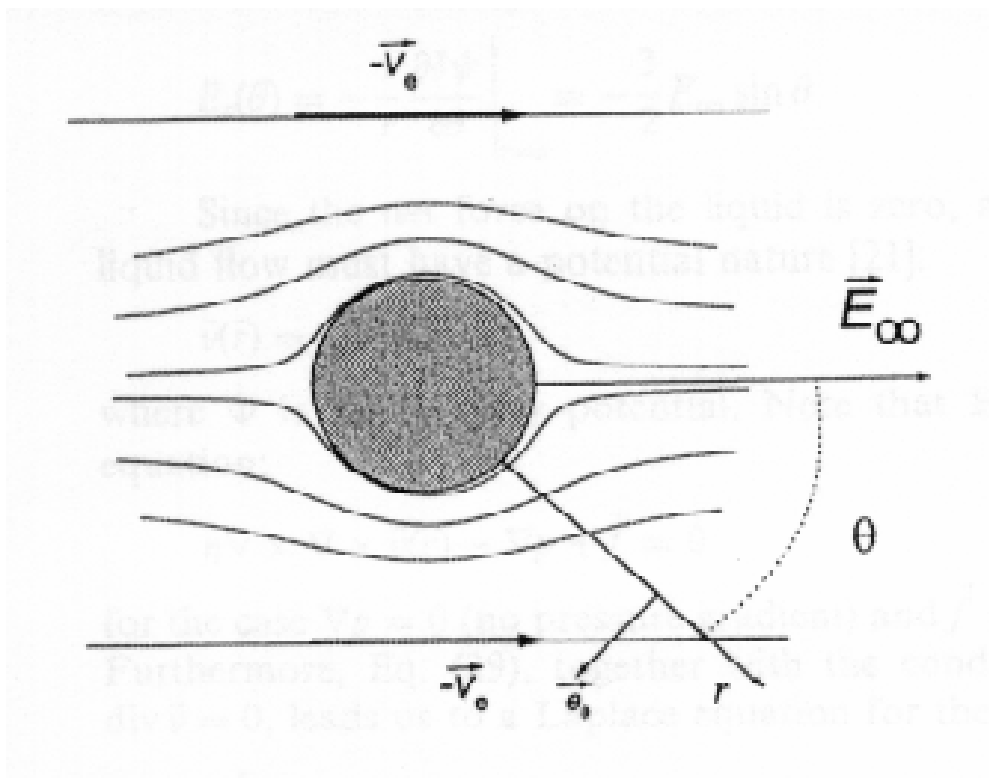


Figura 24. Flujo de líquido en torno a una partícula esférica cargada negativamente. Lejos de la interfase, el líquido se mueve con una velocidad constante $-\vec{v}_e$.

De todo lo expuesto, debe entenderse que la ecuación 23 es válida para cualquier geometría siempre que [Delgado y cols., 1986; Morrison, 1970]: *i*) la partícula dispersa adquiera carga superficial, que se compensa mediante un exceso de carga de signo opuesto en el medio; *ii*) la partícula sea rígida y de forma arbitraria, con potencial eléctrico superficial uniforme (ζ) con respecto al líquido lejos de la interfase; *iii*) las dimensiones de la partícula sean tales que el radio de curvatura de la interfase en cualquier posición sea mucho mayor que el grosor de la doble capa; *iv*) la partícula no sea conductora; *v*) los efectos de la conductancia superficial sean despreciables; *vi*) la constante dieléctrica y la viscosidad del medio sean independientes de la posición (ver, sin embargo, Hunter, 1966; James, 1979; Lyklema y Overbeek, 1961a,b; Overbeek, 1952); y, *vii*) el campo aplicado, a

pesar de estar deformado por la presencia de la partícula, se suma vectorialmente al campo local en equilibrio de la doble capa.

4.2.2. ELECTROFORESIS: TRATAMIENTOS MÁS ELABORADOS

Henry fue el primer autor que eliminó la restricción (*iii*) anterior, y resolvió el problema para esferas (también para cilindros infinitos) de cualquier radio a , es decir, cualquier valor κa , aunque para pequeños potenciales zeta, ya que se acepta que la ecuación 14 determina la distribución de potencial en la doble capa en equilibrio [Henry, 1931]. Restringiéndonos al caso de la esfera, la ecuación de Henry para partículas no conductoras es:

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta f(\kappa a) \quad (24)$$

donde:

$$f(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - 5 \frac{(\kappa a)^3}{48} + \dots \quad (25)$$

Una fórmula aproximada para $f(\kappa a)$ fue publicada a finales del siglo pasado [Ohshima, 1998].

Gracias a Overbeek, podemos entender y evaluar la movilidad electroforética y, en general, la física del fenómeno electrocinético [Overbeek, 1943, 1952]. Booth también elaboró una teoría que siguió líneas similares, para esferas en ambos casos [Booth, 1948a,b, 1950]. Estos autores, fueron los primeros en considerar que durante la migración electroforética la doble capa pierde su simetría original y se polariza: la distribución del potencial fuera del equilibrio no es la simple adición del creado por el campo externo en torno a la esfera no conductora y el de la doble capa eléctrica en equilibrio [Derjaguin y Dukhin, 1974]. El

problema matemático es mucho más complejo y hasta la aparición de los ordenadores sólo estaban disponibles teorías aproximadas (bajo ζ , gran κa) [Booth, 1948a,b, 1950; Overbeek, 1943, 1950]. Los primeros tratamientos numéricos del problema, válidos para valores arbitrarios del radio, el potencial zeta o las concentraciones iónicas, aparecieron a partir de la década de los sesenta [O'Brien y White, 1978; Wiersema y cols., 1966].

Como no es relevante describir estos tratamientos, simplemente mostraremos algunos resultados en la figura 25. La validez de la fórmula de Smoluchowski para valores elevados κa y valores bajos a moderados de ζ es claramente apreciable. También es evidente que el tratamiento de Henry es válido para ζ bajo, independientemente del grosor de la doble capa.

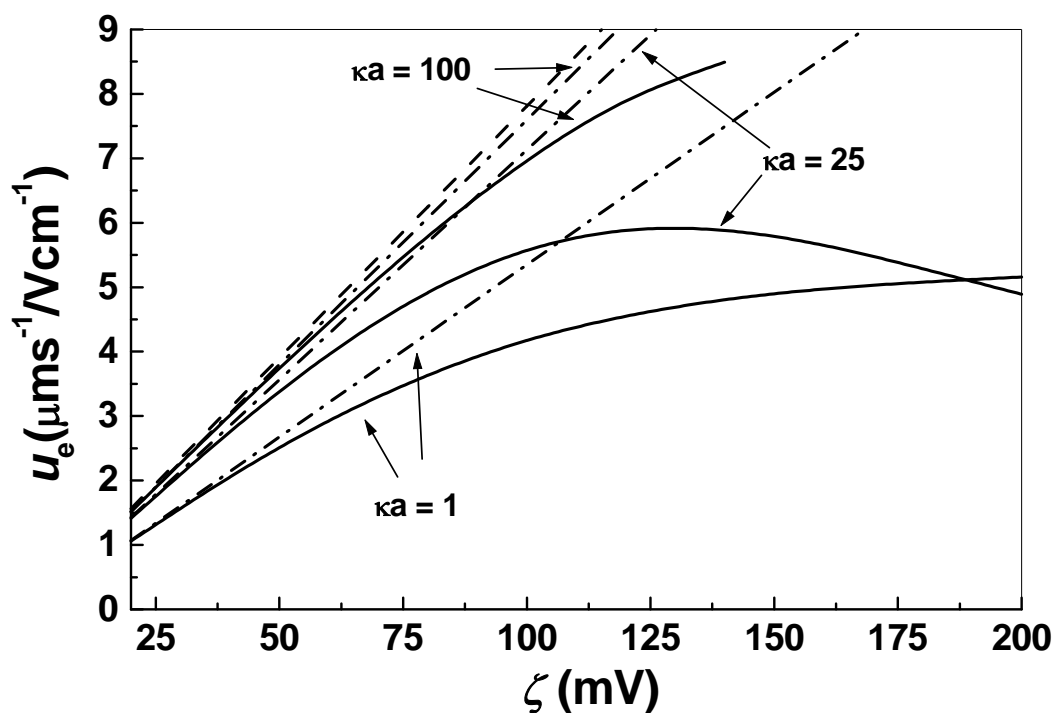


Figura 25. Movilidad electroforética frente a potencial zeta (ζ) para partículas esféricas de radio $a = 100$ nm y para $\kappa a = 1, 25$ y 100 en disoluciones de KCl. Línea discontinua (---): ecuación de Smoluchowski; líneas discontinuas – punteadas (-.-): fórmula de Henry; líneas continuas (-): teoría de O'Brien y White.

4.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La determinación de las movilidades electroforéticas (u_e) de las distintas suspensiones acuosas de nanopartículas se llevó a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra). La medida está basada en el análisis de la autocorrelación de la luz láser dispersada por las nanopartículas en movimiento. El aparato utilizado permite determinar u_e con errores del 5 % o menores.

La temperatura de medida (25 °C) se mantuvo constante (hasta ± 0.2 °C) utilizando un módulo Peltier.

Las suspensiones estudiadas tenían una concentración de nanopartículas de aproximadamente el 0.1 % (p/v). Antes de preparar la suspensión se fijaba la concentración del electrolito (KNO_3) deseada y se ajustaba, en su caso, el pH con HNO_3 o KOH . Debido a la dificultad que presentaba el ajuste de ciertos pH, la preparación de las suspensiones se realizó cuando estos eran estables. De esta manera, evitamos que las nanopartículas estén demasiado tiempo en disolución antes de medirla, lo que podría comprometer la estabilidad de sus propiedades eléctricas superficiales, al favorecerse fenómenos de oxidación y de degradación [Arias y cols., 2001; Plaza y cols., 2002]. Las medidas se realizaron tras 24 horas de contacto de las nanopartículas con el medio de dispersión a $25.0 \text{ °C} \pm 0.5 \text{ °C}$ y bajo agitación mecánica (50 rpm). Los datos presentados son el promedio de 12 determinaciones, cambiando la muestra cada tres. La teoría de O'Brien y White se utilizó para convertir los valores de u_e en ζ [O'Brien y White, 1978].

En el caso del estudio de la estabilidad de las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, las medidas se realizaron de igual forma. La única diferencia introducida fue la composición del medio de dispersión de las nanopartículas (tampón $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$) y la temperatura de las suspensiones ($37.0 \pm 0.5 \text{ °C}$).

4.4. EFECTOS DEL pH Y DE LA FUERZA IÓNICA SOBRE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES

Las propiedades superficiales de los óxidos de hierro son extremadamente sensibles a las variaciones del pH [Plaza y cols., 2002], lo cual no es predecible en el caso de la poli(ϵ -caprolactona) debido a la naturaleza de los grupos responsables de su carga (ácidos carboxílicos libres) [Fattal y cols., 1997; Lince y cols., 2008; Sinha y cols., 2004]. Por ello, centraremos en primer lugar nuestro estudio en el efecto del pH sobre la movilidad electroforética (u_e) y el potencial zeta (ζ) de las nanopartículas.

La figura 26 muestra ambos parámetros en función del pH bajo una fuerza iónica moderada constante (KNO_3 10^{-3} M). Como puede observarse, las nanopartículas de magnetita presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero bien definido en torno a 7, resultado que concuerda con investigaciones previamente realizadas [Arias y cols., 2001; Matijevic, 2002; Plaza y cols., 2002; Regazzoni y cols., 1983]. En el caso del polímero, el punto isoeléctrico se encuentra en las proximidades del pH = 5.5. Esta diferencia entre el comportamiento electrocinético de los núcleos de Fe_3O_4 y la PCL convierten a la electroforesis en una herramienta muy útil para comprobar cualitativamente la eficacia del recubrimiento conformando de esta manera la obtención de nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. De hecho, la figura 26 muestra claramente cómo las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (relación de masas iniciales 2:4) presentan un comportamiento casi idéntico a las de polímero puro. Por lo tanto, podemos concluir que el recubrimiento polimérico oculta muy eficazmente al núcleo magnético, haciendo que la superficie de las nanopartículas compuestas sea indistinguible de la de las nanopartículas de polímero, hecho que se ha observado

en otros trabajos de nuestro grupo de investigación [Arias y cols., 2001, 2006, 2008b].

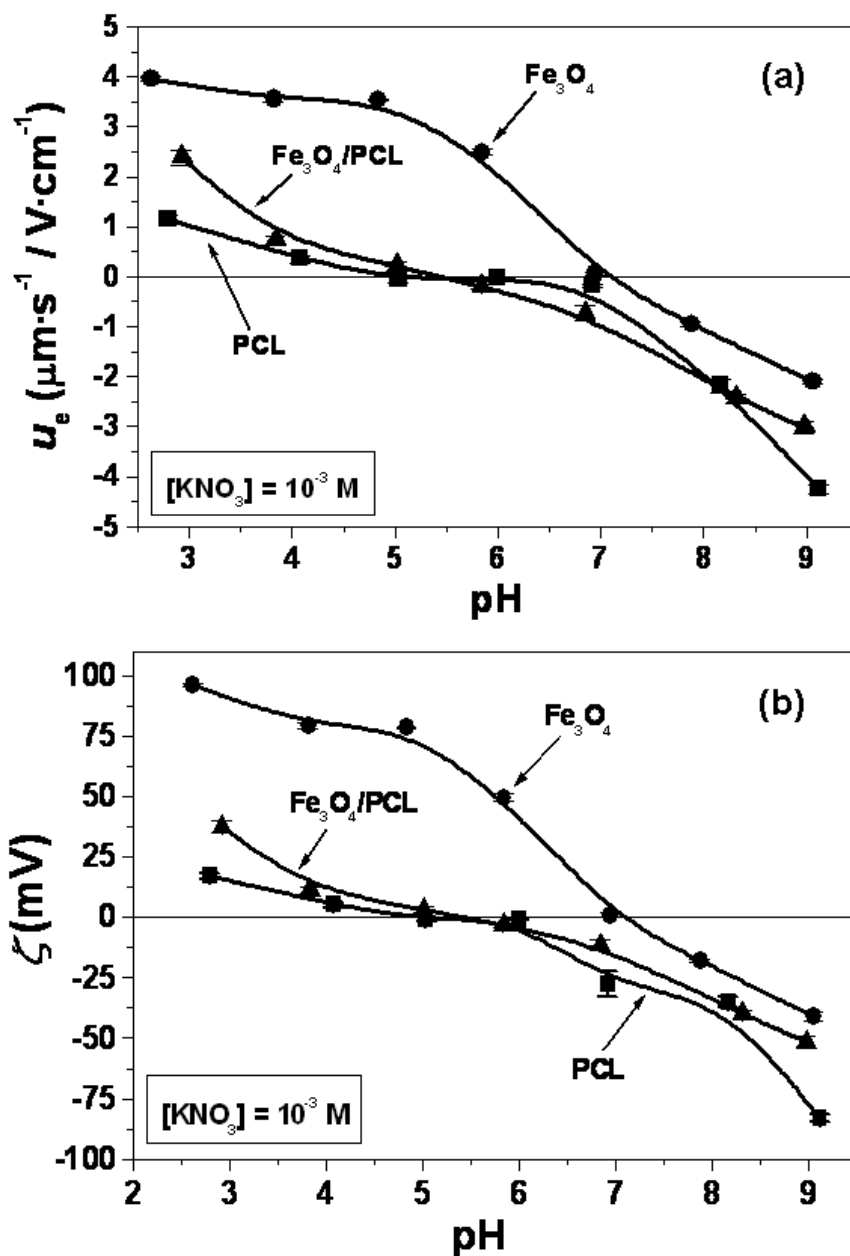


Figura 26. Movilidad electroforética (u_e) (a) y potencial zeta (ζ) (b) de las nanopartículas de Fe_3O_4 (\bullet), PCL (\blacksquare), y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (\blacktriangle) en función del pH, en presencia de 10^{-3} M KNO_3 .

Para confirmar estos interesantes resultados determinamos la movilidad de los tres tipos de coloides en función de la concentración de KNO_3 a $\text{pH} = 6$, siguiendo la misma metodología. Los resultados de este análisis se representan en la figura 27. De nuevo se observa de forma muy clara la similitud entre la electrocinética del polímero y de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, y las diferencias con respecto a la magnetita.

La técnica de electroforesis también fue utilizada, siguiendo la misma técnica y rutina, para analizar las características y la eficacia del recubrimiento cuando cambia la relación de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ utilizada en la formulación de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. La figura 28 muestra los valores de u_e de las nanopartículas compuestas en un medio de dispersión acuoso, en presencia o en ausencia de una fuerza iónica moderada constante ($\text{KNO}_3 10^{-3} \text{ M}$). De forma muy patente, puede apreciarse cómo los valores de u_e característicos de los núcleos magnéticos conducen hacia los de las nanopartículas de polímero puro al aumentar la cantidad de polímero utilizada en la relación de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$, principalmente por encima de 3:4. Por lo tanto, desde un punto de vista electroforético podemos justificar la utilización de una relación de masas iniciales 2:4 para la formulación de las nanopartículas compuestas. Sólo así los valores de u_e de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ son indistinguibles de los del coloide polimérico y, por lo tanto, el recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos será óptimo y eficaz.

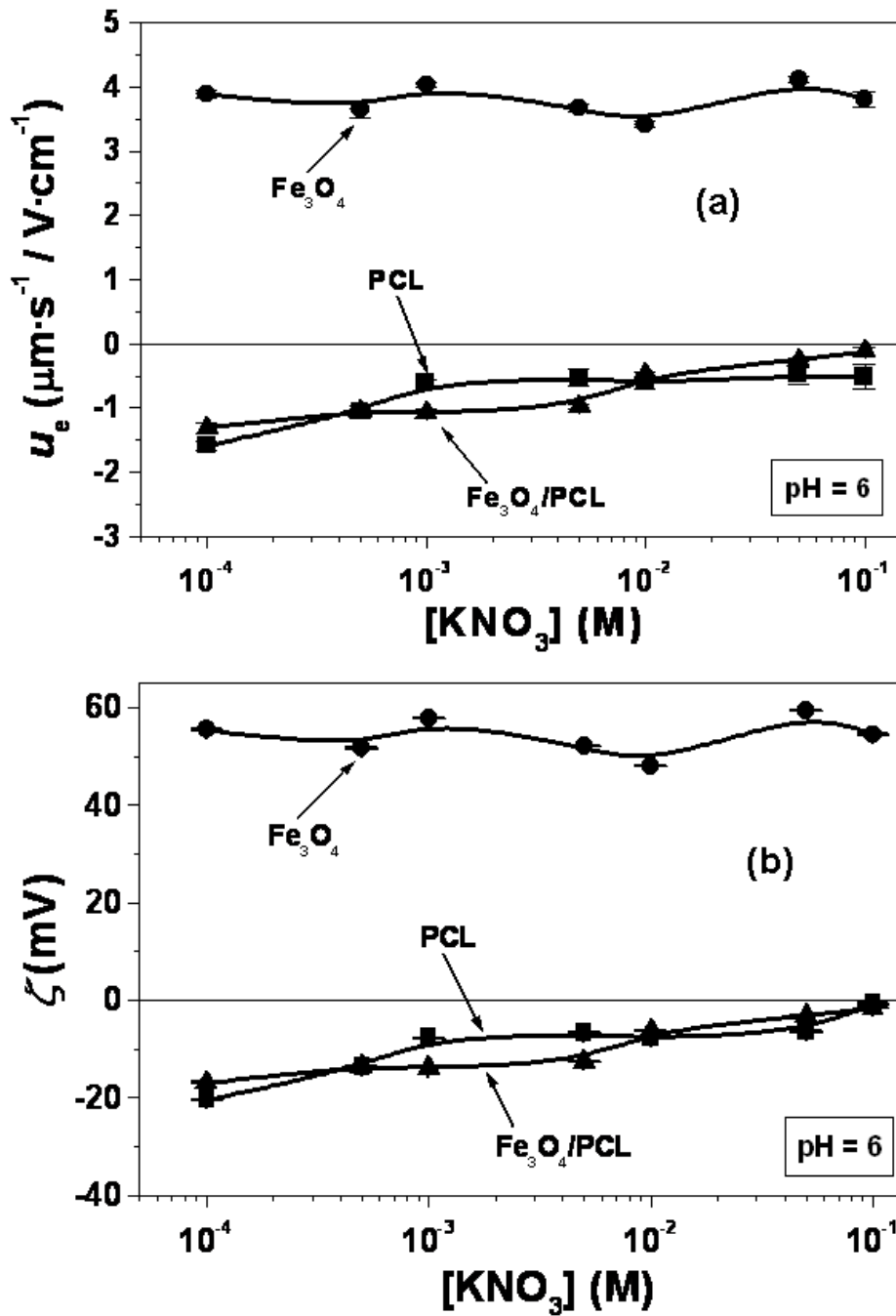


Figura 27. Movilidad electroforética (u_e) (a) y potencial zeta (ζ) (b) de de las nanopartículas de Fe_3O_4 (●), PCL (■), y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (▲) en función de la concentración de KNO_3 a pH = 6.

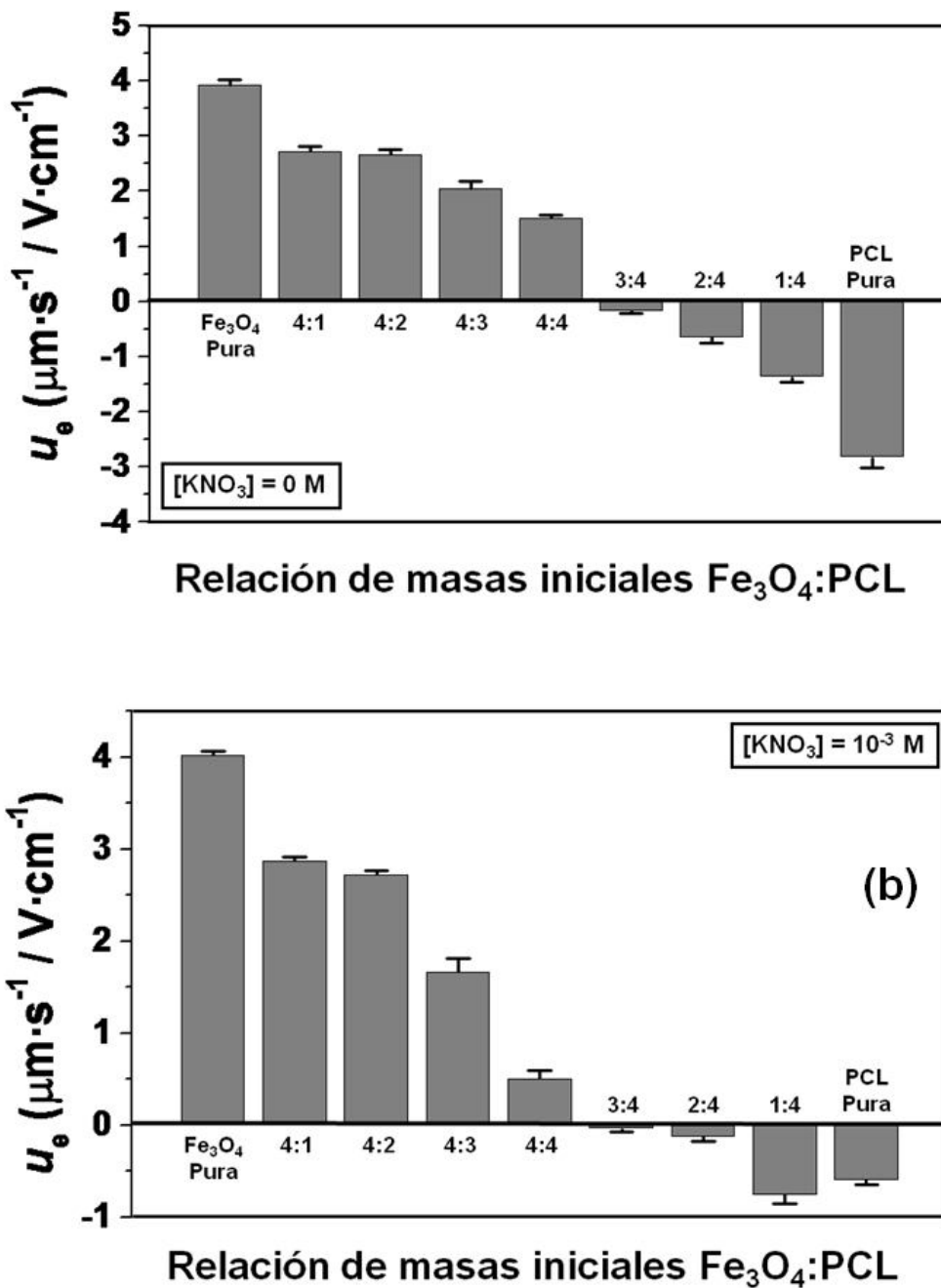


Figura 28. Histograma de las movilidades electroforéticas (u_e) de las nanopartículas compuestas Fe_3O_4 /PCL (a) en agua y (b) en presencia de 10^{-3} M KNO_3 para diferentes relaciones de masas iniciales Fe_3O_4 :PCL. También se incluyen los valores de u_e de las nanopartículas Fe_3O_4 y de PCL.

4.5. MECANISMO DE FORMACIÓN DEL RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO SOBRE LOS NÚCLEOS MAGNÉTICOS

Con toda la información expuesta sobre las características superficiales de los nanomateriales estudiados, podemos argumentar el mecanismo por el que una matriz de poli(ϵ -caprolactona) se deposita sobre los núcleos de magnetita y los engloba. En concreto, puede predecirse una interacción electrostática netamente atractiva entre las nanopartículas de magnetita con carga eléctrica positiva y el polímero con carga eléctrica negativa. Recuérdese (figura 26), que las condiciones ligeramente ácidas en las que se formulan las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (pH = 6.0) determinan estas cargas eléctricas superficiales.

Gracias a esta interacción electrostática de tipo netamente atractivo, es posible la concentración del polímero en las inmediaciones de la superficie de los núcleos de magnetita. Este hecho favorece la inclusión de los núcleos superparamagnéticos en el interior de la matriz polimérica y, por lo tanto, la formación de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. Este es un mecanismo ampliamente descrito en la literatura y que justifica la formación de este tipo de coloides magnéticos compuestos [Arias y cols., 2001, 2007a, 2008a].

4.6. ANÁLISIS ELECTROKINÉTICO DE LA ESTABILIDAD DEL RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO.

La experiencia previa de nuestro grupo de investigación nos hace intuir que la técnica de electroforesis puede ser muy útil para caracterizar la velocidad a la que el

polímero poli(ϵ -caprolactona) se degrada y deja zonas cada vez mayores de magnetita expuestas a la disolución [Arias y cols., 2001]. Las medidas electroforéticas de las suspensiones acuosas de magnetita y de nanocompuestos magnéticos (concentración ≈ 0.1 %, m/v) se realizaron reproduciendo las condiciones fisiológicas (pH 7.4 ± 0.1 , y 37.0 ± 0.5 °C) (Malvern Zetasizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). El experimento se consideró finalizado cuando los valores de movilidad electroforética (u_e) de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ coincidían con los de las nanopartículas puras de Fe_3O_4 , señal inequívoca de la pérdida del recubrimiento polimérico.

En la figura 29 se aprecia cómo los valores de u_e de la magnetita permanecen constantes durante todo el período del estudio ($u_e \approx -3.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$). Este valor negativo de u_e tan elevado podría atribuirse a la formación en la superficie de la magnetita de una fina capa de oxidación (maghemita, un estado más oxidado de ésta), como se ha descrito en medios acuosos [Plaza y cols., 2002]. De hecho, los valores de u_e de nanopartículas de maghemita (de igual tamaño a la Fe_3O_4 y bajo las mismas condiciones experimentales) eran muy similares a los de nuestros núcleos de óxido de hierro ($u_e \approx -3.6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Es muy interesante comprobar en esta figura cómo los valores de u_e de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ se aproximan progresivamente a los característicos de los núcleos magnéticos. En concreto, se hacen iguales tras 15 días. A partir de entonces, no se observan diferencias significativas entre la u_e de ambos materiales. Por tanto, podría decirse que la superficie de los núcleos de Fe_3O_4 de los nanocompuestos queda cada vez más expuesta al medio de dispersión (de ahí los valores cada vez más negativos de u_e), por la degradación progresiva del recubrimiento. Así, cuando la cubierta de polímero se pierde completamente, ambos valores de u_e son indistinguibles.

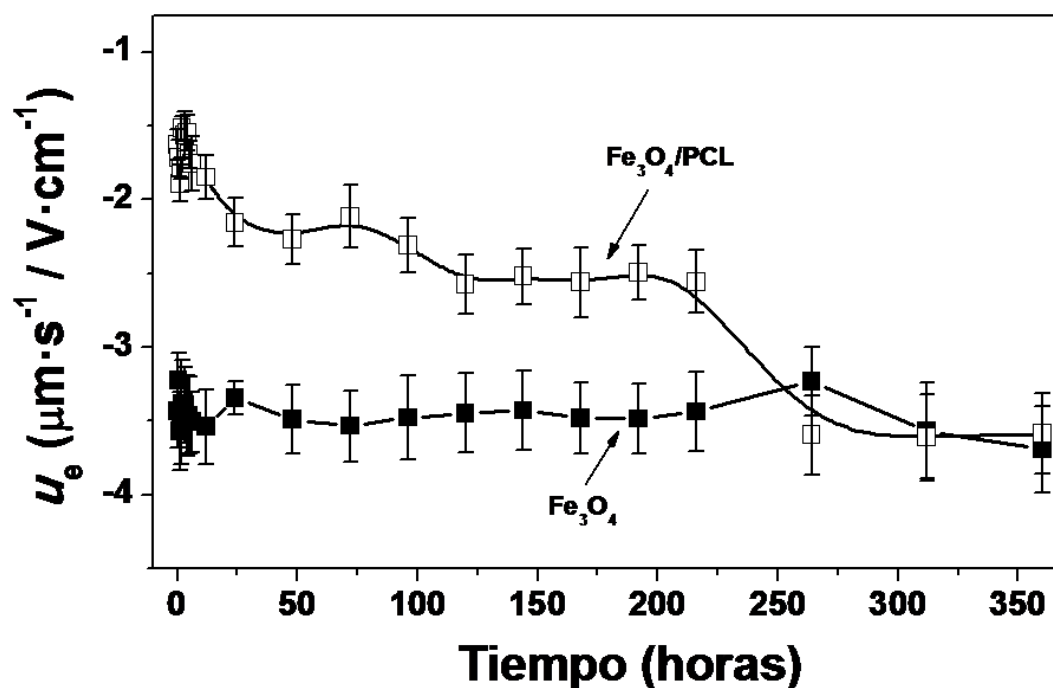


Figura 29. Evolución de los valores de movilidad electroforética (u_e) de las nanopartículas de Fe_3O_4 (■) y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (□) en función del tiempo, a $\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$, y 37.0 ± 0.5 °C.

Esta evolución progresiva de u_e hacia los valores típicos de la Fe_3O_4 , pone de manifiesto cualitativamente que la velocidad de degradación del polímero es lenta, lo que ha sido asociado al alto grado de cristalinidad y a la gran hidrofobia de este polímero. En el caso de que el mecanismo de liberación de un fármaco vehiculizado en esta matriz sea consecuencia del proceso de degradación de ésta, la electroforesis se convierte en una herramienta cualitativa indirecta para caracterizar ese proceso de liberación.

Capítulo 5.

Termodinámica
Superficial

En este capítulo describimos la metodología seguida para la identificación y la cuantificación de las interacciones no electrostáticas en la interfase nanopartícula/medio acuoso, usando una teoría termodinámica de la tensión superficial o energía libre de los sólidos. Con este fin, usaremos un modelo termodinámico que incluye las interacciones de van der Waals y ácido-base entre las nanopartículas, o entre ellas y el medio de dispersión. El modelo permite caracterizar el sólido mediante tres componentes de su energía libre superficial: γ_s^{LW} (Lifshitz-van der Waals, representativa de las interacciones no polares o dispersivas de la interfase), γ_s^+ (aceptor de electrones o ácido de Lewis) y γ_s^- (donante de electrones o base de Lewis). Estas dos últimas contribuciones (polares) contienen información sobre interacciones de corto alcance, a las que se suele llamar fuerzas de solvatación, estructurales o, en caso de un medio acuoso, fuerzas de hidratación.

Estimaremos así la importancia de las contribuciones no electrostáticas al balance total de la energía de interacción entre las nanopartículas de los sistemas analizados. Para llevar a cabo esta determinación, se utilizarán los datos experimentales de los ángulos de contacto formados por líquidos seleccionados con nuestros tres tipos de sistemas: nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$). Además, se prestará especial atención al análisis comparativo de la energía libre superficial de los diferentes tipos de materiales puros: núcleo magnético (Fe_3O_4), recubrimiento polimérico (PCL) y nanopartículas compuestas ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$).

5.1. INTERACCIONES SUPERFICIALES

La principal interacción interfacial a tener en cuenta entre partículas coloidales cargadas, inmersas en un medio acuoso, es la electrostática (*EL*). Este tipo de interacción nos da idea del alcance e intensidad de la repulsión eléctrica. Sin embargo, también existen otro tipo de interacciones entre las moléculas que constituyen las distintas fases en disolución y que pueden adquirir valores significativos. De entre ellas, vamos a considerar dos como más significativas:

- Interacciones dispersivas interacciones electrodinámicas o Lifshitz-van der Waals (*LW*). Se denominan así por su relación con fenómenos de dispersión de luz en el visible y el ultravioleta. Están siempre presentes, al igual que sucede con la interacción gravitatoria. El modelo clásico DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) las considera, junto con la interacción electrostática, responsables de la energía total de interacción entre partículas.
- Otras interacciones no dispersivas (fuerzas de solvatación, estructurales y de hidratación) o interacciones no-DLVO: electrón-donante/electrón-aceptor, o ácido-base de Lewis (*AB*). El modelo teórico que permite analizarlas fue desarrollado a finales del siglo pasado [van Oss y cols., 1986].

5.1.1. INTERACCIONES DISPERSIVAS

Van der Waals fue el primer investigador que sugirió que en los líquidos y gases no ideales existe entre átomos y moléculas una interacción de naturaleza diferente de la electrostática (interacción de van der Waals). Más adelante, diversos investigadores analizaron la naturaleza de esta forma de interacción [Debye, 1921; Langbein, 1974; London, 1930]. Según estos autores, cuando dos átomos o moléculas se encuentran en el vacío, se pueden considerar tres contribuciones diferentes a la interacción de van der Waals:

- Interacciones entre dipolos permanentes o fuerzas de orientación de Keesom.
- Interacciones entre dipolos permanentes y dipolos inducidos en otros átomos o moléculas (fuerzas de inducción de Debye).
- Interacciones entre dipolos instantáneos (originados por fluctuaciones de carga eléctrica) y dipolos inducidos: fuerzas de dispersión de London.

El conjunto de estas fuerzas dispersivas entre átomos o pequeñas moléculas disminuye muy rápidamente con la distancia entre partículas (l), dada su dependencia con l^{-6} en el vacío. Las interacciones de London son universales y aparecen entre cualquier par de átomos o moléculas en fase condensada. La contribución de este tipo de interacciones es muy superior a las de Keesom y Debye [Fowkes, 1963], las cuales requieren que haya dipolos permanentes [Chaudhury y Good, 1983; Fowkes y Mostafa, 1978]. En efecto, se ha demostrado que, macroscópicamente, las interacciones en fase condensada son principalmente de dispersión (London-van der Waals), siendo la contribución neta de las otras dos formas del orden del 2-3 % del total de la energía de interacción dispersiva [Chaudhury, 1987]. En todo caso, en este tipo de sistemas macroscópicos las interacciones van der Waals-Keesom y van der Waals-Debye se pueden tratar de igual forma que las interacciones van der Waals-London [Abrikossova y Derjaguin, 1992; Chaudhury y Good, 1983]. Por eso, todas ellas se pueden agrupar como interacciones electrodinámicas, denominadas genéricamente interacciones Lifshitz-van der Waals (LW).

Debe recordarse que aunque las interacciones dispersivas son débiles en comparación con las electrostáticas responsables del alcance iónico o del covalente, que afectan de forma considerable a un variado conjunto de fenómenos relacionados con los sistemas coloidales, tales como la adhesión, la adsorción, la agregación de partículas en suspensión o la estructura de macromoléculas

condensadas, como polímeros o proteínas [Israelachvili, 1991]. Resumiendo, las características esenciales de estas interacciones son:

- Pueden ser efectivas a una distancia entre 0.2 y 10 nm.
- En general, son atractivas, aunque, como ya indicó Hamaker, para partículas de materiales diferentes inmersas en un líquido, pueden ser repulsivas.
- Son fuerzas no aditivas, pues la interacción dispersiva entre dos sistemas físicos se ve afectada por la presencia de otros cercanos.

Matemáticamente, es posible obtener mediante un término global la contribución a la tensión superficial de todas las interacciones de tipo dispersivo. Esto se realiza mediante la teoría de Lifshitz de la atracción entre sistemas macroscópicos [Ninhan y Parsegian, 1970; Parsegian y Ninhan, 1969] y se denomina componente LW o Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) a la componente de la tensión superficial o energía libre superficial asociada a estas interacciones.

5.1.2. INTERACCIONES NO-DLVO

Hay una serie de fenómenos relacionados con la estabilidad coloidal, que no se pueden explicar sólo mediante la interacción electrostática entre dobles capas eléctricas y las fuerzas de van der Waals. Así, por ejemplo, el hinchamiento espontáneo de arcillas secas cuando están en contacto con agua [van Olphen, 1977]. Tampoco puede explicarse por qué las dispersiones de sílice no coagulan en el punto isoeléctrico (o pH de potencial zeta cero) en el seno de disoluciones salinas concentradas [Allen y Matijević, 1969]. Recientemente, se han encontrado comportamientos similares en suspensiones de sulfuro de zinc [Durán y cols., 1995] o de látex de etilcelulosa [Vera y cols., 1996], entre otros ejemplos [Laskowski y Pugh, 1992; Pashley, 1992]. Por eso ha sido necesario introducir las denominadas fuerzas no-DLVO (cuyo alcance es del orden de pocos nanómetros), entre las que se incluyen la repulsión hidrófila, la atracción hidrófoba, los enlaces de hidrógeno, los enlaces π , o la presión osmótica en

suspensiones muy concentradas de polímeros. Las fuerzas más conocidas son las que tienen su origen en la solvatación de las superficies (por lo que se denominan estructurales), pudiendo ser atractivas (efecto hidrófobo), repulsivas (efecto hidrófilo) e incluso oscilatorias. Son interacciones de tipo polar y pueden llegar incluso a alcanzar un valor dos órdenes de magnitud superior a las interacciones EL y LW . Analizaremos a continuación los aspectos físicos fundamentales de estas fuerzas no-DLVO.

A diferencia de las teorías sobre las fuerzas de van der Waals y de interacción entre dobles capas eléctricas, que son teorías del continuo basadas en las propiedades macroscópicas del medio líquido (por ejemplo, su constante dieléctrica, densidad o índice de refracción), las fuerzas no-DLVO actúan a pequeñas distancias de la interfase. Así, los valores de estas magnitudes son diferentes de los que adquieren en el seno del líquido. Por lo tanto, el potencial de interacción entre moléculas situadas a esas distancias, puede ser muy distinto del esperado en teorías del continuo. De esta forma, la densidad en el caso de los líquidos contenidos entre dos paredes muy próximas entre sí es oscilatoria, con una periodicidad del orden de magnitud del tamaño molecular [Israelachvili, 1991]. En efecto, sólo con consideraciones geométricas, sin tener en cuenta interacciones atractivas entre las moléculas de disolvente y las paredes, puede argumentarse que las moléculas se ven forzadas a acomodarse entre las dos superficies, siguiendo un cierto ordenamiento que origina la fuerza oscilatoria de solvatación [Christenson y Horn, 1985; Christenson, 1988; Horn y Israelachvili, 1981].

La situación es mucho más compleja en los sistemas físicos reales: en el caso de existir una interacción atractiva entre la superficie y las moléculas de líquido adyacentes, el empaquetamiento molecular descrito será más denso y la fuerza resultante entre las fases sólidas, aunque oscilatoria, tendrá una componente repulsiva de largo alcance. Si, por el contrario, la interacción superficie-líquido es más débil que la interacción líquido-líquido, la fuerza de solvatación oscilatoria presentará una componente monótona atractiva.

A la componente de la tensión superficial asociada a estas interacciones no dispersivas, se le engloba en un término general denominado ácido-base (γ^{AB}).

5.1.3. CONTRIBUCIONES A LA ENERGÍA LIBRE SUPERFICIAL. TEORÍA DE VAN OSS Y COLS.

Para poder predecir el valor que adquieren las interacciones ya descritas en este capítulo [Lifshitz-van der Waals (*LW*) y ácido-base (*AB*)] es necesario hacer previamente una caracterización termodinámica de la superficie. Para ello, consideraremos el proceso reversible de acercar dos sistemas físicos en el vacío, formados por un sólido o líquido, *I*, hasta formar una fase continua donde entran en contacto superficies iguales unitarias [Good, 1993]. Se denomina energía libre de cohesión ($\Delta G_{C,1}$) a la variación de energía libre que tiene lugar en el proceso, y trabajo de cohesión al opuesto de esta magnitud. A partir de ello podremos definir la tensión superficial (o energía libre superficial) del material *I* (γ_1) de la forma:

$$\Delta G_{C,1} = -W_{C,1} = -2\gamma_1 \quad (26)$$

indicando el factor 2 que al unir las dos superficies de los sistemas físicos desaparecen dos interfases.

Si se considera un proceso también reversible, igual al anterior, pero con dos sistemas físicos de materiales diferentes, *I* y *2*, se habla de adhesión, siendo $\Delta G_{A,12}$ la energía libre de adhesión y $W_{A,12}$ el trabajo de adhesión. En este caso, se destruyen las interfases *I*-vacío y *2*-vacío, pero se crea la interfase *I*-*2*. Se define entonces la tensión interfacial (γ_{12}) mediante la ecuación de Dupré [Adamson, 1982].

$$\Delta G_{A,12} = -W_{A,12} = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad (27)$$

De igual forma cuando se unen dos sistemas físicos, de materiales diferentes 1 y 3 , en un medio líquido 2 , desaparecen las interfases $1-2$ y $3-2$ y se crea la interfase $1-3$. En este caso, la ecuación de Dupré queda de la forma:

$$\Delta G_{123} = \gamma_{13} - \gamma_{12} - \gamma_{23} \quad (28)$$

Esa variación de energía libre será una medida de la energía de interacción entre los sistemas 1 y 3 en el medio 2 . Si lo que se produce es una interacción entre partículas idénticas en suspensión en un medio líquido, 1 y 3 son el mismo material, 1 , en el medio 2 :

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} \quad (29)$$

La energía libre interfacial está relacionada con las fuerzas de interacción que las superficies de las fases 1 y 2 se ejercen entre sí (cohesión) o con la otra fase (adhesión). La caracterización termodinámica superficial de este tipo de sistema físico permite determinar los valores de energía libre superficial e interfacial y, a partir de ellos, evaluar la naturaleza y alcance de las interacciones de origen no electrostático en la interfase.

La ecuación que constituye la base para el desarrollo del modelo de van Oss y cols., sobre la tensión superficial y sus componentes es la que expresa la tensión superficial total de cualquier fase como suma de dos contribuciones o componentes, que son las asociadas a interacciones Lifshitz-van der Waals (LW) y ácido-base (AB) [van Oss, 2006]:

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + \gamma_1^{AB} \quad (30)$$

El siguiente paso es postular una regla de combinación para calcular la contribución del carácter ácido y básico a las energías libres de adhesión a través de la interfase, o a la energía interna de cohesión de una fase.

La ecuación 30 se puede hacer extensiva a la energía libre de la interfase 1-2:

$$\gamma_{12} = \gamma_{12}^{LW} + \gamma_{12}^{AB} \quad (31)$$

A continuación, se expresa matemáticamente cada uno de los dos sumandos de la tensión superficial de la ecuación 31. Utilizando la regla de Good-Girifalco [Good y Girifalco, 1960; Overbeek, 1952], el primer término γ_{12}^{LW} queda de la forma:

$$\gamma_{12}^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}} \right)^2 = \gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW} - 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} \quad (32)$$

La obtención del segundo sumando (γ_{12}^{AB}) no puede hacerse mediante la regla anterior, pues no es aplicable a las interacciones asimétricas AB [Fowkes, 1963]. Se postula entonces la siguiente regla de combinación para la componente AB de la tensión interfacial:

$$\gamma_{12}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+}\right) = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_2^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_2^-}\right) \quad (33)$$

donde γ_i^+ y γ_i^- representan, respectivamente, la contribución electrón-aceptor (ácido de Lewis) y electrón-donante (base de Lewis) a la tensión superficial de la fase i . La ecuación 33 para una fase queda de la forma:

$$\gamma_1^{AB} = 2\sqrt{\gamma_1^+\gamma_1^-} \quad (34)$$

Sustituyendo la ecuación 34 en la ecuación 30:

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + 2\sqrt{\gamma_1^+\gamma_1^-} \quad (35)$$

Sustituyendo las ecuaciones 32 y 33 en la ecuación 31, y teniendo en consideración la ecuación 35, se obtiene:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2\sqrt{(\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW})} - 2\sqrt{(\gamma_1^+ \gamma_2^-)} - 2\sqrt{(\gamma_1^- \gamma_2^+)} \quad (36)$$

que expresa la tensión interfacial entre las fases I y 2 .

Es usual hacer una clasificación de los materiales en función de los valores que adquieren las componentes ácido y base de Lewis: bipolares, si las moléculas se comportan como ácidos y bases de Lewis simultáneamente; monopolares, cuando una de esas dos componentes (ácido o base) es despreciable o nula frente a la otra; y apolares, si se anulan ambas componentes. Si un material es monopolar, no existe el término γ_i^{AB} , y la tensión superficial total (γ_i) es igual al término LW . No obstante, tales materiales pueden interaccionar fuertemente con materiales bipolares y materiales monopolares de polaridad opuesta, a pesar de la aparente naturaleza apolar de su tensión superficial. Ambas interacciones LW y AB entre dos cuerpos idénticos o entre dos diferentes en el vacío, son siempre atractivas. Sin embargo, cuando estos cuerpos están inmersos en un líquido, puede surgir una interacción repulsiva. Con respecto a la interacción LW , solamente aquella que tiene lugar entre dos materiales diferentes I y 3 , inmersos en un líquido 2 , puede ser repulsiva [Derjaguin, 1954; Fowkes y Mostafa, 1978; Hamaker, 1937; Visser, 1972] siempre que la componente apolar del líquido (γ_2^{LW}), cumpla: $\gamma_1^{LW} < \gamma_2^{LW} < \gamma_3^{LW}$ [Neumann y cols., 1979; van Oss, 2006].

En cuanto a la componente AB , la interacción neta entre dos cuerpos polares en un medio líquido puede ser repulsiva, siempre y cuando los dos cuerpos sean del mismo material y se verifique que los valores de γ^+ y γ^- del líquido estén comprendidos entre los valores de γ^+ y γ^- del material polar [van Oss, 2006].

El punto importante que queremos resaltar por su significación en la determinación de la energía total de interacción entre dos partículas coloidales es que el conocimiento de los componentes γ_i^{LW} y γ_i^\pm para las fases implicadas

permite calcular dicha energía. En efecto, la energía libre de interacción (por unidad de superficie) entre dos partículas de material *I* inmersas en un líquido *2* será:

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} = -2\left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}}\right)^2 - 4\left(\sqrt{\gamma_1^+\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+}\right) \quad (37)$$

Nótese que un valor positivo de ΔG_{121} implicaría una repulsión neta entre las superficies (presión de hidratación o interacción hidrófila). Teniendo en cuenta que ΔG_{121}^{LW} es siempre negativo, el carácter atractivo o repulsivo de la interacción, representado por el valor de ΔG_{121} , dependerá de la contribución ácido-base ΔG_{121}^{AB} . En medio acuoso, la componente *AB* de la energía de cohesión del agua, debido a sus enlaces por puentes de hidrógeno es 102 mJ/m². Este valor es lo suficientemente elevado como para imponer un efecto atractivo neto entre superficies de partículas apolares o débilmente polares (efecto hidrófobo).

En otras ocasiones, como sucede en especial con las superficies monopolares ($\gamma = \gamma^{LW}$; $\gamma^{AB} = 0$, usualmente $\gamma^+ = 0$ y $\gamma^- \neq 0$) [van Oss y cols., 1988], el elevado valor del carácter básico de estas superficies las hace muy hidrófilas. Desde este punto de vista, el modelo de van Oss propone una interpretación de las interacciones de solvatación, según la cual tienen su origen en intercambios *AB* (ácido-base de Lewis) entre la superficie de las partículas dispersas y el medio de dispersión (agua generalmente). La componente *AB* del incremento de la energía libre de Gibbs asociado a dicha interacción es la fuerza termodinámica responsable de las mismas.

5.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La tensión superficial de un líquido y la tensión interfacial entre dos líquidos son dos magnitudes a las que se puede tener acceso experimental de forma directa. Sin embargo, en el caso de los sólidos, es necesario recurrir a medidas de otras magnitudes para poder obtener a partir de ellas los valores de las tensiones superficiales. Junto con la técnica de penetración de líquidos en capa fina, la técnica de medida de ángulos de contacto es la más importante y habitual. Ambas han sido descritas con detalle en trabajos anteriores [Arias y cols., 2001; Chibowski y cols., 1993; Durán y cols., 1994, 1995]. A continuación, realizamos una breve descripción de la técnica de medida de ángulos de contacto, pues es la que hemos utilizado en nuestro trabajo.

El sistema físico al que se aplica esta técnica está constituido por una superficie sólida, una gota de líquido depositada sobre ella y el aire. Mediante la medida del ángulo de contacto (θ) entre la fase líquida y la gaseosa que la rodea (interfase líquido-gas) se obtienen los valores de las componentes de la tensión superficial del sólido. La aplicación de este método está restringida a los casos en los que la superficie del sólido sea plana, homogénea y rígida a escala macroscópica.

La definición termodinámica del ángulo de contacto viene dada por la ecuación de Young. Para una superficie sólida con las características mencionadas, sobre la que se deposita una gota de líquido puro, el ángulo de contacto de equilibrio es una magnitud única que cumple la ecuación de Young [Neumann y Good, 1972]:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_L \cos \theta \quad (38)$$

donde γ_{sv} , γ_{sl} y γ_L son, respectivamente, las tensiones interfaciales sólido-vapor y sólido-líquido, y la tensión superficial del líquido. La ecuación 38 se puede escribir de la forma:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta + \pi_e \quad (39)$$

donde γ_S es la tensión superficial del sólido y π_e es la presión superficial (*film pressure*), definida por:

$$\pi_e \equiv \gamma_S - \gamma_{sv} \quad (40)$$

esto es, la presión bidimensional que ejerce el vapor adsorbido sobre la superficie sólida. En el caso de que γ_S sea superior a γ_L , esta adsorción provoca una disminución de la tensión superficial del sólido hasta alcanzar, en caso de saturación, el valor de la tensión superficial del líquido [Janczuk y cols., 1984, 1987]. Bajo estas condiciones límite, $\pi_e = \gamma_S - \gamma_L$ [Janczuk y cols., 1989]. En el caso contrario, que corresponde generalmente a sólidos de poca energía superficial, como los utilizados en este trabajo, π_e es despreciable y la ecuación de Young se puede escribir:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta \quad (41)$$

Un factor importante a considerar en las medidas de ángulo de contacto es el fenómeno de histéresis. Cuando una gota de líquido se deposita sobre la superficie de un sólido, se puede producir dependiendo del método utilizado un avance (la gota se deposita sobre una superficie seca) o una regresión (la gota depositada se retrae, desplazándose sobre zonas ya mojadas) de la gota. De esta forma, los respectivos ángulos de contacto son: θ_a (avance) y θ_r (retroceso). Se verifica que θ_r es siempre inferior a θ_a . Este fenómeno puede dificultar la estimación del verdadero ángulo de contacto, pues existe una gran dependencia entre la amplitud de la histéresis y el volumen de la gota utilizado. Este efecto se puede minimizar

disminuyendo el volumen de la gota de líquido. Nuestras medidas experimentales se han realizado sobre el ángulo de avance. Un trabajo reciente explica los valores de los ángulos de retroceso como consecuencia de la disminución de la energía superficial del sólido causada por la presión superficial asociada a la adsorción del vapor del líquido utilizado [Chibowski y González-Caballero, 1993].

Una vez medidos los ángulos de contacto, es posible determinar los componentes de la energía superficial del sólido. Sustituyendo en la ecuación 41 el valor de γ_{SL} dado por la ecuación 53, se obtiene:

$$2\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+} = \gamma_L(1 + \cos\theta) \quad (42)$$

Midiendo los ángulos de contacto formados por tres líquidos diferentes, de los que se conocen las componentes de su tensión superficial, se puede establecer un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas como la ecuación 42, a partir de la cual se calcularán los valores de las componentes del sólido. Por lo general, se suelen utilizar dos líquidos polares y uno apolar.

El análisis termodinámico superficial se efectuó en los tres tipos de nanopartículas sintetizadas: núcleo magnético (magnetita, Fe_3O_4), recubrimiento polimérico [poli(ϵ -caprolactona), PCL] y compuestas obtenidas utilizando la relación de masas iniciales 2:4 [magnetita/ poli(ϵ -caprolactona), Fe_3O_4 /PCL]. Los líquidos empleados fueron: agua filtrada y desionizada con un sistema Milli-Q Academic (Millipore, Francia), formamida (Carlo Erba, Italia) y α -bromonaftaleno (Merck, Alemania). En la aplicación del modelo de van Oss se utilizaron los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba utilizados (tabla 4) [van Oss, 2006].

| Líquido | γ^{LW} | γ^+ | γ^- |
|--------------------------|---------------|------------|------------|
| Agua | 21.8 | 25.5 | 25.5 |
| Formamida | 39.0 | 2.28 | 39.6 |
| α -Bromonaftaleno | 43.6 | 0.0 | 0.0 |

Tabla 4. Componentes de la tensión superficial (mJ/m^2) a 20 °C de los líquidos utilizados en el experimento de medida del ángulo de contacto.

La medida de los ángulos de contacto se realizó con un goniómetro Ramé-Hart 100-0.7-00 (USA), que permite observar las gotas de líquido depositadas sobre un sólido. Este aparato dispone de un conjunto de tornillos micrométricos que permiten los desplazamientos verticales y horizontales del sustrato, así como de un limbo graduado para la medida del ángulo con una precisión de $\pm 1^\circ$. El uso de una microjeringa Gimont (EE.UU.) permite controlar el volumen de la gota depositada entre 2 y 4 μL . Las medidas se realizaron a 25.0 ± 0.5 °C, utilizando una cámara termostática. La captura de las imágenes de las gotas de los líquidos depositados sobre la superficie de los materiales se obtuvieron mediante una cámara CCD (Pixelink PL-A662, Canada) y un sistema de análisis digital de imágenes.

Los ángulos de contacto de los líquidos seleccionados se determinaron sobre capas delgadas de los tres tipos de materiales depositadas sobre portaobjetos de microscopio. Estas superficies lisas se obtuvieron tras la adición de manera uniforme de una suspensión acuosa (≈ 10 %, p/v) de cada tipo de coloide sobre la superficie limpia y seca de una placa de vidrio. En la preparación de la muestra pudimos comprobar que con la adición de 10 mL de suspensión acuosa de nanopartículas se obtenía una capa de

material suficientemente gruesa y uniforme. La desecación de los portaobjetos con cada una de las muestras se realizó a 35.0 ± 0.5 °C, utilizando un horno de desecación durante 24 horas. De esta manera, se obtuvo una capa de material muy uniforme a nivel macroscópico, que permitió que la medida de los ángulos de contacto se realizara en gotas muy estables (figura 30).

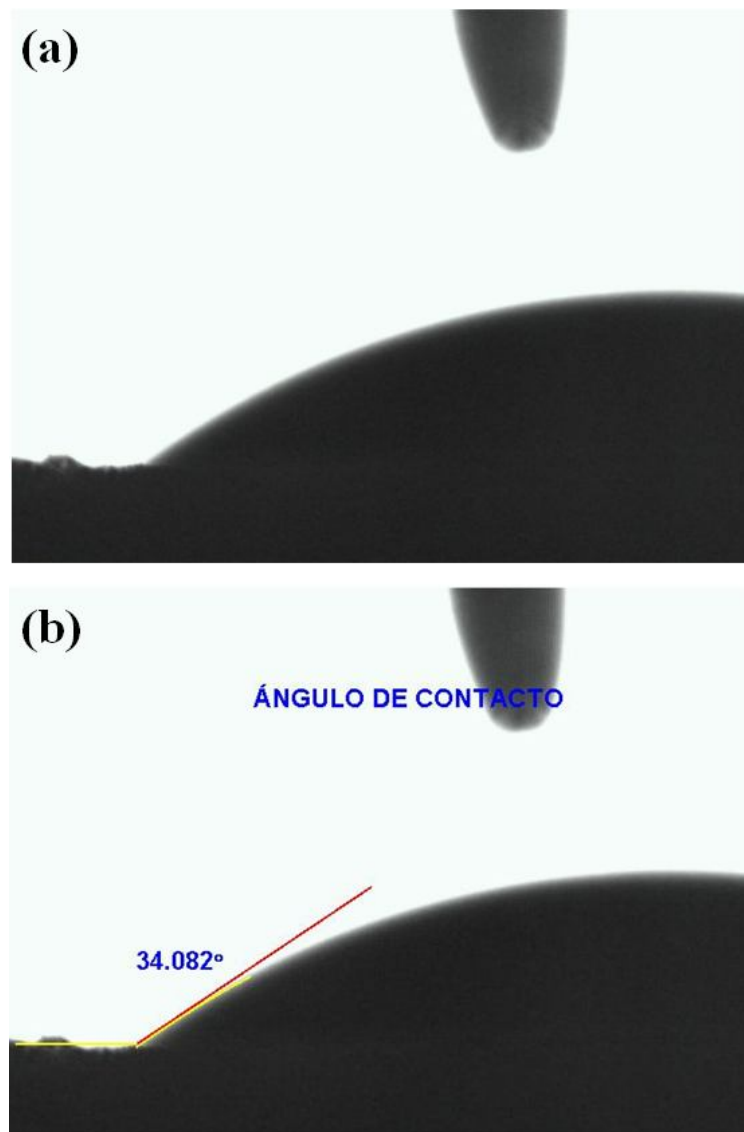


Figura 30. Ejemplo de la determinación del ángulo de contacto. (a) Fotografía de gota depositada; (b) ajuste de perfil de la gota y evaluación del ángulo.

En la figura 31 se recogen los valores promedio de los ángulos de contacto obtenidos tras realizar 16 determinaciones midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de importantes diferencias entre los núcleos de óxido de hierro y las nanopartículas magnéticas compuestas ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$).

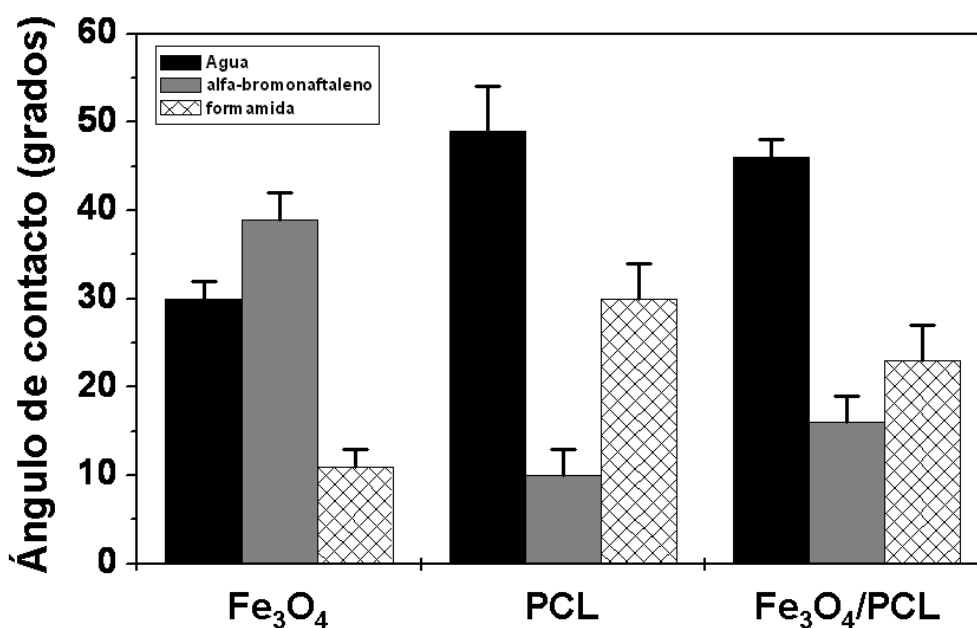


Figura 31. Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones con nanopartículas de Fe_3O_4 , PCL y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$.

5.3. COMPONENTES DE LA ENERGÍA LIBRE SUPERFICIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS

Para aportar una información física veraz sobre la termodinámica de los tres tipos de superficies es necesaria la evaluación de las componentes de γ_s . Los datos representados en la figura 32 confirman en gran medida nuestras estimaciones

sobre la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos basadas en las propiedades electrocinéticas (ver capítulo 4). En particular, para cualquier componente de la energía libre superficial, sus valores para las nanopartículas magnéticas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ coinciden casi totalmente con los correspondientes al polímero puro. Además, a pesar de que la componente Lifshitz-van der Waals (γ_s^{LW}) es la menos afectada por el tratamiento superficial, como suele ser habitual [Arias y cols., 2001, 2006, 2008a], su valor para las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ es casi el mismo que para el polímero. A pesar de que la componente electrón-aceptor (γ_s^+) es muy pequeña para los tres tipos de materiales, sin embargo es virtualmente cero para el polímero y las nanopartículas compuestas y adquiere valores finitos superiores para la magnetita. La contribución electrón-donante (γ_s^-) muestra una diferencia mucho más notable entre los núcleos de óxido de hierro y las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. El elevado valor de esta última componente en el caso de la magnetita confirma su carácter monopolar electrón-donante [Arias y cols., 2001; van Oss, 2006]. Según van Oss, esto quiere decir que la magnetita puede tener interacciones ácido-base con fases de cualquier polaridad (γ^+ , γ^- , o ambas, diferentes de cero) pero las fuerzas AB no contribuyen a su energía libre de cohesión. Resultados similares se han obtenido anteriormente con diferentes compuestos inorgánicos [Chibowski, 1992; Chibowski y Holysz, 1992; Durán y cols., 1994, 1995]. Es bastante general el comportamiento monopolar en los materiales inorgánicos, si bien se ha descrito un carácter bipolar en materiales como la calconita y la galena [Janczuk y cols., 1984, 1987, 1994].

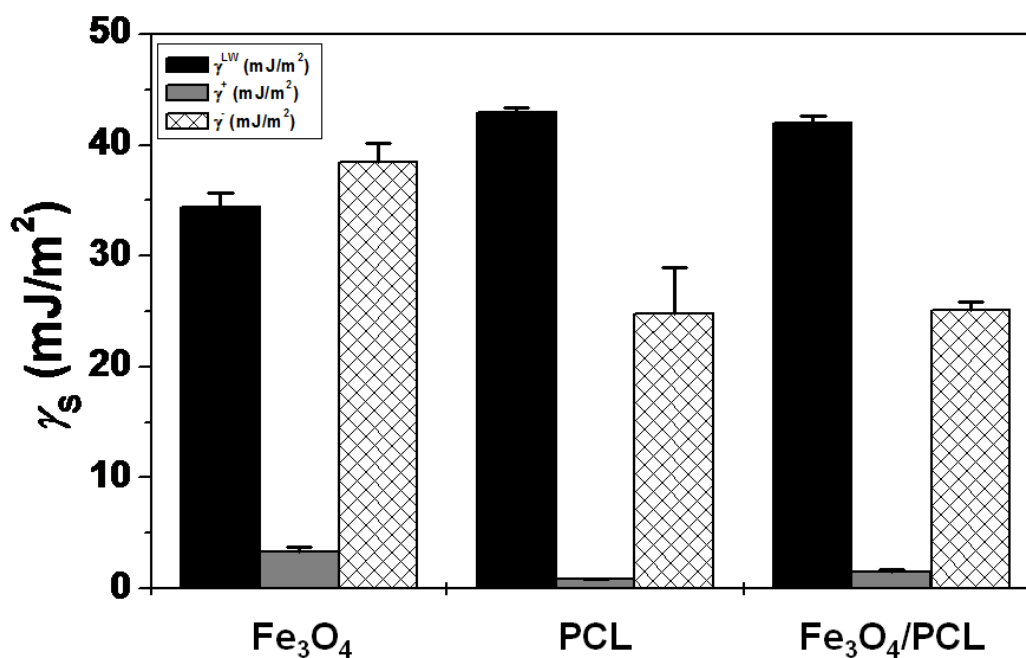


Figura 32. Componentes de la energía libre superficial (mJ/m²) de las nanopartículas de Fe₃O₄, PCL y Fe₃O₄/PCL. γ_s^{LW} es la componente de Lifshitz-van der Waals; γ_s^+ (γ_s^-) es la componente electrón-aceptor (electrón-donante).

A la vista de los resultados obtenidos, (junto con el análisis electrocinético de los tres tipos de coloides), podemos afirmar que el recubrimiento de los núcleos magnéticos es completo cuando se utiliza la relación de masas iniciales 2:4 (Fe₃O₄:PCL).

5.4. ANÁLISIS DE LA NATURALEZA HIDRÓFILA/HIDRÓFOBA

Como ya hemos comentado anteriormente, una caracterización termodinámica exhaustiva como la descrita no sólo tiene interés de por sí, esto es, desde el punto de vista fundamental. Las interacciones implicadas en la determinación de la energía libre superficial de los materiales se manifiestan en fenómenos como la agregación de nanopartículas en suspensión o su adhesión a diferentes sustratos. La idea que subyace en nuestro estudio es que las metodologías empleadas, junto con su base teórica, permiten: *i*) especificar completamente la componente LW de la energía de interacción entre las nanopartículas dispersas (contemplada, junto con la repulsión electrostática entre dobles capas eléctricas, en la teoría clásica DLVO); y *ii*) cuantificar igualmente las contribuciones no-DLVO a la energía total del sistema, las cuales se relacionan con la componente AB de la teoría superficial tanto del sólido en suspensión como del líquido.

Consideramos aquí la importancia de los términos LW y AB de la energía de interacción entre los materiales descritos en este trabajo (fase 1) en un medio acuoso (fase 2):

$$\Delta G_{121} = \Delta G_{121}^{LW} + \Delta G_{121}^{AB} \quad (43)$$

Haciendo uso de la ecuación 51, pueden obtenerse los valores de ΔG_{121}^{LW} y ΔG_{121}^{AB} , que se muestran en la tabla 5. En la misma se puede apreciar que para la magnetita, el intercambio energético debido a la componente LW es bastante menor que el asociado a la componente AB , siendo además negativo. Por tanto, la variación de la energía libre de interacción total es debida, principalmente, a la componente AB [Arias y cols., 2001, 2008].

| Sólido | ΔG_{121}^{LW} (mJ/m ²) | ΔG_{121}^{AB} (mJ/m ²) | ΔG_{121} (mJ/m ²) |
|-------------------------------------|--|--|---------------------------------------|
| Fe ₃ O ₄ | -2.9 ± 0.4 | 14.9 ± 2.1 | 12.1 ± 1.5 |
| PCL | -7.1 ± 1.3 | -1.3 ± 0.4 | -8.3 ± 2.1 |
| Fe ₃ O ₄ /PCL | -6.5 ± 1.1 | -0.7 ± 0.2 | -7.2 ± 1.5 |

Tabla 5. Energía libre de interacción (mJ/m²) entre las nanopartículas y sus componentes *AB* y *LW* en medio acuoso.

El hecho de que sea positiva la contribución *AB*, indica que la naturaleza fuertemente monopolar de la magnetita provoca una repulsión significativa entre las nanopartículas. La interacción *LW*, siempre atractiva en estos casos, es mucho menos intensa, provocando por ello un valor neto positivo para ΔG_{121} . Por el contrario, tanto las nanopartículas compuestas como el polímero tienen valores negativos de ΔG_{121} (atracción hidrófoba), que se añaden a la atracción de van der Waals.

Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los diferentes materiales estudiados. Puede utilizarse el siguiente criterio para determinar cuando un material puede considerarse hidrófilo o hidrófobo [van Oss, 2006]: Si ΔG_{121} resulta ser negativo, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las nanopartículas,

y se consideran hidrófobas. Por el contrario, la hidrofilia se corresponde con valores positivos de ΔG_{121} .

La figura 33 muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de nanomateriales. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde al ser recubierta por el polímero hidrófobo. Esto puede considerarse un indicio muy claro de que dicho recubrimiento es eficaz.

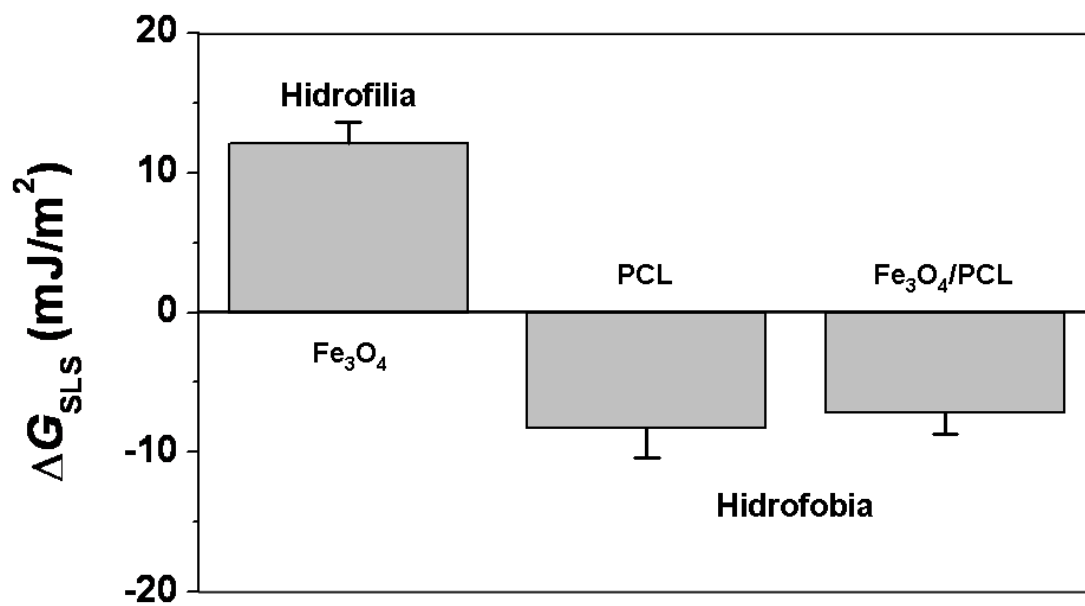


Figura 33. Valores de ΔG_{121} (mJ/m²) y carácter hidrófilo/hidrófobo de los tres tipos de nanomateriales: Fe₃O₄, PCL y Fe₃O₄/PCL.

Capítulo 6.

Propiedades
magnéticas

6.1. PROPIEDADES MAGNÉTICAS

Las propiedades magnéticas macroscópicas de un material son consecuencia de los momentos magnéticos asociados con sus átomos individuales. En un átomo, cada electrón tiene momentos magnéticos que se originan de dos fuentes distintas. Una de estas fuentes está relacionada con el movimiento angular orbital y la otra tiene su origen en su espín. Así, el momento magnético neto de un átomo es justamente la suma de los momentos magnéticos de cada uno de los electrones constituyentes, incluyendo tanto las contribuciones orbitales como de espín y tomando en consideración la cancelación de los momentos. Entre los distintos tipos de magnetismo se incluyen el diamagnetismo, el paramagnetismo y el ferromagnetismo. Junto a éstos, el antiferromagnetismo y el ferrimagnetismo son considerados subclases del ferromagnetismo [Callister, 1996a].

- ◆ Diamagnetismo. Es una forma muy débil de magnetismo que no es permanente y persiste sólo mientras el campo externo está presente. Está asociado a átomos cuyo momento magnético neto es nulo y se debe a un cambio en el movimiento orbital de los electrones debido al campo magnético aplicado. La permeabilidad magnética relativa (μ_r) es ligeramente menor que uno y la susceptibilidad magnética (χ) es negativa.
- ◆ Paramagnetismo. Es característico de aquellos átomos o moléculas que tienen momentos magnéticos permanentes que no interaccionan entre sí y que en ausencia de campo externo están orientados al azar, de modo que una porción cualquiera de material no posee imanación neta permanente. Estos dipolos atómicos son libres para girar y se producirá paramagnetismo cuando, mediante rotación, se alineen de forma preferente con un campo magnético externo. En estos materiales χ es positiva y depende de la temperatura, mientras que μ_r es ligeramente mayor que uno. Una característica muy interesante por

sus implicaciones biomédicas es el superparamagnetismo. Esta propiedad es consecuencia de un cambio cualitativo en la estructura de los materiales magnéticos nanométricos, la cual pasa de estar constituida por numerosos dominios magnéticos, a estar formada por un único dominio magnético o monodominio. Esta estructura determina una reducción muy importante de la barrera de anisotropía magnética, lo que provoca la desaparición de la histéresis (no hay campo coercitivo ni remanencia) [Álvarez Paneque y cols., 2008].

- ◆ Ferromagnetismo. En estos materiales las interacciones de acoplamiento hacen que los momentos magnéticos netos de espín de átomos adyacentes se alineen unos con otros aun en ausencia de un campo magnético aplicado. Esta alineación mutua de los espines se presenta en volúmenes relativamente grandes del cristal denominados dominios. La máxima imanación posible (magnetización de saturación) corresponde a la situación en que todos los dipolos magnéticos en una muestra sólida están mutuamente alineados con el campo externo. Estos materiales presentan una χ positiva, muy grande y dependiente del campo mientras que μ_r tiene un valor en torno a 10^5 . La magnetización de saturación y la permeabilidad magnética dependen significativamente de H y de la temperatura.
- ◆ Antiferromagnetismo. Fenómeno de acoplamiento entre los momentos magnéticos que determina su alineamiento antiparalelo, de modo que el material mostrará imanación espontánea nula. Estos materiales tienen una $\mu_r > 1$ y χ_m positiva.
- ◆ Ferrimagnetismo. La interacción de intercambio entre momentos magnéticos en estos materiales favorece también la alineación antiparalela, pero los momentos no son idénticos en módulo, por lo que no se cancelan completamente. Por este motivo su comportamiento será parecido al de los ferromagnéticos.

6.2. CICLO DE HISTÉRESIS

La magnetita es un material iónico ferrimagnético con estructura cristalina cúbica holoédrica del tipo de las espinelas inversas y que pertenece al grupo de las ferritas blandas [Callister, 1996b]. Su fórmula puede escribirse como $\text{Fe}^{3+}\text{O}^{2-}(\text{Fe}^{3+})_2(\text{O}^{2-})_3$, donde los iones Fe existen en los estados de valencia +2 y +3 en una proporción 1:2. Para cada uno de los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} existe un momento magnético que corresponde a 4 y 5 magnetones de Bohr, respectivamente. Además, los iones O^{2-} son magnéticamente neutros. Entre los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} se producen interacciones de acoplamiento de los espines en las direcciones antiparalelas, similares a las que se producen en el caso del antiferromagnetismo. Sin embargo, se produce un momento ferrimagnético neto debido a que los momentos de espín no se cancelan completamente.

Cualquier material ferromagnético o ferrimagnético a temperaturas inferiores a la temperatura de Curie está formado por pequeñas regiones tridimensionales en las que todos los momentos magnéticos se encuentran alineados en la misma dirección [Callister, 1996; Mercouroff, 1969]. Estas regiones se denominan dominios y cada uno está magnetizado hasta la saturación. Los dominios adyacentes están separados por paredes de dominio, a través de las cuales la dirección de imanación cambia gradualmente. La densidad de flujo (B) y la intensidad del campo magnético (H) no son proporcionales en el caso de los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos. Si el material está inicialmente no imanado, entonces B varía en función de H según se muestra en la figura 34. La curva empieza en el origen, y a medida que aumenta H , la inducción B empieza a aumentar lentamente y después más rápidamente hasta que al final alcanza un nivel determinado y se hace independiente de H . Este valor máximo de B es la densidad de flujo de saturación (B_s) y la imanación correspondiente es la imanación de saturación (M_s). Según la ecuación $B = \mu \cdot H$, la permeabilidad (μ) es la pendiente de la curva B frente a H , y se puede apreciar en la figura 34 que cambia con H . En algunas ocasiones, la pendiente de B frente a H (a $H = 0$) se especifica como una

propiedad del material, denominada permeabilidad inicial (μ_i), tal como se indica en la figura 34.

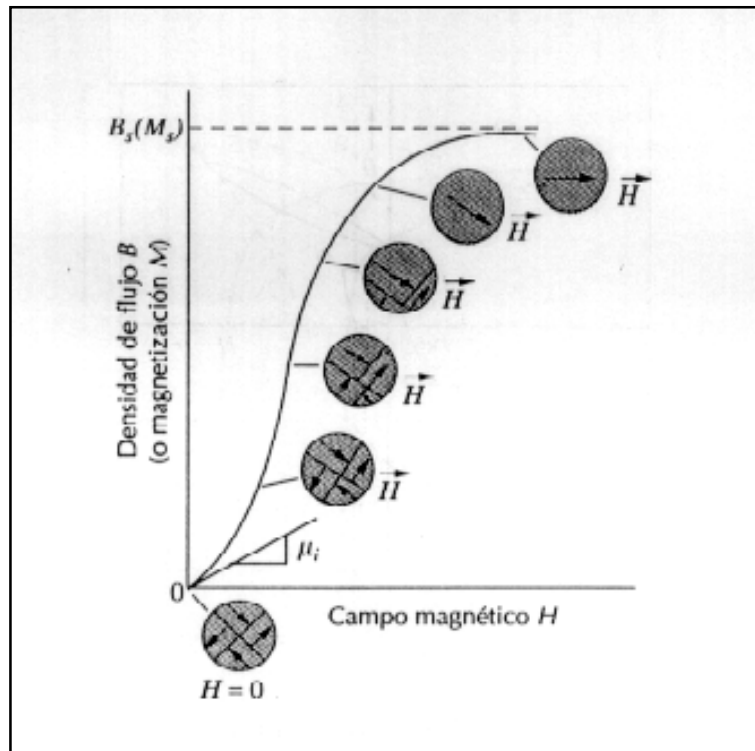


Figura 34. Comportamiento de B frente a H de un material ferromagnético o ferrimagnético que estaba inicialmente desmagnetizado. Se representan las configuraciones de los dominios durante varios estadios de la imanación.

A medida que se aplica el campo H , los dominios cambian de forma y tamaño debido al movimiento de los límites de dominio. Las estructuras típicas de los dominios están representadas de forma esquemática en varios puntos de la curva de la figura 34. Inicialmente, los momentos de los dominios constituyentes están orientados al azar de tal manera que no existe un campo de momento neto B (o M). A medida que se aplica el

campo externo, los dominios que están orientados en direcciones favorables al campo aplicado (o casi alineado con él) crecen a expensas de aquellos que no están favorablemente orientados. Este proceso continúa al aumentar la intensidad del campo hasta que la muestra macroscópica se convierte en un solo dominio, el cual está casi completamente alineado con el campo. La saturación se alcanza cuando este dominio gira y se orienta con el campo H .

A partir de la saturación, punto S de la figura 35, a medida que el campo H se reduce, la curva no invierte su camino original, sino que se produce un efecto de histéresis. Debido a este efecto, el campo B va retrasado con respecto al campo aplicado H , es decir, disminuye más lentamente. Cuando el campo H es cero (punto R de la curva), existe un campo residual B que se denomina remanencia, o densidad de flujo remanente, B_r . Por este motivo, el material permanece imanado en ausencia de un campo externo H .

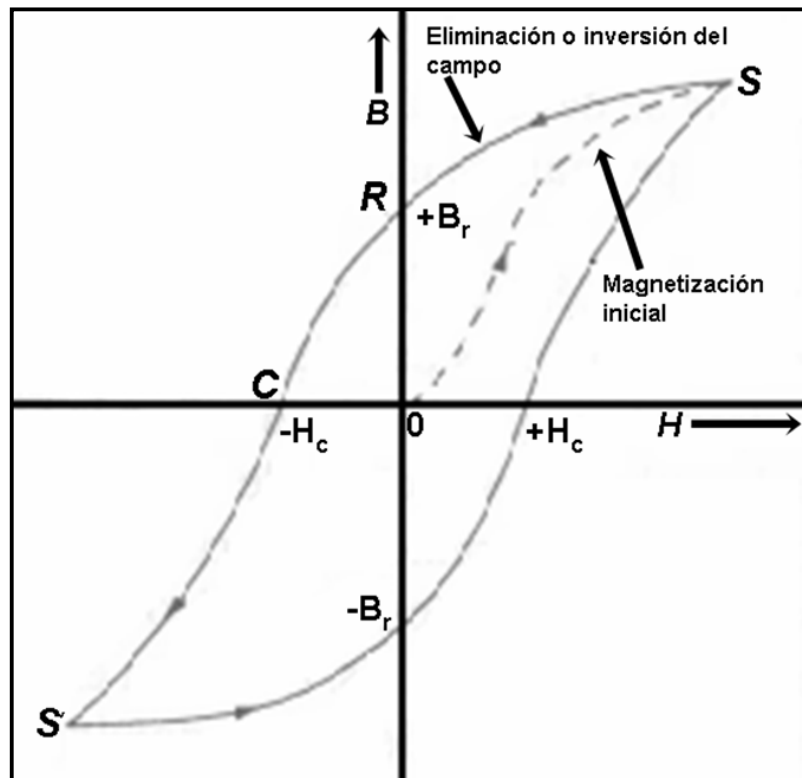


Figura 35. Densidad de flujo magnético frente a la intensidad del campo magnético de un material ferromagnético para la saturación en ambas direcciones (puntos S y S'). La curva de histéresis viene representada por una curva sólida, mientras que la curva discontinua indica la primera imanación del material. La remanencia B_r y la fuerza coercitiva H_c también están indicadas en la figura.

Nuestro objetivo en este apartado de la investigación es caracterizar las propiedades magnéticas de los núcleos de Fe_3O_4 y el efecto que el recubrimiento polimérico puede tener sobre éstos. Además, y con el fin de clarificar las condiciones óptimas para la formulación de nanopartículas Fe_3O_4/PCL , se investigaron las características magnéticas de estas partículas obtenidas para cada una de las relaciones de masa inicial $Fe_3O_4:PCL$ (desde 1:4 hasta 4:1). Las propiedades magnéticas de la magnetita y de las nanopartículas Fe_3O_4/PCL quedan perfectamente definidas mediante el ciclo de

histéresis. Esta caracterización macroscópica del comportamiento magnético de las partículas coloidales se realizó con la ayuda de un magnetómetro-susceptibilímetro Manics DSM-8 (Francia). Todas las medidas se realizaron a 25.0 ± 0.5 °C, ya que a esta temperatura se realizó la preparación y el almacenamiento de las suspensiones.

La figura 36 recoge el ciclo de histéresis de las nanopartículas de magnetita y de un caso de nanopartículas compuestas. En ambos casos, el comportamiento observado se explica considerando el carácter superparamagnético de la magnetita, consecuencia del pequeño tamaño de la Fe_3O_4 (< 20 nm) [López-López y cols., 2005]. Dado que no se pudo determinar con precisión la densidad de las partículas compuestas, los datos de imanación se dan en masa y no en volumen. De la región lineal del ciclo de histéresis (zona de campo magnético bajo) puede estimarse la susceptibilidad magnética inicial (χ_{mi}) de los materiales: $(0.28 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$ m³/kg en el caso de la magnetita, y $(0.110 \pm 0.008) \cdot 10^{-3}$ m³/kg en el caso de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. También se pudo apreciar un valor notablemente menor de la imanación de saturación en este segundo caso, debido a la menor cantidad de material magnetizable.

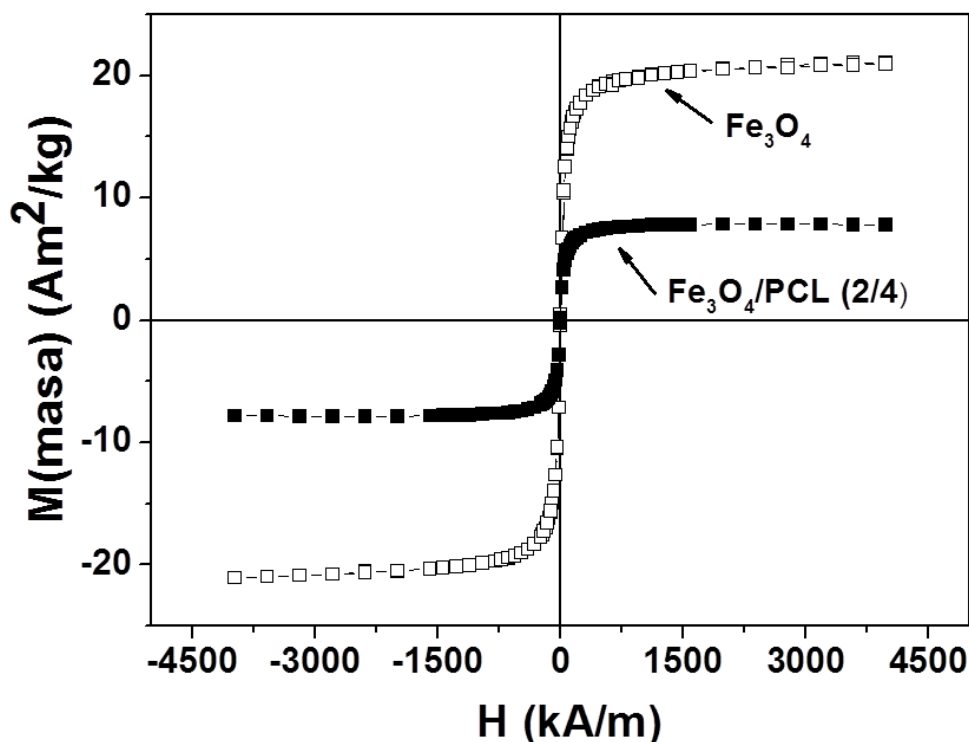


Figura 36. Ciclo de histéresis de las nanopartículas de Fe_3O_4 (\square) y de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (\blacksquare).

El proceso de análisis de las condiciones óptimas de formulación de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ queda completado con el estudio de las propiedades magnéticas de las partículas obtenidas según cada una de las relaciones de masa iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ (desde 1:4 hasta 4:1). La susceptibilidad inicial y la magnetización de saturación de cada uno de los tipos de partículas magnéticas compuestas quedan recogidas en la tabla 6. Estos parámetros magnéticos fueron calculados a partir del ciclo de histéresis de cada una de las muestras.

| Proporción de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{:PCL}$ | Susceptibilidad inicial (χ_{mi}) (m^3/kg) | Magnetización de saturación en masa (Am^2/kg) |
|---|--|---|
| 4:1 | $(0.0093 \pm 0.0007) \cdot 10^{-3}$ | 0.664 ± 0.0005 |
| 4:2 | $(0.080 \pm 0.006) \cdot 10^{-3}$ | 5.730 ± 0.004 |
| 4:3 | $(0.102 \pm 0.008) \cdot 10^{-3}$ | 7.241 ± 0.005 |
| 4:4 | $(0.099 \pm 0.008) \cdot 10^{-3}$ | 7.099 ± 0.005 |
| 3:4 | $(0.102 \pm 0.008) \cdot 10^{-3}$ | 7.296 ± 0.005 |
| 2:4 | $(0.110 \pm 0.008) \cdot 10^{-3}$ | 7.832 ± 0.006 |
| 1:4 | $(0.093 \pm 0.007) \cdot 10^{-3}$ | 6.77 ± 0.005 |
| Fe_3O_4 | $(0.280 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$ | 21.01 ± 0.09 |

Tabla 6. Propiedades magnéticas de los núcleos de Fe_3O_4 y de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ obtenidas a partir de diferentes proporciones de masa inicial $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{:PCL}$.

Como puede observarse en la tabla, las nanopartículas con mejores propiedades magnéticas son aquellas obtenidas a partir de una relación de masas inicial entre 4:4 y 2:4. Creemos que esto puede ser debido a que las nanopartículas así obtenidas albergan un gran número de núcleos superparamagnéticos en su interior (figura 18b) y, por lo tanto, presentan una mayor capacidad para responder a campos magnéticos. Cabe destacar que cuando el exceso de polímero utilizado en la síntesis de las nanopartículas compuestas es muy grande (relación de masas iniciales 1:4), las partículas superparamagnéticas quedan embebidas por una cubierta de polímero tan grande que logra reducir significativamente la magnetización de la muestra (véase figura 18c). Si, por el contrario, la cantidad de polímero utilizada es muy pequeña (relación 4:1), la presencia en las nanopartículas compuestas de una matriz que engloba eficientemente los núcleos de Fe_3O_4 es muy pobre. De esta manera, pocos núcleos magnéticos deben

quedar atrapados en la nanopartícula compuesta formada (figura 18a), lo que explica su escasa respuesta magnética.

Teniendo en cuenta estas propiedades magnéticas y los resultados obtenidos en el apartado 3.1.3. (préstese especial atención a la tabla 3 y su discusión), queda plenamente justificado que la relación de masas inicial $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ sea 2:4 para así obtener las nanopartículas magnéticas compuestas con las mejores características para su uso como coloides magnéticos en el transporte de fármacos hasta el órgano o tejido diana. Además, nos parece realmente interesante el hecho de que las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ obtenidas utilizando esta relación de masas iniciales 2:4, tienen unas propiedades magnéticas comparables a las mejores obtenidas por otros autores. En unidades prácticas cgs, la imanación de saturación es $\approx 7,8$ emu/g frente a ≈ 8 emu/g [Hamoudeh y Fessi, 2006], ≈ 17.6 emu/g [Yang y cols., 2006] y ≈ 10.2 emu/g [Gang y cols., 2007].

Estas propiedades magnéticas de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ nos hacen pensar que el sistema coloidal diseñado tiene las características adecuadas para su utilización en el transporte de fármacos a un órgano o tejido diana: un recubrimiento polimérico que permitirá el transporte de cantidades suficientes de fármaco y su liberación a una velocidad controlable, y unos núcleos magnéticos con enorme capacidad para responder a gradientes magnéticos aplicados. Por este último motivo la direccionabilidad de las partículas coloidales en el organismo, debe quedar asegurado.

6.3. PRUEBA IN VITRO

La capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados de las partículas de Fe_3O_4 y de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ fue analizada cualitativamente mediante visualización del efecto que ejerce un imán permanente de 400 mT sobre una suspensión acuosa de estas partículas coloidales. En concreto, se prepararon sendas suspensiones acuosas

coloidales con una concentración < 0.5 % (p/v). A una temperatura de 25.0 ± 0.5 °C, se puso en contacto la suspensión de Fe_3O_4 y la de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con un gradiente magnético de 400 mT, y se observó el comportamiento de las partículas magnéticas en estas condiciones. Como puede apreciarse en la figura 37, las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ son atraídas muy rápidamente por el imán, lo que confirma las excelentes propiedades magnéticas del nanosistema diseñado. El sobrenadante queda completamente transparente en menos de 1 minuto. Por el contrario, la suspensión de nanopartículas de Fe_3O_4 mantiene su aspecto homogéneo incluso tras 24 horas de exposición al gradiente magnético externo. El carácter superparamagnético de los núcleos de óxido de hierro justifica la ausencia de respuesta magnética.

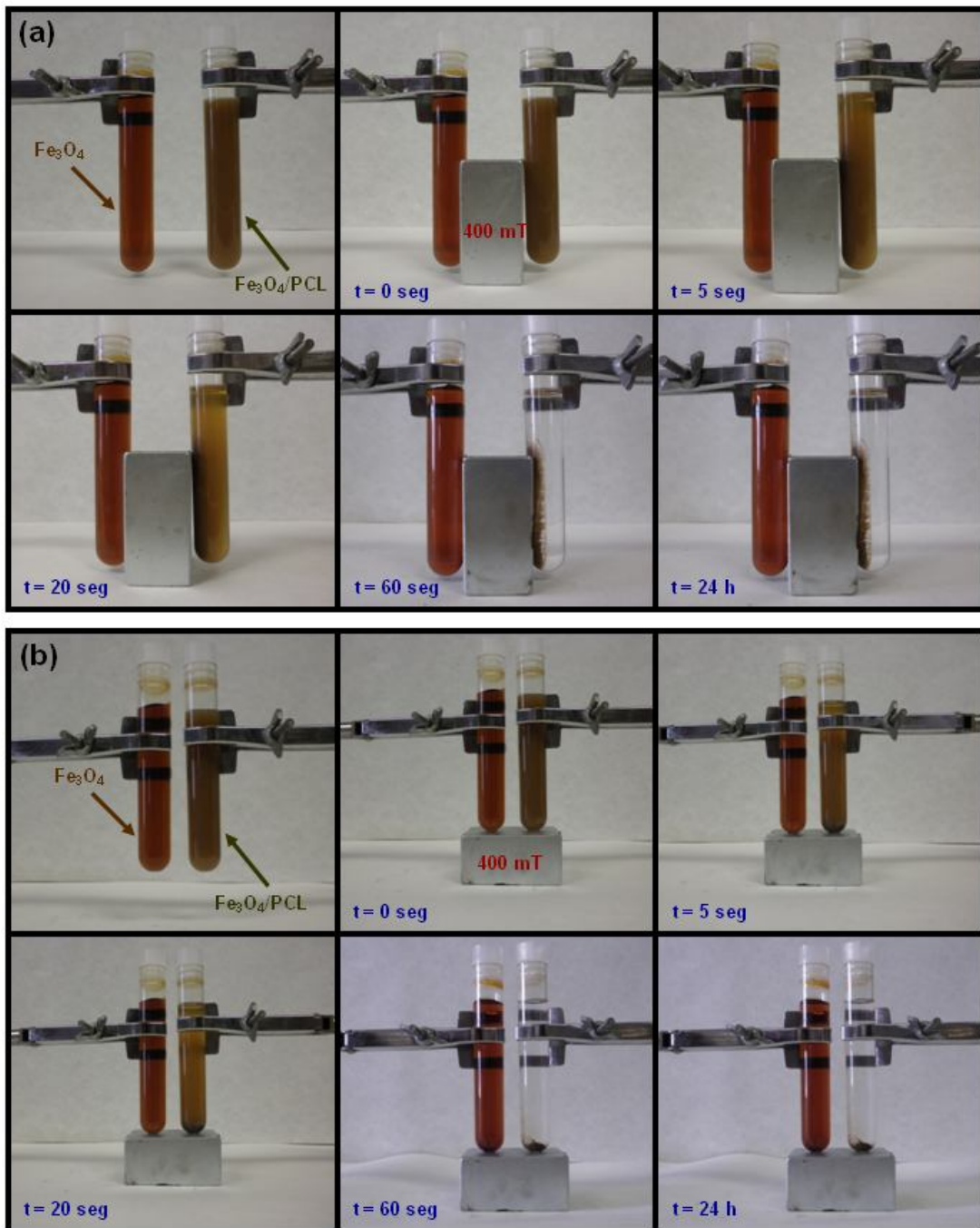


Figura 37. Observación visual de la decantación magnética de las partículas de Fe_3O_4 y de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ bajo la influencia de un imán permanente de 400 mT localizado en el lateral (a) o debajo (b) de las muestras.

Con el fin de analizar el comportamiento microscópico de las suspensiones acuosas de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, realizamos en seguimiento mediante microscopía óptica. Las suspensiones acuosas tenían una concentración de nanopartículas del 0.1 % (p/v) y la exposición a un campo magnético de 400 mT se realizó a 25.0 ± 0.5 °C. En concreto, una gota de suspensión acuosa de las nanopartículas se colocó en un portaobjetos y fue sometida a un imán localizado en diferentes posiciones con respecto a la suspensión magnética. La visualización del efecto que el gradiente magnético ejerce sobre la suspensión de nanopartículas se realizó utilizando un microscopio óptico (magnificación: 40X).

Como puede apreciarse en la figura 38a, la suspensión acuosa de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ es muy homogénea en ausencia de campo magnético aplicado. Sin embargo, cuando la gota de suspensión queda bajo la influencia del imán de 400 mT, las nanopartículas tienden a formar agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección del gradiente magnético aplicado (figura 38b en adelante). Este comportamiento puede explicarse si tenemos en cuenta la mayor importancia de las interacciones magnéticas en comparación con las interacciones coloidales de tipo DLVO (interacciones electrostáticas tipo van der Waals y de hidratación o ácido-base) que se producen entre las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, a pesar de la existencia de un recubrimiento polimérico entorno a los núcleos de óxido de hierro.

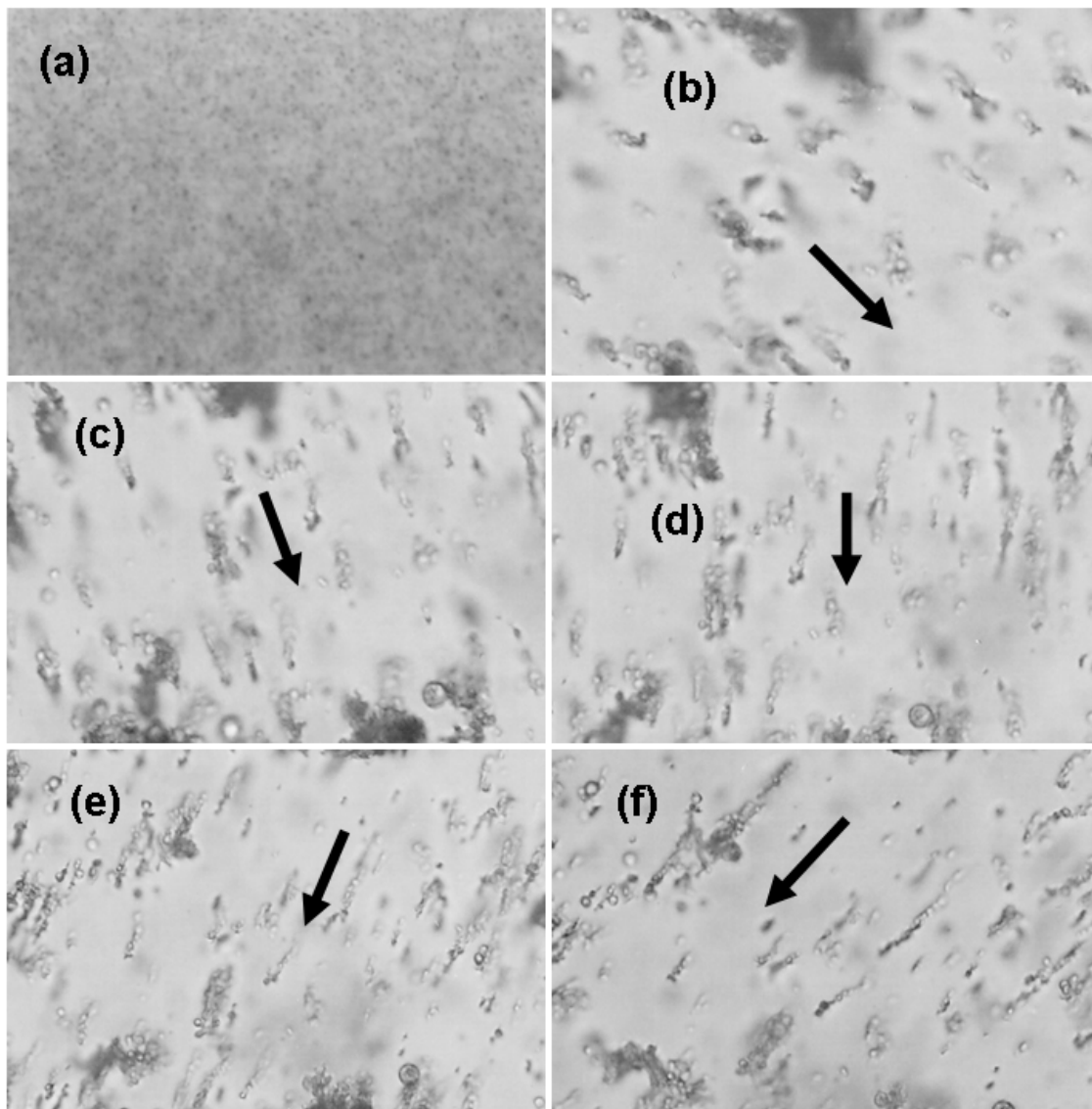


Figura 38. Microfotografía óptica (magnificación: 40X) de una suspensión acuosa de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ en ausencia (a) o bajo la influencia (b, c, d, e, f) de un campo magnético externo, $B= 400 \text{ mT}$, en la dirección de la flecha.

Capítulo 7.

Capacidad de vehiculización de fármacos

Para que un fármaco actúe es indispensable que acceda en concentración suficiente a todas las células sensibles a él. En el caso de los fármacos antiinflamatorios y antineoplásicos, el objetivo es asegurar la máxima acumulación de estos principios en el lugar diana, como medio para lograr acrecentar su eficacia terapéutica. Además, nuevas estrategias farmacoterapéuticas intentan minimizar los fenómenos de toxicidad asociados al tratamiento farmacológico y el desarrollo de resistencias en las células diana [Floréz, 2008]. En este sentido, uno de los campos que está recibiendo especial atención es la utilización de coloides como sistemas transportadores de fármacos al tejido u órgano diana. De hecho, numerosos estudios han puesto de manifiesto que los sistemas transportadores basados en nanopartículas de origen polimérico o liposomal, y biodegradables, incrementan la captación del principio activo vehiculizado por las células diana. Así, la eficacia del fármaco se verá significativamente acrecentada, junto con la minimización de la incidencia y severidad de las reacciones adversas asociadas a su utilización [Arias, 2008, 2011; Arias y cols., 2009; González-Rodríguez y cols., 2003; Yong y cols., 2005].

Nuestro objetivo principal en este capítulo es lograr la aplicación del coloide magnético que hemos diseñado en el transporte de fármacos de muy diversa naturaleza. En concreto, hemos investigado la vehiculización de los antitumorales doxorubicina y 5-fluorouracilo, y del antiinflamatorio no esteroideo diclofenaco sódico. La doxorubicina o hidroxildaunorrubicina es un antibiótico antitumoral de la familia de las antraciclinas, con una estructura química similar a la daunomicina, siendo como ésta última un intercalante del ADN [Fomari y cols., 1994]. Se sabe que, al intercalarse, inhibe la biosíntesis de macromoléculas al dificultar el avance de la enzima topoisomerasa II que desenrolla el ADN en la transcripción [Mompalmer y cols., 1976]. La doxorubicina estabiliza este complejo de topoisomerasa II después de que se abra la cadena de ADN en la replicación, evitando que se libere la doble hélice y deteniendo así

el proceso, lo que supone la muerte celular. Entre las razones que delimitan su uso clínico destacan *i)* la doxorubicina se absorbe mal por vía oral y atraviesa mal la barrera hematoencefálica; *ii)* el 70 % de la dosis administrada se une a proteínas plasmáticas y se metaboliza extensamente; *iii)* uno de sus metabolitos, el doxorrubinol, es más cardiotóxico y menos antitumoral que la doxorubicina; y, *iv)* debido a su alta metabolización, es necesaria una mayor dosis para conseguir el efecto deseado, lo que además acrecentará la incidencia y severidad de las reacciones adversas [Floréz, 2008].

El 5-fluorouracilo es un antimetabolito análogo de la pirimidina, con un amplio espectro de actividad contra los tumores sólidos, solo o en combinación con otros quimioterápicos. Debido a su estructura química, interfiere en el metabolismo de los nucleósidos y puede incorporarse al ARN y ADN, produciendo citotoxicidad y muerte celular. Una de las muchas razones que limitan su aplicación clínica es el desarrollo de resistencias por las células tumorales. Además, su alta metabolización en el organismo hace necesaria una continua administración a dosis altas para conseguir concentraciones terapéuticas eficaces en el lugar de acción, lo que puede ocasionar de forma colateral una toxicidad severa. Por todo esto, su eficacia real en clínica se encuentra seriamente limitada. Por ejemplo, la respuesta obtenida en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado con el 5-fluorouracilo es inferior al 10 %, y sólo se logra incrementar hasta un 45 % cuando se usa en combinación con otros antitumorales [Zhang y cols., 2008].

Por otro lado, el diclofenaco sódico es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y, como tal, presenta importantes efectos adversos bien conocidos, asociados a su administración oral, p. ej., toxicidad gastrointestinal, úlceras gástricas y anafilaxis, consecuencia de una acción inespecífica en tejidos y órganos sanos [Smith y cols., 2000; Vane y cols., 1998]. Este principio activo se caracteriza por unas propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas desfavorables, y por cierta inestabilidad *in vitro*, lo que dificulta seriamente su actividad farmacológica. Es más, su importante efecto de primer paso, su rápido e intenso metabolismo, y su elevada unión a proteínas plasmáticas determina la necesidad del uso de grandes dosis para lograr un efecto

terapéutico adecuado, lo que aumenta simultáneamente la incidencia y severidad de los efectos adversos asociados [Katzung, 2007].

Según lo expuesto en el capítulo 1, puede esperarse que la utilización de nanopartículas biodegradables constituidas por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico [poli(ϵ -caprolactona)] permita el transporte controlado de dosis de fármaco vehiculizado hasta el tejido u órgano diana. De esta manera, a los principales beneficios comentados sobre el uso de este tipo de nanoplataformas [Durán y cols., 2008; Pouliquen y Chouly, 1999; Senyei y cols., 1978], se sumarían en el caso de la doxorrubicina y del 5-fluorouracilo los derivados de la mejora de sus problemas de estabilidad (cardiotoxicidad de los productos de degradación generados *in vitro* y/o *in vivo* [Katzung, 2007; Lemaire y cols., 1994] y de su perfil farmacocinético (rápida metabolización: semivida plasmática de 10 minutos) [Flórez, 1997a, b, c], pudiéndose incluso llegar a vencer los fenómenos de resistencia que las células cancerosas lograran desarrollar [Durán y cols., 2008]. En cuanto al diclofenaco sódico se mejorarán los problemas relacionados con la vía de administración oral, la inestabilidad *in vitro* e *in vivo*, y la inespecificidad de acción.

En el presente capítulo desarrollaremos, en primer lugar, la caracterización espectrofotométrica para la determinación de la capacidad de vehiculización de fármaco (absorbido y adsorbido) por los coloides formulados. Además, determinaremos la longitud de onda de máxima absorbancia y el coeficiente de absortividad molar característico de cada uno de los fármacos. La metodología reproducible que permite medir eficazmente la incorporación de fármacos en la nanoplataforma está basada en la aplicación de la extensión de la ley de Beer a mezclas de sustancias absorbentes.

El estudio de la adsorción superficial de fármaco en los tres tipos de nanomateriales se abordará desde un punto de vista cualitativo (electroforesis) y cuantitativo (espectrofotometría UV-Vis). Finalmente, realizamos la caracterización *in vitro* del proceso de liberación de los fármacos desde las nanopartículas, y la estimación de las cinéticas correspondientes.

7.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS FÁRMACOS ESTUDIADOS

7.1.1. AGENTES ANTITUMORALES: DOXORRUBICINA Y 5-FLUOROURACILO

El objetivo último de la terapia antineoplásica es la eliminación completa de toda célula cancerosa. La quimioterapia constituye un método terapéutico muy útil que pretende, junto con otras estrategias terapéuticas como la cirugía y la radioterapia, mejorar el pronóstico de la enfermedad. La acción de los antineoplásicos se dirige en su totalidad a frenar la proliferación y el crecimiento celular. Para ello, los agentes quimioterápicos actúan sobre la maquinaria reproductora celular y sólo excepcionalmente el objetivo primordial es inhibir la síntesis de proteínas [Flórez, 2008]. La Organización Mundial de la Salud clasifica los fármacos antineoplásicos en tres niveles de prioridad, según criterios avalados científicamente acerca de la utilidad en el tratamiento de tumores y según la incidencia global de los tumores que responden a la terapia [Sikora y cols., 1999]. Dentro de los antineoplásicos que pertenecen al grupo de prioridad 1 se encuentra la doxorubicina y el 5-fluorouracilo (tabla 7), eficaces en el tratamiento de los diez tipos de tumores con mayor incidencia (pulmón, estómago, mama, colorrectal, cérvix, cabeza y cuello, linfoma, hepatobiliar, esofágico y próstata) y de aquellos clasificados en las categorías 1 y 2. La primera categoría incluye tumores para los que existe evidencia de que un fármaco o una combinación de quimioterápicos,

utilizada en solitario o con otras modalidades terapéuticas, da lugar a una curación total en algunos pacientes o a una prolongación de la supervivencia en la mayoría. Éstos son: cáncer de células germinales, trofoblástico, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, linfoma de enfermedad de Hodgkin y no Hodgkin. En la categoría 2 se engloban tumores en los que la supervivencia media se prolonga cuando la quimioterapia es utilizada como coadyuvante de la cirugía local o la radioterapia en los estados iniciales de la enfermedad. Éstos son: cáncer colorrectal, de mama, de ovario, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, retinoblastoma y tumor de Wilms.

| | Actividad sobre los diez tipos de cáncer con mayor incidencia | Actividad sobre los tipos de cáncer agrupados en las categorías 1 y 2 |
|------------------------|---|---|
| Bleomicina | + | + |
| Clorambucilo | + | + |
| Cisplatino | + | + |
| Ciclofosfamida | + | + |
| Doxorrubicina | + | + |
| Etopósido | + | + |
| 5-fluorouracilo | + | + |
| Metotrexato | + | + |
| Prednisolona | + | + |
| Procarbina | – | + |
| Tamoxifeno | + | + |
| Vincristina | + | + |
| Citarabina | – | + |
| Dactinomicina | – | + |
| 6-mercaptopurina | – | + |
| Vinblastina | + | + |
| Daunorubicina | – | + |

Tabla 7. Fármacos anticancerígenos de prioridad 1. El signo + indica actividad sobre ese grupo de tumores y el signo – indica ausencia de actividad.

DOXORRUBICINA

La doxorrubicina utilizada (Sigma Aldrich, Alemania) es un polvo rojo, cristalino, con un peso molecular de 543.52 g/mol. Su punto de fusión se encuentra entre 202-205

°C. La doxorubicina (1,4-hidroxil daunorrubicina) es un antibiótico antitumoral perteneciente al grupo de las antraciclinas y aislada de *Streptomyces peucetius* variante *peucetius*. Este fármaco se encuentra entre los más usados, presentando una mayor y más extensa actividad biológica que su antecesor (daunorrubicina). Está constituida por un compuesto de estructura tetracíclica, de carácter cromóforo, unido por enlace glucosídico a un aminoazúcar (figura 39). La molécula presenta un amplio espectro de actividad clínica en procesos hematológicos malignos, así como una gran variedad de tumores sólidos.

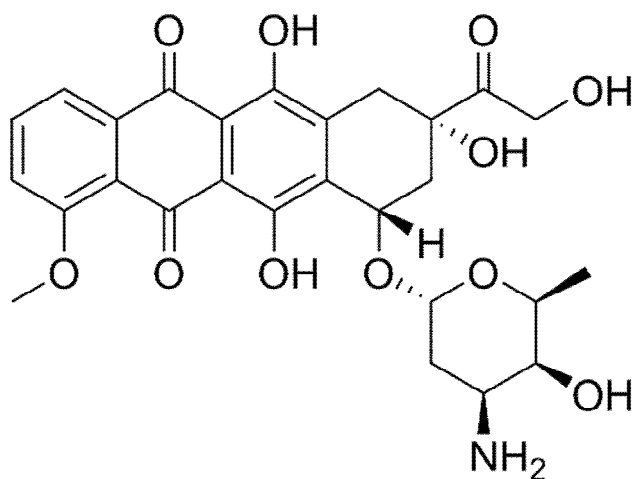


Figura 39. Estructura química de la doxorubicina.

Se han descrito múltiples acciones biológicas de las antraciclinas, cuya contribución a las acciones antineoplásica y citotóxica fundamentales puede ser variable. Destaca su capacidad para intercalarse entre los pares de bases adyacentes de ADN y fijarse con intensidad diversa. Esta acción modifica las propiedades del ADN, pero por sí misma no es suficiente para ser letal. Una de las acciones que actualmente se considera crítica es la inhibición de la topoisomerasa II (topo II). Las antraciclinas se fijan al complejo binario ADNtopo II formando un complejo ternario, de gran estabilidad, que facilita la rotura irreversible tanto de cadenas sencillas como de cadenas

dobles de ADN. De hecho, células en las que una mutación provoca una alteración de la topoisomerasa II (*at-mdr*) se hacen resistentes a las antraciclinas (y a otros antineoplásicos). Por el contrario, células con aumento de los niveles de topoisomerasa II se vuelven hipersensibles a estos antibióticos [Floréz, 2008].

Además, las antraciclinas forman radicales libres semiquinónicos por reducción enzimática. Estos radicales libres pueden alterar el ADN por procesos de alquilación o pueden provocar la peroxidación de lípidos celulares no saturados, lo que induce una lesión celular. Sin embargo, la acción desarrollada contribuye más a la actividad cardiotoxica de las antraciclinas que a la acción antineoplásica. Las antraciclinas también pueden alterar la membrana celular, inhibir la fosforilación oxidativa de las mitocondrias e inhibir diversas enzimas relacionadas con el ADN y el ARN como las polimerasas, helicasas y enzimas reparadoras.

La doxorubicina se absorbe mal por vía oral y atraviesa mal la barrera hematoencefálica. El 70 % de la dosis administrada se une a proteínas plasmáticas y se metaboliza extensamente. Como consecuencia de esta metabolización se genera el metabolito cardiotoxico doxorrubinol, el cual tiene una actividad antitumoral claramente inferior. La semivida plasmática de la doxorubicina oscila entre 18 y 30 horas y puede presentar ciclo enterohepático. En cuanto a la toxicidad de la molécula, inicialmente aparecen náuseas y vómitos, diarrea, irritación local, estomatitis y alopecia. La mielodepresión alcanza su mayor grado durante la segunda semana, afectando en mayor proporción la serie blanca que a la roja o las plaquetas. Por otro lado, existe cierta sinergia entre las antraciclinas y las radiaciones, incrementándose la toxicidad en órganos no irradiados directamente. Una reacción adversa preocupante y muy específica es la cardiotoxicidad, que puede presentarse bajo dos formas: *a*) la aguda producida por única dosis, con alteraciones en el electrocardiograma caracterizadas por cambios de la onda *T* y del intervalo *ST*, y arritmias; puede producirse también un síndrome de pericarditis-miocarditis aguda con insuficiencia cardíaca congestiva; y, *b*) la crónica, que depende de la acumulación de dosis sucesivas y que afecta específicamente al

miocardio: la lesión origina insuficiencia cardíaca resistente al tratamiento con derivados digitálicos. El riesgo de cardiotoxicidad aumenta cuando la dosis total de doxorubicina supera los 550 mg/m² y es aún mayor si se asocia su uso a radioterapia, cuando existe previamente cardiopatía, o en edades extremas (niños y ancianos) [Katzung, 2007].

La doxorubicina es uno de los medicamentos contra el cáncer más importantes, con una gran actividad clínica en el carcinoma de mama, endometrio, ovario, testículos, tiroides, estómago, vejiga, hígado, pulmón, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, osteosarcoma y rhabdomyosarcoma. También se usa ampliamente en procesos hematológicos malignos como la leucemia linfoblástica aguda, el mieloma múltiple y los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin. Por lo general, se usa en combinación con otros agentes antitumorales (p. ej., ciclofosfamida, cisplatino y 5-fluorouracilo) para así asegurar una mayor eficacia terapéutica. Sin embargo, este tipo de estrategias puede incrementar la incidencia o severidad de las reacciones adversas en los pacientes [Floréz, 2008].

5-FLUOROURACILO

El 5-fluorouracilo utilizado (Fagron Iberica S.A.V., España) es un polvo cristalino blanco, inodoro, con un peso molecular de 130.08 g/mol y estable en aire. Su punto de fusión se encuentra entre 280 y 284 °C, y es soluble en agua, metanol, etanol y alcohol isopropílico [Florey, 1973a]. El 5-fluorouracilo es un antineoplásico perteneciente al grupo de los fármacos antimetabolitos, los cuales actúan en la fase de la síntesis del ciclo celular porque interfieren en la síntesis de ARN y ADN. La mayoría de los fármacos pertenecientes a este grupo son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división. Otros miembros de este grupo inhiben enzimas específicas necesarias para la síntesis de compuestos esenciales para la supervivencia de la célula maligna. Su eficacia, en general, es máxima cuando la proliferación celular es rápida [Floréz, 2008].

El 5-fluorouracilo es el más sencillo de los fármacos análogos del uracilo. En su estructura química incorpora un átomo de flúor en la posición 5 en lugar del hidrógeno (figura 40). Es un antimetabolito de la uridina que actúa como falso sustrato en el proceso de síntesis de los constituyentes esenciales de los ácidos nucleicos, principalmente en la fase *S* del ciclo celular, provocando la síntesis de un ADN anómalo o incluso la detención del proceso. El 5-fluorouracilo lesiona las células mediante dos mecanismos de acción, cuya contribución a la acción citotóxica varía según el tipo de tumor: la inhibición de la timidilato-sintasa (que provoca la depleción de d-TMP, un nucleótido indispensable para la síntesis de ADN) y la incorporación progresiva al ARN (interfiriendo así con su procesamiento y su función específica). Para ello, debe transformarse inicialmente en el desoxirribonucleótido correspondiente, el ácido 5-fluorodesoxiuridílico.

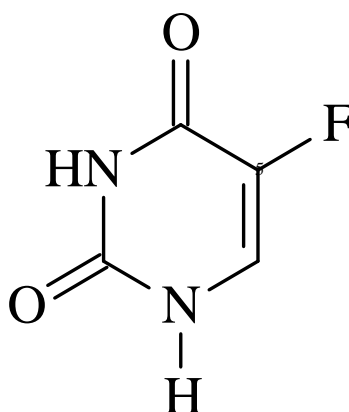


Figura 40. Estructura química del 5-fluorouracilo.

Se trata de uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de muchos tumores sólidos. En particular, es todavía fundamental en el cáncer colorrectal. Sin embargo, su eficacia está limitada por la rapidez de su metabolización (semivida plasmática ≈ 10

minutos). Numerosas investigaciones pretenden mejorar su perfil farmacocinético y, así, incrementar su eficacia. Por ejemplo:

- Mediante combinación con otros antitumorales, aunque no se ha obtenido una mayor tasa de respuesta en comparación con su administración en solitario.
- Uso simultáneo con agentes modificadores biológicos como el ácido fólico y el metotrexato, los cuáles interactúan con las acciones biológicas del 5-fluorouracilo aumentando sus efectos terapéuticos. Esta estrategia parece ser más eficaz que su administración en solitario.
- La infusión continua de este fármaco incrementa el porcentaje de células tumorales susceptibles. Esta lucha hace posible la utilización de dosis muy activas en pacientes resistentes al 5-fluorouracilo administrado como bolo inyectable.

El 5-fluorouracilo se emplea principalmente en algunos adenocarcinomas del aparato digestivo (colon, páncreas, estómago y recto) y de la mama y, con menor frecuencia, en hepatomas y carcinomas de ovario, próstata, cuello uterino, vejiga y orofaringe. En ocasiones, se ha utilizado en infusión intraarterial (p. ej., en metástasis hepática del carcinoma de colon), pero la forma más frecuente de administración es la infusión intravenosa continua durante 120 horas (20-30 mg/Kg/día). En el tratamiento de tumores de cabeza y cuello se asocia al cisplatino en infusión durante 92 horas. El 5-fluorouracilo también se utiliza como tratamiento paliativo en pacientes no curados por cirugía o radioterapia, y ha sido empleado en el tratamiento del cáncer de la cubierta externa de la glándula adrenal, de endometrio, de esófago, de pene, de vulva y en el hepatoblastoma. Por vía tópica este agente antitumoral puede provocar fotosensibilización y eritema, exfoliación, ulceración, necrosis y reepitelización. No obstante, se utiliza esta vía de administración en el tratamiento de la psoriasis, en la terapéutica de nuevos tumores epidérmicos y de la queratosis premaligna de la piel [Floréz, 2008].

Al igual que ocurre con otros antineoplásicos, la especificidad del 5-fluorouracilo por las células tumorales es escasa y ello condiciona la frecuente y grave afectación de otros órganos y tejidos. Por este motivo, se genera una toxicidad que casi siempre limita las posibilidades de administrar la dosis total que teóricamente sería conveniente. Las reacciones adversas más frecuentes se aprecian en el tracto gastrointestinal y en la médula ósea. Las primeras manifestaciones tóxicas son náuseas y vómitos, y las diferidas son estomatitis y ulceraciones en diversas localizaciones del tubo digestivo. En la médula ósea provoca mielosupresión, en la que predomina leucopenia. Este fármaco puede producir también alopecia, conjuntivitis y síntomas neurológicos agudos (somnolencia, parestesias y atasia cerebelosa). La actividad mielotóxica del 5-fluorouracilo predomina cuando la administración parenteral es en forma de bolo, y disminuye si se administra en infusión intravenosa. Algunos de los efectos adversos que produce pueden aparecer meses o años después de su administración. Un efecto no comúnmente asociada a este fármaco es la cardiotoxicidad [Bertolini y cols., 1999], atribuida a los compuestos de degradación (fluoroacetaldehído y ácido fluoromalonaldehídico) presentes en los viales inyectables que se forman con el tiempo en el medio básico necesario para solubilizar el fármaco. La metabolización del fluoroacetaldehído genera el fluoroacetato, compuesto potencialmente cardiotoxico [Lemaire y cols., 1994]. Finalmente, el 5-fluorouracilo, como muchos de los agentes antineoplásicos, altera los mecanismos de división y procesamiento de las células implicadas en la inmunidad celular. De ahí que con frecuencia surja un estado de depresión inmunitaria que facilita la aparición de infecciones por virus, hongos y bacterias. Además, la modificación que induce de la estructura del genoma puede originar otras formas de toxicidad cada vez más preocupantes: la mutagenicidad y la carcinogenicidad [Katzung, 2007].

7.1.2. DICLOFENACO SÓDICO

El diclofenaco sódico (Fagron ibérica S.A.V., España) es un polvo blanco cristalino, inodoro, ligeramente higroscópico, con un peso molecular de 318.13 g/mol y

estable frente a fenómenos de oxidación. Su punto de fusión se encuentra entre 283 y 285 °C, y es soluble en metanol, agua y acetona [Florey, 1973b]. Pertenece al grupo terapéutico de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). La mayoría de los componentes de este grupo comparten tres acciones farmacológicas características (analgésica, antitérmica y antiinflamatoria), pudiendo ser la eficacia relativa para cada una de ellas diferente. Por su actividad farmacológica característica, los AINE se autoprescriben frecuentemente sin control médico para aliviar dolores moderados o para bajar la fiebre, bien como fármacos aislados o asociados a muchos otros. Como comparten una capacidad elevada para provocar reacciones adversas de intensidad y gravedad variable, su toxicidad aguda y crónica reviste interés epidemiológico. Los principales efectos terapéuticos y muchas de las reacciones adversas de los AINE pueden explicarse por su efecto inhibitorio de la actividad de las ciclooxigenasas. Como es bien sabido, estas enzimas convierten el ácido araquidónico localizado en las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos. Algunos de estos eicosanoides pueden participar en los mecanismos patógenos de la inflamación, el dolor y la fiebre. Por este motivo, la inhibición de la enzima que desencadena su síntesis justifica la actividad terapéutica de los AINE y también las reacciones adversas características de estos fármacos [Flórez, 2008].

Los AINE están indicados especialmente en ciertos dolores caracterizados por una participación destacada de las prostaglandinas (p. ej., dismenorreas o situaciones, como metástasis óseas, que cursan con intensa actividad osteoclástica). Clásicamente se ha aceptado que la acción analgésica de los AINE tiene lugar a nivel periférico, mediante la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas producidas frente a una agresión o lesión tisular. De esta manera, los AINE impiden que los eicosanoides contribuyan, con su acción sensibilizadora sobre las terminaciones nerviosas nociceptivas, a aumentar la acción estimulante del dolor de otros mediadores allí liberados (histamina, bradicinina, etc.).

El diclofenaco sódico se encuentra dentro del grupo de los salicilatos. El núcleo fundamental de la estructura química de este antiinflamatorio es el ácido salicílico (o ácido 2-hidroxibenzoico, figura 41). Es un derivado del fenilacético con actividad analgésica, antitérmica y antiinflamatoria potentes, y eficacia comparable a la de los derivados del ácido propiónico.

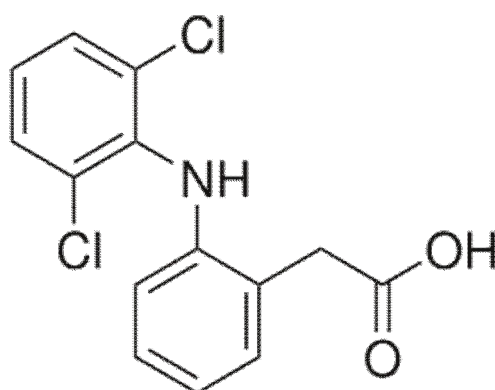


Figura 41. Estructura química del diclofenaco sódico.

A las dosis habituales, el diclofenaco interfiere menos en la agregación plaquetaria que la mayoría de los AINE y es uricosúrico. Como el resto de AINE, inhibe la síntesis de prostaglandinas, pero además disminuye la concentración de ácido araquidónico en los leucocitos. El diclofenaco se absorbe bien por vía oral y rectal, aunque el fenómeno del primer paso hepático limita su biodisponibilidad al 50 %. El diclofenaco se une a proteínas en un 99 % y se elimina principalmente en la orina y la bilis, tras sufrir reacciones de hidroxilación y conjugación. Su semivida plasmática es de 1 – 2 horas. Sin embargo, esta molécula pasa fácilmente al líquido sinovial, lo cual explica que la duración de la actividad farmacológica sea más prolongada de lo esperable por su reducida semivida plasmática.

Las reacciones adversas que más frecuentemente se asocian con el uso de este principio activo son, en conjunto, similares a las de los derivados del ácido propiónico.

Cabe destacar, sin embargo, que el 15 % de los pacientes presenta un aumento temporal de las transaminasas hepáticas que, si bien suele ser reversible, en ocasiones permanece y obliga a la suspensión del tratamiento. También han se descrito algunos casos de anemia aplásica. Entre los efectos adversos que se producen como consecuencia de la utilización de dosis altas de este fármaco son muy habituales las alteraciones gastrointestinales (tales como hemorragias gastrointestinales, úlceras y perforaciones), los accidentes cardiovasculares y cerebrovasculares, las reacciones cutáneas graves (incluyendo dermatitis exfoliativa y síndrome de Stevens-Johnson), las reacciones hepáticas (por la elevación de las enzimas hepáticas durante el tratamiento prolongado) y las alteraciones en la función renal (que inducen la retención de líquidos) [Flórez, 2008].

7.2. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS DE LAS DISOLUCIONES DE FÁRMACO

7.2.1. ABSORBANCIA ÓPTICA DE LAS DISOLUCIONES

El espectrofotómetro ultravioleta-visible utilizado en nuestro trabajo (Pekin Elmer Lambda 40, Spectrometer UV-Vis, EE.UU.) está equipado con una lámpara de deuterio, que produce un espectro continuo útil para la región comprendida entre 180 y 375 nm, y otra de wolframio, útil para la región de longitudes de onda comprendida entre 350 y 1100 nm. Así, este aparato permite obtener un espectro desde los 180 nm hasta 1100 nm. La cubeta utilizada es de cuarzo, transparente en la región espectral de interés, y con un camino óptico de 1 cm. Su mantenimiento es crítico para la calidad de las medidas, por lo que la limpieza completa antes y después de su uso es fundamental y se realizó siempre con agua destilada y acetona.

Las primeras etapas de un análisis espectrofotométrico pretenden el establecimiento de las condiciones de trabajo y la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración de la especie a estudiar. Las medidas de absorbancia espectrofotométricas se hacen normalmente a la longitud de onda correspondiente a un pico de máxima absorción, ya que el cambio en la absorbancia por unidad de concentración es mayor en este punto, lográndose así una máxima sensibilidad. Además, bajo estas circunstancias se puede esperar un mejor acuerdo con la ley de Beer, y las medidas son menos sensibles a las incertidumbres que surgen de las limitaciones del instrumento [Skoog y cols., 2001].

Si bien la metodología seguida en la formulación de los coloides determina las condiciones de trabajo (el fármaco se encontrará disuelto en un medio acuoso diseñada para la precipitación del polímero en forma de nanopartículas), un aspecto crucial previo es la clarificación de las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de fármaco. Este estudio se realizó prestando especial atención a su concentración, a la temperatura y al pH de las disoluciones utilizadas. Debido a la (ligera) fotosensibilidad de los tres fármacos investigados [Florey, 1973a,b, 1980], por cautela siempre se procedió con diligencia en la preparación y manipulación de las soluciones de estas moléculas activas. Además, las disoluciones preparadas siempre se conservaron en recipientes cubiertos por papel de aluminio.

En el caso de la doxorrubicina, se investigaron las condiciones óptimas de conservación durante 24 horas según la concentración molar de fármaco (desde 10^{-5} hasta 10^{-3}), la temperatura (4 y 25 °C) y el pH de las disoluciones (pH natural = 5.2, pH = 7.4 ajustado con un tampón NaOH-KH₂PO₄). No se observó ningún tipo de alteración macroscópica de las disoluciones de este agente quimioterápico tras el período de conservación de 24 horas. Finalmente, y en referencia a la temperatura de conservación, las disoluciones preparadas se mantuvieron siempre a 4 °C hasta ser utilizadas para así ralentizar los posibles procesos de degradación. Tras definir las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de doxorrubicina en nuestro trabajo, se

procedió a preparar la curva de calibrado a partir de una batería de disoluciones de este fármaco. Se determinó la longitud de onda de máxima absorbancia y se calculó el coeficiente de absortividad molar de este agente anticanceroso, información de suma utilidad en los estudios de vehiculización en las nanoplataformas diseñadas. Transcurridas 24 horas desde su preparación, se determinó el espectro de absorción UV-Vis de cada una de las disoluciones de doxorubicina (en el intervalo de concentración $10^{-5} - 10^{-3}$), realizando un barrido de longitudes de onda desde 600 a 200 nm, con intervalos de 1.0 nm. Se utilizó como blanco en la calibración previa del aparato agua bidestilada para eliminar las posibles interferencias en el espectro del fármaco generadas por el medio de disolución.

Los resultados de este estudio se recogen en la figura 42, donde sólo se observa señal por debajo de 600 nm y se aprecia cómo la absorbancia de la muestra se incrementa al aumentar la concentración de fármaco en el medio. Además, se aprecian claramente dos máximos en el espectro. No obstante, el único que presenta una longitud de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones es el correspondiente a 481 nm [Florey, 1980]. Ésta será la longitud de onda utilizada en nuestras determinaciones. Además, se aprecia una irregularidad manifiesta del espectro a concentraciones superiores a $2 \cdot 10^{-4}$ M, valor a partir del cual es patente la tendencia de los dos picos a fusionarse. Esto provoca también que la longitud de onda de máxima absorbancia decrezca significativamente conforme la concentración de doxorubicina aumenta por encima de $2 \cdot 10^{-4}$ M. A estas elevadas concentraciones, es evidente la imposibilidad de realizar una estimación fiable, mediante espectrofotometría UV-Vis, de la cantidad de fármaco presente en disolución, ya que el rango de concentraciones posibles para un valor de absorbancia determinado es muy variable. Esta desviación manifiesta de la ley de Beer podría justificarse por el hecho de que, aunque normalmente el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a 10^{-2} M, la doxorubicina pertenece al grupo de moléculas orgánicas para las que se han descrito excepciones a este comportamiento.

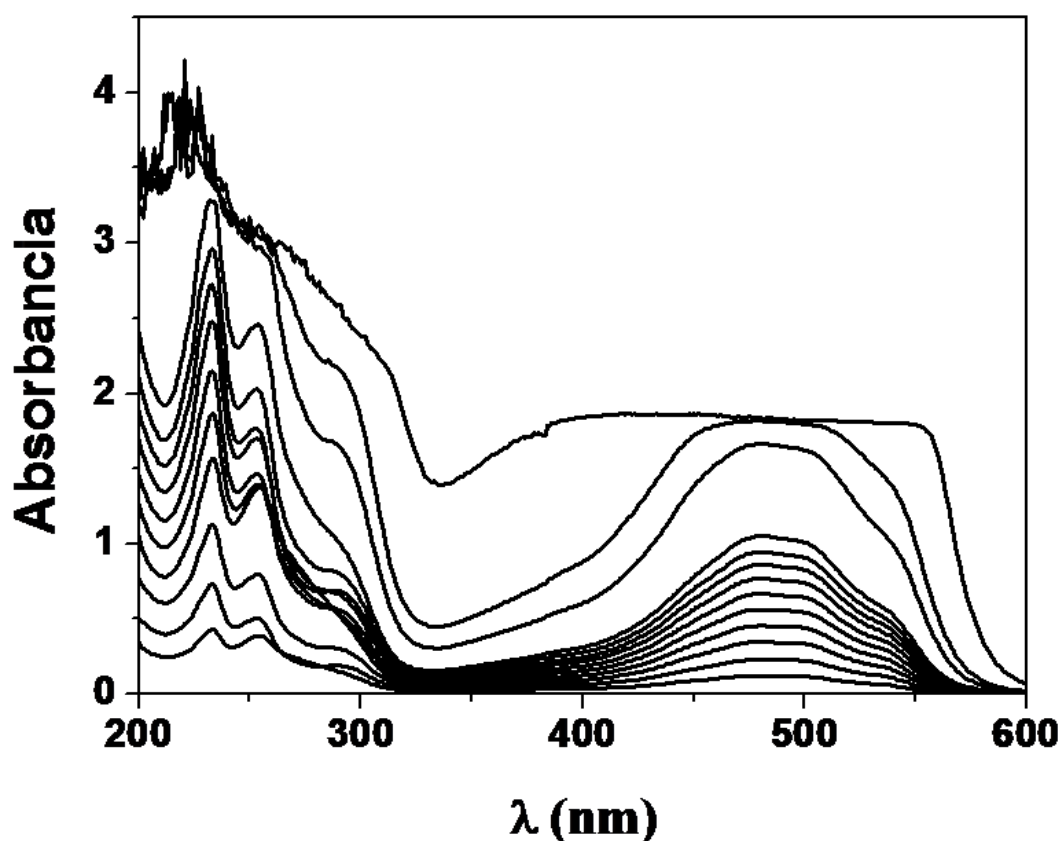


Figura 42. Espectro de absorbancia UV-Vis de las disoluciones de doxorrubicina. Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$ y 10^{-3} M.

La determinación del coeficiente de absortividad molar (ϵ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y concentración mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue $\epsilon = 10450 \pm 150 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($r = 0.999$). En la figura 43 se muestran los datos y la recta de ajuste. Es destacable cómo los valores de absorbancia a diferentes concentraciones obtenidos a 481 nm cumplen la ley de Beer.

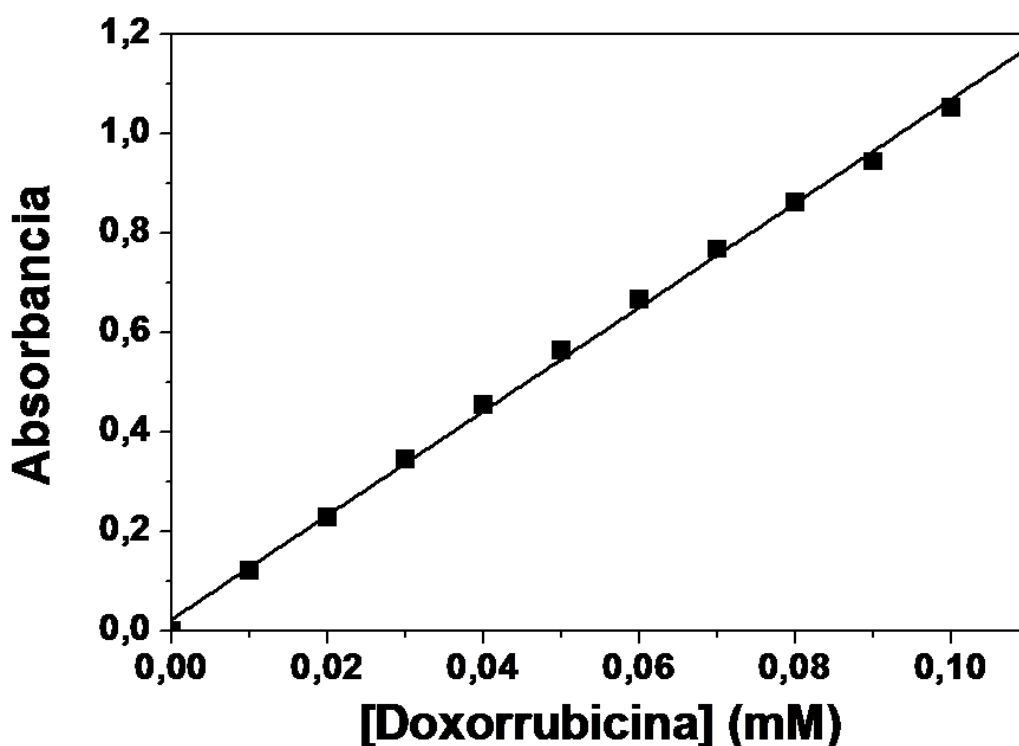


Figura 43. Determinación del coeficiente de absortividad molar de las disoluciones de doxorubicina a la longitud de onda de máxima absorbancia (481 nm).

La misma metodología experimental descrita para la doxorubicina se siguió en la determinación de las condiciones óptimas de conservación de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo. Las únicas diferencias fueron que las concentraciones utilizadas llegaron hasta 10^{-2} M y que el pH natural de las disoluciones acuosas de este fármaco era 4.8. Para la disolución de los cristales de 5-fluorouracilo se precisó la utilización de ultrasonidos. Su intensidad y la duración de la aplicación fue menor para las disoluciones preparadas a pH 7.4. No se observó ningún tipo de alteración macroscópica en las disoluciones de este agente quimioterápico tras el período de conservación de 24 horas. Sin embargo, se ha descrito que en disoluciones con una concentración superior a 10^{-2} M ocurre espontáneamente la recristalización de este fármaco en solución [Arias y cols., 2005; Barberi-Heyob y cols., 1995]. Finalmente, y

en referencia a la temperatura de conservación, las disoluciones preparadas se mantuvieron a 4 °C hasta ser utilizadas, para así ralentizar posibles procesos de degradación [Arias y cols., 2005]. La curva de calibrado de las disoluciones de 5-fluorouracilo se realizó utilizando las concentraciones molares 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2} M. Transcurridas 24 horas desde su preparación, se determinó el espectro de absorción UV-Vis de cada una de las disoluciones según la metodología ya descrita para la doxorubicina. No se investigó un intervalo de longitudes de onda mayor ya que el 5-fluorouracilo no presenta absorción en la zona del visible del espectro [Arias y cols., 2005].

Los resultados de este estudio se recogen en la figura 44, donde sólo se observa señal por debajo de 325 nm y se aprecia cómo la absorción se incrementa al aumentar la concentración de fármaco en el medio. El único máximo de los observados que presenta una longitud de onda de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones es el correspondiente a 266 nm [Florey, 1973a], longitud de onda seleccionada para las medidas que realizamos. A partir de la concentración $2 \cdot 10^{-4}$ M es patente la tendencia de los dos máximos a fusionarse, hecho que se produce por encima de 10^{-3} M. La longitud de onda de máxima absorbancia decrece significativamente conforme la concentración de 5-fluorouracilo aumenta por encima de $2 \cdot 10^{-4}$ M. Esta desviación de la ley de Beer impide realizar determinaciones fiables a estas concentraciones.

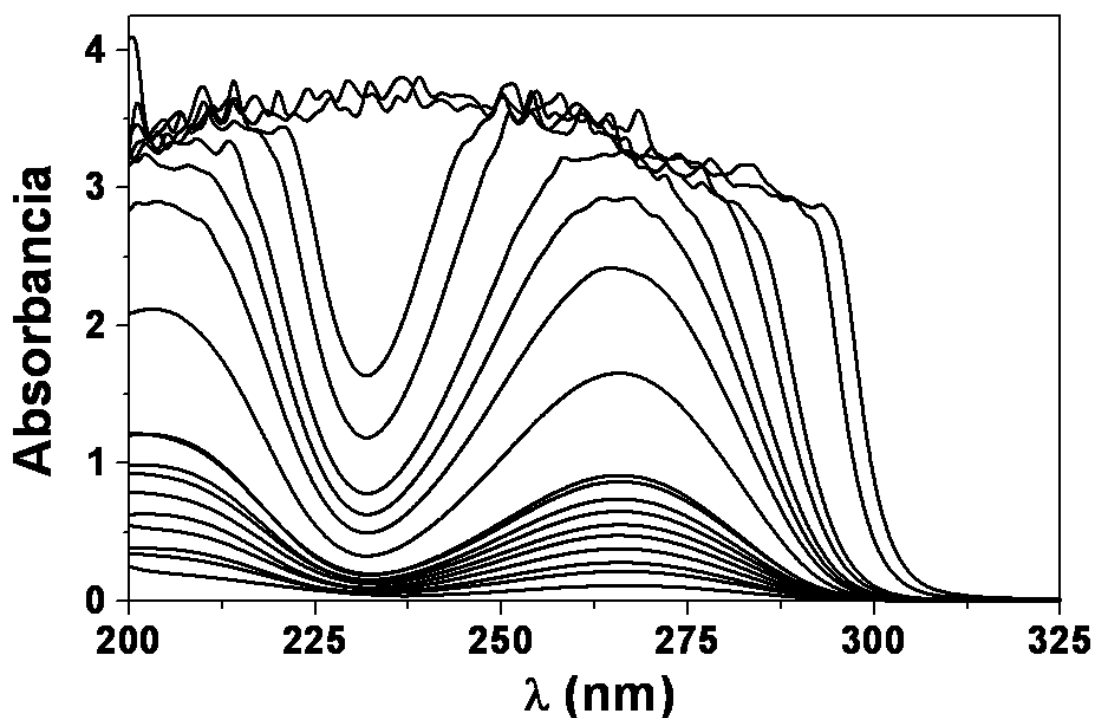


Figura 44. Espectro de absorbancia UV-Vis de las disoluciones de 5-fluorouracilo. Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2} M.

La determinación del coeficiente de absortividad molar (ϵ) se realizó según la metodología ya indicada, siendo el resultado obtenido $\epsilon = 7370 \pm 90 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($r = 0.999$). En la figura 45 se muestran los datos y la recta de ajuste. Los valores de absorbancia a diferentes concentraciones obtenidos a 266 nm cumplen la ley de Beer.

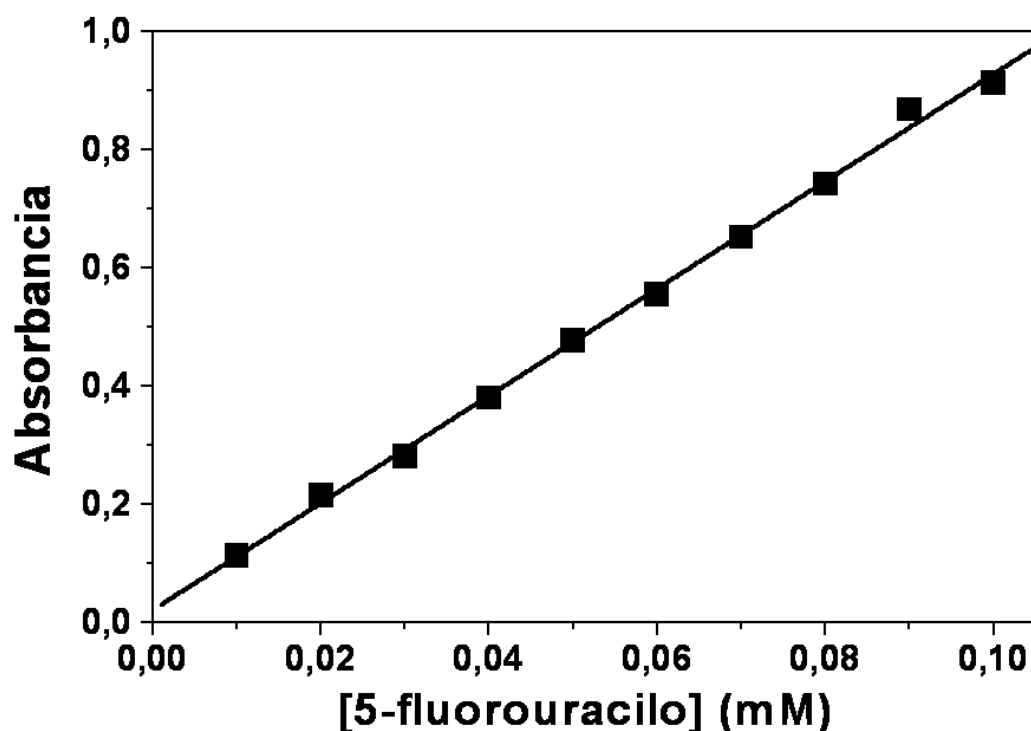


Figura 45. Determinación del coeficiente de absorptividad molar de las disoluciones de 5-fluorouracilo a la longitud de onda de máxima absorbancia (266 nm).

Al igual que se ha realizado en el caso de las disoluciones acuosas de doxorrubicina y de 5-fluorouracilo, en primer lugar determinamos las condiciones óptimas de conservación de las disoluciones de diclofenaco sódico durante 24 horas según la concentración molar de fármaco (desde 10^{-5} hasta 10^{-2}), la temperatura ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y el pH de las disoluciones (pH natural = 6.4, y pH = 7.4 ajustado con tampón NaOH- KH_2PO_4). Para ello, se siguió la metodología descrita, no observándose ningún tipo de alteración visible en las disoluciones tras este período 24 horas. A continuación, se preparó una curva de calibrado a partir de una batería de disoluciones de diclofenaco sódico (concentraciones molares: 10^{-5} , $2\cdot 10^{-5}$, $3\cdot 10^{-5}$, $4\cdot 10^{-5}$, $5\cdot 10^{-5}$, $6\cdot 10^{-5}$, $7\cdot 10^{-5}$, $8\cdot 10^{-5}$,

$9 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} M). Tras 24 horas, se determinó el espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones de AINE según la metodología descrita. Estudios precedentes han puesto de manifiesto que este principio activo no tiene absorción en la zona del visible del espectro [Arias y cols., 2010b].

Se observó absorbancia no nula en el espectro por debajo de 350 nm y, nuevamente, los valores de absorbancia eran proporcionales a la concentración de diclofenaco sódico en el medio acuoso (figura 46). Se aprecian también dos máximos en el espectro obtenido, aunque sólo el que aparece a 276 nm permanece invariable en un amplio rango de concentraciones [Florey, 1973b]. Por lo tanto, descartamos el máximo que se genera a menor longitud de onda y los espectros obtenidos a concentraciones superiores a 10^{-4} M, ya que a partir de esta concentración los picos claramente tienden a fundirse en uno (y ya no existe linealidad absorbancia-concentración), hecho que se produce por encima de $2 \cdot 10^{-4}$ M. La irregularidad del espectro a estas altas concentraciones impide cualquier tipo de medida. Como consecuencia de todo lo comentado, la longitud de onda del pico de interés (276 nm) se desplaza hacia la izquierda al aumentar la concentración de diclofenaco sódico, nuevo ejemplo de desviación de la Ley de Berr.

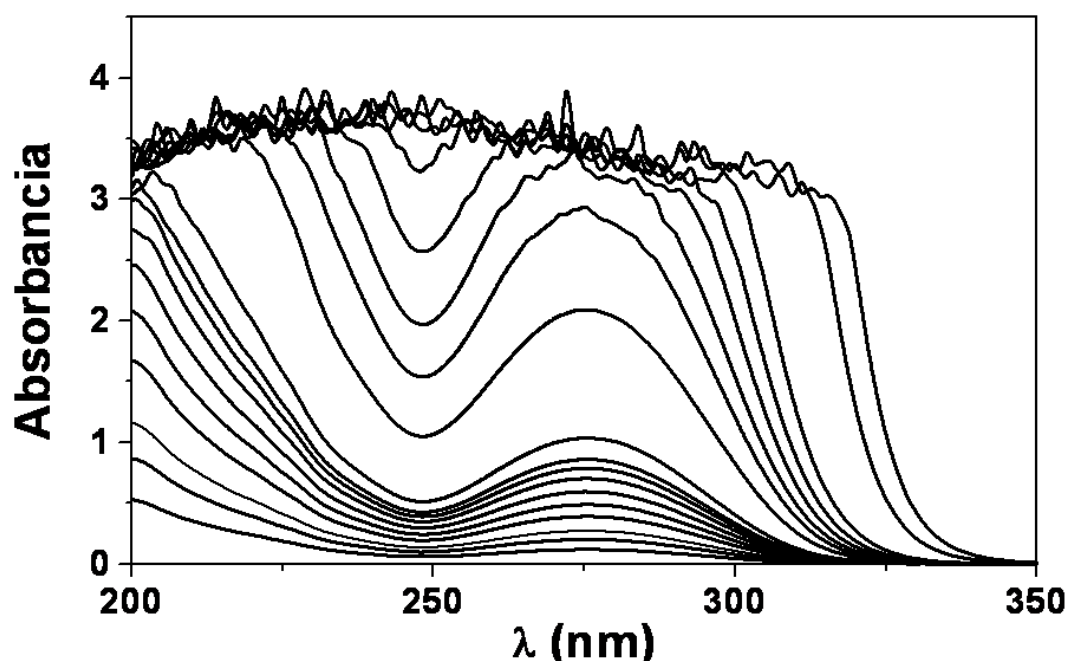


Figura 46. Espectro de absorbancia UV-Vis de las disoluciones de diclofenaco sódico. Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2} .

El coeficiente de absortividad molar (ϵ) se obtuvo ajustando según la metodología descrita siendo el resultado obtenido $\epsilon = 9540 \pm 170 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($r = 0.999$). Como puede apreciarse en la figura 47, los valores de absorbancia a diferentes concentraciones para la longitud de onda de medida (276 nm) cumplen la ley de Beer.

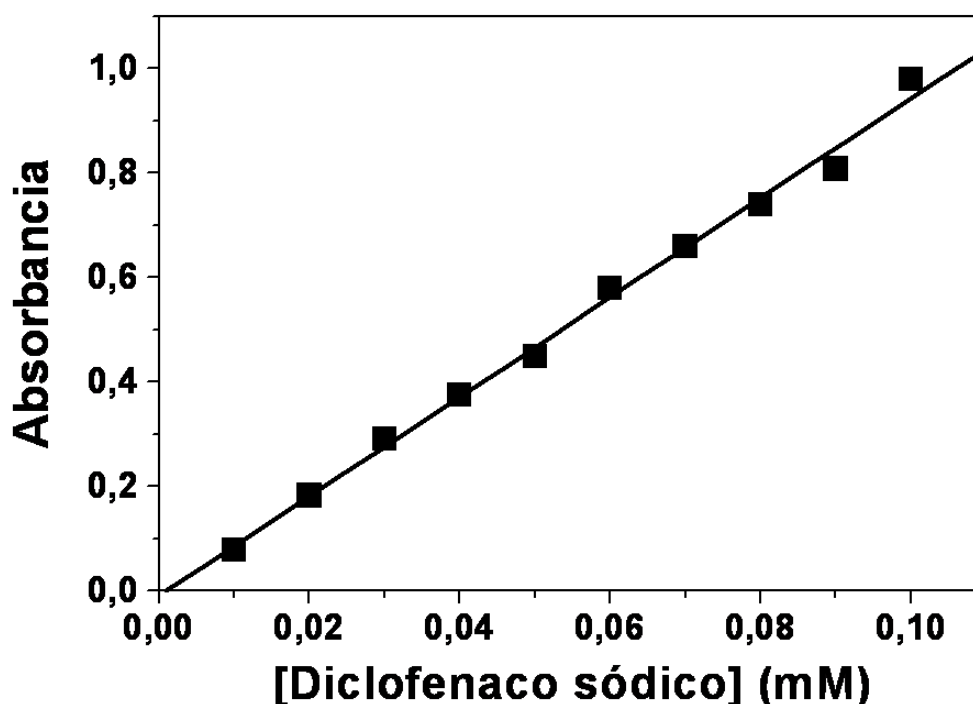


Figura 47. Determinación del coeficiente de absortividad molar de las disoluciones de diclofenaco sódico a la longitud de onda de máxima absorbancia (276 nm).

7.2.2. FACTORES EXPERIMENTALES CONDICIONANTES

Si bien ya hemos señalado las condiciones en que deben prepararse y conservarse las disoluciones acuosas de los fármacos objeto de estudio, en este apartado pretendemos establecer hasta qué punto influye en sus propiedades espectrofotométricas la exposición a distintas temperaturas de conservación, a la luz y a diferentes condiciones de pH.

En primer lugar, investigamos el efecto de la temperatura y el de la luz sobre la absorbancia UV-Vis de las disoluciones acuosas de doxorrubicina. La concentración de las disoluciones de antitumoral preparadas fue siempre 10^{-4} M, siendo dividida esta batería de preparaciones en cuatro grupos diferentes según las condiciones de

conservación durante 24 horas: *i*) exposición a la luz a 4.0 ± 0.5 °C; *ii*) protección de la luz (papel de aluminio) a 4.0 ± 0.5 °C; *iii*) exposición a la luz a temperatura ambiente (25.0 ± 0.5 °C); y, *iv*) protección de la luz (papel de aluminio) a temperatura ambiente. Como puede apreciarse en la figura 48, la luz y la temperatura afectan considerablemente a los valores de absorbancia a 481 nm. En este caso, se observa una disminución importante en la absorbancia cuando el principio activo es conservado a temperatura ambiente y expuesto a la luz ambiental, tanto a 4 °C como a 25 °C. Por ello, las disoluciones acuosas de fármaco estuvieron siempre protegidas de la luz mediante papel de aluminio, conservándose hasta su utilización en el frigorífico.

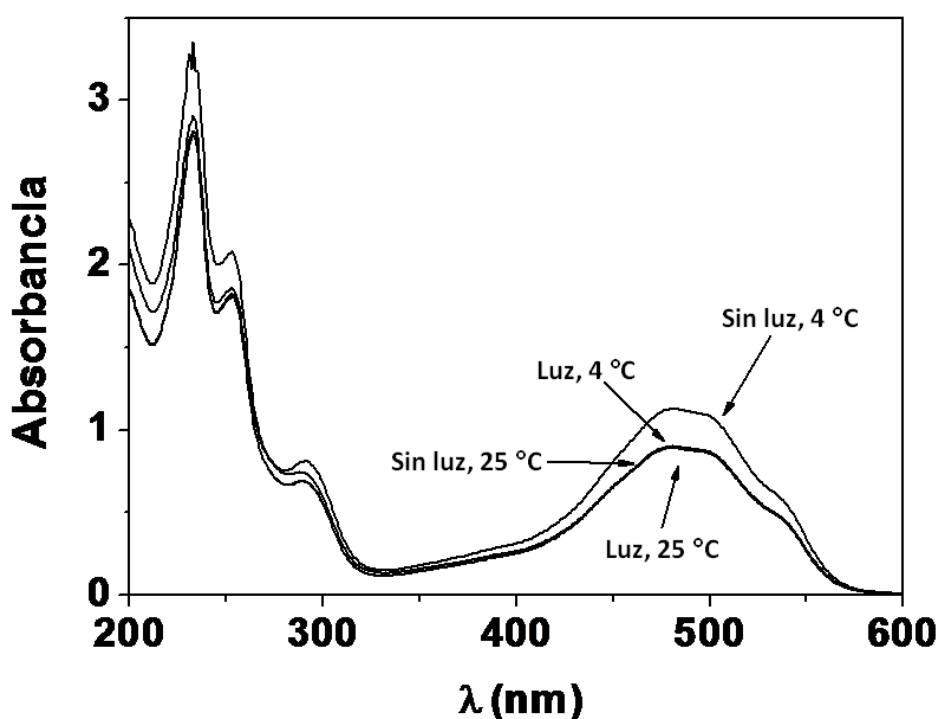


Figura 48. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones de doxorubicina (10^{-4} M) expuestas y protegidas de la luz, a diferentes temperaturas (4 y 25 °C).

Por otro lado, comprobamos si se producían diferencias significativas cuando fijamos en las disoluciones el pH natural (5.2) o el pH 7.4 (tampón NaOH-KH₂PO₄). Para ello, utilizamos las disoluciones con y sin tampón a la concentración de 10⁻⁴ M, obteniendo los resultados que se presentan en la figura 50. Como puede observarse, el contacto de las moléculas del fármaco con el tampón ocasiona una disminución de la absorptividad del fármaco. En cuanto al efecto que tiene el pH sobre la absorbancia óptica de las disoluciones, se prepararon disoluciones con concentraciones 10⁻⁵, 5·10⁻⁵ y 10⁻⁴ M de principio activo a pH natural (pH 5.2) o pH 7.4 con tampón NaOH-KH₂PO₄. El espectro UV-Vis se obtuvo tras 24 horas de conservación de las disoluciones a 4 °C, protegidas de la luz con papel de aluminio (figura 49). Los valores de absorbancia óptica a 481 nm decrecen claramente cuando el fármaco queda expuesto a un pH 7.4, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que bajo estas condiciones se favorece la transformación (degradación) del agente quimioterápico en la molécula cardiotoxica doxorrubinol.

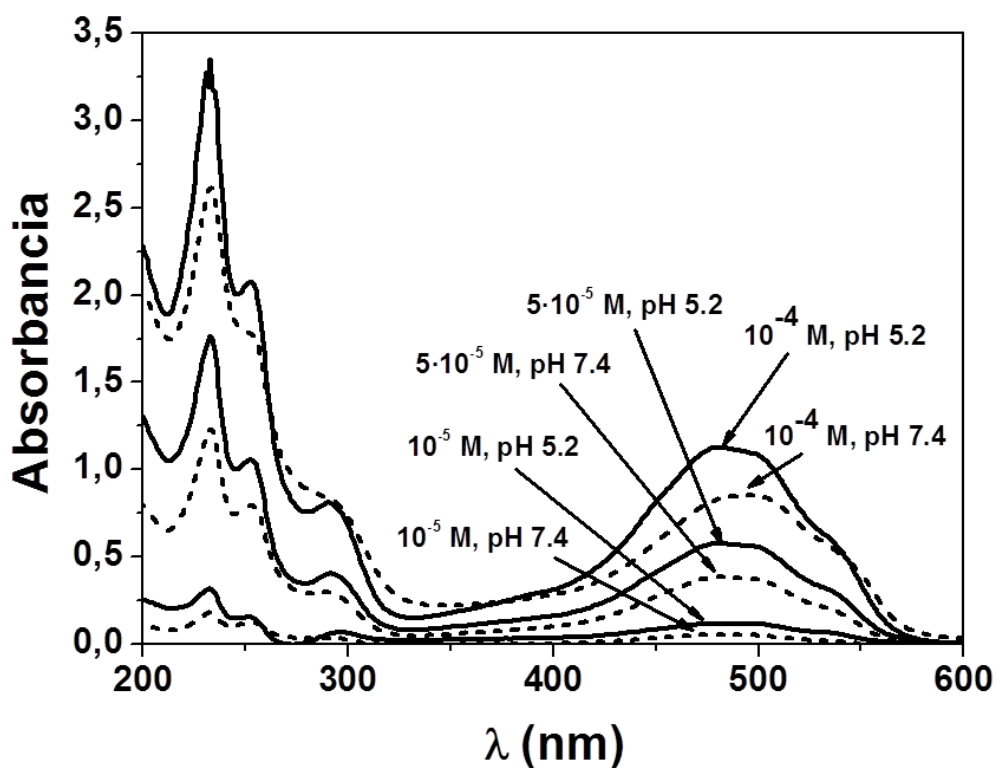


Figura 49. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones de doxorribicina (10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ y 10^{-4} M) preparadas utilizando agua bidestilada (pH natural 5.2, —) o tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH 7.4, - - -).

Estos cambios en la absorbancia UV-Vis a pH 7.4 nos hacen intuir que el coeficiente de absorptividad molar calculado a pH 5.2 no será válido en estas condiciones de medida. Por este motivo, y pensando en las medidas espectrofotométricas que realizaremos para caracterizar la liberación *in vitro* de este fármaco desde las nanoplataformas sintetizadas, preparamos una curva de calibrado con una batería de disoluciones acuosas de doxorribicina a pH 7.4. La figura 50a nos muestra la aparición de dos máximos por debajo de 600 nm. Se aprecia además cómo la absorción crece al incrementar la concentración de principio activo en el medio. El primero de ellos ($\lambda =$

482 nm) será el que utilizemos en las medidas espectrofotométricas de la liberación de fármaco. Por encima de $2 \cdot 10^{-4}$ M, los máximos tienden a fusionarse en uno (hecho que ocurre a 10^{-3} M) por lo que no se pueden realizar medidas a estas concentraciones ya que para un único valor de absorbancia, el rango de concentraciones posibles es muy variable. El coeficiente de absorción molar (ε) fue calculado mediante el ajuste de datos de absorbancia y concentración con el método de los mínimos cuadrados (figura 50b). El resultado obtenido fue $\varepsilon = 8100 \pm 120 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($r = 0.999$).

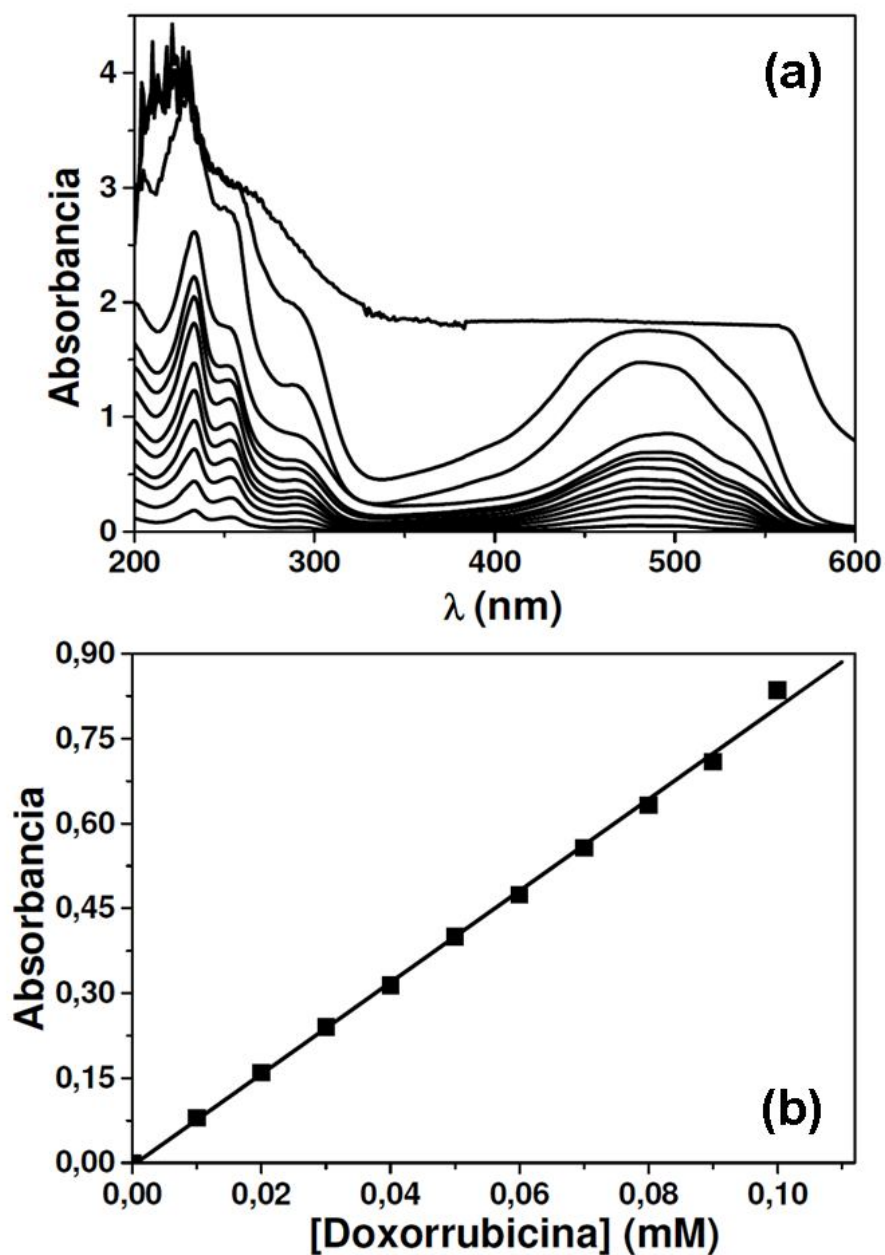


Figura 50. (a) Espectro de absorbancia UV-Vis de disoluciones de doxorubicina preparadas utilizando un tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH 7.4). Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$ y 10^{-3} M. (b) Determinación del coeficiente de absorvividad molar de las disoluciones de doxorubicina a pH 7.4 ± 0.1 (482 nm).

El estudio del efecto de la luz, la temperatura y el pH sobre la absorbancia UV-Vis de las disoluciones de 5-fluorouracilo siguió idéntica metodología que en el caso de la doxorubicina. Como puede apreciarse en la figura 51, la luz y la temperatura afectan levemente a los valores de absorbancia a 266 nm. En concreto, hay una mayor tendencia hacia valores menores cuando el principio activo se conserva a temperatura ambiente y expuesto a la luz ambiental. Por este motivo y, tal y como hemos indicado previamente, las disoluciones acuosas de este fármaco se mantuvieron siempre protegidas de la luz y a baja temperatura.

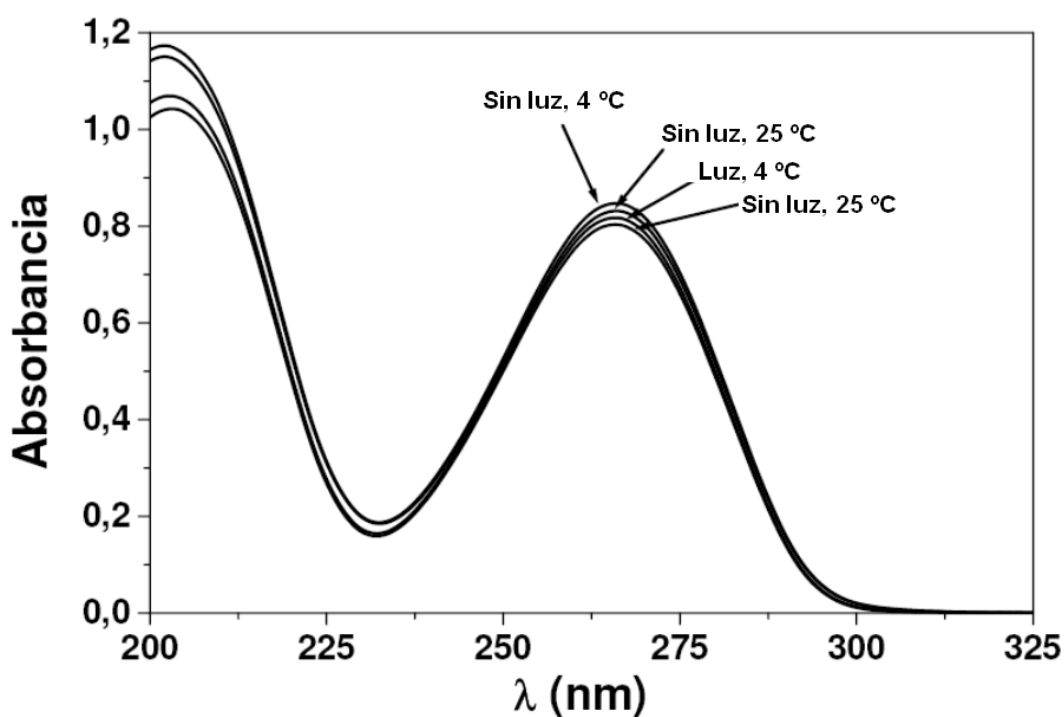


Figura 51. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones de 5-fluorouracilo (10^{-4} M) expuestas y protegidas de la luz, a diferentes temperaturas (4 y 25 °C).

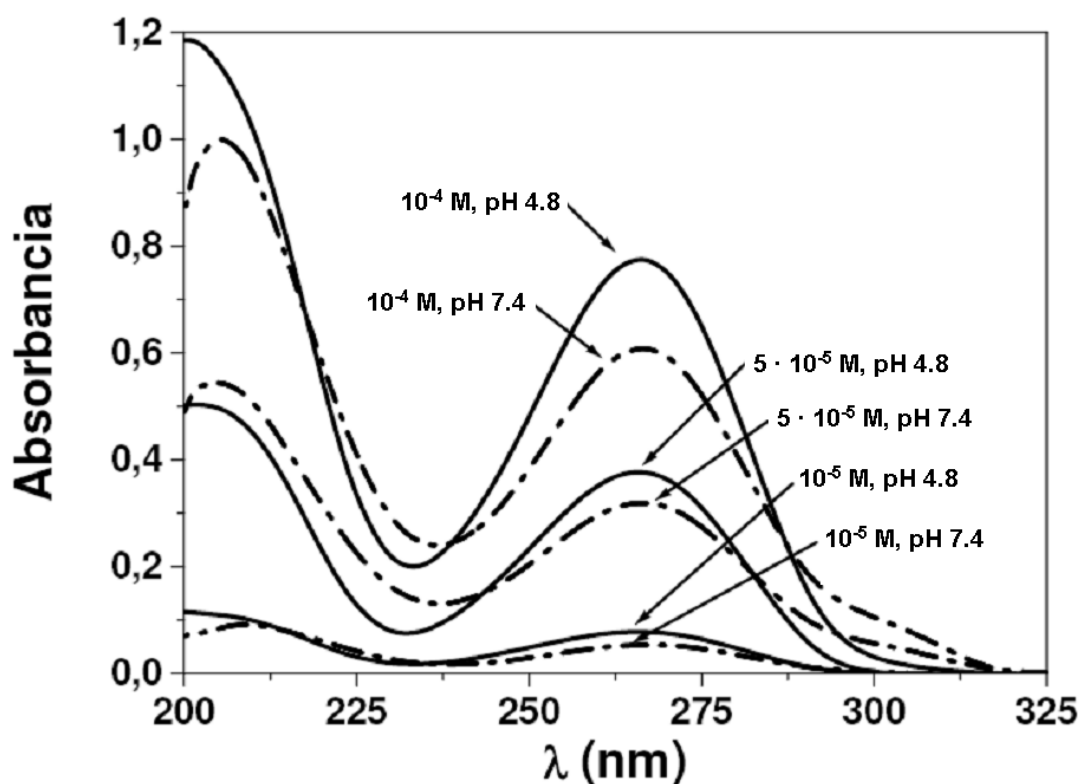


Figura 52. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones de 5-fluorouracilo (5-FU: 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$ y 10^{-4}) preparadas utilizando agua bidestilada (pH natural, 4,8) (—) o tampón NaOH- KH_2PO_4 (pH 7,4, ---).

En el caso del efecto del pH sobre la absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo (figura 52) existe una clara reducción en los valores de absorbancia a 266 nm cuando el fármaco se expone a un pH ligeramente básico [Arias y cols., 2005]. Esto es lógico si recordamos que bajo estas condiciones se encuentra favorecida la transformación (degradación) del agente antitumoral en las sustancias cardiotoxicas fluoroacetaldehído y ácido fluoromalonaldehídico [Bertolini y cols., 1999; Lemaire y cols., 1994]. Por ello, preparamos una curva de calibrado con una batería de disoluciones acuosas a pH 7,4. La figura 53a nos muestra la aparición de dos máximos

por debajo de 350 nm, cuya absorbancia crece al aumentar la concentración de principio activo en el medio. El primero de ellos ($\lambda = 266$ nm, como ocurre a pH 4.8) será el que utilizemos en la cuantificación de la liberación de fármaco desde los diferentes tipos de nanopartículas. Por encima de $2 \cdot 10^{-4}$ M, los máximos tienden a fusionarse en uno (lo que ocurre cuando la concentración es superior a 10^{-3} M), por lo que no pueden realizarse medidas por encima de esta concentración. En la figura 53b quedan recogidos los datos experimentales utilizados y la resta de ajuste obtenida en la determinación del coeficiente de absorptividad molar ($\epsilon = 5890 \pm 160 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $r = 0.997$).

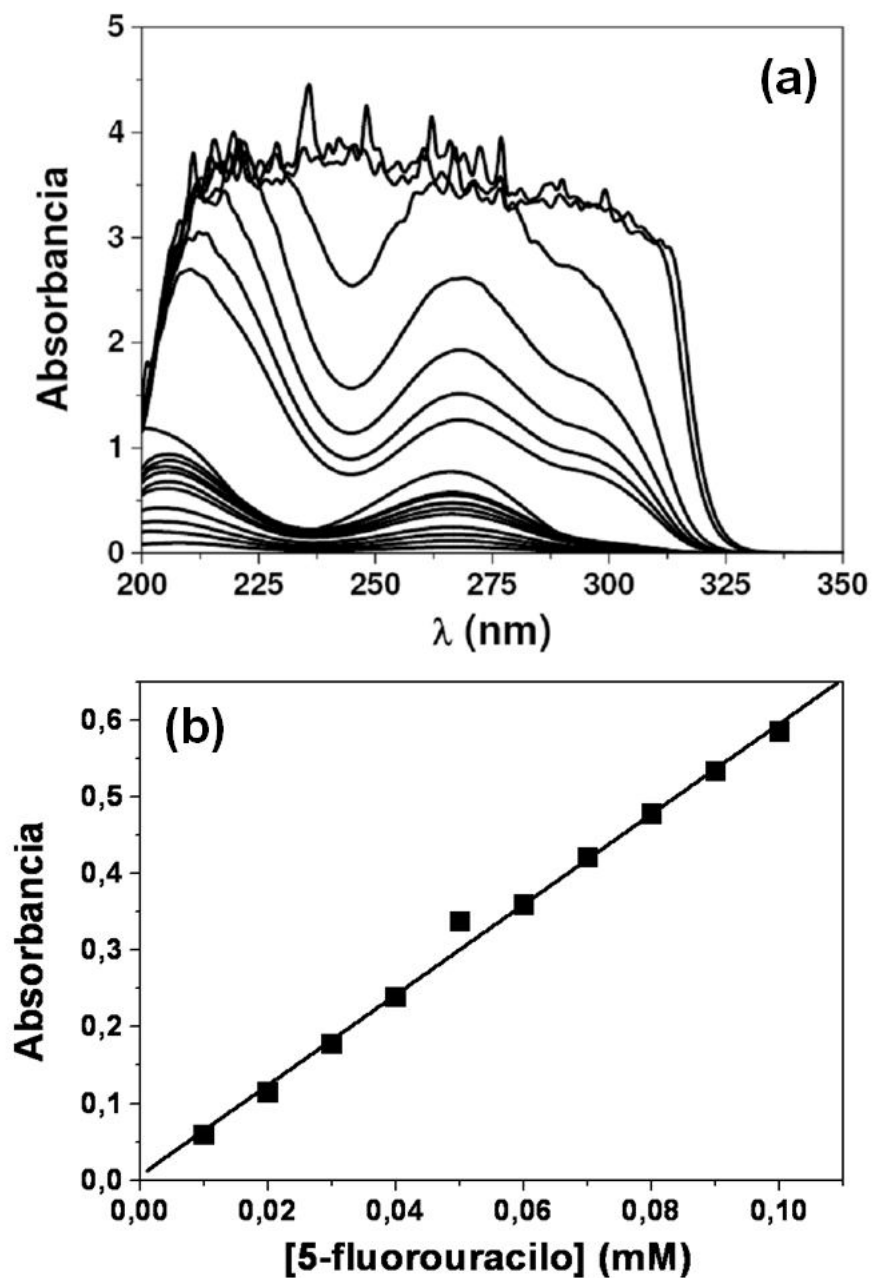


Figura 53. (a) Espectro de absorbancia UV-Vis de disoluciones de 5-fluorouracilo preparadas utilizando un tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH 7.4). Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2} . (b) Determinación del coeficiente de adsortividad molar de las disoluciones de 5-fluorouracilo a un pH 7.4 ± 0.1 y para la longitud de onda de máxima absorbancia (266 nm).

El mismo tipo de investigación (y bajo las mismas condiciones) se llevó a cabo en el caso del AINE diclofenaco sódico. El estudio del efecto de la temperatura y de la luz en la absorbancia UV-Vis de las disoluciones de este principio activo queda recogido en la figura 54. Parece claro que ni la luz, ni la temperatura ejercen un efecto significativo sobre los valores de absorbancia a 276 nm. En cualquier caso, las disoluciones acuosas de diclofenaco sódico también serán siempre protegidas de la luz (papel de aluminio) y se conservarán en el frigorífico hasta ser utilizadas.

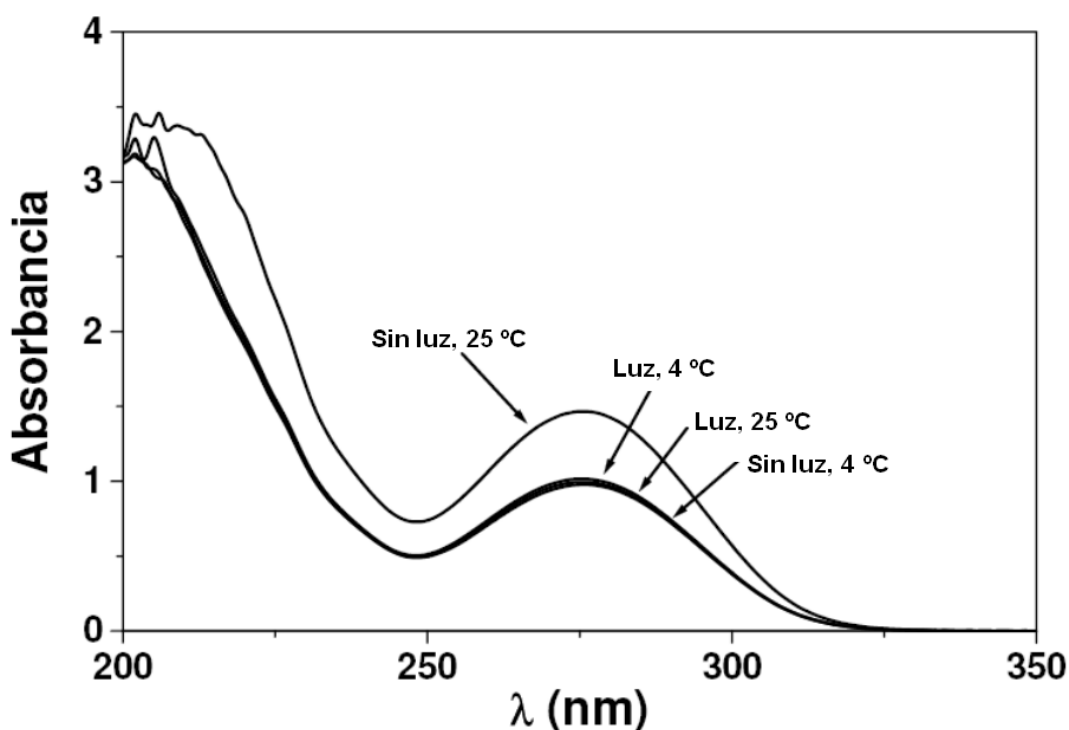


Figura 54. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones de diclofenaco sódico (10^{-4} M) expuestas y protegidas de la luz, a diferentes temperaturas (4 y 25 °C).

Un estudio similar realizado sobre las disoluciones acuosas de diclofenaco sódico, mostró que no hay diferencias significativas entre los espectros de absorbancia determinados a pH 7.4 y 6.4, como se observa en la figura 55. De hecho, el coeficiente

de absorptividad molar a pH 7.4 (figura 56) es muy similar al correspondiente a las disoluciones de diclofenaco sódico preparadas a pH natural 6.4. En concreto el valor calculado es $10610 \pm 140 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($r = 0.998$), comparable a $9540 \pm 170 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ obtenido en este último caso (figura 47).

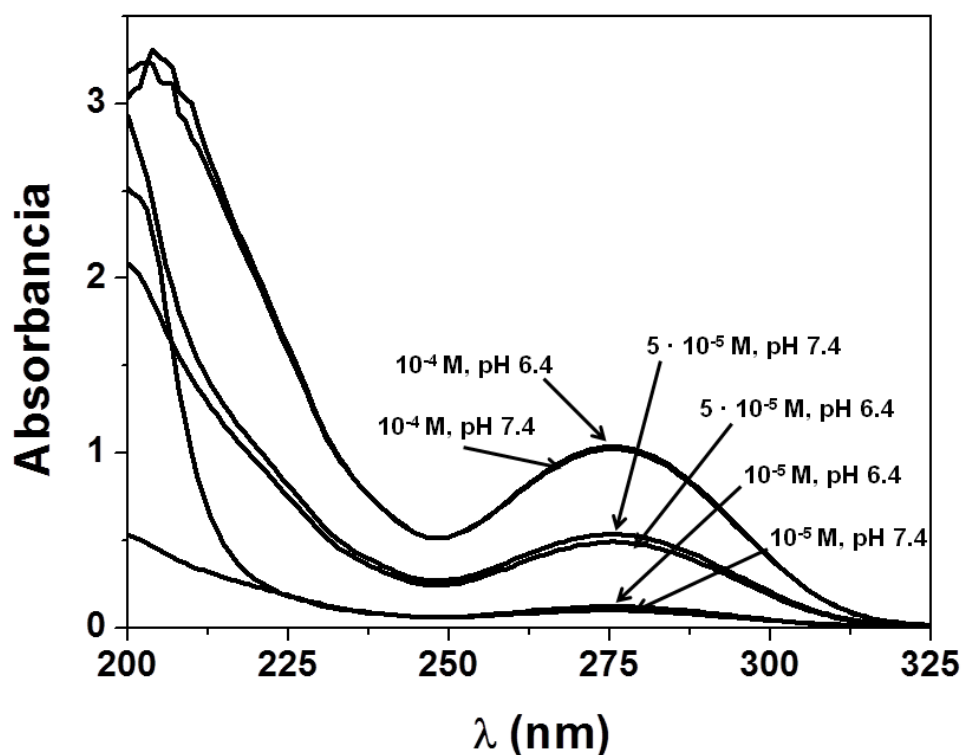


Figura 55. Espectro de absorptividad UV-Vis de las disoluciones acuosas de diclofenaco sódico ($5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y 10^{-4} M), obtenidas con agua bidestilada (pH natural 6.4, —) o con un tampón NaOH- KH_2PO_4 (pH 7.4, ---).

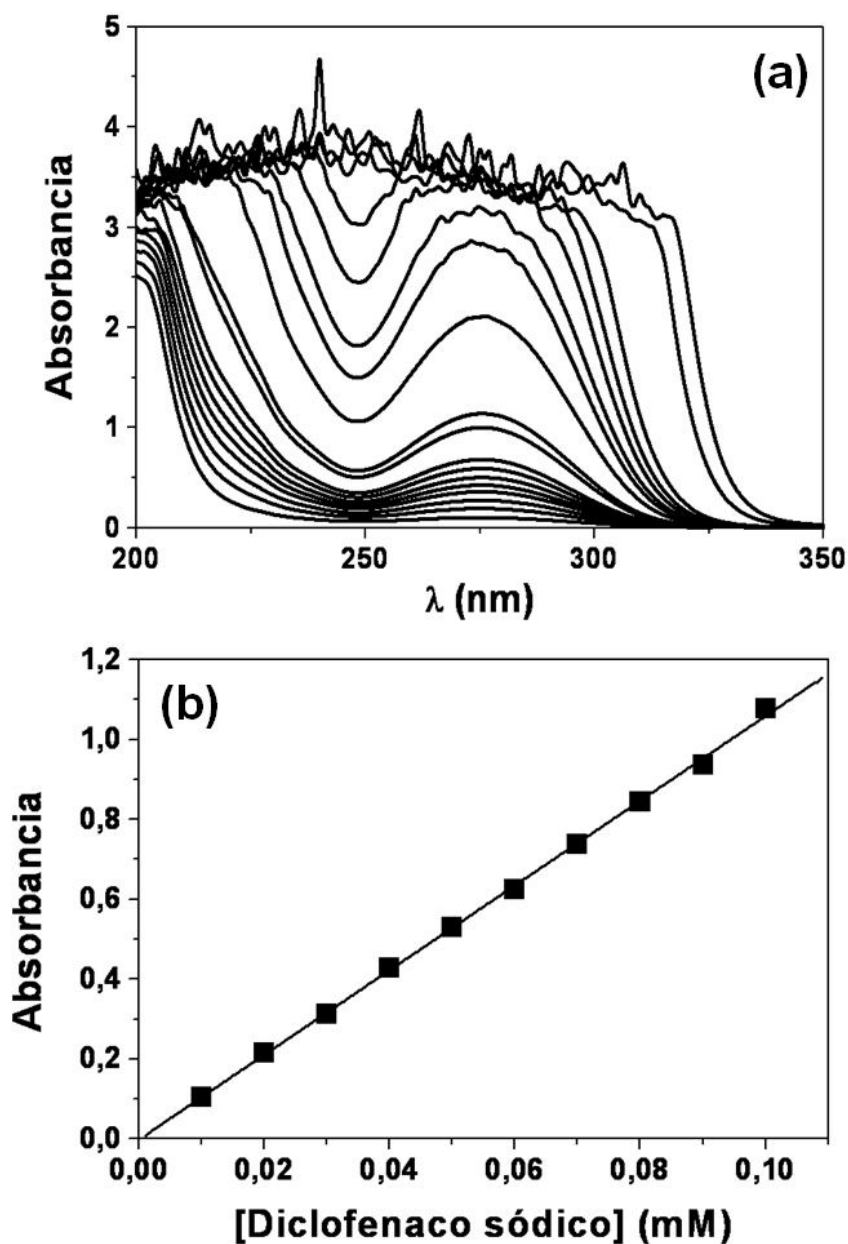


Figura 56. (a) Espectro de absorbancia UV-Vis de disoluciones del diclofenaco sódico obtenidas utilizando un tampón NaOH-KH₂PO₄ como medio de disolución (pH = 7.4). Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10⁻⁵, 2·10⁻⁵, 3·10⁻⁵, 4·10⁻⁵, 5·10⁻⁵, 6·10⁻⁵, 7·10⁻⁵, 8·10⁻⁵, 9·10⁻⁵, 10⁻⁴, 2·10⁻⁴, 3·10⁻⁴, 4·10⁻⁴, 5·10⁻⁴, 7·10⁻⁴, 10⁻³, 5·10⁻³ y 10⁻² M. (b) Determinación del coeficiente de adsortividad molar de las disoluciones del diclofenaco sódico a un pH 7.4 ± 0.1 y para a la longitud de onda de máxima absorbancia (276 nm).

7.2.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

El método espectrofotométrico UV-Vis que se utilizará para el análisis de la cantidad de fármaco vehiculizado o liberado por los coloides debe ser validado previamente para verificar su exactitud, precisión y linealidad. Con este objetivo se prepararon seis réplicas de disoluciones acuosas con concentraciones molares de fármaco entre 10^{-5} M y 10^{-3} M en el caso de la doxorubicina y entre 10^{-5} M y 10^{-2} M para los otros dos fármacos, a pH natural (doxorubicina: 5.2; 5-fluorouracilo: 4.8; diclofenaco sódico: 6.4) y a pH 7.4 (utilizado en los ensayos de liberación *in vitro*). Como siempre, hasta el momento de realizar la medida las disoluciones de fármaco se conservaron a 4 °C durante 24 horas y protegidas de la luz con papel de aluminio.

En la tabla 8 se recogen los valores de absorbancia de las disoluciones acuosas de doxorubicina en función de su concentración a pH natural. Se muestran los valores medios de absorbancia y las desviaciones estándar (D.E.) para cada una de las concentraciones, así como el coeficiente de variación (C.V.). Los pequeños valores de los coeficientes de variación (< 5 % en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. El ajuste lineal de la relación absorbancia (A) – concentración molar (C) [$A = (0.02 \pm 0.09) + (10450 \pm 150) \cdot C$] es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

| Concentración (M) | Absorbancia | C.V. (%) |
|---|---------------------|----------|
| 10^{-5} | 0.1093 ± 0.0019 | 1.74 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | 0.2180 ± 0.003 | 1.37 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | 0.3290 ± 0.007 | 2.02 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | 0.4346 ± 0.005 | 1.25 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | 0.5460 ± 0.023 | 4.20 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | 0.6560 ± 0.013 | 1.98 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | 0.7671 ± 0.023 | 3.01 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | 0.8602 ± 0.016 | 1.90 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | 0.9432 ± 0.023 | 2.40 |
| 10^{-4} | 1.0510 ± 0.01 | 0.95 |
| $2 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 1.0710 ± 0.022 | 2.05 |
| $3 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 1.0010 ± 0.03 | 2.99 |
| 10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$) | 1.1000 ± 0.041 | 3.70 |

Tabla 8. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones acuosas de doxorrubicina para cada una de las concentraciones indicadas a pH 5.2 (natural). El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

Para comprobar la exactitud del método analítico utilizamos los datos de absorbancia de las concentraciones de la tabla 8 (“concentración verdadera” en la tabla 9). Así se obtienen las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas como “estimadas” en la tabla 9. Como antes, los pequeños valores de los C.V. y sus errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico.

| Verdadera (M) | Estimada (M) | Error relativo (%) | C.V. (%) |
|---|------------------------------------|--------------------|----------|
| 10^{-5} | $(1.04 \pm 0.018) \times 10^{-5}$ | 4.30 | 1.74 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | $(2.09 \pm 0.030) \times 10^{-5}$ | 4.10 | 1.37 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | $(3.15 \pm 0.063) \times 10^{-5}$ | 4.64 | 2.02 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | $(4.16 \pm 0.052) \times 10^{-5}$ | 3.80 | 1.25 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $(5.23 \pm 0.220) \times 10^{-5}$ | 4.40 | 4.20 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | $(6.27 \pm 0.124) \times 10^{-5}$ | 4.30 | 1.98 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | $(7.34 \pm 0.221) \times 10^{-5}$ | 4.60 | 3.01 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | $(8.23 \pm 0.156) \times 10^{-5}$ | 2.80 | 1.90 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | $(9.02 \pm 0.22) \times 10^{-5}$ | 0.25 | 2.40 |
| 10^{-4} | $(1.005 \pm 0.009) \times 10^{-4}$ | 0.50 | 0.95 |
| $2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.024 \pm 0.021) \times 10^{-4}$ | 2.30 | 2.05 |
| $3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.58 \pm 0.300) \times 10^{-5}$ | 4.40 | 2.99 |
| $10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.05 \pm 0.040) \times 10^{-4}$ | 4.90 | 3.73 |

Tabla 9. Comparación de las concentraciones “verdaderas” de doxorrubicina en solución acuosa con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Los valores “estimados” son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado - actual)/estimado], también se muestran los C.V.

De igual forma (tabla 10) se procedió en el caso de doxorrubicina a pH 7.4 (tampón NaOH-KH₂PO₄). Los bajos valores de los coeficientes de variación (< 5 %, en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A) – concentración molar (C) [$A = -(0.0048 \pm 0.007) + (8096 \pm 118) \times C$] se confirma estadísticamente, con un error inferior al 0.01 %. Finalmente, se procedió de igual forma a la descrita para demostrar la exactitud del método analítico (tabla 11).

| Concentración (M) | Absorbancia | C.V. (%) |
|---|-------------------|----------|
| 10^{-5} | 0.079 ± 0.001 | 1.0 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | 0.159 ± 0.005 | 3.2 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | 0.240 ± 0.007 | 2.9 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | 0.314 ± 0.009 | 2.9 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | 0.400 ± 0.011 | 2.5 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | 0.474 ± 0.011 | 2.3 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | 0.557 ± 0.003 | 0.5 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | 0.632 ± 0.019 | 3.0 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | 0.709 ± 0.023 | 3.2 |
| 10^{-4} | 0.835 ± 0.012 | 1.4 |
| $2 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.827 ± 0.031 | 3.8 |
| $3 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.833 ± 0.023 | 2.8 |
| 10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.820 ± 0.017 | 2.1 |

Tabla 10. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones acuosas de doxorrubicina a pH 7.4 para cada una de las concentraciones indicadas. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

| Verdadera (M) | Estimada (M) | Error relativo (%) | C.V. (%) |
|---|-----------------------------------|--------------------|----------|
| 10^{-5} | $(9.83 \pm 0.10) \times 10^{-6}$ | 1.73 | 1.00 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | $(1.97 \pm 0.06) \times 10^{-5}$ | 1.52 | 0.03 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | $(2.97 \pm 0.09) \times 10^{-5}$ | 1.01 | 2.91 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | $(3.88 \pm 0.11) \times 10^{-5}$ | 3.09 | 2.87 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $(4.94 \pm 0.12) \times 10^{-5}$ | 1.21 | 2.50 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | $(5.85 \pm 0.14) \times 10^{-5}$ | 2.56 | 2.32 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | $(6.88 \pm 0.04) \times 10^{-5}$ | 1.70 | 0.54 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | $(7.81 \pm 0.23) \times 10^{-5}$ | 2.43 | 3.00 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | $(8.76 \pm 0.28) \times 10^{-5}$ | 2.74 | 3.20 |
| 10^{-4} | $(1.03 \pm 0.015) \times 10^{-4}$ | 3.01 | 1.44 |
| $2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.02 \pm 0.04) \times 10^{-4}$ | 2.10 | 3.75 |
| $3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.03 \pm 0.03) \times 10^{-4}$ | 2.72 | 2.76 |
| $10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.01 \pm 0.02) \times 10^{-4}$ | 1.28 | 2.07 |

Tabla 11. Comparación de las concentraciones “verdaderas” de doxorubicina a pH = 7.4 con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las medidas espectrofotométricas. Los valores “estimados” son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado – actual)/estimado], también se muestran los C.V.

Las tablas 12-19 permiten generalizar estas conclusiones al caso de los fármacos 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico. En ambos casos, las relaciones Absorbancia-Concentración son lineales con error menor del 0.1 %. Dichas relaciones son:

$$A = (0.004 \pm 0.005) + (7370 \pm 90) \cdot C \quad (5\text{-Fu, pH } 4.8)$$

$$A = (0.006 \pm 0.01) + (5890 \pm 160) \times C \quad (5\text{-Fu, pH } 7.4)$$

$$A = (-0.015 \pm 0.006) + (9540 \pm 170) \times C \quad (\text{Diclofenaco, pH } 6.4)$$

Capítulo 7. Capacidad de vehiculización de fármacos

$$A = (-0.002 \pm 0.01) + (10606 \pm 142) \times C \quad (\text{Diclofenaco, pH 7.4})$$

| Concentración (M) | Absorbancia | C.V. (%) |
|---|-------------------|----------|
| 10^{-5} | 0.076 ± 0.003 | 3.7 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | 0.146 ± 0.003 | 2.0 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | 0.215 ± 0.010 | 4.8 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | 0.292 ± 0.008 | 2.8 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | 0.373 ± 0.009 | 2.5 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | 0.429 ± 0.016 | 3.8 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | 0.507 ± 0.024 | 4.8 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | 0.580 ± 0.008 | 1.4 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | 0.653 ± 0.019 | 2.8 |
| 10^{-4} | 0.746 ± 0.035 | 4.7 |
| $2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 0.740 ± 0.009 | 1.26 |
| $3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 0.740 ± 0.013 | 1.75 |
| $4 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 0.758 ± 0.006 | 0.78 |
| $5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 0.721 ± 0.007 | 0.97 |
| $7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 0.729 ± 0.011 | 1.5 |
| $10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | 0.771 ± 0.018 | 2.3 |
| $5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | 0.762 ± 0.020 | 2.6 |
| $10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$ | 0.743 ± 0.012 | 1.68 |

Tabla 12. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo para cada una de las concentraciones indicadas a pH 4.8 (natural). El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

| Verdadera (M) | Estimada (M) | Error relativo (%) | C.V. (%) |
|---|----------------------------------|--------------------|----------|
| 10^{-5} | $(1.07 \pm 0.04) \times 10^{-5}$ | 3.10 | 3.6 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | $(1.98 \pm 0.04) \times 10^{-5}$ | 0.97 | 2.0 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | $(2.92 \pm 0.13) \times 10^{-5}$ | 2.74 | 4.6 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | $(3.95 \pm 0.11) \times 10^{-5}$ | 1.26 | 2.8 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $(5.06 \pm 0.13) \times 10^{-5}$ | 1.18 | 2.5 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | $(5.83 \pm 0.22) \times 10^{-5}$ | 2.91 | 3.7 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | $(6.88 \pm 0.32) \times 10^{-5}$ | 1.74 | 4.7 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | $(7.87 \pm 0.12) \times 10^{-5}$ | 1.65 | 1.5 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | $(8.86 \pm 0.26) \times 10^{-5}$ | 1.58 | 2.9 |
| 10^{-4} | $(1.01 \pm 0.47) \times 10^{-4}$ | 0.99 | 4.6 |
| $2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.00 \pm 0.01) \times 10^{-4}$ | 0.40 | 1.3 |
| $3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.00 \pm 0.02) \times 10^{-4}$ | 0.39 | 1.8 |
| $4 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.03 \pm 0.01) \times 10^{-4}$ | 2.70 | 0.8 |
| $5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.78 \pm 0.10) \times 10^{-5}$ | 2.25 | 1.0 |
| $7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.88 \pm 0.32) \times 10^{-5}$ | 1.12 | 1.5 |
| $10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.04 \pm 0.02) \times 10^{-4}$ | 4.30 | 2.3 |
| $5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.03 \pm 0.03) \times 10^{-4}$ | 3.20 | 2.6 |
| $10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.01 \pm 0.02) \times 10^{-4}$ | 1.69 | 0.8 |

Tabla 13. Comparación de las concentraciones “verdaderas” de 5-fluorouracilo en solución acuosa con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Los valores “estimados” son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado - actual)/estimado], también se muestran los C.V.

| Concentración (M) | Absorbancia | C.V. (%) |
|---|-------------------|----------|
| 10^{-5} | 0.060 ± 0.003 | 4.3 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | 0.114 ± 0.005 | 4.0 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | 0.177 ± 0.007 | 3.9 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | 0.238 ± 0.006 | 2.5 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | 0.310 ± 0.015 | 4.8 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | 0.360 ± 0.006 | 1.7 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | 0.420 ± 0.017 | 4.1 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | 0.477 ± 0.013 | 2.7 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | 0.532 ± 0.011 | 2.0 |
| 10^{-4} | 0.584 ± 0.020 | 3.4 |
| $2 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.610 ± 0.005 | 0.008 |
| $3 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.579 ± 0.015 | 2.5 |
| $4 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.568 ± 0.002 | 0.3 |
| $5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.589 ± 0.020 | 3.4 |
| $7 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.596 ± 0.009 | 1.5 |
| 10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.607 ± 0.013 | 2.1 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.563 ± 0.006 | 1.1 |
| 10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.572 ± 0.023 | 4.0 |

Tabla 14. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo a pH 7.4 para cada una de las concentraciones indicadas. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

| Verdadera (M) | Estimada (M) | Error relativo (%) | C.V. (%) |
|---|----------------------------------|--------------------|----------|
| 10^{-5} | $(1.00 \pm 0.04) \times 10^{-5}$ | 0.13 | 4.30 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | $(1.94 \pm 0.08) \times 10^{-5}$ | 3.10 | 3.97 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | $(3.01 \pm 0.12) \times 10^{-5}$ | 0.41 | 3.88 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | $(4.05 \pm 0.10) \times 10^{-5}$ | 0.17 | 2.50 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $(5.26 \pm 0.25) \times 10^{-5}$ | 4.06 | 4.80 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | $(6.09 \pm 0.10) \times 10^{-5}$ | 1.49 | 1.69 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | $(7.13 \pm 0.29) \times 10^{-5}$ | 1.83 | 3.19 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | $(8.10 \pm 0.22) \times 10^{-5}$ | 1.25 | 2.72 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | $(9.03 \pm 0.19) \times 10^{-5}$ | 0.39 | 2.06 |
| 10^{-4} | $(9.92 \pm 0.34) \times 10^{-5}$ | 0.81 | 3.42 |
| $2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.04 \pm 0.01) \times 10^{-4}$ | 3.40 | 0.82 |
| $3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.82 \pm 0.25) \times 10^{-5}$ | 1.80 | 2.60 |
| $4 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.65 \pm 0.03) \times 10^{-5}$ | 3.70 | 0.35 |
| $5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.00 \pm 0.03) \times 10^{-4}$ | 0.001 | 3.40 |
| $7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.01 \pm 0.01) \times 10^{-4}$ | 1.20 | 1.50 |
| $10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.03 \pm 0.02) \times 10^{-4}$ | 3.01 | 2.10 |
| $5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.56 \pm 0.10) \times 10^{-5}$ | 4.60 | 1.09 |
| $10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.71 \pm 0.40) \times 10^{-5}$ | 2.99 | 4.00 |

Tabla 15. Comparación de las concentraciones “verdaderas” de 5-fluorouracilo a pH = 7.4 con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las medidas espectrofotométricas. Los valores “estimados” son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado – actual)/estimado], también se muestran los C.V.

| Concentración (M) | Absorbancia | C.V. (%) |
|---|-------------------|----------|
| 10^{-5} | 0.100 ± 0.002 | 2.40 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | 0.183 ± 0.007 | 3.81 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | 0.291 ± 0.010 | 3.78 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | 0.376 ± 0.005 | 1.26 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | 0.501 ± 0.017 | 3.40 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | 0.580 ± 0.009 | 1.58 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | 0.659 ± 0.009 | 1.31 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | 0.740 ± 0.011 | 1.47 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | 0.882 ± 0.032 | 3.60 |
| 10^{-4} | 0.980 ± 0.023 | 2.35 |
| $2 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.945 ± 0.014 | 1.50 |
| $3 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.938 ± 0.020 | 2.10 |
| $4 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.953 ± 0.010 | 1.05 |
| $5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.948 ± 0.080 | 0.84 |
| $7 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.961 ± 0.013 | 1.30 |
| 10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.973 ± 0.02 | 2.00 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.992 ± 0.001 | 0.10 |
| 10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$) | 0.987 ± 0.034 | 3.40 |

Tabla 16. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones acuosas de diclofenaco sódico a pH 6.4 (natural) para cada una de las concentraciones indicadas. El C.V. se calculó mediante el cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

| Verdadera (M) | Estimada (M) | Error relativo (%) | C.V. (%) |
|---|------------------------------------|--------------------|----------|
| 10^{-5} | $(1.05 \pm 0.04) \times 10^{-5}$ | 4.60 | 3.40 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | $(1.92 \pm 0.07) \times 10^{-5}$ | 2.60 | 3.80 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | $(3.05 \pm 0.10) \times 10^{-5}$ | 1.64 | 3.40 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | $(3.94 \pm 0.05) \times 10^{-5}$ | 1.52 | 1.26 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $(5.26 \pm 0.18) \times 10^{-5}$ | 4.90 | 3.40 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | $(6.08 \pm 0.10) \times 10^{-5}$ | 1.31 | 1.50 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | $(6.91 \pm 0.09) \times 10^{-5}$ | 1.30 | 1.30 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | $(7.76 \pm 0.11) \times 10^{-5}$ | 3.09 | 1.47 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | $(9.24 \pm 0.33) \times 10^{-5}$ | 2.60 | 3.60 |
| 10^{-4} | $(1.03 \pm 0.02) \times 10^{-4}$ | 2.91 | 2.33 |
| $2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.91 \pm 0.15) \times 10^{-5}$ | 0.91 | 1.50 |
| $3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.84 \pm 0.21) \times 10^{-5}$ | 1.60 | 2.10 |
| $4 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.99 \pm 0.10) \times 10^{-5}$ | 0.10 | 1.05 |
| $5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.94 \pm 0.08) \times 10^{-5}$ | 0.60 | 0.84 |
| $7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.008 \pm 0.014) \times 10^{-4}$ | 0.79 | 1.40 |
| $10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.02 \pm 0.021) \times 10^{-4}$ | 1.96 | 2.00 |
| $5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.04 \pm 0.001) \times 10^{-4}$ | 3.80 | 0.10 |
| $10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.035 \pm 0.036) \times 10^{-4}$ | 3.40 | 3.40 |

Tabla 17. Comparación de las concentraciones “verdaderas” de diclofenaco sódico a pH 6.4 (natural) con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Los valores “estimados” son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado – actual)/estimado], también se muestran los C.V.

| Concentración (M) | Absorbancia | C.V. (%) |
|---|-------------------|----------|
| 10^{-5} | 0.103 ± 0.003 | 2.60 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | 0.215 ± 0.003 | 1.30 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | 0.312 ± 0.003 | 0.95 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | 0.428 ± 0.010 | 2.30 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | 0.531 ± 0.002 | 0.33 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | 0.624 ± 0.004 | 0.67 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | 0.738 ± 0.015 | 2.00 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | 0.845 ± 0.015 | 1.80 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | 0.936 ± 0.011 | 1.20 |
| 10^{-4} | 1.078 ± 0.041 | 3.70 |
| $2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 1.074 ± 0.009 | 0.84 |
| $3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 1.043 ± 0.018 | 1.70 |
| $4 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 1.098 ± 0.012 | 1.10 |
| $5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 1.034 ± 0.020 | 1.90 |
| $7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | 1.112 ± 0.005 | 0.45 |
| $10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | 1.068 ± 0.030 | 2.80 |
| $5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | 1.058 ± 0.040 | 3.80 |
| $10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$ | 1.103 ± 0.009 | 0.82 |

Tabla 18. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones de diclofenaco sódico a pH 7.4 para cada una de las concentraciones indicadas. El C.V. se calculó mediante el cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

| Verdadera (M) | Estimada (M) | Error relativo (%) | C.V. (%) |
|---|----------------------------------|--------------------|----------|
| 10^{-5} | $(9.79 \pm 0.25) \times 10^{-6}$ | 2.20 | 2.50 |
| $2 \cdot 10^{-5}$ | $(2.03 \pm 0.03) \times 10^{-5}$ | 1.30 | 1.50 |
| $3 \cdot 10^{-5}$ | $(2.94 \pm 0.03) \times 10^{-5}$ | 1.98 | 1.02 |
| $4 \cdot 10^{-5}$ | $(4.03 \pm 0.02) \times 10^{-5}$ | 0.88 | 0.50 |
| $5 \cdot 10^{-5}$ | $(5.01 \pm 0.02) \times 10^{-5}$ | 0.13 | 0.39 |
| $6 \cdot 10^{-5}$ | $(5.89 \pm 0.04) \times 10^{-5}$ | 1.90 | 0.68 |
| $7 \cdot 10^{-5}$ | $(6.96 \pm 0.14) \times 10^{-5}$ | 0.54 | 2.01 |
| $8 \cdot 10^{-5}$ | $(7.96 \pm 0.14) \times 10^{-5}$ | 0.45 | 1.76 |
| $9 \cdot 10^{-5}$ | $(8.82 \pm 0.10) \times 10^{-5}$ | 2.02 | 1.13 |
| 10^{-4} | $(1.02 \pm 0.03) \times 10^{-4}$ | 1.61 | 2.90 |
| $2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.01 \pm 0.01) \times 10^{-4}$ | 1.20 | 0.84 |
| $3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.83 \pm 0.17) \times 10^{-5}$ | 1.70 | 1.70 |
| $4 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.03 \pm 0.01) \times 10^{-4}$ | 3.40 | 1.10 |
| $5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.75 \pm 0.19) \times 10^{-5}$ | 2.50 | 1.90 |
| $7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.05 \pm 0.01) \times 10^{-4}$ | 4.60 | 0.45 |
| $10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.01 \pm 0.03) \times 10^{-4}$ | 0.69 | 2.80 |
| $5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(9.97 \pm 0.38) \times 10^{-5}$ | 0.24 | 3.80 |
| $10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$ | $(1.04 \pm 0.01) \times 10^{-4}$ | 3.80 | 0.81 |

Tabla 19. Comparación de las concentraciones “verdaderas” de diclofenaco sódico a pH 7.4 con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las medidas espectrofotométricas. Los valores “estimados” son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado – actual)/estimado], también se muestran los C.V.

Como conclusión, puede afirmarse que el método espectrofotométrico propuesto queda validado en todos los casos, pudiéndose usar los coeficientes de absorptividad calculados para evaluar la concentración de cualquiera de los fármacos en disoluciones cuya concentración se desconoce.

7.2.4. METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE FÁRMACO EN LAS NANOPARTÍCULAS

La determinación cuantitativa de la incorporación de los antineoplásicos doxorubicina y 5-fluorouracilo, y del AINE diclofenaco sódico en las nanoplataformas diseñadas se basa en la metodología establecida por otros autores para la cuantificación del fármaco vehiculizado y liberado por diferentes tipos de sistemas coloidales [Fawaz y cols., 1997; Müller y cols., 1991; Sullivan y Birkinshaw, 2004]. Esta metodología ha sido puesta a punto por nuestro grupo de investigación [Arias y cols., 2008a,b,c]. En concreto, la técnica se basa en la aplicación de la ley de Beer a un medio que contenga más de un tipo de sustancias absorbentes. Como es sabido, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por la suma de las absorbancias de cada una de las especies, siempre que no exista interacción entre éstas. De esta manera, se acepta la contribución de cada una de las sustancias presentes en el medio de dispersión/preparación de las nanopartículas (o de las sustancias que se han generado en el proceso de liberación de los principios activos) a la absorbancia total del sistema.

Respecto al proceso de vehiculización de la doxorubicina, el 5-fluorouracilo y del diclofenaco sódico, podemos citar como sustancias susceptibles de contribuir a esta absorción total los propios principios activos no incorporados por las nanopartículas, los residuos de la síntesis (y degradación) de estos nanomateriales y los restos de otros componentes del medio (p. ej., pluronic[®] F-68). Por lo tanto, puede estimarse la cantidad de fármaco que no ha sido incorporado por estos sistemas restando a la absorción total del sistema la correspondiente al resto de sustancias presentes (residuos de la síntesis de las nanopartículas y restos de otros componentes del medio). Por diferencia entre la concentración inicial y final de fármaco en el medio de contacto/síntesis determinaremos la cantidad total de fármaco vehiculizada por los sistemas transportadores [Arias y cols., 2008d, 2010c, 2011].

7.3. INCORPORACIÓN SUPERFICIAL DE LOS FÁRMACOS EN LAS PARTÍCULAS

Existen dos métodos generales para intentar la vehiculización de un fármaco determinado en sistemas coloidales [Arias y cols., 2010b]: su adición en el momento en el que se generan las nanopartículas, de forma que quede atrapado el principio activo principalmente en la matriz del coloide (método de absorción), o la adsorción superficial tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de principio activo. Es previsible que la mayor captación de fármaco se consiga mediante el método de absorción [Arias y cols., 2009b; Soppimath y cols., 2001].

El estudio de vehiculización superficial de la doxorrubicina, 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico en los nanomateriales diseñados se centró en la evaluación del grado de unión a la superficie como mecanismo coadyuvante en la captación del fármaco por el polímero y las nanopartículas Fe₃O₄/PCL. También determinaremos la adsorción en la superficie de los núcleos magnéticos con vistas a una posible aplicación en la incorporación de fármaco en las nanopartículas compuestas mediante absorción. Para ello, se realizarán determinaciones espectrofotométricas UV-Vis y, como se recoge más adelante, un estudio electroforético de los tres tipos de nanomateriales.

7.3.1 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

La determinación de la adsorción superficial de fármaco sobre las nanopartículas se realizó partiendo de una serie de disoluciones acuosas (10 mL) con diferente concentración molar de principio activo (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-2}), salvo en el caso de la doxorrubicina donde la concentración molar máxima utilizada fue 10^{-3} M. En todos estos medios de dispersión se fijó una concentración de nanopartículas del 1 % (p/v). Justo antes de añadirles se tomó una muestra del medio de dispersión para su posterior comparación. Tras 24 horas de contacto de las nanopartículas con el fármaco a $25\text{ °C} \pm 0.1\text{ °C}$ y bajo agitación mecánica (50 rpm), se separaron los sobrenadantes mediante

doble centrifugación a 11000 rpm durante 40 minutos, para así determinar sus correspondientes espectros de absorción UV-Vis. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones de fármaco. El cálculo de la adsorción superficial de fármaco en los tres tipos de nanopartículas se realizó mediante la comparación de la absorbancia de las muestras del medio (tomadas antes de añadir los coloides) con los sobrenadantes obtenidos tras una doble centrifugación de las suspensiones con fármaco, y una vez eliminada la contribución a la absorbancia total del sistema de los residuos o subproductos del experimento de adsorción [Arias y cols., 2010b]. La cantidad de fármaco incorporado en la superficie de las nanopartículas se expresa en términos de eficacia de atrapamiento (*entrapment efficiency, EE %*) [(fármaco vehiculizado (mg) / cantidad total de fármaco utilizado (mg)) x 100] y de carga de fármaco (*drug loading, DL %*) [(fármaco vehiculizado (mg) / masa total del sistema transportador (mg)) x 100] [Arias y cols., 2009b; Brigger y cols., 2004].

Los resultados de adsorción de doxorrubicina obtenidos en los tres tipos de nanopartículas muestran una considerable adsorción de este fármaco sobre la superficie polimérica (polímero puro y nanopartículas Fe₃O₄/PCL). Pensamos que esto puede ser debido a la existencia de una interacción atractiva de tipo electrostático entre el fármaco cargado positivamente y la superficie negativa del polímero. Por el contrario, debe existir una interacción electrostática de tipo repulsivo con la superficie también positiva de las nanopartículas de magnetita. En cualquier caso y, tal como es de esperar, la vehiculización de fármaco a nivel superficial resulta ser bastante baja (figura 57). En concreto, el valor máximo de *EE %* es $\approx 2.6 \%$, $\approx 29.79 \%$ y $\approx 29.35 \%$, en el caso de la Fe₃O₄, PCL y Fe₃O₄/PCL, respectivamente. Esta muy baja vehiculización queda mejor ejemplificada si tenemos en cuenta los valores de *DL %* conseguidos: $\approx 0.003 \%$, $\approx 1.63 \%$ y $\approx 1.6 \%$ en Fe₃O₄, PCL y Fe₃O₄/PCL, respectivamente. Desde un punto de vista termodinámico podría justificarse la muy baja incorporación superficial de este fármaco hidrófilo en la superficie hidrófoba de tipo polimérico, a pesar de la favorable interacción electrostática comentada. Por otro lado, la existencia de cierta adsorción de este fármaco hidrófilo en la superficie de los núcleos magnéticos (a pesar de la repulsión

electrostática comentada) puede explicarse si tenemos en cuenta el carácter hidrófilo de éstos últimos.

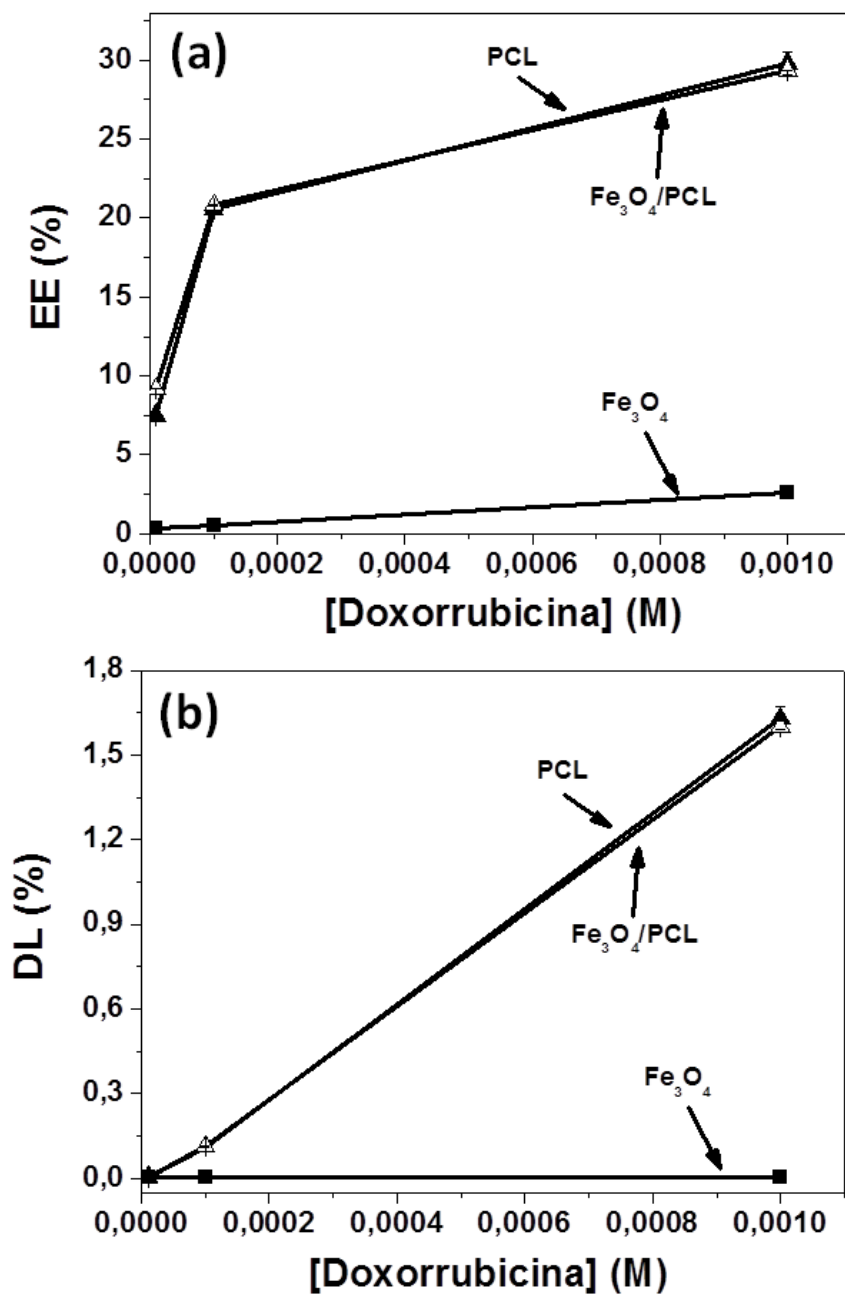


Figura 57. Valores de *EE* (%) (a) y (b) *DL* (%) de la doxorubicina en la superficie de las nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄, ■), poli(ε-caprolactona) (PCL, ▲) y magnetita/poli(ε-caprolactona) (Fe₃O₄/PCL, Δ) en función de la concentración molar de fármaco.

Los resultados son similares en el caso de 5-Fu (figura 58), los valores máximos de *EE* (%) ≈ 12.2 %, ≈ 17.3 % y ≈ 18.1 %, (para Fe_3O_4 , PCL y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, respectivamente) y de *DL* ≈ 1.62 %, ≈ 2.3 % y ≈ 2.4 %.

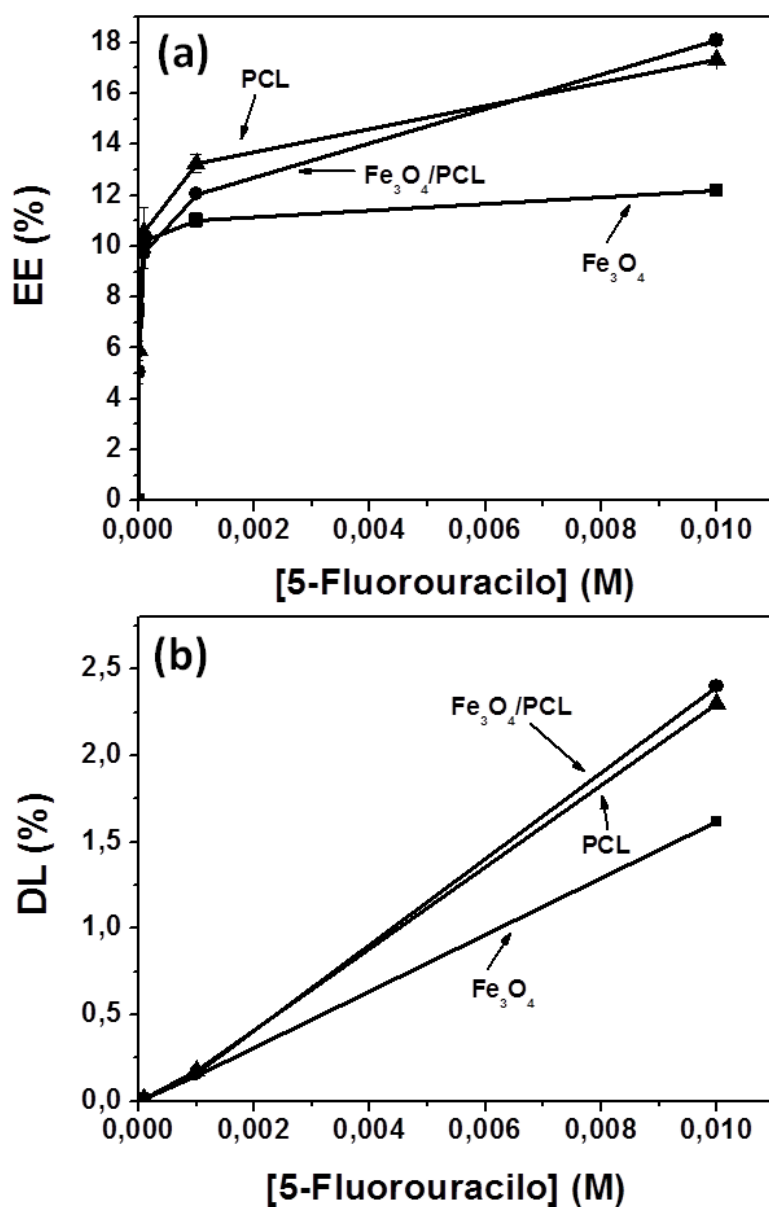


Figura 58. Valores de *EE* (%) (a) y (b) *DL* (%) del 5-fluorouracilo en la superficie de las nanopartículas de Fe_3O_4 (■), PCL (▲) y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (●) en función de la concentración molar de fármaco.

Un razonamiento similar justifica los resultados en adsorción superficial del diclofenaco sódico en los tres tipos de nanopartículas (figura 59). En concreto, los valores máximos de *EE* alcanzados son: 21.1 %, 10.1 % y 11.4% en el caso de Fe_3O_4 , PCL y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, respectivamente. Con respecto a los valores de *DL*, los valores máximos obtenidos fueron: 6.7 %, 3.3 % y 3.9 %, respectivamente. En este caso, la superficie de los núcleos magnéticos incorpora una mayor cantidad de AINE por dos motivos principales: *i*) una interacción electrostática de tipo atractivo entre la magnetita cargada positivamente y la molécula negativa de fármaco; y *ii*) una interacción termodinámica de tipo atractivo entre la magnetita hidrófilo y el fármaco hidrófobo. La casi nula vehiculización en las superficies de tipo polimérico se debe a la repulsión de tipo electrostático existente entre la matriz polimérica con carga negativa y el fármaco también cargado negativamente [Arias y cols., 2010b].

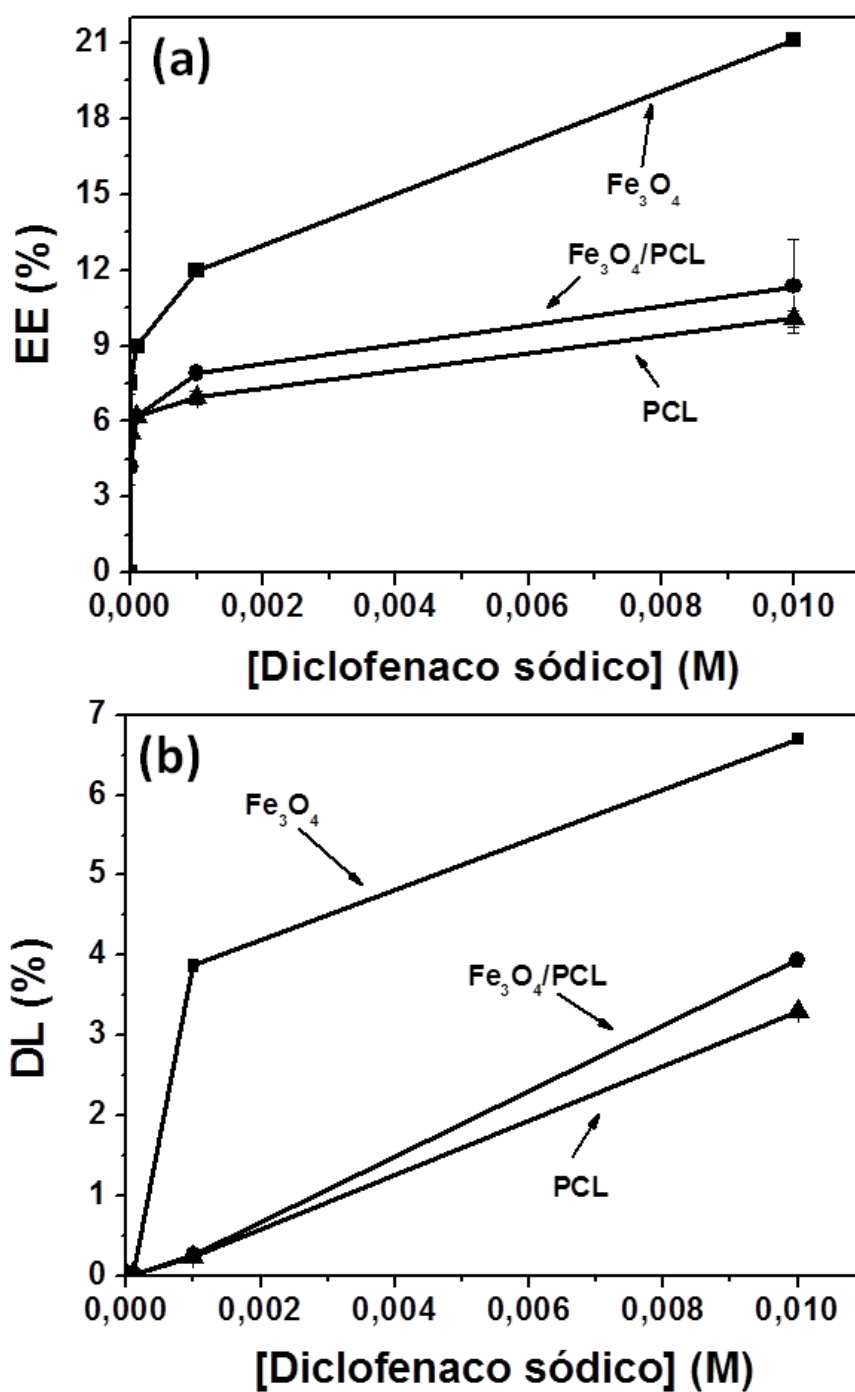


Figura 59. Valores de *EE* (%) (a) y (b) *DL* (%) del diclofenaco sódico en la superficie de las nanopartículas de Fe₃O₄ (■), PCL (▲) y Fe₃O₄/PCL (Δ) en función de la concentración molar de fármaco.

7.3.2. ANÁLISIS ELECTROCINÉTICO

Como prueba adicional de tipo cualitativo de la existencia de adsorción superficial de los tres fármacos, estudiamos cómo se ve modificada la movilidad electroforética (u_e) de cada una de las nanopartículas desarrolladas al ponerlas en contacto con los principio activo. La extrema sensibilidad de la técnica de electroforesis debe permitir la identificación de cambios en las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas que sean consecuencia de la adsorción de moléculas de fármaco.

La metodología experimental seguida es igual a la descrita en las anteriores determinaciones electroforéticas. Las suspensiones preparadas (25 mL) tenían una concentración de nanopartículas ≈ 0.1 % (p/v). Se prepararon, cuando fue posible, dos series de suspensiones para cada uno de los tipos de nanopartículas con el objetivo de descartar la influencia de los iones presentes en la disolución en la u_e de los coloides. En concreto, una serie de suspensiones tenía una fuerza iónica de KNO_3 10^{-3} M, mientras que la otra consistía simplemente en agua bidestilada como medio de dispersión (excepto en el caso de la doxorubicina, donde solo se realizó esta última). Cada suspensión contenía una determinada concentración molar de fármaco (10^{-5} a 10^{-2}). Las medidas se realizaron tras 24 horas de conservación de las suspensiones a 25.0 ± 0.5 °C, protegidas de la luz ambiental (con papel de aluminio) y bajo agitación constante (50 rpm), comprobando previamente el pH. Los datos presentados son el promedio de doce determinaciones, cambiando la muestra cada tres.

La figura 60 muestra la evolución de u_e con la concentración molar de doxorubicina para los tres tipos de nanopartículas desarrolladas. En el caso del polímero puro y de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, se observa una tendencia general de la u_e a aumentar (hacia valores positivos que se alcanzan para concentraciones 0.1 y 0.05 mM, respectivamente) al incrementar la concentración de este fármaco antitumoral en el medio. Las especies positivas adsorbidas en la superficie con carga negativa pueden provenir de la protonización de algún grupo de la molécula de fármaco, quizá el

-NH. La adsorción sobre las partículas de magnetita no recubierta es, sin embargo, poco o nada observable, predominando probablemente la repulsión electrostática a pH natural.

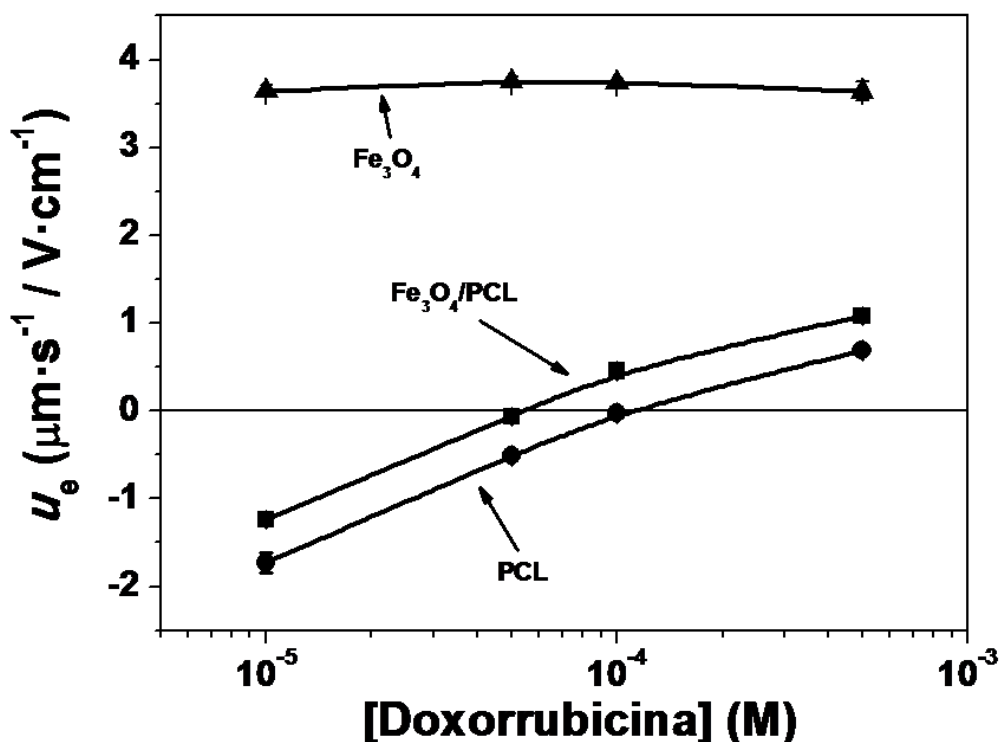


Figura 60. Movilidad electroforética (u_e) de las nanopartículas de Fe_3O_4 (\blacksquare), PCL (\bullet) y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (\blacktriangle) en función de la concentración molar de doxorubicina.

La figura 61 muestra la evolución de los valores de u_e con la concentración molar de 5-fluorouracilo para los tres tipos de coloides, en presencia y en ausencia de electrolito (10^{-3} M KNO_3 en su caso). En el caso del polímero puro y de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, se observa una tendencia general de la u_e a aumentar levemente (sin evidencia de inversión de carga en este caso) al aumentar la concentración de fármaco en el medio. Hay, además un claro efecto de la presencia de KNO_3 : la presencia del electrolito (KNO_3) produce la compresión de la doble capa, con

la consiguiente reducción de u_e . La adsorción debe ser en todo caso pequeña, como demuestra el hecho, ya mencionado, incluso para las mayores concentraciones de 5-fluorouracilo utilizadas, no se observa cambio de signo en los valores de u_e del polímero o de las nanopartículas compuestas.

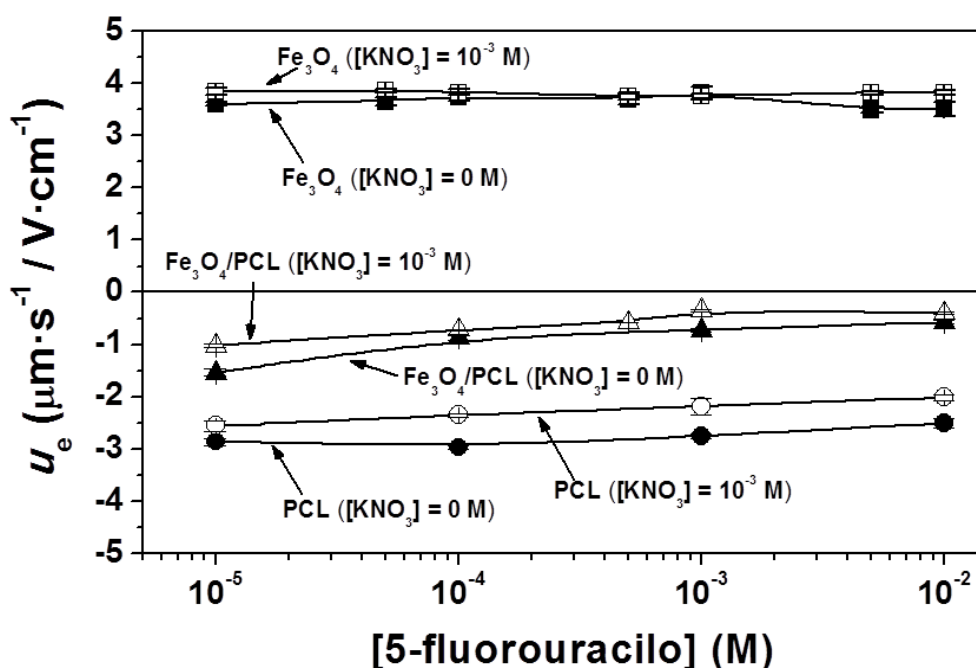


Figura 61. Movilidad electroforética (u_e) de las nanopartículas de Fe_3O_4 (\blacksquare , \square), PCL (\bullet , \circ) y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (\blacktriangle , \triangle) en función de la concentración molar de 5-fluorouracilo, en presencia (símbolo abierto) o en ausencia (símbolos cerrados) de 10^{-3} M KNO_3 .

De igual forma se procedió con las suspensiones acuosas de diclofenaco sódico. La figura 62 muestra la evolución de u_e con la concentración de fármaco para los tres tipos de nanopartículas, en presencia y en ausencia de electrolito añadido (10^{-3} M KNO_3 en su caso). El efecto más significativo se observa en el comportamiento electroforético de los núcleos de óxido de hierro: la movilidad originalmente positiva cambia drásticamente a

negativa cuando la concentración de fármaco se encuentra por encima de 10^{-3} M, como consecuencia de la adsorción de este principio activo con carga eléctrica negativa.

Las variaciones de u_e observadas en el caso de las nanopartículas de PCL y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ son claramente menos importantes. Esto hace pensar en una menor adsorción del principio activo en estas superficies. En las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ existe una cierta tendencia a valores de u_e más negativos cuando el medio contiene una muy alta concentración de fármaco. Esto posiblemente es consecuencia de la acumulación de especies negativas de principio activo en torno a su superficie. En el caso del polímero puro, la adsorción de las especies negativas se ve parcialmente compensada por la compresión de la doble capa o la adsorción de cationes Na^+ [Arias y cols., 2008e], de modo que a concentración elevada de diclofenaco sódico la movilidad disminuye a valor absoluto. En general, las partículas de polímero puro no parecen ser vehículo adecuado para el diclofenaco.

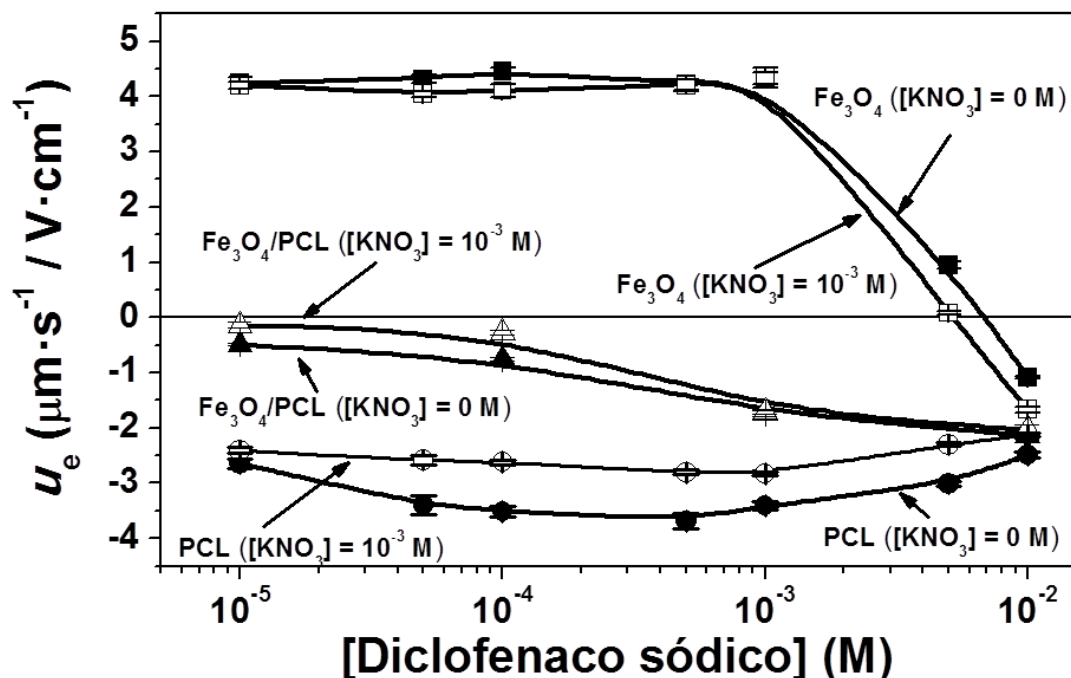


Figura 62. Movilidad electroforética (u_e) de las nanopartículas de Fe_3O_4 (\bullet , \circ), PCL (\blacksquare , \square) y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (\blacktriangle , \triangle) en función de la concentración molar de diclofenaco sódico, en presencia (símbolo abierto) o en ausencia (símbolos cerrados) de 10^{-3} M KNO_3 .

7.4. INCORPORACIÓN MATRICIAL DE FÁRMACO

Una vez confirmada la escasa o moderada adsorción de los tres fármacos estudiados en la superficie de nuestros tres tipos de nanomateriales, nos centraremos en el estudio de la contribución del, a priori, principal método de vectorización de fármacos en sistemas transportadores: la incorporación del principio activo en el momento en que se produce la formación de la nanoplateforma. Para ello, analizaremos el efecto del

principal factor que influencia la captación de principio activo en la matriz de las nanopartículas: la propia concentración de fármaco. De esta manera, pretendemos definir las condiciones de vehiculización óptimas que permiten la incorporación máxima de estos principios activos en el sistema transportador magnético coloidal que proponemos. El análisis de la influencia de la concentración de nuestros principios activos sobre su incorporación en la matriz polimérica se realizó siguiendo la rutina de síntesis y el procedimiento de determinación espectrofotométrica ya descritos y justificados. Para ello, la única variable que se introdujo en la metodología de síntesis de las nanopartículas de PCL y de Fe₃O₄/PCL fue la concentración de fármaco. Las concentraciones molares utilizadas en el caso de la doxorubicina fueron 10⁻⁵, 10⁻⁴ y 10⁻³, mientras que en el caso del 5-fluorouracilo y del diclofenaco sódico se utilizó además 10⁻² M. Para favorecer la incorporación de los fármacos en al interfase Fe₃O₄-PCL y así lograr una mayor vehiculización, se dejaron en contacto durante 24 horas (25.0 ± 0.5 °C y 50 rpm) los núcleos de óxido de hierro con las moléculas de fármaco antes de llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas Fe₃O₄/PCL. Los experimentos se repitieron por triplicado para cada una de las concentraciones molares de fármaco. La determinación de la absorción de fármaco en la matriz de las nanopartículas se realizó mediante la comparación de la absorbancia de las muestras del medio (tomadas antes de llevar a cabo la síntesis) con los sobrenadantes obtenidos tras una doble centrifugación de las suspensiones de nanopartículas formuladas, y una vez eliminada la contribución a la absorbancia total del sistema de los residuos o subproductos del experimento de adsorción [Arias y cols., 2010b]. De nuevo, la cantidad de fármaco incorporado en la matriz de las nanopartículas se ha expresado en términos de *EE* y *DL* (%) [Arias y cols., 2009b; Brigger y cols., 2004].

La cantidad de doxorubicina, 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico absorbidos por las nanopartículas de PCL y por las nanopartículas compuestas Fe₃O₄/PCL se recogen en las figuras 63, 64 y 65, respectivamente. Como puede apreciarse, la absorción aumenta con la concentración de fármaco presente en el medio de síntesis, sugiriéndose un efecto positivo del aumento de dicha concentración sobre la eficacia de la

vehiculización en todos los casos. Este efecto aparece ampliamente descrito en la bibliografía sobre el desarrollo de sistemas coloidales para el transporte de fármacos [Ubrich y Šubr, 2004; Arias y cols., 2008a,b,c, 2011b].

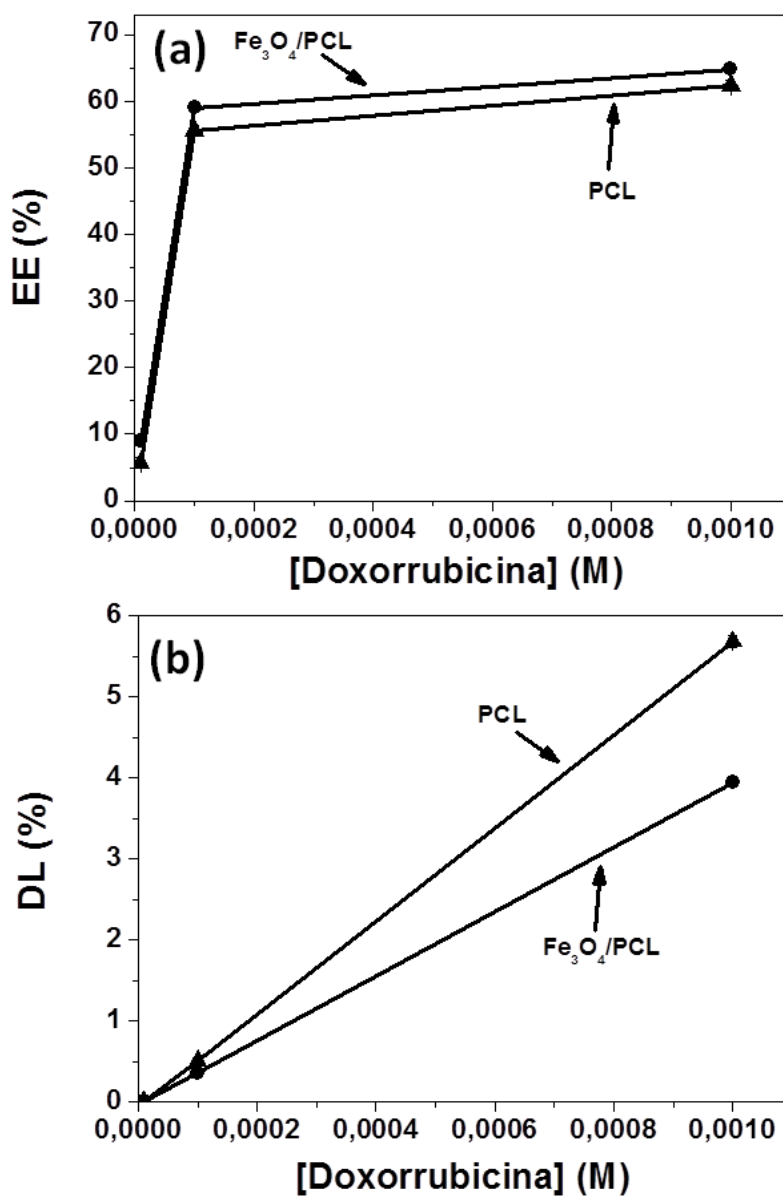


Figura 63. Valores de *EE* (%) (a) y (b) *DL* (%) de la doxorubicina en la matriz polimérica de las nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL, ▲) y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) (Fe₃O₄/PCL, ●) en función de la concentración molar de fármaco.

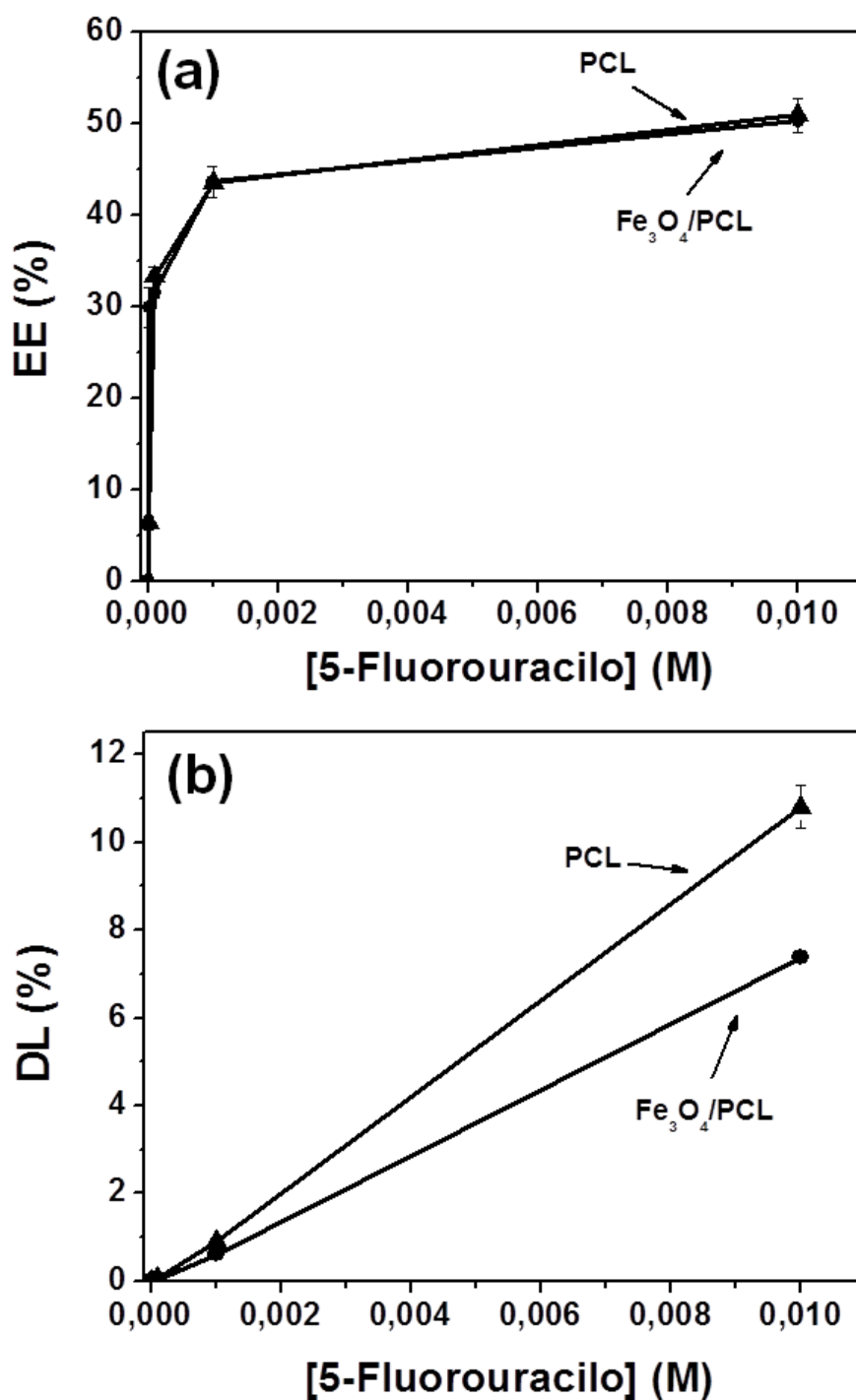


Figura 64. Valores de *EE* (%) (a) y (b) *DL* (%) del 5-fluorouracilo en la matriz polimérica de las nanopartículas de PCL (▲) y Fe₃O₄/PCL (●) en función de la concentración molar de fármaco.

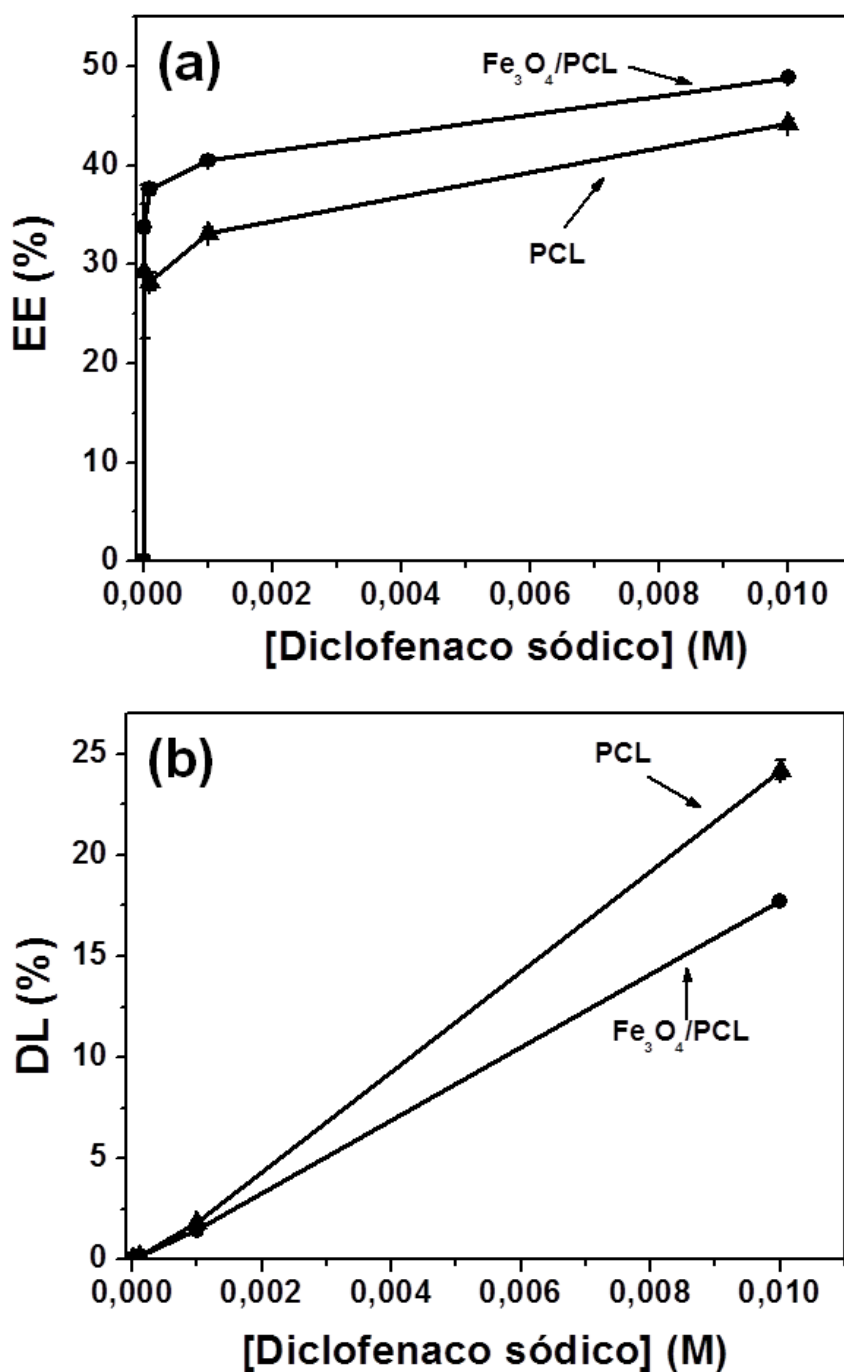


Figura 65. Valores de *EE* (%) (a) y (b) *DL* del diclofenaco sódico en la matriz polimérica de las nanopartículas de PCL (▲) y Fe₃O₄/PCL (●) en función de la concentración molar de fármaco.

Los valores obtenidos para la incorporación mediante absorción de los fármacos estudiados son claramente superiores a los alcanzados mediante el procedimiento de adsorción en superficie, lo que justifica la selección de este método de vehiculización para la síntesis de las nanopartículas compuestas. Por ejemplo, para la máxima concentración de fármaco utilizada, el valor máximo de *EE* (%) alcanzado en las nanopartículas Fe₃O₄/PCL en el caso de la doxorubicina pasa de ≈ 29.4 % mediante el método de adsorción (figura 57) a ≈ 64.8 % mediante el método de absorción. En el caso de 5-fluorouracilo, los valores son de ≈ 18.1 % (figura 58) ≈ 50.2 %. Finalmente, la incorporación superficial de diclofenaco sódico se encuentra ≈ 11.4 % (figura 59) y pasa a unos valores ≈ 48.9 % mediante el método de absorción en matriz. La vehiculización de los tres fármacos en las nanopartículas de PCL es superior siempre a la obtenida en las nanopartículas de Fe₃O₄/PCL. Sin embargo, la capacidad de respuesta a campos magnéticos aplicados que exhiben las nanopartículas compuestas debe asegurar la llegada de la dosis administrada al lugar de acción, proceso menos controlable en el caso de las nanopartículas de PCL.

Al comparar los fármacos entre sí se aprecian valores superiores de vehiculización para la doxorubicina, debido a la atracción electrostática entre el fármaco cargado positivamente y el polímero cargado negativamente. La misma carga positiva de 5-Fu explica su menor absorción, y argumentos similares se pueden usar en el caso del diclofenaco. En este, la vehiculización es mucho menor, ya que se produce interacción electrostática repulsiva entre el fármaco cargado negativamente y el polímero con carga igualmente negativa.

7.5. LIBERACION DE FÁRMACO

En los apartados anteriores se han descrito las condiciones óptimas de vehiculización de los fármacos antineoplásicos y del AINE en las nanopartículas de PCL y en las partículas compuestas. El siguiente paso en este trabajo de investigación es

utilizar las condiciones que permiten una mayor carga de fármaco para preparar las nanopartículas de magnetita (adsorción superficial), PCL y compuestas (estas dos últimas mediante adsorción y absorción) que se utilizarán en los ensayos de liberación *in vitro*. Tales condiciones fueron siempre y según el caso: 10^{-3} M de doxorubicina, y 10^{-2} M para 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico.

El ensayo de liberación *in vitro* de fármaco se realizó por triplicado a 37.0 ± 0.5 °C. Para ello, se utilizó el método de diálisis y un tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4 ± 0.1) como medio de liberación. Las bolsas de diálisis se dejaron sumergidas en agua bidestilada 12 horas antes de comenzar el ensayo. La bolsa de diálisis (Spectrum® Spectra/Por® 6, EE.UU.) tienen un tamaño de poro de 2000 Da y es capaz de retener las nanopartículas en su interior, dejando sólo pasar a su través el fármaco liberado hasta el medio de liberación. Brevemente, las suspensiones de las partículas con fármaco vehiculizado se centrifugaron a 11000 rpm durante 25 minutos, para así eliminar el principio activo no incorporado. Se introdujo 1 mL de suspensión de nanopartículas (concentración de fármacos: 25 mg/mL) en las bolsas de diálisis, cerrando los extremos de la misma con pinzas. A continuación, se sumergieron las bolsas en un vaso con 100 mL de tampón NaOH-KH₂PO₄ en el caso de la doxorubicina y con 200 mL de tampón NaOH-KH₂PO₄ en el caso de 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico. La temperatura de 37.0 ± 0.5 °C y la agitación mecánica (300 rpm) de las bolsas se mantuvieron constante durante todo el ensayo. Las muestras tomadas del medio (1 mL) se recogieron a intervalos de tiempo prefijado (nanopartículas con fármaco incorporado mediante adsorción: 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas; nanopartículas con fármaco incorporados mediante absorción: 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 24 horas, y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 días) y se analizaron mediante la metodología UV-Vis ya descrita y en la longitud de onda de máxima absorbancia correspondiente. Un volumen igual de solución tampón, (mantenido a la misma temperatura), fue añadido al medio de liberación tras cada toma de muestra con el objetivo de mantener las condiciones *sink*. El mismo procedimiento analítico utilizado

en la determinación de la vehiculización de fármaco, fue seguido en los ensayos de liberación *in vitro* de los fármacos.

La figura 66a recoge los valores de liberación de doxorubicina (vehiculizada a nivel superficial) desde las nanopartículas sintetizadas. Parece claro que la liberación en el caso del polímero puro y de las nanopartículas compuestas Fe₃O₄/PCL, se produce de manera más lenta (es total tras 4 horas) en comparación con las nanopartículas de Fe₃O₄ (completa tras solo 1 hora). Este hecho puede justificarse teniendo en cuenta que existe una interacción superficial desfavorable entre las moléculas de fármaco cargadas positivamente y la superficie, también de carga positiva, de las nanopartículas de magnetita. Aún así, podemos considerar que el proceso es muy rápido en todos los casos y no adecuado para fines terapéuticos, ya que la dosis vehiculizada quedaría libre del sistema transportador antes de llegar al lugar de acción (extensa biodistribución).

Sin embargo, la liberación de la doxorubicina cuando se incorpora en la matriz de las nanopartículas es mucho más sostenida en el tiempo (figura 66b). Tanto en las nanopartículas de polímero como en las compuestas, el proceso puede considerarse bifásico. En primer lugar, una fase de liberación rápida que probablemente significa la pérdida del fármaco asociado a la superficie o débilmente atrapado (tras 1 hora el 22 % de la doxorubicina vehiculizada se libera desde las nanopartículas de PCL, mientras que en el caso de las nanopartículas compuestas es el 17 %). Sin embargo, la liberación de doxorubicina se hace más lenta durante la segunda fase del proceso. En esta última etapa de liberación, el mecanismo responsable podría ser la degradación de la cubierta polimérica (véase el apartado 4.6.) y/o la difusión de este fármaco a través de la matriz polimérica. En ambos tipos de nanopartículas la liberación de doxorubicina es completa tras 10 días. Finalmente se puede apreciar una velocidad de liberación ligeramente más lenta en el caso de las nanopartículas compuestas. Este fenómeno puede explicarse si recordamos que parte del principio activo debe encontrarse adsorbido en la superficie de los núcleos de óxido de hierro cuando precipita el recubrimiento polimérico sobre éstos (véase el apartado 7.4.). Así, la cantidad de moléculas de

fármaco localizada en la interfase Fe_3O_4 -PCL debe difundir a través de toda la matriz polimérica para poder salir al exterior, lo que ralentiza la velocidad de liberación.

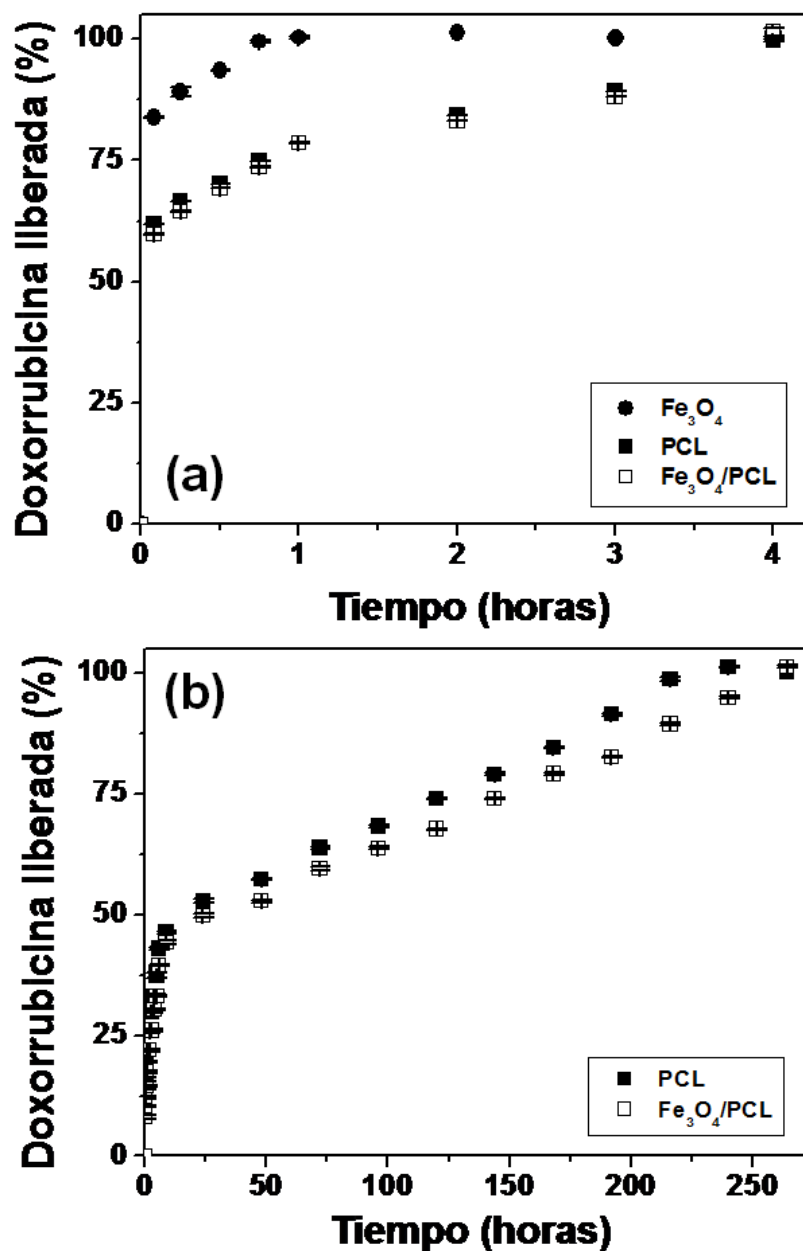


Figura 66. Liberación de doxorubicina (%) (a) adsorbida y (b) absorbida desde las nanopartículas de Fe_3O_4 (●), PCL (■) y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (□) en función del tiempo de incubación en una solución tampón $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$) a 37.0 ± 0.5 °C.

Similares conclusiones pueden extraerse al analizar los datos de liberación de 5-fluorouracilo desde las nanopartículas sintetizadas (figura 67a). Brevemente, la adsorción superficial hace que la liberación sea muy rápida (nunca superior a 3 horas), inadecuada para fines clínicos. Nuevamente se aprecia una liberación algo más lenta desde las superficies poliméricas por la interacción electrostática favorable fármaco – polímero ya comentada en el caso de la doxorubicina. Por el contrario, la cesión es significativamente más lenta cuando el fármaco se vehiculiza en la matriz polimérica (figura 67b). El proceso de liberación pasa a ser bifásico aunque más lento desde las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (ver los comentarios realizados en el caso de la doxorubicina). Desde las nanopartículas poliméricas, el 34 % del fármaco es cedido rápidamente en la primera hora, mientras que el 66 % restante se libera a lo largo de los 8 días posteriores. Cuando la liberación se produce desde las nanopartículas compuestas, el proceso se realiza de una forma más lenta, liberándose el 30 % a lo largo de la primera hora y el 70 % restante a lo largo de 10 días.

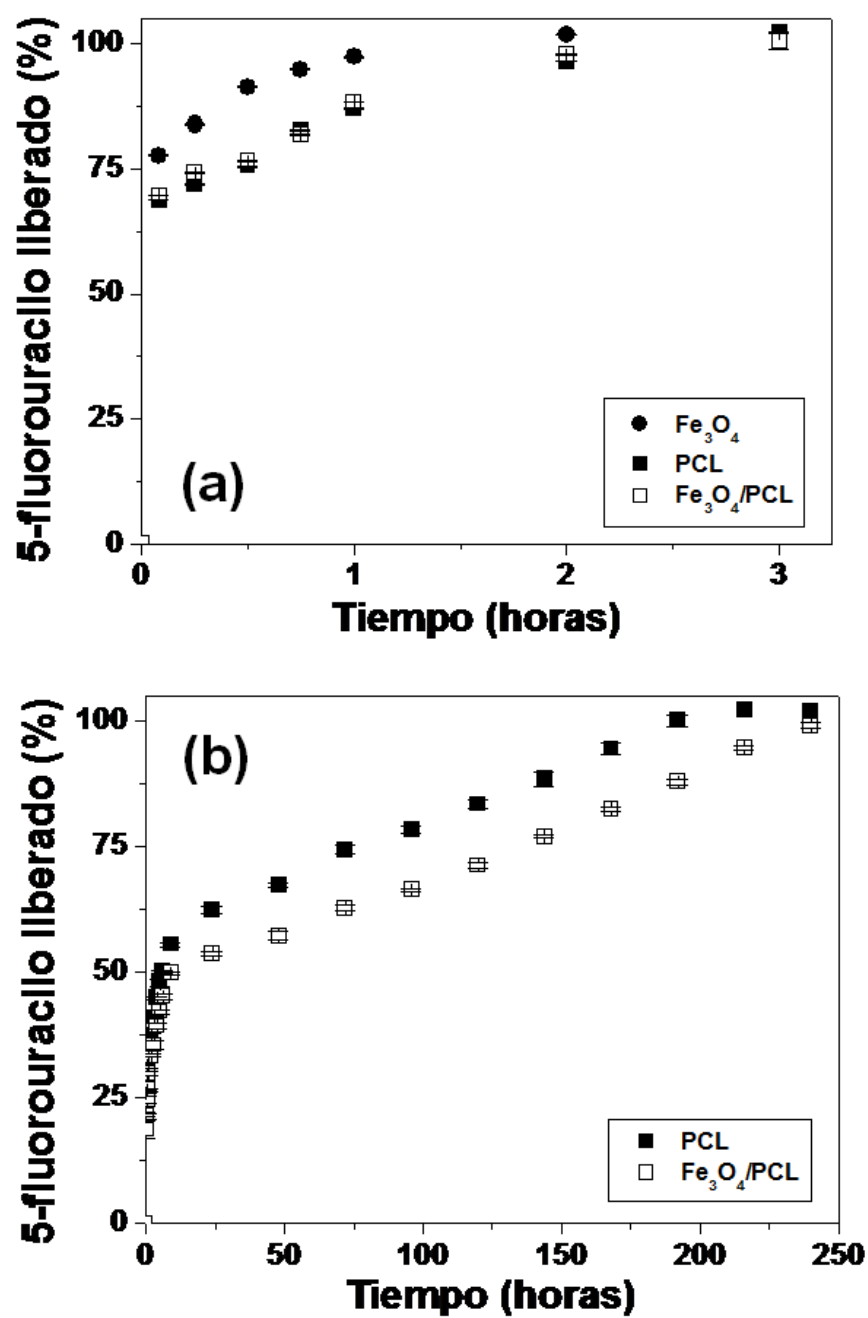


Figura 67. Liberación de 5-fluorouracilo (%) (a) adsorbido y (b) absorbido desde las nanopartículas de Fe₃O₄ (●), PCL (■) y Fe₃O₄/PCL (□) en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4 ± 0.1) a 37.0 ± 0.5 °C..

La liberación de diclofenaco sódico desde las nanopartículas es algo diferente en comparación con los fármacos antitumorales ya descritos (figura 68). En este caso, si bien la liberación del AINE adsorbido es también muy rápida (completa en tan solo 4 horas) y no apropiada para fines terapéuticos, el proceso es más lento desde las nanopartículas de magnetita. El diclofenaco sódico interacciona favorablemente con la superficie positiva de la magnetita, quedando durante algo más de tiempo retenido en ésta. Al igual que en los fármacos antitumorales, el proceso de liberación se ralentiza notablemente cuando el AINE se incorpora en la matriz polimérica mediante absorción (figura 68b).

El proceso es bifásico en ambos tipos de nanopartículas, pero más lento desde las nanoplateformas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (ver los comentarios realizados en el caso de las moléculas antitumorales). La liberación de diclofenaco sódico desde las nanopartículas poliméricas se produce con una primera fase muy rápida donde la fracción de fármaco liberada es $\approx 38\%$ durante la primera hora. Mientras que la liberación más lenta ocurre durante la segunda fase del proceso ($\approx 62\%$ en los 5 días restantes). Por el contrario, si la liberación se produce desde las nanopartículas compuestas, el proceso se realiza de una forma más lenta, liberándose el 33% a lo largo de la primera hora y el 67% restante se libera a lo largo de 10 días. Parece claro que la liberación de este último fármaco es mucho más rápida en comparación con los otros dos. Creemos que esto puede ser debido a que la débil interacción electrostática matriz polimérica – molécula de fármaco dificulta la retención del diclofenaco sódico en el interior de la nanopartícula.

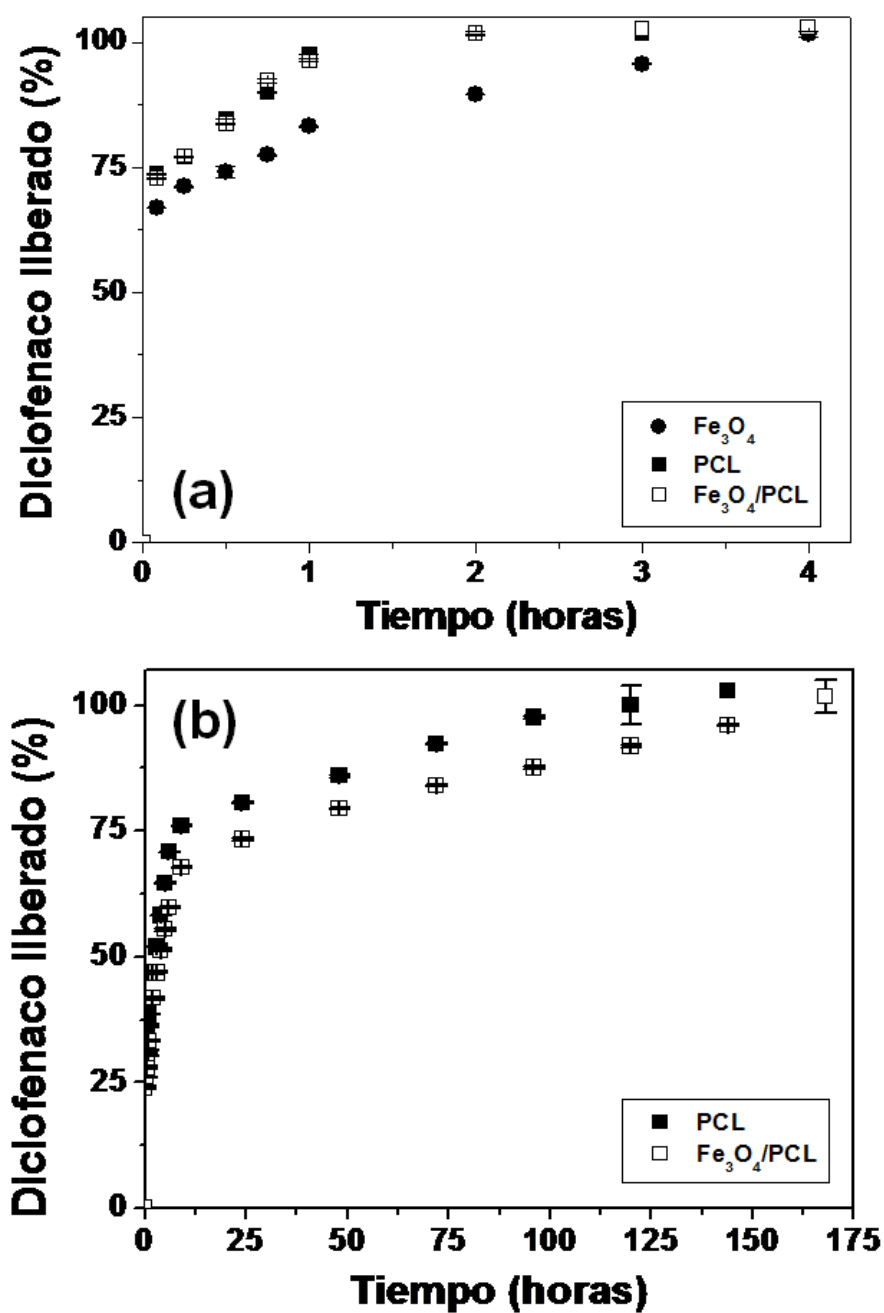


Figura 68. Liberación de diclofenaco sódico (%) (a) adsorbido y (b) absorbido desde las nanopartículas de Fe₃O₄ (●), PCL (■) y Fe₃O₄/PCL (□) en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4 ± 0.1) a 37.0 ± 0.5 °C.

Para finalizar el estudio de la liberación de los fármacos desde las nanopartículas desarrolladas, realizamos el ajuste cinético de los perfiles de liberación utilizando para ello el análisis de varianza de la regresión al modelo (criterio ANOVA) y del coeficiente de determinación, r^2 . Según estos criterios, seleccionamos en primer lugar los ajustes con mayor valor del estadístico F de Fisher (cociente entre las medias de cuadrados de regresión y residual) y de entre ellos admitimos que el que presente un mayor valor de r^2 (una mayor suma de cuadrados de regresión) corresponderá con la ecuación de la cinética que mejor se ajusta a los resultados obtenidos *in vitro* [Doménech y cols., 1998; Morales y cols., 2004]. Hemos ensayado diferentes modelos matemáticos con la finalidad de elegir el que con mayor fiabilidad sea capaz de explicar la cinética de liberación de nuestro fármaco:

- a) Cinética de orden cero: describe un sistema donde la velocidad de liberación de fármaco es constante. Es decir:

$$Q_t = K_0 t \quad (44)$$

Siendo Q_t la cantidad acumulada de fármaco a tiempo t ; y, K_0 la constante de liberación.

- b) Cinética de orden uno: en este caso la liberación de fármaco va a depender de la concentración del mismo en el sistema.

$$\begin{aligned} \frac{dQ_t}{dt} &= K_1(Q_\infty - Q_t) \\ Q_t &= Q_\infty (1 - e^{-K_1 t}) \end{aligned} \quad (45)$$

siendo Q_∞ la máxima cantidad liberada, que se supone estará en disolución para un tiempo mucho mayor que $1/K_1$.

- c) Cinética de raíz cuadrada (Higuchi): relacionada con la liberación por difusión del fármaco.

$$Q_t = A + B \cdot \sqrt{t} \quad (46)$$

d) Cinética de raíz cúbica: la liberación se produce por erosión o disolución de la matriz polimérica en todo su volumen:

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = A + B \cdot t \quad (47)$$

En las tablas 20, 21 y 22 se recogen los valores de F y r^2 correspondientes a los distintos ajustes cinéticos de la liberación de doxorrubicina, 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico desde las nanopartículas de magnetita, de poli(ϵ -caprolactona) y de los nanocompuestos magnetita/poli(ϵ -caprolactona).

| | VALORES DE F Y r^2 | | | | |
|--|------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | Cinética de orden cero | Cinética de orden uno | Cinética de raíz cuadrada | Cinética de raíz cúbica |
| Fe₃O₄ | F | 54 | 813 | 19191 | 751 |
| | r^2 | 0.930 | 0.445 | 0.976 | 0.399 |
| PCL | F | 112.5 | 193 | 8289 | 425 |
| | r^2 | 0.941 | 0.191 | 0.981 | 0.629 |
| Fe₃O₄/PCL | F | 91.9 | 164 | 3725 | 384 |
| | r^2 | 0.928 | 0.198 | 0.964 | 0.655 |

Tabla 20. Valores del estadístico F y del coeficiente de determinación r^2 obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de doxorrubicina liberada en función del tiempo desde las nanopartículas de Fe₃O₄, PCL y Fe₃O₄/PCL (método de formulación mediante adsorción superficial).

| | VALORES DE F Y r^2 | | | | |
|--|------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | Cinética de orden cero | Cinética de orden uno | Cinética de raíz cuadrada | Cinética de raíz cúbica |
| Fe₃O₄ | F | 2.7 | 586 | 3644 | 409 |
| | r^2 | 0.220 | 0.456 | 0.914 | 0.237 |
| PCL | F | 70 | 183 | 8019 | 304 |
| | r^2 | 0.919 | 0.151 | 0.981 | 0.48 |
| Fe₃O₄/PCL | F | 49 | 214 | 5038 | 306 |
| | r^2 | 0.889 | 0.172 | 0.964 | 0.417 |

Tabla 21. Valores del estadístico F y del coeficiente de determinación r^2 obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de 5-fluorouracilo liberado en función del tiempo desde las nanopartículas Fe₃O₄, PCL y Fe₃O₄/PCL (método de formulación mediante adsorción superficial).

| | VALORES DE F Y r^2 | | | | |
|--|------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | Cinética de orden cero | Cinética de orden uno | Cinética de raíz cuadrada | Cinética de raíz cúbica |
| Fe₃O₄ | F | 119.4 | 218 | 125302 | 409 |
| | r^2 | 0.944 | 0.163 | 0.993 | 0.55 |
| PCL | F | 63 | 338 | 11339 | 532 |
| | r^2 | 0.925 | 0.217 | 0.976 | 0.502 |
| Fe₃O₄/PCL | F | 22.52 | 251 | 2699 | 255 |
| | r^2 | 0.811 | 0.284 | 0.938 | 0.938 |

Tabla 22. Valores del estadístico F y del coeficiente de determinación r^2 obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de diclofenaco sódico liberado en función del tiempo desde las nanopartículas Fe₃O₄, PCL y Fe₃O₄/PCL (método de formulación mediante adsorción superficial).

En todos los casos, la liberación del fármaco adsorbido sobre las nanopartículas obtenidas presenta valores de F y r^2 que indican un ajuste significativo a una cinética de raíz cuadrada, con los coeficientes de ajuste indicados en la tabla 23 (la figura 69 es un ejemplo que muestra el buen acuerdo entre los datos experimentales y la curva de ajuste). Esta cinética puede explicarse por la mayor concentración de fármaco presente en la superficie de la nanopartícula y la baja concentración de fármaco en el medio, lo que producirá difusión (dependencia con \sqrt{t} , ecuación 46) desde la zona superficial, en la que el fármaco se encuentra más concentrado hacia el seno de la disolución, donde la concentración es menor. No hay alteración de la matriz.

| SISTEMA | A | B |
|--|----------------|----------------|
| DOXO, Fe ₃ O ₄ | (76.99 ± 1.35) | (24.24 ± 1.88) |
| DOXO, PCL | (56.18 ± 1.31) | (20.67 ± 1.09) |
| DOXO, Fe ₃ O ₄ /PCL | (53.74 ± 1.94) | (22.16 ± 1.61) |
| 5-Fu, Fe ₃ O ₄ | (73.75 ± 2.60) | (21.85 ± 2.97) |
| 5-Fu, PCL | (60.55 ± 1.44) | (24.68 ± 1.38) |
| 5-Fu, Fe ₃ O ₄ /PCL | (62.68 ± 1.88) | (23.05 ± 1.80) |
| Diclofenaco, Fe ₃ O ₄ | (60.85 ± 0.80) | (20.27 ± 0.66) |
| Diclofenaco, PCL | (60.65 ± 1.24) | (20.60 ± 1.42) |
| Diclofenaco, Fe ₃ O ₄ /PCL | (65.11 ± 2.79) | (27.91 ± 3.20) |

Tabla 23. Coeficientes de ajuste de la ecuación (46) a la cinética de liberación de los diferentes fármacos desde la superficie de cada una de las nanopartículas.

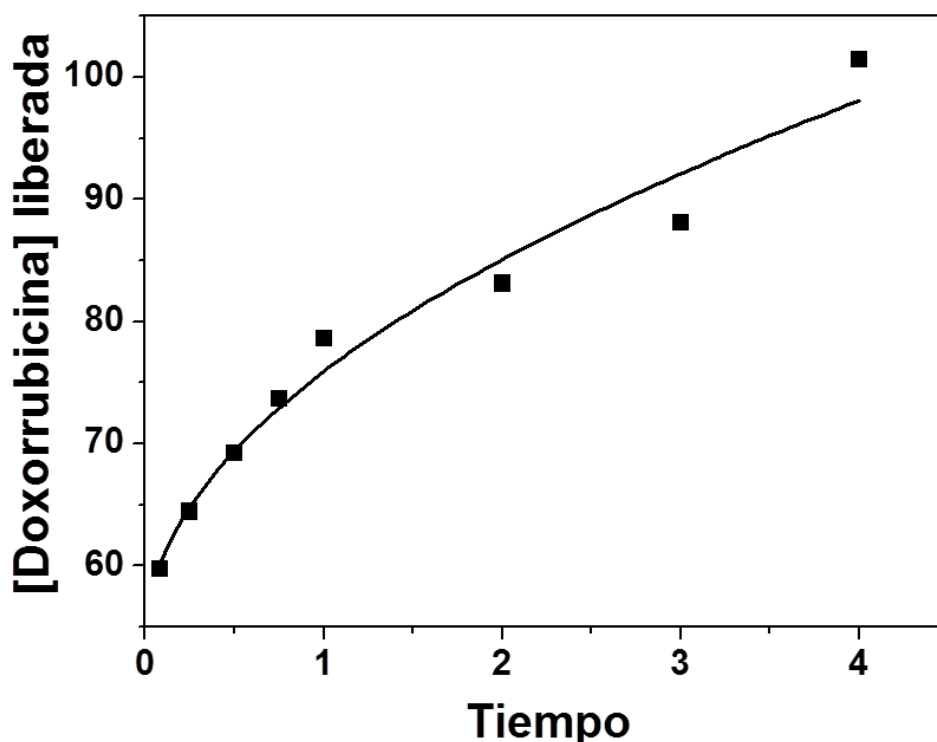


Figura 69. Ejemplo de ajuste (líneas continua) de la ecuación (48) a datos experimentales (símbolos) en el caso de doxorubicina adsorbida sobre $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$.

En cuanto a la liberación de los distintos fármacos desde el interior de las nanopartículas sintetizadas, debemos diferenciar en la realización del ajuste cinético las dos fases características del proceso: una fase rápida de unas 9 horas de duración y, a continuación, una segunda fase de liberación mucho más prolongada y lenta (figuras 66-68). Como puede apreciarse en las tablas 24-26, independientemente del tipo de fármaco, la cinética que mejor describe la primera fase del proceso de liberación es de nuevo la de raíz cuadrada (vease tabla 27 para los coeficientes de ajuste y figuras 70-72). Esto es indicativo de una difusión inicial desde la parte más superficial de las nanopartículas hacia el medio. Sin embargo, en la segunda fase la cinética a la que mejor se ajusta el proceso de liberación se corresponde con orden 0 (coeficientes de

ajuste en tabla 28), lo que implica una liberación constante y sostenida del fármaco a lo largo del tiempo, sin efecto significativo de la cantidad ya liberada. Una posible explicación a este tipo de liberación podría basarse en el hecho de que el fármaco que se encuentra originalmente en el interior de la matriz alimenta constantemente la superficie con nuevas moléculas que pasan al medio. Se requiere para ello una elevada cantidad de fármaco absorbida en la matriz y no fuertemente ligado a esta.

Este modo de liberación no se observa, sin embargo, en el caso de las nanopartículas de PCL vehiculizando diclofenaco sódico. En este tipo de sistemas la cinética que mejor se ajusta a la liberación es la de Higuchi ($\propto \sqrt{t}$). Los parámetros de esta cinética se indican a continuación:

$$y = (63.77 \pm 1.64) + (3.36 \pm 0.19) \cdot \sqrt{t} \quad (48)$$

Creemos que esto se puede deber a que existe una cierta repulsión electrostática entre las nanopartículas y el fármaco, ya que ambos presentan una carga superficial negativa. El fármaco difundirá en este caso lentamente a través de la matriz polimérica, por lo que este proceso es mucho más lento que la difusión desde la superficie descrita anteriormente.

| | VALORES DE F Y r^2 | | | | |
|---|------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | Cinética de orden cero | Cinética de orden uno | Cinética de raíz cuadrada | Cinética de raíz cúbica |
| PCL (1ª fase) | F | 137 | 137 | 30.39 | 51.5 |
| | r^2 | 0.932 | 0.758 | 0.989 | 0.388 |
| PCL (2ª fase) | F | 2264.83 | 312 | 3139.48 | 436.25 |
| | r^2 | 0.996 | 0.654 | 0.965 | 0.751 |
| Fe ₃ O ₄ /PCL (1ª fase) | F | 184 | 189 | 3023 | 38.8 |
| | r^2 | 0.948 | 0.871 | 0.992 | 0.421 |
| Fe ₃ O ₄ /PCL (2ª fase) | F | 2562.56 | 315 | 2640.88 | 487.54 |
| | r^2 | 0.996 | 0.660 | 0.959 | 0.779 |

Tabla 24. Valores del estadístico F y del coeficiente de determinación r^2 obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de doxorrubicina liberada en función del tiempo desde la matriz de las nanopartículas de PCL y Fe₃O₄/PCL (método de formulación mediante absorción).

| | VALORES DE F Y r^2 | | | | |
|---|------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | Cinética de orden cero | Cinética de orden uno | Cinética de raíz cuadrada | Cinética de raíz cúbica |
| PCL (1ª fase) | F | 94.8 | 142.9 | 8856 | 115 |
| | r^2 | 0.904 | 0.493 | 0.991 | 0.373 |
| PCL (2ª fase) | F | 2923 | 356 | 6836 | 605.19 |
| | r^2 | 0.998 | 0.560 | 0.977 | 0.739 |
| Fe ₃ O ₄ /PCL (1ª fase) | F | 98.1 | 140 | 6968 | 100 |
| | r^2 | 0.907 | 0.552 | 0.991 | 0.379 |
| Fe ₃ O ₄ /PCL (2ª fase) | F | 1758 | 278 | 2498 | 563.74 |
| | r^2 | 0.995 | 0.571 | 0.952 | 0.787 |

Tabla 25. Valores del estadístico F y del coeficiente de determinación r^2 obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de 5-fluorouracilo liberado en función del tiempo desde la matriz de las nanopartículas de PCL y Fe₃O₄/PCL (método de formulación mediante absorción).

| | VALORES DE F Y r^2 | | | | |
|---|------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | Cinética de orden cero | Cinética de orden uno | Cinética de raíz cuadrada | Cinética de raíz cúbica |
| PCL (1ª fase) | F | 159.5 | 104 | 4686 | 78.4 |
| | r^2 | 0.940 | 0.533 | 0.989 | 0.387 |
| PCL (2ª fase) | F | 149.53 | 796 | 24669.17 | 723.21 |
| | r^2 | 0.974 | 0.593 | 0.987 | 0.552 |
| Fe ₃ O ₄ /PCL (1ª fase) | F | 169 | 113.3 | 11303 | 77.9 |
| | r^2 | 0.944 | 0.587 | 0.996 | 0.409 |
| Fe ₃ O ₄ /PCL (2ª fase) | F | 1022.08 | 576 | 15556.14 | 1036.36 |
| | r^2 | 0.994 | 0.504 | 0.981 | 0.720 |

Tabla 26. Valores del estadístico F y del coeficiente de determinación r^2 obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de diclofenaco sódico liberado en función del tiempo desde la matriz de las nanopartículas de PCL y Fe₃O₄/PCL (método de formulación mediante absorción).

| SISTEMA | A | B |
|--|----------------|-----------------|
| DOXO, PCL | (7.56 ± 0.76) | (13.33 ± 0.45) |
| DOXO, Fe ₃ O ₄ /PCL | (3.00 ± 0.68) | (13.88 ± 0.40) |
| 5-Fu, PCL | (20.30 ± 0.06) | (12.14 ± 0.35) |
| 5-Fu, Fe ₃ O ₄ /PCL | (16.53 ± 0.59) | (11.45 ± 0.035) |
| Diclofenaco, PCL | (20.60 ± 1.07) | (19.07 ± 0.63) |
| Diclofenaco, Fe ₃ O ₄ /PCL | (17.23 ± 0.60) | (17.01 ± 0.35) |

Tabla 27. Coeficientes de ajuste de la ecuación (46) a la cinética de liberación que describen la primera etapa de liberación de los diferentes fármacos desde PCL y Fe₃O₄/PCL.

| SISTEMA | A | B |
|--|----------------|----------------|
| DOXO, PCL | (46.63 ± 0.72) | (0.23 ± 0.005) |
| DOXO, Fe ₃ O ₄ /PCL | (43.28 ± 0.69) | (0.21 ± 0.004) |
| 5-Fu, PCL | (57.30 ± 0.50) | (0.22 ± 0.004) |
| 5-Fu, Fe ₃ O ₄ /PCL | (47.02 ± 0.76) | (0.21 ± 0.005) |
| Diclofenaco, PCL | ----- | ----- |
| Diclofenaco, Fe ₃ O ₄ /PCL | (69.75 ± 0.63) | (0.19 ± 0.006) |

Tabla 28. Componentes de las ecuaciones de las cinéticas de orden cero que describen la segunda etapa de liberación de los diferentes fármacos desde PCL y Fe₃O₄/PCL.

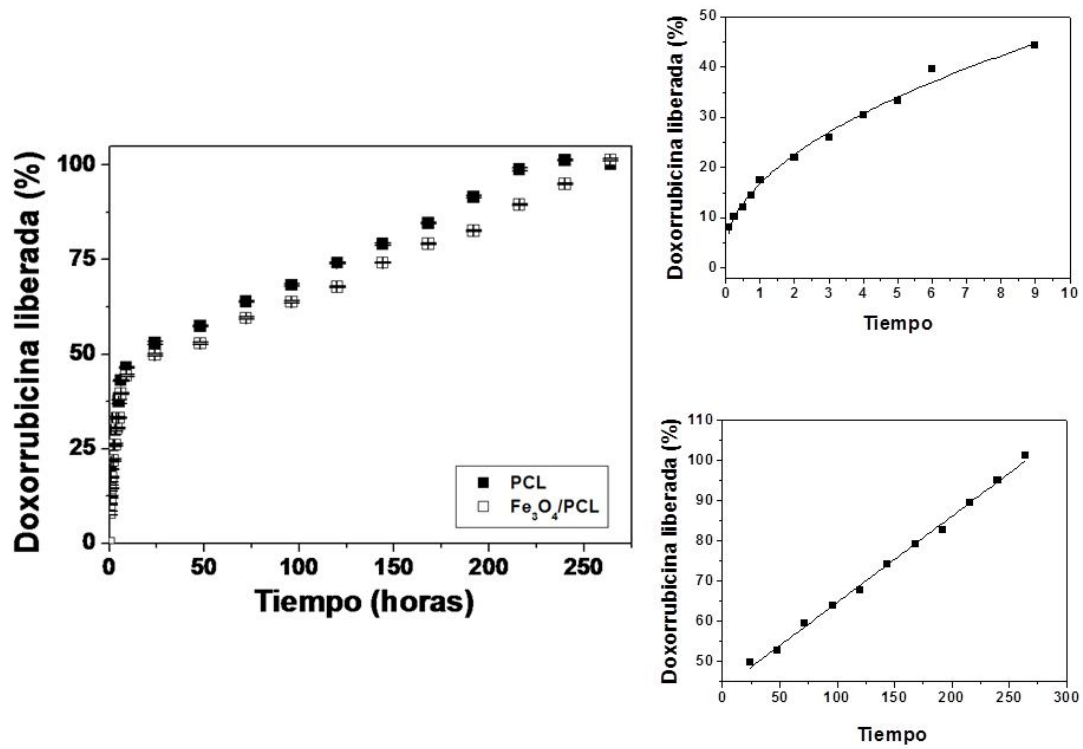


Figura 70. Izquierda: datos experimentales de la cinética de liberación de doxorubicina desde las partículas poliméricas (PCL) y compuestas (Fe₃O₄/PCL). Derecha: líneas de mejor ajuste de los datos de estas últimas a los modelos descritos en el texto, para la fase inicial de liberación (arriba) y para tiempos largos (abajo).

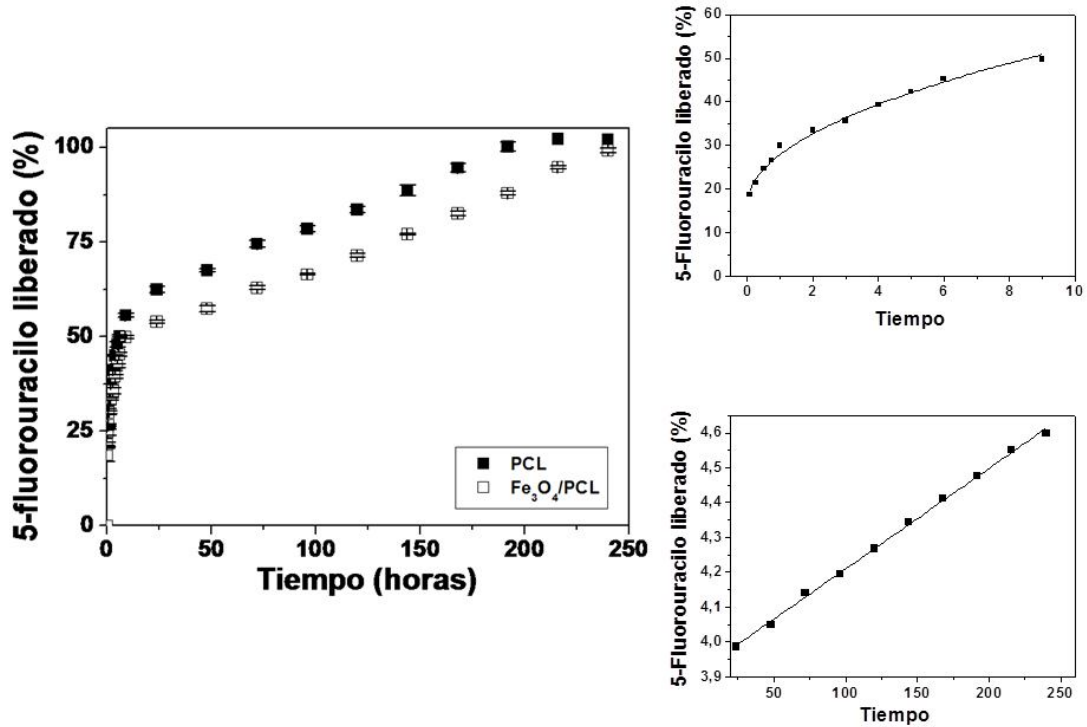


Figura 71. Izquierda: datos experimentales de la cinética de liberación de 5-fluorouracilo desde las partículas poliméricas (PCL) y compuestas ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$). Derecha: líneas de mejor ajuste de los datos de estas últimas a los modelos descritos en el texto, para la fase inicial de liberación (arriba) y para tiempos largos (abajo).

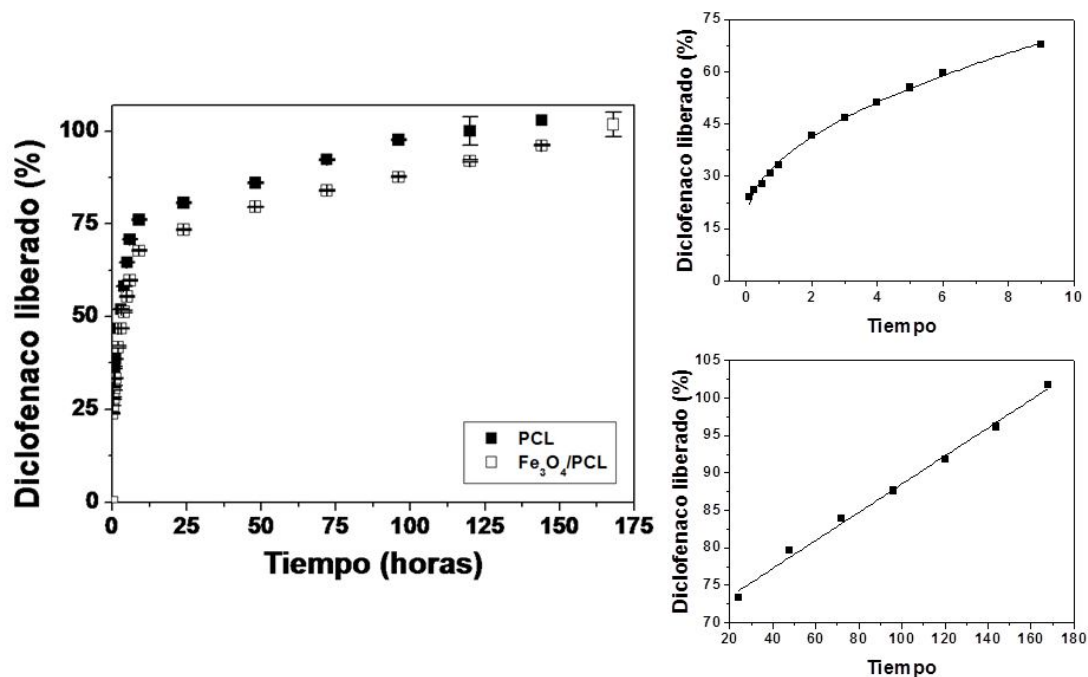


Figura 72. Izquierda: datos experimentales de la cinética de liberación de diclofenaco sódico desde las partículas poliméricas (PCL) y compuestas ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$). Derecha: líneas de mejor ajuste de los datos de estas últimas a los modelos descritos en el texto, para la fase inicial de liberación (arriba) y para tiempos largos (abajo).

Las figuras 70-72 ilustran los resultados y sus mejores ajustes para fármacos absorbidos en matriz. Creemos importante insistir en que la liberación sostenida de los tres fármacos en el tiempo es idónea para lograr un efecto farmacológico óptimo *in vivo*. Es decir, casi toda la dosis de principio activo vehiculizada en los nanocompuestos se liberará exclusivamente en el lugar de acción, una vez que las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ se acumulen de forma selectiva a este nivel con la ayuda del campo magnético aplicado.

Capítulo 8.

Conclusiones

El presente trabajo de investigación, tiene dos principales objetivos. Uno es la consecución bajo condiciones óptimas de un sistema transportador de fármacos formado por nanopartículas compuestas de un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico biodegradable. El segundo es la vehiculización de los antineoplásicos doxorrubicina y 5-fluorouracilo, y el antiinflamatorio diclofenaco sódico. Las principales aportaciones pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

1. Sobre la síntesis de las nanopartículas compuestas.

a) Se ha puesto a punto un procedimiento reproducible de síntesis de nanopartículas, formadas por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico [poli(ϵ -caprolactona)].

b) Para optimizar las condiciones de la síntesis, se analizó el efecto de la proporción inicial de masas magnetita/polímero sobre las nanopartículas compuestas obtenidas, y se concluyó que la relación 2:4 es la óptima. El análisis de las propiedades eléctricas superficiales y de las propiedades magnéticas de las nanopartículas avala esta conclusión.

c) De esta manera, se ha logrado el diseño de un sistema de liberación controlada de fármaco constituido por un núcleo magnético, responsable del pequeño tamaño y de las propiedades magnéticas de las nanopartículas obtenidas; y por un recubrimiento polimérico, muy apropiado para el transporte y liberación controlada de fármaco.

2. Sobre la estructura y composición química.

d) Mediante la comparación de los difractogramas de rayos X obtenidos para las nanopartículas de magnetita, polímero y compuestas, comprobamos la perfecta coincidencia de los difractogramas de las nanopartículas magnéticas con el patrón ASTM de la magnetita. Esto permite identificar las muestras como magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta, incluso tras quedar embebida en una matriz polimérica. De esta manera es de esperar que las propiedades magnéticas persistan tras el recubrimiento de los núcleos magnéticos por el polímero biodegradable.

e) El análisis del espectro de infrarrojos constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento, ya que permitió la identificación de los grupos funcionales del polímero y una banda característica de la magnetita en las partículas compuestas.

3. Sobre las propiedades eléctricas superficiales.

f) El estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de nanopartículas mediante electroforesis constituye una prueba importante de la existencia del recubrimiento. Éste oculta muy eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de las nanopartículas compuestas sea indistinguible de la de las nanopartículas de polímero.

g) El análisis preliminar de la estabilidad del recubrimiento mediante el estudio de la evolución de las propiedades electrocinéticas de las nanopartículas compuestas en función del tiempo muestra cómo el comportamiento de éstas se aproxima al de la magnetita en agua.

h) Empleando la información obtenida del estudio electrocinético de nuestros materiales, hemos justificado el mecanismo de formación de la capa de recubrimiento polimérico sobre los núcleos magnéticos. Ésta se genera como consecuencia de la

atracción electrostática entre las nanopartículas de magnetita cargadas positivamente y la matriz polimérica con carga negativa, lo que induce la concentración del polímero en las inmediaciones de la superficie de la magnetita.

4. Sobre la termodinámica superficial.

i) Utilizando un modelo termodinámico aplicable a la interfase sólido/líquido ha sido posible llevar a cabo una completa caracterización termodinámica superficial de las nanopartículas sintetizadas.

j) La diferente naturaleza de las superficies de magnetita, poli(ϵ -caprolactona) y nanopartículas compuestas se manifiesta en cambios sufridos por las interacciones interfaciales entre el sólido y los líquidos de ensayo, y en general, en diferentes contribuciones a la energía superficial total de cada tipo de sólido.

k) Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los diferentes nanomateriales. La naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde al ser recubierta por el polímero hidrófobo, lo que se considera una prueba muy significativa de la eficacia del recubrimiento.

5. Sobre las propiedades magnéticas.

l) Al quedar englobados los núcleos de óxido de hierro en el interior de la matriz polimérica, la imanación de la nanopartícula resulta ser muy elevada por su carácter superparamagnético. Esta propiedad ha sido comprobada cualitativamente de forma visual y mediante microscopía óptica en suspensiones acuosas de los nanocompuestos.

m) Hemos desarrollado una *prueba de concepto in vivo* sobre las interesantes posibilidades que podrían ofrecer las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona)

como sistemas transportadores de fármacos. Para ello, se ha aplicado un método histológico de tinción de los núcleos de óxido de hierro en un modelo de tumor subcutáneo L1210 desarrollado en ratones DBA/2. Sólo los cortes histológicos de las masas tumorales de los ratones tratados con las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) guiadas magnéticamente mostraron una importante acumulación de hierro en el intersticio tumoral.

6. Sobre la capacidad de transporte y liberación controlada de los fármacos Doxorrubicina, 5- fluorouracilo y diclofenaco sódico.

n) Se ha validado y utilizado un procedimiento espectrofotométrico sencillo para la determinación de la incorporación de los fármacos en las nanopartículas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona), y para la cuantificación de la cantidad de fármaco cedida al medio en los ensayos de liberación.

o) Hemos estudiado y definido las condiciones óptimas de vehiculización de doxorrubicina, 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico en los nanocompuestos, mediante dos métodos: *i*) la adición del principio activo en el medio acuoso donde precipitará el polímero y que contiene los núcleos magnéticos en suspensión, antes de que se desencadene la formación de las nanopartículas compuestas; y, *ii*) la adsorción tras la formación e incubación de los nanocompuestos en una disolución de principio activo.

p) El análisis espectrofotométrico de la incorporación de fármaco por las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) pone de manifiesto la contribución de la adsorción superficial al proceso de vehiculización de los fármacos. Se ha observado un efecto positivo de la concentración de principio activo en el medio de contacto sobre la cantidad adsorbida por las nanopartículas compuestas.

q) La absorción de los fármacos en matriz mejora considerablemente los resultados de vehiculización obtenidos mediante el método de adsorción superficial. La adsorción previa de principio activo en la superficie de los núcleos de óxido de hierro, junto con los fenómenos de interacción electrostática entre las moléculas de fármaco y los nanomateriales justifican los interesantes resultados de vehiculización obtenidos. Existe también un importante efecto positivo de la concentración de principio activo utilizada sobre los resultados de vehiculización.

r) El estudio de la liberación *in vitro* de los fármacos incorporados en la superficie de las nanopartículas compuestas revela de forma general un perfil de cesión muy rápido de principio activo, completo en menos de cuatro horas y que se ajusta, según el criterio de Akaike (AIC), a una cinética de liberación raíz cúbica. Sin embargo, la liberación del fármaco incorporado en los nanocompuestos mediante absorción en matriz resulta ser mucho más interesante para obtener un óptimo efecto farmacológico.

Capítulo 9.

Bibliografía

- Abrikossova II, Derjaguin BV. Measurement of molecular attraction between solid bodies of different nature at large distances. *Prog. Surf. Sci.* 1992; 40: 133-140.
- Adamson AW. *Physical chemistry of surfaces*. Nueva York: John Wiley & Sons 1982.
- Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lübbe AS. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.* 2000; 60: 6641-6648.
- Alexiou C, Arnold W, Hulin P, Klein RJ, Renz H, Parak FG, Bergemann C, Lübbe AS. Magnetic mitoxantrone nanoparticle detection by histology, X-ray and MRI after magnetic tumor targeting. *J. Magn. Magn. Mater.* 2001; 225: 187-193.
- Alexiou C, Schmid RJ, Jurgons R, Kremer M, Wanner G, Bergemann C, Huenges E, Nawroth T, Arnold W, Parak FG. Targeting cancer cells: Magnetic nanoparticles as drug carriers. *Eur. Biophys J.* 2006; 35: 446-450.
- Allen LM, Matijević EJ. Stability of colloidal silica: I. Effect of simple electrolytes. *J. Colloid Interface Sci.* 1969; 31: 287-296.
- Allen TM. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994; 15: 215-220.
- Allen TM, Cullis PT. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science* 2004; 303: 1818-1822.
- Álvarez Paneque A, Reguera Ruiz E, Estévez Hernández O, Martínez García R, Canino Ramos C, Díaz Castañón S. Síntesis y caracterización de un sistema de nanopartículas superparamagnéticas basado en la ferrita de manganeso ($MnFe_2O_4$) tipo espinela. *Revista Cubana de Química* 2008; 20: 70-76.

- Andresen TL, Davidsen J, Begtrup M, Mouritsen OG, Jørgensen K. Enzymatic release of anti-tumor ether lipids by specific phospholipase A₂ activation of novel liposome-forming prodrugs. *J. Med. Chem.* 2004; 47: 1694-1703.
- Andresen TL, Jensen SS, Kaasgaard T, Jørgensen K. Triggered activation and release of liposomal prodrugs and drugs in cancer tissue by secretory phospholipase A₂. *Curr. Drug Deliv.* 2005; 2: 353-362.
- Ang KL, Venkatraman S, Ramanujan RV. Magnetic PNIPA hydrogels for hyperthermia applications in cancer therapy. *Mater. Sci. Eng. C.* 2007; 27: 347-351.
- Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Release* 2001; 77: 309-321.
- Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Delgado AV. Loading of 5-fluorouracil to poly(ethyl-2-cyanocrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2005; 1: 632-634.
- Arias JL, Gallardo V, Linares-Molinero F, Delgado AV. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2006; 299: 599-607.
- Arias JL, López-Viota M, Ruiz MA, López-Viota J, Delgado AV. Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/Shell nanoparticles for biomedical applications. *Int. J. Pharm.* 2007a; 339: 237-245.
- Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(buthylcyanoacrylate) nanospheres. *Int. J. Pharm.* 2007b; 337: 282-290.
- Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules* 2008; 13: 2340-2369.

- Arias JL, Harivardhan Reddy L, Couvreur P. Magneto-responsive squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. *Langmuir* 2008a; 24: 7512-7519.
- Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008b; 69: 54-63.
- Arias JL, Ruiz MA, Gallardo V, Delgado AV. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J. Control. Release* 2008c; 125: 50-58.
- Arias JL, Linares-Molinero F, Gallardo V, Delgado AV. Study of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) (core/shell) particles as anticancer drug delivery systems: Loading and release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008d; 33: 252-261.
- Arias JL, López-Viota M, Clares B, Ruiz MA. Stability of febendazole suspensions for veterinary use correlation between zeta potential and sedimentation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008e; 34: 257-262.
- Arias JL, López-Viota M, López-Viota J, Delgado AV. Development of iron/ethylcellulose (core/shell) nanoparticles loaded with diclofenac sodium for arthritis treatment. *Int. J. Pharm.* 2009a; 382: 270-276.
- Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J. Drug Target.* 2009b; 27: 586-598.
- Arias JL, López-Viota M, Gallardo V, Ruiz MA. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the chemotherapy agent tegafur. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2010a; 36: 744-750.

- Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA. Formulation and physicochemical characterization of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2010b; 75: 204-208.
- Arias JL, Martínez-Solez GI, López-Viota M, Ruiz MA. Formulation of chitosan nanoparticles loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett. Drug Des. Discov.* 2010c; 7: 70-78.
- Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: An overview. *Mini Rev. Med. Chem.* 2011; 11: 1-17.
- Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Delgado AV. Engineering of an antitumor (core/shell) magnetic nanoformulation based on the chemotherapy agent ftorafur. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2011a; 384: 157-163.
- Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* 2011b; 12: 97-104.
- Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Hirsuta S, Arbiol J, Ibarra MR, Santamaría J. Sustained release of doxorubicin from zeolite-magnetite nanocomposites prepared by mechanical activation. *Nanotechnology* 2006a; 17: 4057-4064.
- Arruebo M, Galán M, Navascues N, Téllez C, Marquina C, Ibarra MR, Santamaría J. Development of magnetic nanostructured silica based materials as potential vectors for drug delivery applications. *Chem. Mater.* 2006b; 18: 1911-1919.
- Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* 2007; 2: 22-32.
- Barberi-Heyob M, Watelet M, Merlin JL, Bleyer C, Schroeder B. Stability of newly-formulated 5-fluorouracil solutions. *Bull. Cancer* 1995; 82: 1025-1031.

- Batrakova EV, Kabanov AV. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J. Control. Release* 2008; 130: 98-106.
- Bawa P, Pillay V, Choonara YE, Toif LC. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. *Biomed. Mater.* 2009; 4: 022001-022015.
- Bee A, Massart R. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Mater.* 1995; 149: 6-9.
- Behrens S, Bönnemann H, Matoussevitch N, Gorschinski A, Dinjus E, Habicht W, Bolle J, Zinoveva S, Palina, Hormes J, Modrow H, Bahr S, Kemper V. Surface engineering of Co and FeCo nanoparticles for biomedical application. *J. Phys. Condens. Matter* 2006; 18: S2543-S2561.
- Bertolini A, Fiumanò M, Muffatti A, Pedroncelli S, Doria A, Codazi G, Giustiani S, Scarinci A, Redaelli G. Acute cardiotoxicity due to 5-fluorouracil: An underestimated toxicity. *Minerva Cardioangiol.* 1999; 47: 269-273.
- Bibby DC, Talmadge JE, Dalal MK, Kurz SG, Chytil KM, Barry SE, Shand DG, Steiert M. Pharmacokinetics and biodistribution of RGD-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles in tumor-bearing mice. *Int. J. Pharm.* 2005; 293: 281-290.
- Billmeyer FW. Morfología y orden en los polímeros cristalinos. En: *Ciencia de los Polímeros*. (Ed.: Billmeyer FW). Barcelona: Reverté 1975; pp. 148-167.
- Bisby RH, Mead C, Morgan CG. Active uptake of drugs into photosensitive liposomes and rapid release on UV photolysis. *Photochem. Photobiol.* 2000; 72: 57-61.
- Blagoeva PM, Balansky RM, Mircheva TJ, Simeonova MI. Diminished genotoxicity of mitomycin C and famorubicin included in polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Mutat. Res.* 1992; 268: 77-82.

- Bogdanov A, Wright SC, Marecos EM, Bogdanova A, Martin C, Petherick P, Weissleder R. A long-circulating co-polymer in “passive targeting” to solid tumors. *J. Drug Target.* 1997; 4: 321-330.
- Booth F. Surface conductance and cataphoresis. *Trans. Faraday Soc.* 1948a; 44: 955-959.
- Booth F. Theory of electrokinetic effects. *Nature* 1948b; 161: 83-86.
- Booth F. The cataphoresis of spherical, solid non-conducting particles in a symmetrical electrolyte. *Proc. Roy. Soc.* 1950; 203: 514-533.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 631-651.
- Brigger I, Morizet J, Laudani L, Aubert G, Appel M, Velasco V, Terrier-Lancombe MJ, Desmaële D, d'Angelo J, Couvreur P, Vassal G. Negative preclinical results with stealth[®] nanospheresencapsulated doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *J. Control Release* 2004; 100: 29-40.
- Callister WDJr. Estructura de los polímeros. En: *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*. (Ed. Callister WDJr). Vol. 2. Barcelona: Reverté 1996a; pp. 482-486.
- Callister WDJr. Propiedades magnéticas. En: *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*. (Ed. Callister WDJr). Vol. 2. Barcelona: Reverté 1996b; pp. 685-717.
- Cannon WR, Danforth SC, Flint JH, Haggerty JS, Marra RA. Sinterable ceramic powders from laser-driven reactions: I, Process description and modelling. *J. Am. Chem. Soc.* 1982; 77: 324-330.

- Carpenter EE. Iron nanoparticles as potential magnetic carriers. *J. Magn. Magn. Mater.* 2001; 225: 17-20.
- Chan DCF, Kirpotin DB, Bunn JrPA. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer. *J. Magn. Magn. Mater.* 1993; 122: 374-378.
- Chang RK, Price JC, Whitworth CW. Dissolution characteristics of poly (ϵ -caprolactone)-polylactide microspheres of chlorpromazine. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1986; 12: 2355-2380.
- Charles SW. The preparation of magnetic fluids. En: *Ferrofluids*. (Ed.: Odenbach S). Berlin: Springer 2003; pp. 3-18.
- Chaudhury MK, Good RJ. Retarded van der Waals force theory and stability of thick films in systems of three condensed phases. *J. Colloid Interface Sci.* 1983; 94: 292-294.
- Chaudhury MK. Hamaker Constant and the Dispersion Component of the Surface Tension of Liquid Mercury. *J. Colloid Interface Sci.* 1987; 119: 174-180.
- Chibowski E. Solid surface free energy components determination by the thin-layer wicking technique. *J. Adhesion Sci. Technol.* 1992; 6: 1069-1090.
- Chibowski E, Holysz L. Use of the Washburn equation for surface free energy determination. *Langmuir* 1992; 8: 710-716.
- Chibowski E, González-Caballero F. Theory and practice of thin-layer wicking. *Langmuir* 1993; 9: 330-340.
- Chibowski E, Kerkeb ML, González-Caballero F. Effect of inorganic ions on changes in the energetic heterogeneity of the cholesterol surface. *Langmuir* 1993; 9: 2491-2495.

Capítulo 9. Bibliografía

- Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1310-1316.
- Christenson HK, Horn RG. Solvation forces measured in non-aqueous liquids. *Chemica Scripta* 1985; 25: 37-41.
- Christenson HK. Non-DLVO forces between surfaces-solvation, hydration and capillary effects. *J. Disp. Sci. Technol.* 1988; 9: 171-206.
- Ciofani G, Riggio C, Raffa V, Menciassi A, Cuschieri A. A bi-modal approach against cancer: Magnetic alginate nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia. *Med. Hypotheses* 2009; 73: 80-82.
- Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 2006; 23: 1417-1450.
- Dash BC, Réthoré G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials* 2010; 31: 8188-8197.
- Davis SC, Szoka FC. Cholesterol phosphate derivatives: Synthesis and incorporation into a phosphatase and calcium-sensitive triggered release liposome. *Bioconj. Chem.* 1998; 9: 783-792.
- Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008; 7: 771-782.
- Debye PJW. Molekularkräfte und ihre Elektrische Deutung. *Physik Zeit.* 1921; 22: 302-308.
- Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, Ferrari M. Intravascular delivery of particulate systems: Does geometry really matter? *Pharm. Res.* 2009; 26: 235-243.

- Delgado A, González-caballero F, Bruque JM. On the zeta potential and surface charge density of montmorillonite in aqueous electrolyte solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 1986; 113: 203-211.
- Delgado A. Interfacial electrokinetics and electrophoresis. New York: Marcel Dekker 2002.
- Derjaguin, B.V. A theory of the hetero-coagulation, interaction and adhesion dissimilar particles in solutions of electrolytes. *Dis. Faraday Soc.* 1954; 18: 85-98.
- Derjaguin BV, Dukhin SS. Nonequilibrium double layer and electrokinetic phenomena. En: *Surface and Colloid Science*. (Ed.: Matijević E). Vol. 7. New York: Wiley 1974; pp. 273-335.
- Derycke A, Kamuhabwa A, Gijssens A, Roskams T, de Vos D, Kasran A, Huwyler J, Missiaen L, de Witte PAM. Transferrin-conjugated liposome targeting of the photosensitizer AlPcS4 to rat bladder carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004; 96: 1620-1630.
- Dewhirst MW, Prosnitz L, Thrall D, Prescott D, Clegg S, Charles C, MacFall, J, Rosner G, Samulski T, Gillette E, LaRue S. Hyperthermia treatment of malignant diseases: Current status and a view toward the future. *Semin. Oncol.* 1997; 24: 616-625.
- Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Develop. Res.* 2006; 67: 55-60.
- Doménech J, Martínez J, Plá JM. En: *Biofarmacia y farmacocinética*. Madrid: Síntesis 1998.
- Dukhin SS. Development of notions as to the mechanism of electrokinetic phenomena and the structure of the colloid micelle. En: *Surface and colloid science*. (Ed.: Matijević E). Nueva York: Wiley; 1974; pp. 1-47.

- Dukhin SS, Derjaguin BV. Equilibrium double layer and electrokinetic phenomena. En: *Surface and colloid science*. (Ed.: Matijević E). Vol. 7. Nueva York: Wiley 1974; pp. 49-272.
- Durán JDG, Delgado AV, González-Caballero F, Chibowski E. Surface free energy components of monodisperse zinc sulfide. *Mater. Chem. Phys.* 1994; 38: 42-49.
- Durán JDG, Guindo MC, Delgado AV. Electrophoretic properties of colloidal dispersions of monodisperse zinc sulphide: Effects of potential determining ions and surface oxidation. *J. Colloid Interface Sci.* 1995; 173: 436-442.
- Durán JDG, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloids as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97: 2948-2983.
- Edens HA, Levi BP, Jaye DL, Wash S, Reaves TA, Turston JR, Nusrat A, Parkos CA. Neutrophil transepithelial migration: Evidence for sequential, contact-dependent signalling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. *J. Immunol.* 2002; 169: 476-486.
- Elaissari A, Sauzedde F, Montagne F, Pichot C. Preparation of magnetic lattices. En: *Colloidal polymers. Synthesis and characterization*. (Ed.: Elaissari A) New York: CRC Press. 2003; pp. 285-318.
- Esmaeili F, Grahremani MH, Ostad SN, Atyabi F, Seyedabadi M, Malekshahi MR, Amini M, Dinarvand R. Folate-receptor-targeting delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J. Drug Target.* 2008; 16: 415-423.
- Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 6315-6320.

- Fattal F, Peracchia MT, Couvreur P. Poly(ϵ -caprolactone). Poly(alkylcyanoacrylates). En: *Handbook of biodegradable polymers*. (Eds.: Domb AJ, Kost J, Wiseman DM). Amsterdam: Harwood Academic Publishers 1997; pp. 183-202.
- Fawaz F, Guyot M, Lagueny AM, Devissaguet JPh. Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: Preparation and characterization, *Int. J. Pharm.* 1997; 154: 191-203.
- Feltin N, Pileni MP. New technique for synthesizing iron ferrite magnetic nanosized particles. *Langmuir* 1997; 13: 3927-3933.
- Fernández-Pacheco R, Arruebo M, Marquina C, Ibarra R, Arbiol J, Santamaría J. Highly magnetic silica-coated iron nanoparticles prepared by the arc-discharge method. *Nanotechnology* 2006; 17: 1188-1192.
- Fernández-Pacheco R, Marquina C, Valdivia JG, Gutiérrez M, Romero MS, Cornudella R, Laborda A, Vilorio A, Higuera T, García A, García de Jalón JA, Ibarra MR. Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants. *J. Magn. Mater.* 2007; 311: 318-322.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JPh, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 1989; 55: R1-R4.
- Fiévet F. Polyol process. Polyol process. En: *Fine particles: Synthesis, characterization and mechanism of growth*. (Ed.: Sugimoto T). New York: Marcel Dekker 2000; pp. 460-496.
- Fischer HC, Chan WCW. Nanotoxicity: The growing need for *in vivo* study. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007; 18: 565-571.

Capítulo 9. Bibliografía

- Florey K. Fluorouracil. En: *Analytical profiles of drug substances*. (Eds.: Rudy BC, Senkowski BZ). Vol. 2. New York and London: Academic Press 1973a; pp. 221-244.
- Florey K. Diclofenac Sodium. En: *Analytical profiles of drug substances*. (Eds.: Adeyeye CM and Li PK). Vol. 19. New York and London: Academic Press 1973b; pp. 123-144.
- Florey K. Doxorubicin. En: *Analytical profiles of drug substances*. (Eds.: Vigevani A and Willianson MJ). Vol. 9. New York and London: Academic Press 1980; pp. 245-274.
- Flórez J. Farmacología humana. Barcelona: Maason S.A. 2008.
- Fontana G, Pitarresi G, Tomarchio V, Carlisi B, San-Biagio PL. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 1998; 19: 1009-1017.
- Formari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. Interference by Doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol. Pharmacol.* 1994; 45: 649-656.
- Fowkes FMJ. Additivity of intermolecular forces at interfaces I. Determination of the contribution to surface and interfacial tensions of dispersion forces in various liquids. *Phys. Chem.* 1963; 67: 2538-2541.
- Fowkes FM, Mostafa MA. Acid-base interactions in polymer adsorption. *I.E.C. Prod. Res. Dev.* 1978; 17: 3-7.
- Gaber MH, Wu NZ, Hong K, Huang SK, Dewhirst MW, Papahadjopoulos D. Thermosensitive liposomes: Extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1996; 36: 1177-1187.

- Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz AT, Zalipsky S. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1177-1192.
- Gaines RV, Skinner HCW, Foord EE, Mason B, Rosenzweig A. Multiple oxides. En: *Dana's New Mineralogy*. (Ed.: Dana J). New York: John Wiley & Sons. Inc. 1997; pp. 299-300.
- Gallo JM, Gupta PK, Hung CT, Perrier DG. Evaluation of drug delivery following administration of magnetic albumin microspheres containing adriamycin to the rat. *J. Pharm. Sci.* 1989; 78: 190-194.
- Gang J, Park SB, Hyung W, Choi EH, Wen J, Kim HS, Shul YG, Haam S, Song SY. Magnetic poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing Fe₃O₄ and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model. *J. Drug Target.* 2007; 15: 445-453.
- Gao Z, Fein HD, Rapoport N. Ultrasound-enhanced tumour targeting of polymeric micellar drug carrier. *Mol. Pharm.* 2004; 1: 317-330.
- Gao J, Zhonga W, Hea J, Li H, Zhanga H, Zhoua G, Li B, Lua Y, Zoua H, Koua G, Zhanga D, Wanga H, Guoa Y, Zhong Y. Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes. *Int. J. Pharm.* 2009; 374: 145-152.
- Garg A, Tisdale AW, Haidari E, Kokkoli E. Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide. *Int. J. Pharm.* 2009; 366: 201-210.
- Gartstein E, Cohen JB, Mason TO. Defect agglomeration in Wüstite at high temperatures-II.: An electrical conduction model. *J. Phys. Chem. Solids* 1986; 47: 775-781.

- Gerasimov OV, Boomer JA, Qualls MM, Thompson DH. Cytosolic drug delivery using pH- and light-sensitive liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999; 38: 317-338.
- Glöckl G, Hergt R, Zeisberger M, Dutz S, Nagel S, Weitschies W. The effect of field parameters, nanoparticles properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2935-S2950.
- Gómez-Lopera SA, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Colloidal stability of magnetite/poly(lactic acid) core/shell nanoparticles. *Langmuir* 2006; 22: 2816-2821.
- González-Carreño T, Morales MP, Gracia M, Serna CJ. Preparation of uniform γ -Fe₂O₃ particles with nanometer size by spray pyrolysis. *Mater. Lett.* 1993; 18: 151-155.
- González-Rodríguez ML, Maestrelli F, Mura P, Rabasco AM. In vitro release of sodium diclofenac from a central core matrix tablet aimed for colonic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003; 20: 125-131.
- Good RJ, Girifalco LA. A theory for estimation of surface and interfacial energies. III. Estimation of surface energies of solids from contact angle data. *J. Phys. Chem.* 1960; 64: 561-565.
- Good RJ. Surface free energy of solids and liquids: Thermodynamics, molecular forces, and structure. *J. Colloid Interface Sci.* 1977; 59: 398-419.
- Good RJ. Contact angle, wetting and adhesion: A critical review. En: *Contact angle, wettability and adhesion*. (Ed.: Mittal KL). Utrecht: Koninklijke Brill NV. 1993; pp. 3-36.
- Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S, Gabizon A. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 1949-1957.

- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev.* 2002; 2: 48-58.
- Grainger DW. Nanotoxicity assessment: All small talk. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009; 61: 419-421.
- Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, Langer RS, Farokhzad OC. Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today* 2007; 2: 14-21.
- Guan H, McGuire MJ, Li S, Brown KC. Peptide-targeted polyglutamic acid doxorubicin conjugates for the treatment of alpha(v)beta(6)-positive cancers. *Bioconjug. Chem.* 2008; 19: 1813-1821.
- Guo X, Szoka FC. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery. *Acc. Chem. Res.* 2003; 36: 335-341.
- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005; 26: 3995-4021.
- Hamaker HC. The London-van der Waals attraction between spherical particles. *Physica* 1937; 4: 1058-1072.
- Hamoudeh M, Fessi H. Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2006; 300: 584-590.
- Han SK, Na K, Bae YH. Sulfonamide based pH sensitive polymeric micelles: Physicochemical characteristics and pH-dependent aggregation. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2003; 214: 49-59.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 1363-1380.

Capítulo 9. Bibliografía

- Hau P, Fabel K, Baumgart U, Rummele P, Grauer O, Bock A, Dietmaier C, Dietmaier W, Dietrich J, Dudel C, Hübner F, Jauch T, Drechsel E, Kleiter I, Wismeth C, Zellner A, Brawanski A, Steinbrecher A, Marienhagen J, Bogdahn U. Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer* 2004; 100: 1199-1207.
- Hauck M, Coffin D, Dodge R, Dewhirst M, Mitchell J, Zalutsky MA. A local hyperthermia treatment which enhances antibody uptake in a glioma xenograft model does not affect tumor tumour interstitial blood pressure. *Int. J. Hyperth.* 1997; 13: 307-316.
- Henry DC. The cataphoresis of suspended particles. Part. I. The equation of cataphoresis. *Proc. Roy. Soc.* 1931; 133: 106-129.
- Hergt R, Dutz S, Müller R, Zeisberger M. Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2919-S2934.
- Hess PH, Parker PH. Polymers for stabilization of colloidal cobalt particles. *J. Appl. Polymer. Sci.* 1966; 10: 1915-1917.
- Hilger I, Dietmar E, Linß W, Streck S, Kaiser WA. Developments for the minimally invasive treatment of tumours by targeted magnetic heating. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2951-S2958.
- Hilgenbrink AR, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: From therapeutics to diagnostics. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94: 2135-2146.
- Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheresch DA. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science*, 2002; 296: 2404-2407.

- Horn RG, Israelachvili J. Direct measurement of structural forces between two surfaces in a nonpolar liquid. *J. Chem. Phys.* 1981; 75: 1400-1411.
- Huber DL. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* 2005; 1: 482-501.
- Hunter RJ. The interpretation of electrokinetic potentials. *J. Colloid Int. Sci.* 1966; 22: 231-239.
- Hunter RJ. *Zeta Potential in colloid science*. Nueva York: Academic Press 1981.
- Hunter RJ. *Foundations of colloid science*. Oxford: Oxford University Press 1987.
- Huwlyer J, Drewe J, Krähenbühl S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *Int. J. Nanomed.* 2008; 3: 21-29.
- Hwang SH, Rait A, Pirollo KF, Zhou Q, Yenugonda VM, Chinigo GM, Brown ML, Chang EH. Tumor-targeting nanodelivery enhances the anticancer activity of a novel quinazolinone analogue. *Mol. Cancer. Ther.* 2008; 7: 559-568.
- Hyeon T, Lee SS, Jongnam Park J, Chung Y, Na HB. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J. Am Chem. Soc.* 2001; 123: 12798-12801.
- Iannone A, Magin RL, Walczack T, Federico M, Swartz HM, Tomasi A, Vannini V. Blood clearance of dextran magnetite particles determined by a non-invasive in vivo ESR method. *Magn. Reson. Med.* 1991; 22: 435-442.
- Ibrahim A, Couvreur P, Roland M, Speiser P. New magnetic drug carrier. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983; 35: 59-61.
- Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 714-727.

- Israelachvili J. Special interactions: Hydrogen-bonding and hydrophobic and hydrophilic interactions. En: *Intermolecular and surface forces*. Londres: Academic Press 1991; pp. 151-168.
- Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 100: 1-11.
- Jabr-Milane LS, van Vlerken LE, Yadav S, Amiji MM. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. *Cancer Treat. Rev.* 2008; 34: 592-602.
- Jain RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors: Lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *J. Control. Release* 2001; 74: 7-25.
- James AM. Surface and colloid science. New York: Plenum Press 1979.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T. Interpretation of the contact angle in quartz/organic liquid film-water system. *J. Colloid Interface Sci.* 1984; 102: 533-538.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T. Interpretation of the contact angle in marble/organic liquid film-water system. *Mater. Chem. Phys.* 1987; 16: 489-499.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T, González-Caballero F. Surface free energy of celestite and its flotation activity. *Colloids and Surfaces*, 1989; 35: 41-48.
- Janczuk B, Chibowski E, Wójcik W, Guindo MC, González-Caballero F. Surface free energy of some lead compounds compared to galena. *Mater. Chem. Phys.* 1994; 37: 64-67.
- Jeong JH, Kim SW, Park TG. A new antisense oligonucleotide delivery system based on self-assembled ODN-PEG hybrid conjugate micelles. *J. Control. Release* 2003; 93: 183-191.

- Jurgons R, Seliger C, Hilpert A, Trahms L, Odenbach S, Alexiou C. Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy. *J. Phys. Condens Matter* 2006; 18: S2893-S2902.
- Kallumadil M, Tada M, Nakagawa T, Abe M, Southern P, Pankhurst QA. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009; 321: 1509-1513.
- Kamada H, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Kodaira H, Tsunoda S, Okamoto T, Mukai Y, Shibata H, Nakagawa S, Mayumi T. Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 2545-2550.
- Karant H, Murthy RS. pH-sensitive liposomes: Principle and application in cancer therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 2007; 59: 469-483.
- Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles – A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* 2009; 188: 112-118.
- Karmali PP, Kotamraju VR, Kastantin M, Black M, Missirlis D, Tirrell M, Ruoslahti E. Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors. *Nanomedicine: NBM* 2009; 5: 73-82.
- Katzung BG. *Farmacología básica y clínica*. Méjico: Manual Moderno. 2007.
- Kim SH, Jeong JH, Chun KW, Park TG. Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate. *Langmuir* 2005; 21: 8852-8857.
- Kim D, Lee ES, Park K, Kwon IC, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive micelle: Antitumoral efficacy against ovarian A2780/DOXR tumor. *Pharm. Res.* 2008a; 25: 2074-2082.

- Kim MJ, Lee HJ, Lee IA, Kim IY, Lim SK, Cho HA, Kim JS. Preparation, of pH-sensitive, long-circulating and EGFR-targeted immunoliposomes. *Arch. Pharm. Res.* 2008b; 31: 539-546.
- Kim IY, Kang YS, Lee DS, Park HJ, Choi EK, Oh YK, Son HJ, Kim JS. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice. *J. Control. Release* 2009; 140: 55-60.
- Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *Int. J. Hyperther.* 1999; 15: 345-370.
- Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, Braun RD, Colvin OM, Needham D, Dewhirst MW. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: Importance of triggered drug release. *Cancer Res.* 2000; 60: 6950-6957.
- Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: Effect of particle size. *Cancer Res.* 2001; 60: 4440-4445.
- Kono K. Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 307-319.
- Kos J, Obermajer N, Doljaka B, Kocbeka P, Kristl J. Inactivation of harmful tumour-associated proteolysis by nanoparticulate system. *Int. J. Pharm.* 2009; 381: 106-112.
- Kunzmann A, Andersson B, Thumherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta* 2011; 1810: 361-373.
- Kuo-Yung C, Yu-Der L. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone initiated by the antitumor agent doxifluridine. *Acta Biomater.* 2009; 5: 1075-1081.

- Lai TY, Lee WC. Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2009; 204: 148-153.
- LaMer VK, Dinegar RH. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *J. Am Chem. Soc.* 1950; 72: 4847-4854.
- Langbein D. Theory of Van der Waals attraction. New York: Springer-Verlag 1974.
- Larina IV, Evers BM, Ashitkov TV, Bartels C, Larin KV, Esenaliev RO. Enhancement of drug delivery in tumors by using interaction of nanoparticles with ultrasound radiation. *Technol. Cancer. Res. Treat.* 2005; 4: 217-226.
- Laskowski JS, Pugh RJ. Dispersions stability and dispersing agents. En: *Colloid Chemistry in Mineral Processing*. (Eds.: Laskowski JS, Ralston J). Londres: Elsevier 1992; 115-171.
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Elst LV, Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* 2008; 108: 2064-2110.
- LaVan DA, McGuire T, Langer R. Smallscale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnol* 2003; 21: 1184-1191.
- Lee ES, Na K, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor. *J. Control. Release* 2005; 103: 405-418.
- Lemaire L, Arellano M, Malet-Martino MC, Martino R, De Forni M. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil: A question of formulation. *Bull. Cancer* 1994; 81: 1057-1059.
- Lemieux P, Page M. Sensitivity of multidrug-resistant MCF-7 cells to a transferrin-doxorubicin conjugate. *Anticancer Res.* 1994; 14: 397-403.

- Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanotechnology and aptamers: Applications in drug delivery. *Trends Biotechnol.* 2008; 26: 442-449.
- Li JL, Wang L, Liu XY, Zhang ZP, Guo HC, Liu WM, Tang SH. In vitro cancer cell imaging and therapy using transferring-conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* 2009a; 274: 319-326.
- Li F, Wu H, Zhang H, Li F, Gu CH, Yang Q. Antitumor drug Paclitaxel-loaded pH-sensitive nanoparticles targeting tumor extracellular pH. *Carbohydr. Polym.* 2009b; 77: 773-778.
- Liang B, He ML, Chan CY, Chen YC, Li XP, Li Y, Zheng D, Lin MC, Kung HF, Shuai XT, Peng Y. The use of folate-PEG-grafted-hybranched-PEI nonviral vector for the inhibition of glioma growth in the rat. *Biomaterials* 2009; 30: 4014-4020.
- Liburdy RP, Tenforde TS, Magin RL. Magnetic field-induced drug permeability in liposome vesicles. *Radiation Res.* 1986; 108: 102-111.
- Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL, Wang LF. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. *Biomaterials* 2009; 30: 5114-5124.
- Lince F, Marchisio DL, Barresi AA. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *J. Colloid Interface Sci.* 2008; 322: 505-515.
- Llovet MI, Egea MA, Valero J, Alsina MA, García ML, Chauvet A. Metotrexate loaded nanoparticles: Analysis of drug content and study of the matrix structure. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1995; 21: 1761-1771.

- Lo CL, Lin KM, Hsiue GH. Preparation and characterization of intelligent core-shell nanoparticles based on poly(D,L-lactide)-g-poly(N-isopropyl acrylamide-comethacrylic acid). *J. Control. Release* 2005; 104: 477-488.
- London F. Zur Theorie und systematic der molekularkräfte. *Physik Zeit.* 1930; 63: 245-279.
- López García JJ, Moya AA, Horno JJ, Delgado AV, González-Caballero F. A network model of the electrical double layer around a colloid particle. *J. Colloid Interface Sci.* 1996; 183: 124-130.
- López-López MT, Durán JDG, Delgado AV, González-Caballero F. Stability and magnetic characterization of oleate-covered magnetite ferrofluids in different nonpolar carriers. *J. Colloid Interface Sci.* 2005; 291: 144-151.
- López-Pérez JA, López-Quintela MA, Mira J, Rivas J. Preparation of magnetic fluids with particles obtained in microemulsions. *IEEE Trans. Magn.* 1997; 33: 4359-4362.
- Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009; 13: 256-262.
- Lu YJ, Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 675-693.
- Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, Matthias M, Dörken B, Herrmann F, Gürtler R, Hohenberger P, Haas N, Sohr R, Sander B, Lemke AJ, Ohlendorf D, Huhnt W, Huhn D. Clinical experiences with magnetic drug targeting: A phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* 1996a; 56: 4686-4693.

- Lübbe AS, Bergemann C, Huhnt W, Fricke T, Riess H, Brock JW, Huhn D. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: Tolerance and efficacy. *Cancer Res.* 1996b; 56: 4694-4701.
- Lübbe AS, Bergemann C, Brock JW, McClure DG. Physiological aspects in magnetic drug-targeting. *J.Magn-Magn. Mater* 1999; 194: 149-155.
- Luo Q, Chen J, Dai K. Study on the cytocompatibility of biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microspheres *in vitro*. *J. Control. Release* 2003; 65: 429-438.
- Lyklema J, Overbeek JThG. Electrochemistry of silver iodide the capacity of the double layer at the silver iodide-water interface. *J. Colloid Sci.* 1961a; 16: 595-608.
- Lyklema J, Overbeek JThG. On the interpretation of electrokinetic. *J. Colloid Sci.* 1961b; 16: 501-512.
- Lyklema J. Water at interfaces: A colloid-chemical approach. *J. Colloid Interface Sci.* 1977; 58: 242-250.
- Lyklema J. Structure of the solid/liquid interface and the electrical double layer. En: *Solid/liquid dispersions*. (Ed.: Tadros TF). Londres: Academic Press pp. 1987; 63-90.
- Lyklema J. Thermodynamic foundation of interface and colloid science. En: *Fundamentals of Interface and Colloid Science: Solid-Liquid Interfaces*. Londres: Academic Press 1995; 2.1-2.103.
- Lyklema J, Minor M. On surface conduction and its role in electrokinetics. *Colloids Surf. A.* 1998; 140: 33-41.
- Lynch I, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 2008; 3: 40-47.
- Lyon RJP. Infrared absorption spectroscopy. En: *Physical methods, in determinative mineralogy*. (Ed.: Zussman J). Lóndres: Academic Press 1967; pp. 371-399.

- Ma Z, Jhun BS, Oh CK. Upstream stimulating factor-1 mediates the E-box-dependent transcriptional repression of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in human mast cells. *FEBS letters* 2007; 581: 4485-4490.
- Maaßen S, Fattal E, Müller RH, Couvreur P. Cell culture for the assessment of toxicity and uptake of polymeric particulate drug carriers. *S.T.P. Pharma Sci.* 1993; 3: 11-22.
- Maeda H, Wu T, Sawa Y, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J. Control Release* 2000; 65: 271-284.
- Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 71: 409-419.
- Mai J, Song S, Rui M, Liu D, Ding Q, Peng J, Xu Y. A synthetic peptide mediated active targeting of cisplatin liposomes to Tie2 expressing cells. *J. Control. Release* 2009; 139: 174-181.
- Mangelsdorf CS, White LR. Effect of stern-layer conductance on electrokinetic transport properties of colloidal particles. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1990; 86: 2859-2870.
- Mangelsdorf CS, White LR. The dynamic double layer part 1: Theory of a mobile stern layer. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998a; 94: 2441-2452.
- Mangelsdorf CS, White LR. The dynamic double layer part 2: Effects of Stern-layer conduction on the high-frequency electrokinetic transport properties. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998b; 94: 2583-2593.
- Mamot C, Drummond DC, Hong K, Kirpotin DB, Park JW. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. *Drug Resist. Updates* 2003; 6: 271-279.

- Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, Kennel SJ, Huang L, Iwatsuru M. Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipatic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal-antibodies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995; 1234: 74-80.
- Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Mag. Mag.* 1981; 17: 1247-1248.
- Matijević E, Sapieszko RS. Forced hydrolysis in homogeneous solutions. En: *Fine particles: Synthesis, characterization and mechanism of growth.* (Ed.: Sugimoto T). New York: Marcel Dekker 2000; pp. 2-34.
- Matijević E, Partch TE. Synthesis of monodispersed colloids by chemical reactions in aerosols. En: *Fine particles: Synthesis, characterization and mechanism of growth.* (Ed.: Sugimoto T). New York: Marcel Dekker 2000; pp. 97-113.
- Matijević E. A critical review of the electrokinetics of monodispersed inorganic colloids. En: *Interfacial electrokinetics electrophoresis.* (Ed.: Delgado AV). Nueva York: Marcel Dekker 2002; pp. 199-218.
- Matsuo H, Wakasugi M, Takanaga H, Ohtani H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y. Possibility of the reversal of multidrug resistance and the avoidance of side effects by liposomes modified with MRK-16, a monoclonal antibody to P-glycoprotein. *J. Control. Release* 2001; 77: 77-86.
- McCarron PA, Woolfson AD, Keating SM. Sustained release of 5-fluorouracil from polymeric nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000; 52: 1451-1459.
- Meers P. Enzyme-activated targeting of liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 265-272.

- Mercoureff W. Propriétés magnétiques des solides et propriétés similaires. En: *Aspects Modernes de la Physique des Solides*. (Ed.: Mercoureff W). París: Masson & Cie 1969; pp. 75-103.
- Mitra S, Gaur U, Gosh PC, Maitra AN. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Release* 2001; 74: 317-323.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 283-318.
- Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: Critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* 2003; 42: 463-478.
- Momparler RL, Karon M, Siegel SE, Avila F. Effect of Adriamycin on DNA, RNA and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res.* 1976; 36: 2891-2895.
- Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, Montero MI, Serna CJ. Surface and internal spin canting in g-Fe₂O₃ nanoparticles. *Chem. Mater.* 1999; 11: 3058-3064.
- Morales ME, Gallardo V, Calpena AC, Doménech J, Ruiz MA. Comparative study of morphine diffusion from sustained release polymeric suspensions. *J. Control. Release* 2004; 95: 75-81.
- Morrison FA. Electrophoresis of a particle of arbitrary shape. *J. Colloid Interface Sci.* 1970; 34: 210-214.
- Moroz P, Jones SK, Gray BN. Magnetically mediated hyperthermia: Current status and future directions. *Int. J. Hyperthermia* 2002; 18: 267-284.

- Müller RH, Lherm C, Herbolt J, Couvreur P. Propidium-iodide-loaded polyalkylcyanoacrylate particles: Labelling conditions and loading capacity. *Colloid Polymer Sci.* 1991; 269: 147-152.
- Müller RH, Maaßen S, Weyhers H, Specht F, Lucks JS. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1996; 138: 85-94.
- Na K, Lee ES, Bae YH. Adryamicin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity in vitro. *J. Control. Release* 2003; 87: 3-13.
- Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 285-305.
- Némati F, Dubernet C, Fessi H, De Verdière AC, Poupon MF, Puisieux F, Couvreur P. Reversion of multidrug resistance using nanoparticles in vitro: Influence of the nature of the polymer. *Int. J. Pharm.* 1996; 138: 237-246.
- Neumann A, Good RJ. Thermodynamics of contact angles. I. Heterogeneous solid surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 1972; 38: 341-358.
- Neumann A, Omenyi SN, van Oss CJ. Negative Hamaker coefficients. II. Phase separation of polymer solutions. *Colloid Polymer Sci.* 1979; 257: 413-419.
- Ninhan BW, Parsegian VA. Van der Waals forces: Special characteristics in lipid-water systems and a general method of calculation based on the Lifshitz. Theory. *J. Biophys.* 1970; 10: 646-663.
- O'Brien RW, White LR. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1978; 274: 1607-1624.

- Ocaña M, Rodríguez-Clemente R, Serna CJ. Uniform colloidal particles in solution: Formation mechanisms. *Adv. Mater.* 1995; 7: 212–216.
- Ohshima H. Interfacial electrokinetic phenomena. En: *Electrical phenomena at interfaces*. (Eds.: Ohshima H, Furusawa K). Vol. 2. Nueva York: Marcel Dekker 1998; pp. 19-55.
- Okon E, Pouliquen D, Okon P, Kovaleva ZV, Stepanova TP, Lavit SG, Kudryavtsev BN, Jallet P. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat: A histologic and biophysical study. *Lab. Invest.* 1994; 71: 895-903.
- Önyüksel H, Mohantya PS, Rubinsteina I. VIP-grafted sterically stabilized phospholipid nanomicellar 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin: A novel targeted nanomedicine for breast cancer. *Int. J. Pharm.* 2009; 365: 157-161.
- Overbeek JHG. Theorie der elektroforese. Der relaxationseffekt. *Kolloid Beih.* 1943; 54: 287-364.
- Overbeek JHG. Electrokinetic Phenomena. En: *Colloid Science*. (Ed.: Krut HR). Vol. 1. Amsterdam: Elsevier 1952; 194-244.
- Pakunlu RI, Wang Y, Saad M, Khandare JJ, Starovoytov V, Minko T. In vitro and in vivo intracellular liposomal delivery of antisense oligonucleotides and anticancer drug. *J. Control. Release* 2006; 114: 153-162.
- Pan XQ, Lee RJ. In vivo antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal daunorubicin in a murine leukemia model. *Anticancer Res.* 2005; 25: 343-346.
- Pan J, Feng SS. Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials* 2009; 30: 1176-1183.

Capítulo 9. Bibliografía

- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Application of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2003; 36: R167-R181.
- Panofski WKH, Phillips M. Three-dimensional potential problems. En: *Classical electricity and magnetism*. (Eds.: Panofski WKH, Phillips M). Addison-Wesley. Reading 1975; 81-94.
- Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting enables neuroprotection in brain ischemia following delayed intravenous administration of neurotrophins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002; 513: 397-430.
- Park JW, Kirpotin DB, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Papahadjopoulos D, Benz CC. Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced anticancer efficacy due to targeted delivery. *J. Control. Release* 2001; 74: 95-113.
- Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* 2002; 4: 95-99.
- Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Moore D, Papahadjopoulos D, Benz CC. Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced efficacy due to targeted delivery. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 1172-1181.
- Park EK, Kim SY, Lee SB, Lee YM. Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *J. Control. Release* 2005; 109: 158-168.
- Parsegian VA, Ninham BW. Application of Lifschitz theory to the calcinations of van der Waals forces across thin liquid films. *Nature* 1969; 224: 1197-1198.
- Pashley RM. Interparticulate forces. En: *Colloid chemistry in mineral processing*. (Eds.: Laskowski JS, Ralston J). Londres: Elsevier 1992; 91-114.

- Patil YB, Toti US, Khdair A, Ma L, Panyam J. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* 2009a; 30: 859-866.
- Patil Y, Sadhukha T, Ma L, Panyam J. Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. *J. Control. Release* 2009b; 136: 21-29.
- Pileni MP. Nanosized particles made in colloidal assemblies. *Langmuir* 1997; 13: 3266-3276.
- Pileni MP. Magnetic fluids: Fabrication, magnetic properties, and organization of nanocrystals. *Adv. Funct. Mater* 2001; 11: 323-333.
- Pitt CG. Poly(ϵ -caprolactone) and its co-polymers. En: *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. (Eds.: Chasin M, Langer R). New York: Marcel Decker 1990; pp. 71-120.
- Plaza RC, Arias JL, Espín M, Jiménez ML, Delgado AV. Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *J. Colloid Interface Sci.* 2002; 245: 86-90.
- Ponsart S, Coudane J, Vert M. A novel route to poly-(ϵ -caprolactone)-based copolymers via anionic derivatization. *Biomacromolecules* 2000; 1: 275-281.
- Poore GA, Senyei AE. Selective targeting of magnetic albumin to the Yoshida sarcoma: Ultrastructural evaluation of microsphere disposition. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1983; 19: 141-148.
- Pouliquen D, Chouly C. Magnetic microcarriers for medical applications. En: *The MML series: Medical & biotechnology applications*. (Ed.: Arshady R). Vol. 2. Londres: Citus Books 1999; pp. 343-382.

- Pulkkinen M, Pikkarainen J, Wirth T, Tarvainen T, Haapa-aho V, Korhonen H, Seppälä J, Järvinen K. Three-step tumor targeting of paclitaxel using biotinylated PLA-PEG nanoparticles and avidin-biotin technology: formulation development and in vitro anticancer activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; 70: 66-74.
- Puntes VF, Krisnan KM, Alivisatos AP. Colloidal nanocrystal shape and size control: The case of cobalt. *Science* 2001; 291: 2115-2117.
- Purushotham S, Ramanujan RV. Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomater.* 2009; 6: 502-510.
- Rapoport N, Christensen D, Fein HD, Barrows L, Gao Z. Ultrasound-triggered drug targeting to tumors in vitro and in vivo. *Ultrasonics* 2004; 42: 943-950.
- Rapoport N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* 2007; 32: 962-990.
- Reddy LH. Drug delivery to tumors: Recent strategies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57: 1231-1242.
- Reddy GR, Bhojani MS, McConville P, Moody J, Moffat BA, Hall DE, Kim G, Koo YEL, Woolliscroft MJ, Sugai JV, Johnson TD, Philbert MA, Kopelman R, Rehemtulla A, Ross BD. Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 6677-6686.
- Regazzoni AE, Blesa MA, Maroto AJG. Interfacial properties of zirconium dioxide and magnetite in water. *J. Colloid Interface Sci.* 1983; 91: 560-570.
- Rivas J, Sánchez RD, Fondado A, Izco C, García-Bastida AJ, García-Otero J, Mira J, Baldomir D, González A, Lado I, López-Quintela MA, Oseroff SB. Structural and magnetic characterization of Co particles coated with Ag. *J. Appl. Phys.* 1994; 76: 6564-6566.

- Rockenberger J, Scher EC, Alivisatos AP. A new nonhydrolytic single-precursor approach to surfactant-capped nanocrystals of transition metal oxides. *J. Am. Chem. Soc.* 1999; 121: 11595-11596.
- Rosengart AJ, Kaminski MD, Chen H, Caviness PL, Ebner AD, Ritter JA. Magnetizable implants and functionalized magnetic carriers: A novel approach for noninvasive yet targeted drug delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 633-638.
- Rosenweig RE. Magnetic fluids. En: *Ferrohydrodynamics*. (Ed.: Rosenweig RE). New York: Dover Publications 1997; pp. 33-73.
- Russel WB, Saville DA, Schowalter WR. Electrostatics. En: *Colloidal dispersions*. (Eds.: Russel WB, Saville DA). Cambridge: University Press 1989; 88-128.
- Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Arias JL. Drug delivery systems base on poly(ϵ -caprolactone) for cancer treatment. *Ars Pharm.* 2009; 50: 83-96.
- Sahoo SK, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int. J. Cancer* 2004; 112: 335-340.
- Sahoo SK, Labhasetwar V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol. Pharm.* 2005; 2: 373-383.
- Sapra, P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid Res.* 2003; 42: 439-462.
- Schiffelers RM, Storm G, Bakker-Woudenberg IAJM. Host factors influencing the preferential localization of sterically stabilized liposomes in *Klebsiella pneumoniae*-infected rat lung tissue. *Pharm. Res.* 2001; 18: 780-787.

Capítulo 9. Bibliografía

- Schiffelers RM, Koning G.A, ten Hagen TL, Fens MH, Schraa AJ, Janssen AP, Kok RJ, Molema G, Strom G. Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J. Control. Release* 2003; 91: 115-122.
- Schröder A, Honen R, Turjeman K, Gabizon A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *J. Control. Release* 2009; 137: 63-68.
- Schütt W, Grüttner C, Häfeli U, Zborowski M, Teller J, Putzar H, Schümichen C. Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy – possibilities and limitations. A mini-review. *Hybridoma* 1997; 16: 109-117.
- Senyei A, Widder KJ, Czerlinski G. Magnetic guidance of drug-carrying microspheres. *J. Appl. Phys.* 1978; 49: 3578-3583.
- Service RF. Nanotechnology takes aim at cancer. *Science* 2005; 310: 1132-1134.
- Sharma AK, Zhang L, Li S, Kelly DL, Alakhov VY, Batrakova EV, Kabanov AV. Prevention of MDR development in leukemia cells by micelle-forming polymeric surfactant. *J. Control. Release* 2008; 131: 220-227.
- Shen Z, Wei W, Zhao Y, Ma G, Dobashi T, Maki Y, Su Z, Wan J. Thermosensitive polymer-conjugated albumin nanospheres as thermal targeting anti-cancer drug carrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008; 35: 271-282.
- Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm.* 2005; 293: 261-270.
- Shmeeda H, Mak L, Tzemach D, Astrahan P, Tarshish M, Gabizon A. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 818-824.

- Shubayev VI, Pisanic II TR, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61: 467-477.
- Shum P, Kim JM, Thompson DH. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 273-284.
- Sikora K, Advani S, Korolchouk V, Magrath I, Levy L, Pinedo H, Schwartzman G, Tattersall M, Yan S. Essential drugs for cancer therapy: A World Health Organization consultation. *Ann. Oncol.* 1999; 10: 385-390.
- Silverstein R, Webster FX. Spectrometry identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons Inc. 1998.
- Simard P, Leroux JC. pH-sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells. *Int. J. Pharm.* 2009; 381: 86-96.
- Sinha VR, Bansal K, Kaumria R, Trehan A. Poly-(ϵ -caprolactone) microspheres and nanospheres: An overview. *Int. J. Pharm.* 2004; 278: 1-23
- Singh M, Atwal H, Micetich R. Transferrin directed delivery of adriamycin to human cells. *Anticancer Res.* 1998; 18: 1423-1427
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. Madrid: McGraw Hill 2001.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 2000; 69: 145-182.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradation polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 2001; 70: 1-20.

Capítulo 9. Bibliografía

- Steinke F, Andráa W, Heidec R, Wenera C, Bellemann ME. Rotating magnetic microspheres as heating mechanism for remote controlled drug release. *J. Magn. Mater.* 2007; 311: 216-218.
- Stella B, Arpicco S, Peracchia MT, Desmaële D, Hoebeke J, Rendir M, d'Angelo J, Cattel L, Couvreur P. Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 2000; 89: 1452-1464.
- Stevens PJ, Sekido M, Lee RJ. A folate receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug. *Pharm. Res.* 2004; 21: 2153-2157.
- Stolnik S, Illum L, Davis SS. Long circulating microparticulate drug carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1995; 16: 195-214.
- Stubbs M, McSheehy RMJ, Griffiths JR, Bashford L. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol. Med. Today* 2000; 6: 15-19.
- Sugimoto T, Matijević E. Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. *J Colloid Interface Sci.* 1980; 74: 227-243.
- Sullivan CO, Birkinshaw C. In vitro degradation of insulin-loaded poly(*n*-butylcyanoacrylate) nanoparticles, *Biomaterials* 2004; 25: 4375-4382.
- Sun S, Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am Chem. Soc.* 2002; 124: 8204-8205.
- Sun B, Ranganathan B, Feng SS. Multifunctional poly(D,L-lactide-*co*-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. *Biomaterials* 2008; 29: 475-486.
- Sunderland CJ, Steiert M, Talmadge JE, Derfus AM, Barry SE. Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Develop. Res.* 2006; 67: 70-93.

- Suryanarayanan R. X-Ray Powder Diffractometry. En: *Physical characterization of pharmaceutical solids*. (Ed.: Brittain HG). New York: Marcel Dekker Inc. 1995; pp. 187-221.
- Suzuki S, Inoue K, Hongoh A, Hashimoto Y, Yamazoe Y. Modulation of doxorubicin resistance in a doxorubicin-resistant human leukaemia cell by an immunoliposome targeting transferrin receptor. *Br. J. Cancer* 1997; 76: 83-89.
- Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Kawamura T, Shimada S, Matsumoto K, Saida T, Honda H. Heat immunotherapy using magnetic nanoparticles and dendritic cells for T-lymphoma. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 100: 112-115.
- Taratula O, Garbuzenko OB, Kirkpatrick P, Pandya I, Savla R, Pozharov VP, He H, Minko T. Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery. *J. Control. Release* 2009; 140: 284-293.
- Tarjat P, González-Carreño T, Serna CJ. Single-step nanoengineering of silica coated maghemite hollow spheres with tunable magnetic properties. *Adv. Mater.* 2001; 13: 1620-1624.
- Tarjat P, González-Carreño T, Serna CJ. Synthesis of nanomagnets dispersed in colloidal silica cages with applications in chemical separation. *Langmuir* 2002; 18: 4556-4558.
- Tartaj P, Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T, Serna CJ. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D Appl. Phys.* 2003; 36: R182-R197.
- Tashjian JA, Dewhirst MW, Needham D, Viglianti BL. Rationale for and measurement of liposomal drug delivery with hyperthermia using non-invasive imaging techniques. *Int. J. Hyperthermia* 2008; 24: 79-90.

- Tietze R, Jurgons R, Lyer S, Schreiber E, Wiekhorst F, Eberbeck D, Richter H, Steinhoff U, Trahms L, Alexiou C. Quantification of drug-loaded magnetic nanoparticles in rabbit liver and tumor after *in vivo* administration. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009; 321: 1465-1468.
- Toneguzzo P, Viau G, Acher O, Fiévet-Vincent F, Fiévet F. Monodisperse ferromagnetic particles for microwave applications. *Adv. Mater* 1998; 10: 1032-1035.
- Toshima N, Lu P. Synthesis and catalysis of colloidal dispersions of Pd/Ni bimetallic clusters. *Chem. Lett.* 1996; 9: 729-730.
- Ulbrich K, Šubr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1023-1050.
- Van Olphen HJ. An introduction to clay colloidal chemistry. Nueva York: Wiley 1977.
- Van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 1986; 111: 378-390.
- Van Oss CJ. Interfacial forces in aqueous media. Boca Raton: CRC Press 2006.
- Van Verklen LE, Duan Z, Seiden MV, Amiji MM. Modulation of intracellular ceramide using polymeric nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 4843-4850.
- Van Worterghem J, Morup S, Charles S, Wells S, Villadsen J. Formation of metallic glass by thermal decomposition of Fe(CO)₅. *Phys. Rev. Lett.* 1986; 55: 410-413.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998; 38: 97-120.

- Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, Brigger I, Couvreur P. Drug delivery to resistant tumors: The potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Control Release* 2003; 93: 151-160.
- Veiseh O, Kievit FM, Gunn JW, Ratner BD, Zhang M. A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells. *Biomaterials* 2009; 30: 649-657.
- Vera P, Gallardo V, Salcedo J, Delgado AV. Colloidal stability of a pharmaceutical latex: Experimental determinations and theoretical predictions. *J. Colloid Interface Sci.* 1996; 177: 553-560.
- Viau G, Fievet-Vincent F, Fiévet F. Monodisperse iron-based particles: Precipitation in liquid polyols. *J. Mater Chem.* 1996; 6: 1047-1053.
- Villar AV, Alonso A, Goni FM. Leaky vesicle fusion induced by phosphatidylinositol-specific phospholipase C: observation of mixing of vesicular inner monolayers. *Biochemistry* 2000; 39: 14012-14018.
- Viota JL, Durán JDG, González-Caballero F, Delgado AV. Magnetic properties of extremely bimodal magnetite suspensions. *J. Magn. Magn. Mater.* 2007; 314: 80-86.
- Visser J. On Hamaker constants: A comparison between Hamaker constants and Lifshitz-van der Waals constants. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1972; 4: 331-363.
- Wagner E. Programmed drug delivery: Nanosystems for tumor targeting. *Expet. Opin. Biol. Ther.* 2007; 7: 587-593.
- Widder KJ, Morris RM, Poore GA, Howard DP, Senyei AF. Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: Total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* 1983; 19: 135-140.

- Wiersema PH, Loeb AL, Overbeek JTG. Calculation of the electrophoretic mobility of a spherical colloid particle. *J. Colloid Interface Sci.* 1966; 22: 78-99.
- Willis MC, Collins BD, Zhang T, Green LS, Sebesta DP, Bell C, Kellogg E, Gill SC, Magallanez A, Knauer S, Bendele RA, Gill PS, Janjic N. Collins, B. Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjug. Chem.* 1998; 9: 573-582.
- Wu J, Lu Y, Lee A, Pan X, Yang X, Zhao X, Lee R.J. Reversal of multidrug resistance by transferrin-conjugated liposomes coencapsulating doxorubicin and verapamil. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2007; 10: 350-357.
- Yang J, Park SB, Yoon HG, Huh YM, Haam S. Preparation of poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. *Int. J. Pharm.* 2006; 324: 185-190.
- Yellen BB, Forbes ZG, Halverson DS, Fridman G, Barbee KA, Chorny M, Levy R, Friedman G. Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications. *J. Magn. Mater.* 2005; 293: 647-654.
- Yong CS, Oh YK, Kim YI, Kim JO, Yoo BK, Rhee JD, Lee KC, Kim DD, Park YJ, Kim CK, Choi HG. Physicochemical characterization and in vivo evaluation of poloxamer-based solid suppository containing diclofenac sodium in rats. *Int. J. Pharm.* 2005; 301: 54-61.
- Zara GP, Cavalli R, Bargoni A, Fundaro A, Vighetto D, Gasco MR. Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: Pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues. *J. Drug Target.* 2002; 10: 327-335.

- Závišová V, Koneracká M, Múčková M, Kopčanský P, Tomašovičová N, Lancz G, Timko M, Pätoprstá B, Bartoš P, Fabián M. Synthesis and characterization of polymeric nanospheres with the anticancer drug paclitaxel and magnetic particles. *J. Magn. Mater.* 2009; 321: 1613-1616.
- Zhang ZY, Shum P, Yates M, Messersmith PB, Thompson DH. Formation of fibrinogen-based hydrogels using phototriggerable diplasmalogen liposomes. *Bioconj. Chem.* 2002; 13: 640-646.
- Zhang Y, Schlachetzki F, Pardridge WM. Global non-viral gene transfer to the primate brain following intravenous administration. *Mol. Ther.* 2003; 7: 11-18.
- Zhang J, Misra RDK. Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core-shell nanoparticle carrier and drug release response. *Acta Biomater.* 2007; 3: 838-850.
- Zhang CF, Jugold M, Woenne EC, Lammers T, Morgenstern B, Mueller MM, Zentgraf H, Bock M, Eisenhut M, Semmler W, Kiessling F. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res.* 2007; 67: 1555-1562.
- Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 2008; 13: 1551-1569.
- Zhu L, Huo Z, Wang L, Tong X, Xiao Y, Ni K. Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive magnetoliposomes. *Int. J. Pharm.* 2009; 370: 136-143.
- Zukoski CF, Saville DA. The interpretation of electrokinetic measurements using a dynamic model of the stern layer: I. The dynamic model. *J. Colloid Interface Sci.* 1986; 114: 32-44.

