



***Nanocompuestos de hierro-polímero
biodegradable como sistemas de liberación
de fármacos antitumorales***

Programa Oficial de Doctorado en Física y Ciencias del Espacio

TESIS DOCTORAL

Luis Ricardo Gómez Sotomayor

Departamento de Física Aplicada
Grupo de Física de Interfases y Sistemas Coloidales
Universidad de Granada
2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Luis Ricardo Gómez Sotomayor
D.L.: GR 1843-2014
ISBN: 978-84-9083-026-0

El doctorando Luis Ricardo Gómez Sotomayor y el director de la Tesis: Dr. D. Ángel V. Delgado Mora, Catedrático de Física Aplicada de la Universidad de Granada,

DECLARAMOS,

Al firmar esta Tesis doctoral, titulada

Nanocompuestos de hierro-polímero biodegradable como sistemas de liberación de fármacos antitumorales.

que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 11 de Enero de 2014

Director de la Tesis:

Dr. Ángel V. Delgado Mora

Doctorando:

Luis Ricardo Gómez Sotomayor

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas del departamento de Física aplicada; quienes durante todo este tiempo han tenido para conmigo la paciencia, muchas veces infinita, que un espíritu como el mío requiere para solventar un trabajo como éste. Sólo con su ayuda y apoyo día a día he podido llegar hasta aquí. Agradezco, en particular, el apoyo tenaz del Prof. A. Delgado, cuya presteza fue la piedra angular de lo que juntos hemos construido. Mi gratitud para mis padres, Alicia y Francisco, quienes desde los crepúsculos nostálgicos de la distancia me brindaron su cariño; a ellos entre todos, dedico éste trabajo. Nunca estuve sólo, es cierto; la bella Claudia tomo mi mano y ese favor, inmerecido, me ha guiado hasta aquí. A sus padres, Antonio y Teresa, les agradezco su motivación y afecto. A todos los ellos y a los que no he mencionado, muchas gracias. Pero hay unos seres mágicos que todos los días me llenaron de amor, sonrisas y una alegría inmortal, mis pequeños amores, el hermoso Guille y la bella María José; a ellos todo lo que soy.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida de la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia PE2008-FQM3993).

Índice

Cap. 1. Introducción	1
1.1.Generalidades	3
1.2.Objetivos	7
Cap. 2. Aplicaciones de nanopartículas magnéticas en biomedicina	9
2.1. Generalidades	11
2.2. Implicaciones de las propiedades físicas de las partículas	13
2.3. Mecanismos de acción del fármaco liberado	15
2.3.1. <i>Aspectos generales</i>	15
2.3.2. <i>Transporte mediado por anticuerpos monoclonales</i>	19
2.3.3. <i>Transporte mediado por receptores de ácido fólico y derivados</i>	20
2.4. Sistemas sensibles a estímulos	21
2.4.1. <i>Control del proceso de liberación de fármaco mediante cambios en el pH</i>	21
2.4.2. <i>Control de los procesos de liberación de fármacos mediante cambios en la temperatura</i> ..	23
2.4.3. <i>Transporte de fármaco mediante la utilización de gradientes magnéticos</i>	24
2.4.4. <i>Control del proceso de liberación mediante la luz</i>	26
2.4.5. <i>Uso de ultrasonidos</i>	26
2.4.6. <i>Conclusiones</i>	28
2.5. Antineoplásicos	29
2.5.1 <i>Generalidades</i>	29
2.5.2. <i>5-Fluorouracilo</i>	30
2.5.3. <i>Doxorrubicina</i>	31

2.5.4. Gemcitabina.....	32
2.6. Empleo de nanopartículas magnéticas en el transporte y liberación de fármacos	33
2.6.1. Generalidades.....	33
2.6.2. Contribución propuesta en este trabajo.....	37
2.7. Toxicidad	37

Cap. 3. Síntesis y caracterización de partículas compuestas de núcleo magnético y recubrimiento polimérico 39

3.1. Introducción	41
3.2. Procedimientos de síntesis de nanopartículas	41
3.2.1 Hierro/magnetita	41
3.2.2. Recubrimiento con Fe_3O_4 mediante oxidación controlada	44
3.2.3. Recubrimiento con poli(etilenglicol).....	45
3.2.4. Recubrimiento de magnetita con carbopolchitosán.....	47
3.3. Estudio morfológico	49
3.3.1. Diseños I y II.....	49
3.3.2. Nanopartículas comerciales de hierro.....	50
3.3.3. Partículas compuestas Fe/PEG.....	51
3.3.4. Magnetita/carbopol/chitosán.....	54
3.4. Difracción de rayos X	55
3.5. Propiedades magnéticas.....	57
3.5.1. Generalidades.....	57
3.5.2. Superparamagnetismo.....	61
3.5.3. Propiedades magnéticas y aplicaciones biomédicas.....	63
3.5.4. Metodología experimental.....	63
3.5.5. Resultados y discusión.....	64

Cap. 4. Propiedades eléctricas superficiales	67
4.1. Introducción	69
4.2. Descripción clásica de la doble capa eléctrica	71
4.3. Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta	73
4.4. Electroforesis	74
4.5. Metodología experimental	78
4.6. Efecto del pH y de la fuerza iónica sobre la movilidad electroforética	79
4.6.1. <i>Partículas de hierro</i>	79
4.6.2. <i>Electroforesis de partículas recubiertas de PEG</i>	82
4.6.3. <i>Nanoestructuras basadas en magnetita</i>	86
Cap. 5. Evaluación de la capacidad de vehiculización de fármacos	89
5.1. Introducción	91
5.2. Espectrofotometría UV-Vis	92
5.2.1. <i>Fundamentos</i>	92
5.2.3. <i>Absorbancia óptica de las disoluciones de fármaco antitumoral</i>	93
5.3. Incorporación superficial del fármaco en las nanopartículas Recubiertas	98
5.3.1. <i>Metodología</i>	98
5.3.2. <i>Fe/magnetita/PEG con 5-FU</i>	99
5.3.3. <i>Fe/magnetita/PEG con doxorubicina</i>	102
5.3.4. <i>NPCZ/PEG con 5-FU</i>	103
5.3.5. <i>NPCA/PEG con DOX</i>	104
5.3.6. <i>Complejos magnetita/Carbopol/Chitosán (M/C/CH) con gemcitabina</i>	106
5.4. Liberación de antitumorales	108
5.4.1. <i>5-Fluororacilo</i>	108
5.4.2. <i>Doxorubicina</i>	109
5.4.3. <i>Gemcitabina</i>	111

Cap. 6. Interacción con células sanguíneas y tumorales	113
6.1. Introducción	115
6.2. Metodología	115
<i>6.2.1. Nanopartículas de hierro y células sanguíneas</i>	115
<i>6.2.2. Nanopartículas M/C/CH y células tumorales</i>	117
Cap. 7. Resumen y Conclusiones	119
Cap. 8. Bibliografía	127

1.

Introducción

1.1. Generalidades

La mayoría de los productos farmacéuticos se administran mediante las llamadas formas de dosificación convencionales (disoluciones inyectables, capsulas, tabletas, etc.), garantizando su efecto terapéutico con la dificultad de mantener una concentración de fármaco en el organismo, sin picos ni valles de concentración plasmática, particularmente en casos de administración crónica de estas formas de dosificación.

Gracias a los rápidos avances en nanotecnología y biología molecular se han desarrollado nanopartículas (NPs) con propiedades funcionales específicas que compensan las deficiencias de los tradicionales sistemas de diagnóstico y terapéuticos [; Farokhzad y Langer, 2006; Ferrari, 2005; Sanvicens y Marco, 2008]. Actualmente la tecnología de NPs se está empleando en la preparación de medios de contraste más brillantes y que actúan en tejidos específicos para visualizar y ayudar a diagnosticar enfermedades en sus primeras etapas y, en algunos casos, incluso antes de que se manifiesten [He y cols., 2008; Matsuura y Rowlands, 2008]. Simultáneamente se está promoviendo el empleo de NPs como portadoras de fármacos debido al avance en el diseño de nanoestructuras; ello trae como consecuencia una mayor eficacia en el tratamiento, además de una reducción considerable de los efectos secundarios no deseados [Boyd, 2008; Torchilin, 2006].

Se requiere un cuidadoso diseño de las NPs para controlar su forma, tamaño, o las modificaciones de su superficie que, como las que aquí se proponen, puedan dirigirse específicamente al tejido dañado y eliminarlo. El diseño adecuado de cada parámetro debe ser evaluado con objeto de producir una NP que pueda superar las barreras biológicas y llevar a cabo su función. Para ello, las moléculas que interactuarán con el tejido diana deben ser elegidas sobre la base de sus propiedades físicas, además de sus características de unión a las NPs, a las que deben integrarse de tal manera que las NPs permanezcan funcionalmente activas durante todo su recorrido por el organismo.

Para el diseño de las NPs, previo a la síntesis, se requiere entender la naturaleza de la nanoestructura como (a) un producto farmacéutico que debe recorrer el cuerpo del paciente en busca de su objetivo y (b) una entidad

biocompatible que no hará daño. De hecho, existen una serie de barreras biológicas que protegen al cuerpo contra cualquier antígeno, asociadas al sistema inmunológico, evitando con ello que lleguen a su destino [Ferrari, 2005]. Estas barreras pueden restringir la función de las NPs mediante el bloqueo de su movimiento, causando cambios físicos en las mismas, o mediante la inducción de una respuesta negativa del huésped por medio de la señalización bioquímica [Belting y cols., 2005].

Las NPs, inmediatamente después de su administración intravascular, entran en contacto con la sangre, una solución heterogénea que por su elevada concentración iónica puede inducir la aglomeración de las NPs, alterando con ello sus propiedades. Al mismo tiempo, mientras se encuentren en el torrente sanguíneo, las partículas pueden interactuar con las proteínas del plasma (lo cual puede desencadenar una reacción del sistema inmune), las matrices extracelulares, y las superficies de otras células [Davis, 2002]. En cada caso existe el riesgo de que las NPs se vinculen a otro tipo de células antes de alcanzar el tejido diana.

Por otra parte, existen varias restricciones anatómicas que limitan el acceso, y que las NPs deben superar en lo que respecta a sus dimensiones. En ciertos órganos como el cerebro o el riñón estos requisitos de tamaño son especialmente estrictos [Longmire y cols., 2008]. Por ejemplo, en el cerebro, las células endoteliales y los astrocitos limitan los niveles de pinocitosis, formando uniones estrechas entre las células en la interface sangre-cerebro, produciendo una barrera estructural y metabólica conocida como la *barrera hematoencefálica*. Solo NPs de pequeño tamaño y con las propiedades físico-químicas adecuadas pueden pasar dicha barrera [Begley, 2004].

Los espacios extracelulares no son las únicas barreras biológicas; de hecho las barreras intracelulares son la razón primordial por la cual muchos sistemas de liberación de fármacos fallan. Una vez que se ha unido la NP a la membrana de su célula objetivo suele entrar en la célula por medio del mecanismo de endocitosis (mediada por un receptor); una vez dentro del citoplasma la NP es confinada a los compartimientos endosomales para su transformación y destrucción (a través de la acidificación de los endosomas) [Bareford y Swaan, 2007]. La mayor parte de estos endosomas se trasladan después a los lisosomas, donde reacciones de hidrólisis y enzimáticas metabolizan completamente las macromoléculas. Sin embargo, los sistemas transportadores de fármacos pueden diseñarse para evitar este destino,

facilitando la evacuación endosomal antes del transporte lisosomal [Belting y cols., 2005]. Cada uno de estos obstáculos debe ser considerado en la síntesis y en las propiedades superficiales de las NPs.

La inespecificidad es la principal desventaja de los fármacos empleados en quimioterapia para el tratamiento del cáncer. Los medicamentos (por lo general citotóxicos) se administran por vía intravenosa y su distribución sistémica es general. Las consecuencias de dicha inespecificidad terapéutica son los bien conocidos efectos secundarios de la quimioterapia; el fármaco citotóxico ataca indiscriminadamente a las células cancerígenas y a las normales y sanas [Dobson, 2006; Sun, 2008]. En este aspecto pueden también mencionarse ventajas de las nanopartículas, que pueden utilizarse para tratar tumores de cuatro maneras diferentes:

- a) Pueden conjugarse anticuerpos específicos a las NPs para unirse selectivamente a receptores relacionados e inhibir el crecimiento tumoral.
- b) Una vez dentro del tumor pueden provocar hipertermia.
- c) Las nanopartículas pueden cargarse de medicamentos [Peng, 2008a; Fernández-Pacheco y cols., 2006; Subramani y cols., 2009]. La dosificación selectiva de agentes antitumorales adsorbidos en la superficie de las NPs es una alternativa prometedora a la quimioterapia convencional.
- d) Si se trata de NPs magnetizables será posible concentrarlas en el lugar de destino con la ayuda de un imán externo, liberando los fármacos en el área deseada [Fernández-Pacheco y cols., 2006].

El proceso de guiado magnético de este tipo de NPs está basado en el equilibrio entre las fuerzas ejercidas sobre ellas por el flujo sanguíneo y la fuerza de un campo magnético aplicado externamente. Cuanto mayor sea la imanación de saturación (M_s) de las partículas, menor será el campo magnético precisado para su retención y mayor su eficacia de la orientación magnética. A pesar de que el comportamiento de las partículas magnéticas en los líquidos viene dado por ecuaciones de la llamada ferrohodinámica [Charles y Popplewell; 1980], diversos factores biológicos pueden afectar in vivo las características de las NPs como ya se ha mencionado. Para el transporte magnéticamente controlado las NPs pueden ser

retenidas en el tejido diana siempre y cuando las fuerzas magnéticas puedan contrarrestar las velocidades de flujo del torrente sanguíneo (> 10 cm/s en las arterias, > 0.05 cm/s en los capilares) [Gupta y Hung, 1994]. Se ha sugerido que a velocidades de flujo sanguíneo (en las arterias o en los capilares) de $0.05 - 0.1$ cm/s, la aplicación de un campo magnético de 0.8 T es suficiente para permitir la localización deseada de NPs que contengan un 20 % de material férrico [Senyei y cols., 1978]. Por otra parte, puede incrementarse más de 30 veces la velocidad de liberación, mediante sistemas poliméricos de fármacos que contienen NPs magnéticas expuestas a un campo magnético externo oscilatorio; el mecanismo parece implicar el movimiento de las cadenas poliméricas con o sin la entrada de agua, la cual provoca una mayor disolución del fármaco. [Kost y cols., 1985; Langer, 1983; Saslawski y cols., 1988].

Otra manera de incrementar la respuesta magnética supone aumentar el contenido magnético, pero esta alternativa está restringida por la reducción proporcional en contenido de fármaco [Gupta y Hung, 1988] y, en el caso de los eritrocitos y otras células sanguíneas, por la resistencia al shock osmótico y la turbulencia [Jain y Vyas, 1994].

Por todo ello, hemos seleccionado partículas de composición mixta para nuestro estudio. Estarán formadas por un núcleo de hierro o hierro/magnetita de tamaño nanométrico, que permitirá maximizar la respuesta magnética de las partículas, dada la gran imanación de saturación del hierro. Que sepamos, nunca se ha usado hierro nanométrico con este objetivo, siendo, por el contrario, muy frecuentes los estudios con sus óxidos. El hierro se recubrirá de un polímero biocompatible, el polietilenglicol (PEG), frecuentemente utilizado como componente de transportadores de fármacos inyectables. El recubrimiento de NPs con polímeros es uno de los métodos más utilizados para resolver la estabilidad de las nanopartículas frente a la oxidación. El recubrimiento con PEG promueve solubilidad en agua, reduce la toxicidad, disminuye la degradación enzimática [Chertok y cols., 2009], y aumenta *in vivo* la vida media de los fármacos. Debe tenerse en cuenta que en el caso de tiempos cortos de circulación disminuye la eficiencia de las NPs para liberar el fármaco en el sitio del tumor. La incorporación de un polímero hidrófilo, como el polietilenglicol, a la superficie de la nanopartícula

permite una reducción de la opsonización, lo que reduce la eliminación por parte del sistema reticuloendoplasmático [Gref y cols., 2000; Otsuka y cols., 2003].

1.2. Objetivos

Se pretende alcanzar los siguientes objetivos en este trabajo de investigación:

1. Síntesis de nanopartículas compuestas de un núcleo magnético (hierro, hierro/magnetita, magnetita) y un recubrimiento polimérico biocompatible (polietilenglicol, chitosán). Investigación de la forma, tamaño, propiedades magnéticas y estructura de las nanopartículas sintetizadas.
2. Estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas compuestas con las de sus componentes mediante electroforesis. Estudio de la estabilidad de las propiedades eléctricas superficiales.
3. Determinación de la capacidad de incorporación de 5-fluorouracilo y doxorubicina por las nanoestructuras magnéticas mediante medidas espectrofotométricas y de movilidad electroforética.
4. Estudio de la capacidad de vehiculización de los fármacos antineoplásicos y su liberación.

2.

Aplicaciones de nanopartículas magnéticas en biomedicina

2.1. Generalidades

Dentro del amplio espectro de materiales que se están investigando para uso biomédico, las nanopartículas magnéticas (NPMs) han recibido una atención considerable debido a sus propiedades magnéticas intrínsecas, que permiten su seguimiento por medio de resonancia magnética [Sun y cols., 2008] y el direccionamiento y localización de sus nanocompuestos en las cercanías del tejido diana. Además, presentan un bajo perfil de toxicidad [Chomoucka y cols., 2010; Lewinski y cols., 2008; McCarthy y Weissleder, 2008; Veiseh y cols., 2010;] y son susceptibles de diferentes modificaciones superficiales, con recubrimientos biocompatibles (a los que se unen los receptores adecuados) [Gupta y Gupta, 2005; Gupta y cols., 2007; Laurent y cols., 2008; Misra, 2008]. Por esta flexibilidad se han empleado en aplicaciones tales como separación magnética [Dobson, 2006; McCarthy y cols., 2007; Pankhurst y cols., 2003], biosensores [Perez y cols., 2002; Zhao y cols., 2006], diagnóstico por imagen *in vivo* [Corot y cols., 2006; Frullano y Meade, 2007; Sun y cols., 2008], transporte de fármacos [Dobson, 2006; Duran y cols., 2008], reparación de tejidos [Solanki y cols., 2008], e hipertermia [Arruebo y cols., 2007; Mornet y cols., 2005; Thiesen y Jordan, 2008; Wang y cols., 2009] entre otros. Además se puede aumentar la especificidad de su acción mediante la adición de moléculas bioactivas (absorbidas dentro de los poros o alojadas dentro del recubrimiento o sobre él) [Goya y cols., 2008; Lee y cols., 2007; McCarthy y cols., 2007; McCarthy y Weissleder, 2008; Sun y cols., 2008], creando así transportadores de fármacos que *idealmente* no interactúan con el tejido sano [Chertok y cols., 2008; Dobson, 2006; Goya y cols., 2008; Jurgons y cols., 2006; Pankhurst y cols., 2003; Sun y cols., 2008; Tartaj y cols., 2003].

Idealmente, un sistema transportador de fármaco basado en NPMs, debe tener algunas de las principales características que siguen [Gupta y Gupta, 2005]:

- (1) Que sea biodegradable, con eliminación y toxicidad mínima de los productos de degradación.
- (2) Para permitir su distribución a nivel capilar y una perfusión uniforme su tamaño debe ser inferior a 1.4 μm . Si las partículas tienen tamaño menor de 4 μm serán eliminadas por las células del sistema retículo-endotelial, principalmente en el hígado (60-90%) y el bazo (3-10%). Partículas mayores

de 200 nm son generalmente filtradas en el bazo, mientras que las partículas de hasta 100 nm son principalmente fagocitadas en el torrente sanguíneo. En general, cuanto mayor es el tamaño de las partículas, más corta es su vida media en el plasma sanguíneo [Arruebo y cols., 2007; Chomoucka y cols., 2010].

- (3) La velocidad de liberación del fármaco debe ser controlable o predecible y debe ocurrir en el lugar deseado.
- (4) Debe tener la capacidad de transportar los agentes terapéuticos en cantidades suficientes, sin hacer que el organismo se cargue demasiado de material magnetizable.
- (5) Ha de presentar una respuesta magnética adecuada a los campos y gradientes magnéticos técnicamente alcanzables, a la velocidad de flujo presente en los sistemas fisiológicos.
- (6) Sus propiedades superficiales (energía superficial o mojabilidad, y cuantía y signo de su carga superficial) deben permitir una máxima biocompatibilidad y mínima antigenicidad.

El fármaco puede desarrollar su acción mediante varios mecanismos, una vez liberado del transportador magnético en el tejido diana [Laurent y cols., 2008], entre ellos:

- a. El fármaco es liberado del transportador detenido por el campo magnético en la pared del vaso y ejercerá su acción según su mecanismo habitual.
- b. Si el fármaco es de carácter enzimático actúa al mismo tiempo que está unido al transportador inmovilizado en la pared del vaso.
- c. El fármaco es transportado junto con su transportador desde el vaso sanguíneo directamente al tejido objetivo.

2.2 Implicaciones de las propiedades físicas de las partículas

El objetivo de una gran variedad de sistemas transportadores de fármacos que utilizan NPs es la búsqueda de nuevas técnicas para la terapéutica del cáncer [Haley y cols., 2008]. Actualmente, los tipos de nanopartículas que se usan en la investigación terapéutica del cáncer incluyen dendrímeros [Kukowska-Latallo y cols., 2005], liposomas [Bellocq y cols., 2003], nanopartículas poliméricas [Betancourt y cols., 2007], micelas [Sutton y cols., 2007], nanopartículas de proteínas [Veronese y cols., 2005], nanopartículas de cerámica [Montet y cols., 2006], nanopartículas virales [Flenniken y cols., 2005], las nanopartículas metálicas [Lowery y cols., 2006], y nanotubos de carbono [Kam y cols., 2005]. Se han desarrollado propiedades de los materiales de cada sistema de nanopartículas para mejorar la farmacocinética que permita alcanzar el tumor.

Las propiedades físico-químicas parecen influenciar significativamente la biodistribución de las NPs [Dobrovolskaia y cols., 2008; Longmire y cols., 2008; Reschel y cols., 2002]. El tamaño de las mismas afecta su hidrodinámica, por ejemplo (a) ayuda a regular la concentración de NPs en los vasos sanguíneos [Decuzzi y Ferrari, 2006; Decuzzi y cols., 2005; Decuzzi y cols., 2006], (b) afecta el mecanismo de eliminación de las NPs del organismo, y (c) establece la permeabilidad vascular para que puedan salir las NPs [Chavanpatil y cols., 2006]. Para este último caso se han desarrollado modelos que sugieren que NPs pequeñas y esféricas, presentan mayores tasas de difusión, incrementando la concentración de NPs en el centro del vaso sanguíneo, limitando así las interacciones con las células endoteliales y prolongando el tiempo de circulación de las NPs en la sangre [Decuzzi y cols., 2006].

Además, el tamaño afecta a los mecanismos por los cuales las NPs salen de la circulación sanguínea [Choi y cols., 2007; Longmire y cols., 2008; Moghimi, 1995a; Moghimi y Hunter, 2001; Moghimi y cols., 2001; Zamboni, 2008]. En algunos estudios, por ejemplo, se ha reportado que NPs de tamaño inferior a 20 nm se excretan por vía renal [Banerjee y cols., 2002; Choi y cols., 2007], mientras que NPs de mediano tamaño (30-150 nm) se acumulan en médula ósea [Moghimi, 1995b], corazón, riñón y estómago [Banerjee y cols., 2002] y para partículas de diámetro aún mayor (150-300 nm) se han encontrado en hígado y bazo [Moghimi, 1995c]. Si bien estos rangos de tamaño proporcionan una idea general de los mecanismos por los

cuales las NPs salen del organismo, al mismo tiempo otros parámetros físicos afectan su movilidad.

La biodistribución de las NPs puede estar afectada por la hidrofobicidad y la carga eléctrica, al limitar o estimular sus interacciones con el sistema inmunológico, las proteínas plasmáticas, las matrices extracelulares y otras líneas celulares [Davis, 2002]. En concreto, NPs eléctricamente cargadas e hidrófobas, tienen cortos períodos de circulación debido a la adsorción de las proteínas plasmáticas (opsonización), que puede llevar a su reconocimiento por el sistema retículo endotelial (seguido del retiro de la circulación sanguínea) [Chouly y cols., 1996]. NPs cargadas positivamente pueden también unirse a células no objetivo (que tienen, por lo general, carga negativa), lo que provoca una internalización no específica. También, los grupos hidrofóbicos en la superficie de las NPs pueden inducir su aglomeración, lo cual lleva a una rápida eliminación por el sistema retículo endotelial.

Es preciso evitar que las NPs sean expulsadas por el sistema retículo-endotelial aumentando los tiempos de circulación, pues tiempos de circulación cortos disminuyen la eficiencia con la cual las NPs pueden llegar al sitio del tumor. Para ello es importante su modificación para crear una superficie que limite la opsonización (la adhesión de las proteínas del plasma sanguíneo a la superficie de las NPs). La incorporación de un polímero hidrófilo, como el polietilenglicol (PEG), a la superficie de la nanopartícula permite una reducción de la opsonización, lo que a su vez dificulta su eliminación por el sistema retículo-endotelial [Bhadra y cols., 2003; Fawaz y cols., 1993; Gref y cols., 2000; Otsuka y cols., 2003]. La Fig. 2.1 ilustra este tipo de modificación, que ha demostrado reducir el potencial de opsonización por repulsión estérica, prolongando los tiempos de circulación de las NPs [Harris y Chess, 2003].

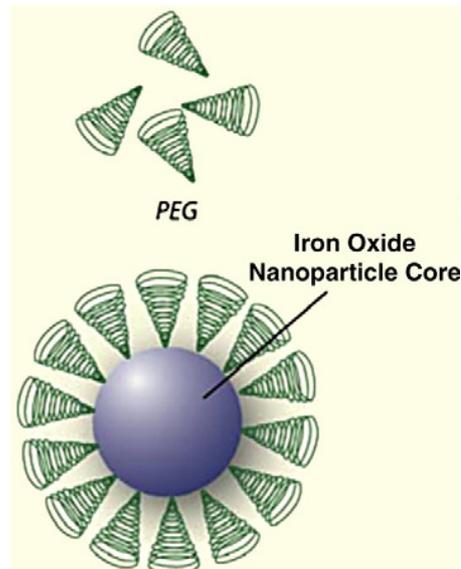


Fig. 2.1. Ilustración del ensamblaje de polímeros sobre la superficie del núcleo magnético de una nanopartícula [Veiseh y cols., 2010].

Es por todo esto que en la actualidad 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].

2.3 Mecanismos de acción del fármaco liberado

2.3.1. Aspectos generales

Inmediatamente después de la administración de un transportador coloidal o nanométrico, éste interacciona intensamente con el sistema fagocítico mononuclear o 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. Para la acción de la mayoría de los agentes antitumorales, los órganos del SRE son lugares importantes pero desfavorables, pudiendo generarse reacciones de citotoxicidad severa [Moghimi y cols., 2001]. De cualquier forma, 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]. No obstante, debido a la corta vida media del coloide ($t_{1/2} \approx 5$ min), no es posible el acceso a tumores localizados en otras zonas del organismo. De esta forma, queda restringida la utilidad de estos sistemas en la terapia del cáncer a los tumores localizados en el SRE [Brigger y cols., 2002].

Sin embargo, se han descrito estrategias novedosas para el diseño de nanosistemas transportadores de fármacos en recientes investigaciones, haciendo posible progresivamente 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 disfuncional, 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. 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 (Fig.2.2) [Cho y cols., 2008; Decuzzi y cols., 2009; Maeda y cols., 2009; Moghimi y cols., 2001; Rapoport, 2007].

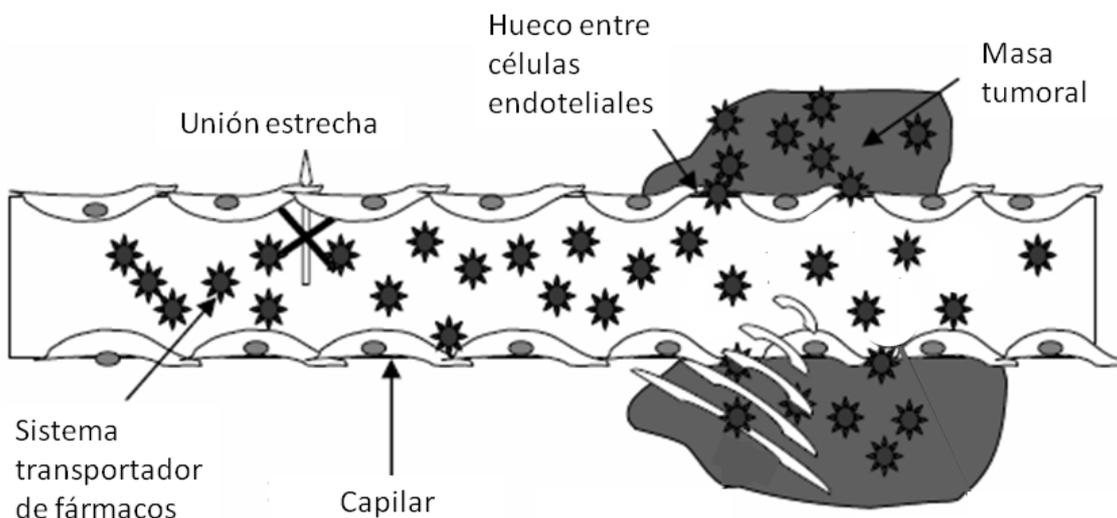


Fig. 2.2. Extravasación selectiva de los nanosistemas transportadores de fármaco a través de los defectos existentes en la micro-vasculatura tumoral. El coloide sólo abandona la circulación sanguínea cuando alcanza esta zona capilar alterada.

Adaptado de Rapoport, 2007. Copyright Elsevier (2007).

Como anteriormente hemos mencionado, se puede controlar el destino biológico de los sistemas coloidales inyectados ajustando su tamaño y sus características superficiales, con el objetivo de lograr su acumulación específica en el tumor [Maeda y cols., 2009; Mitra y cols., 2001]. El tamaño debe ser lo suficientemente pequeño como para escapar del SRE, pero lo suficientemente grande como para que no haya extravasación a través de capilares sanos. 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, ya se ha mencionado la necesidad de recubrir la superficie del coloide hidrófobo con un polímero o, alternativamente, el sistema transportador puede estar constituido por co-polímeros 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 pueden 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. Por tanto, puede decirse, 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 [Choy cols., 2008; Decuzzi y cols., 2009]. Realmente, 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 doxorubicina (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].

También se han desarrollado 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.

Aunque 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].

El diseño de los nanotransportadores según este tipo de estrategia cuenta en su superficie con biomoléculas que pretenden la unión de las nanopartículas a la célula y su posterior internalización por esta. Igualmente 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. Algunos se consideran brevemente a continuación.

2.3.2. Transporte mediado por anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son un tipo de molécula (para nuestros objetivos, aprobadas por la FDA) diseñada para su interacción específica y unión con antígenos y receptores de las células cancerosas [Imai y Takaoka, 2006]. Los inmuno-liposomas constituyen un ejemplo muy representativo de nanopartículas modificadas superficialmente con anticuerpos. 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; Sapa y Allen, 2003].

Además, se ha propuesto 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.

2.3.3. Transporte mediado por receptores de ácido fólico y derivados

Los receptores de folato son cuantiosos sobre la superficie de las células cancerosas 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 pueden llegar a desarrollar algunas células tumorales [Goren y cols., 2000].

Se ha demostrado en un estudio 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(alquilcianoacrilato) 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). En estos casos se demuestra una mayor acumulación *in vivo* en la masa tumoral [Patil y cols., 2009a].

2.4 Sistemas sensibles a estímulos

Esencialmente, los sistemas transportadores sensibles a estímulos tienen un diseño 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, el cual debe producirse en la región diana para que sea sólo aquí donde ocurra la liberación de las moléculas de fármaco. De esta manera, éste 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. Con esta estrategia se 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].

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

El control del proceso de liberación de fármaco mediante cambios en el pH es 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 (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 vehiculizado. 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].

Diversos estudios han demostrado que los sistemas liposomales sensibles a variaciones de pH permiten un mejor transporte de fármacos antitumorales hasta el tejido 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 \approx 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 inmuno-liposomas 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].

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

La característica definitoria de los coloides elaborados con materiales termosensibles es su 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.

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.

Mediante esta estrategia, en el tratamiento del cáncer, 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]. 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, la degradación del polímero es provocada por el calentamiento específico de este nanomaterial y libera el 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 magneto-liposomas (magnetosomas) termosensibles para el transporte de metotrexato. La membrana lipídica de estos sistemas está constituida por 1,2 dipalmitoilglicero-3-fosfocolina 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, no finalizan aquí las aplicaciones de los óxidos de hierro superparamagnéticos en este campo 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 se someten a la acción de un campo magnético alterno de frecuencia entre 100 KHz y 1 MHz los rápidos cambios de orientación del momento magnético del nanomaterial, provocados por el campo alterno determina un fenómeno de calentamiento. Los experimentos indican específicamente que la temperatura del espacio intersticial tumoral aumenta hasta $\approx 41 - 45$ °C, provocando daños irreversibles en las células tumorales, 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 [Steinke y cols., 2007].

2.4.3. Transporte de fármaco mediante la utilización de gradientes magnéticos

Los coloides magnéticos son capaces de llevar a los agentes quimioterápicos de manera específica al lugar de acción por su capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados, que permiten conducir un coloide hasta el tumor diana, y mantenerlo concentrado en este lugar durante el tiempo preciso para que todo el fármaco vehiculado 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. Por una parte el material de recubrimiento [p. ej., liposoma, chitosán, poli(D,L-lactida-co-glicolida), poli(ϵ -caprolactona) o poli(alquilcianoacrilato)] 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 la fuerza magnética disminuye con la distancia, la principal limitación de esta estrategia es asegurar el valor de dicha fuerza para controlar la permanencia del coloide magnético en el lugar diana, o para activar la liberación del fármaco. Se ha propuesto la implantación de pequeños imanes para solventar este problema, 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].

2.4.4. Control del proceso de liberación mediante la luz

Existe poco interés en los últimos años en el diseño de materiales capaces de responder a estímulos luminosos (luz ultravioleta o visible). Sin embargo, los sistemas transportadores de fármacos capaces de degradarse ante este tipo de estímulo (principalmente luz visible), liberando así el fármaco transportado, son 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.

2.4.5. Uso de 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 modo 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].

Recientemente se ha publicado un estudio donde 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 termostático a 24°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. 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].

En resumen, la eficacia de los agentes quimioterápicos está limitada principalmente por el desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia de 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.

2.4.6. Conclusión

Es indispensable para que actúe un fármaco que acceda en concentración suficiente a todas las células sensibles a él. El objetivo, en el caso de los fármacos antineoplásicos, es asegurar la máxima acumulación de estos principios en el lugar diana, para lograr acrecentar su eficacia terapéutica. Asimismo, se intentan minimizar los fenómenos de toxicidad asociados al tratamiento farmacológico y el desarrollo de resistencias en las células diana con nuevas estrategias fármaco terapéuticas [Flórezz, 2008].

Se proponen por ello sistemas coloidales o basados en NPs para el tratamiento del cáncer con el objetivo de solucionar estos problemas [Arias, 2011; Reddy, 2005]. Aumentando la acumulación específica del fármaco en la zona tumoral e incrementando el tiempo de exposición de las células cancerosas a estos principios activos mediante esta asociación. La mejora del perfil farmacocinético y la disminución de la toxicidad asociada a éstos por inespecificidad de acción son otros beneficios asociados a la vehiculización de los fármacos en sistemas coloidales. 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]. Para conseguir el transporte eficaz de cualquier antitumoral a la zona diana, se están concentrando numerosos esfuerzos en el desarrollo de coloides, basados principalmente en sistemas vesiculares (liposomas y niosomas) o polímeros, [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].

2.5. Antineoplásicos

2.5.1 Generalidades

La terapia antineoplásica tiene como último objetivo la eliminación completa de toda célula cancerosa. La quimioterapia es 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 labor de los antineoplásicos es en definitiva frenar la proliferación y el crecimiento celular. Para ello, la maquinaria reproductora celular es el objetivo primordial de los agentes quimioterápicos y sólo excepcionalmente el inhibir la síntesis de proteínas [Flórez, 2008]. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los fármacos antineoplásicos pueden dividirse 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]. La doxorrubicina y el 5-fluorouracilo se encuentran dentro de los antineoplásicos que pertenecen al grupo de prioridad 1, 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. Se incluyen en la primera categoría 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. 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.

2.5.2. 5-Fluorouracilo

El fármaco 5-fluorouracilo (5-FU) 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 (Fig. 2.3), interfiere en el metabolismo de los nucleósidos y puede incorporarse al ARN y ADN, produciendo citotoxicidad y muerte celular; aunque también pueden inhibir enzimas imprescindibles para la síntesis de compuestos esenciales [Flórez, 1997]. El 5-fluorouracilo incorpora un átomo de flúor en la posición 5 en lugar del hidrogeno 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 fluorouracilo daña las células tumorales por medio de dos mecanismos: provocando la depleción del nucleótido d-TMP, mediante la inhibición de la timidilato-sintetasa y la incorporación progresiva al ARN, interfiriendo en su procesamiento. Para ello, debe transformarse inicialmente en el desoxirribonucleótido correspondiente, el ácido 5-fluorodesoxiuridílico.

El desarrollo de resistencias por las células tumorales es una de las muchas razones que limitan su aplicación clínica. También, 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]. El 5-fluorouracilo utilizado es un polvo cristalino, blanco, inodoro, con un peso molecular de 130.08 g/mol y estable en aire.

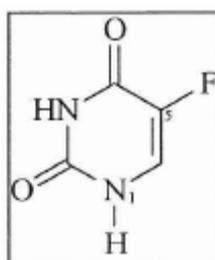


Fig. 2.3. Estructura química del 5-fluorouracilo.

La especificidad del 5-FU por las células tumorales es escasa, al igual que ocurre con otros antineoplásicos, y ello condiciona la frecuente y grave afectación de otros órganos y tejidos. Por este motivo, se genera una toxicidad que casi siempre limitaría 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. Un efecto no comúnmente asociado 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 pueden originar otras formas de toxicidad cada vez más preocupantes: la mutagenicidad y la carcinogenicidad [Katzung, 2007].

2.5.3. Doxorubicina

La doxorubicina o hidroxildaunorubicina (DOX) pertenece a la familia de las antraciclinas, con una estructura química, que 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].

Las razones que limitan su uso clínico destacan *i)* 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 cardiotoxico y menos antitumoral que la doxorubicina; y, *iv)* es necesaria una dosis mayor para conseguir el efecto deseado, debido a su alta metabolización, lo que además acrecienta la incidencia y severidad de las reacciones adversas [Floréz, 2008].

La doxorubicina usada (Sigma Aldrich, Alemania) es un polvo rojo, cristalino, con un peso molecular de 543.52 g/mol. Está constituida por un compuesto de estructura tetracíclica, de carácter cromóforo, unido por enlace glucosídico a un amino azúcar (Fig. 2.4). La molécula presenta un amplio espectro de actividad clínica en procesos hematológicos malignos, así como una gran variedad de tumores sólidos.

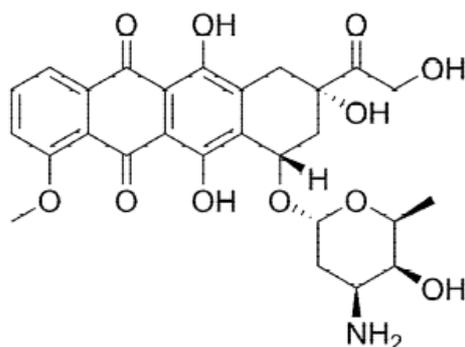


Fig. 2.4. Estructura química de la doxorubicina.

La semivida plasmática de la doxorubicina se encuentra entre 18 y 30 horas y puede presentar ciclo enterohepático. En cuanto a la toxicidad de la molécula, al inicio aparecen náuseas y vómitos, diarrea, irritación local, estomatitis y alopecia. Como ya hemos mencionado una reacción adversa preocupante y muy específica es la cardiotoxicidad, que 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].

2.5.4. Gemcitabina

Este fármaco, específico del ciclo celular, se ha demostrado como un antitumoral muy potente, activo frente a diferentes tipos de células malignas [Capuzzo y cols., 2005], y capaz de producir muerte celular por apoptosis. Aunque usada primordialmente en el tratamiento del cáncer de páncreas y pulmón, se ha demostrado su eficacia en una gran variedad de patologías tumorales [Burriss y cols., 1997; Fowler y van Lee, 2003; Sandler y cols., 2000]. Como en muchos otros casos, uno de los problemas para su uso es su escasa vida media por degradación enzimática. De aquí la necesidad de mejorar su perfil farmacéutico mediante sistemas

de liberación [Arias y cols., 2011; Stella y cols., 2007]. La Fig. 2.5 muestra su estructura molecular. Como se puede observar, dependiendo del pH del medio la molécula adquirirá carga positiva debido a la protonización de sus grupos amino, de modo similar a lo esperable en la molécula de DOX (Fig. 2.4).

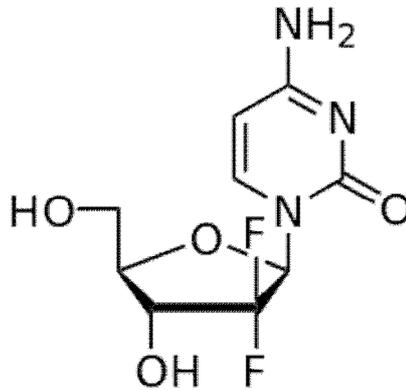


Fig. 2.5. Estructura química de la gemcitabina.

2.6. Empleo de nanopartículas magnéticas en el transporte y liberación de fármacos.

2.6.1 Generalidades

Los métodos de síntesis de coloides para el transporte de fármacos presentan una gran variedad y versatilidad que determinan un gran potencial para el diseño de nuevas formas de dosificación que mejoren la farmacoterapia actual. Existen cada vez más materiales propuestos y estrategias que permiten su modificación para mejorar el transporte y la liberación controlada de principios activos [Arias, 2011; Arruebo y cols., 2007; Fischery Chan, 2007; Grainger, 2009; Lynch y Dawson, 2008; Service, 2005; Shubayev y cols., 2009]. Uno de los sistemas que más interesantes posibilidades ofrecen con estos fines son los coloides magnéticos. De forma general, este tipo de nanopartículas está constituido por un núcleo magnético (principalmente de óxido de hierro o hierro como en este trabajo) englobado en una matriz orgánica (p. ej., polímero, polisacárido o almidón) o inorgánicos (p. ej., sílice). Se pueden modificar fácilmente las características del coloide 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. En biomedicina, los coloides magnéticos basados en nanopartículas superparamagnéticas presentan numerosas posibilidades, 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 T1* y T2*; *ii)* transportar y acumular el fármaco vehiculizado en el tejido 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.

Con relación a la segunda aplicación mencionada, diversos estudios han demostrado que estos nanosistemas modifican eficientemente las propiedades farmacocinéticas de los principios activos y su biodistribución en el organismo. Asimismo, 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 investigaciones iniciales 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 demostró 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). Posteriormente, se estudió la eficacia de los coloides magnéticos en la potenciación de la acción antitumoral de epirrubicina en ratas con carcinoma de colon e hipernefronas. 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].

Se realizó el primer ensayo en fase I con este tipo de materiales en pacientes con procesos oncológicos avanzados y sin respuesta a la quimioterapia estándar [Lübbe y cols., 1996a]. Este estudio fue pionero 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. Esta investigación puso de manifiesto la necesidad 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. La observación de una reducción significativa en el volumen del tumor en 4 de los 14 pacientes incluidos en el ensayo fue el resultado más interesante de este trabajo. Desde ese momento, muchas investigaciones se centraron en establecer una "prueba de concepto" de la acumulación del coloide magnético en la masa cancerosa [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 7T.

La selectividad de acción del fármaco vehiculizado se puede justificar, 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].

Además de generar el efecto de hipertermia ya comentado, la utilización de campos magnéticos alternos permite, 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 $\approx 42^{\circ}\text{C}$, 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 electrostérico si la cadena de polímero está cargada. Actualmente, 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]:

- El utilizar intensos campos magnéticos para asegurar la perfecta acumulación del coloide magnético en el lugar diana.
- No existen suficientes estudios que aseguren su fácil producción a gran escala, su estabilidad y los beneficios económicos asociados a este tipo de terapia.
- No hay seguridad absoluta de que los más que prometedores resultados logrados en animales pequeños (ratones, ratas, conejos, etc.) sean extrapolables al ser humano.
- Debe todavía asegurarse completamente el destino biológico del fármaco mediante el perfecto control de los procesos de liberación.

• Podrían agregarse en el torrente sanguíneo las nanopartículas magnéticas, 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.

2.6.2 Contribución propuesta en este trabajo

En el presente trabajo se aporta información al campo de la utilización de NPMs en la liberación de fármacos en aspectos que, resumidamente, pueden enunciarse como sigue:

- ✓ Se emplean por primera vez nanopartículas de hierro y de hierro/magnetita como núcleos de nanoestructuras magnéticas de transporte y liberación de antitumorales 5-FU y DOX.
- ✓ Se ensaya sistemáticamente su capacidad de carga de fármaco utilizando métodos electrocinéticos.
- ✓ Se diseñan sistemas recubiertos que muestran elevada compatibilidad con células sanguíneas.
- ✓ Se utiliza carbopol y quitosán, dos polímeros extremadamente biocompatibles como sustrato para el transporte de gemcitabina.

2.7. Toxicidad

En el diseño de una nanoplataforma antitumoral, uno de los aspectos más importantes es garantizar su biocompatibilidad. Es por eso que se necesitan muchos estudios sobre la toxicidad de los materiales utilizados 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].

Las propiedades físicoquímicas deben de ser adecuadas en cuanto a geometría (forma y tamaño), y estructura y composición química en los sistemas coloidales

biocompatibles [Maa β en 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].

El organismo debe eliminar los productos de biodegradación en el menor tiempo posible. Se debe vigilar 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].

El análisis de la actividad antitumoral de estas nanoplataformas es el principal objetivo en la mayoría de los estudios que se realizan. Existen actualmente insuficientes estudios sobre las reacciones de toxicidad asociadas a estos nanosistemas en el organismo. Son necesarios una gran cantidad de estudios 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].

3.

Síntesis y caracterización de partículas compuestas de núcleo magnético y recubrimiento polimérico

Se describen en este capítulo los métodos empleados en la preparación de las partículas compuestas que posteriormente se usaron como vehículos para el transporte y liberación de los fármacos utilizados.

3.1. Introducción

A medida que la investigación en lo que se ha dado en llamar *nanomedicina* ha avanzado en las últimas décadas, en terrenos tales como agentes de contraste en MRI, transportadores de fármacos, o herramientas de tratamiento y diagnóstico del cáncer, se ha impuesto la necesidad de mejorar el diseño de las nanoestructuras que mejor se adaptan a cada aplicación particular [Perrault y cols., 2009]. Por ello, es de interés considerar innovaciones en diseño, intentando obtener el máximo de eficiencia en el vehículo de transporte de fármacos que pretendemos diseñar. En nuestro caso, se pretende utilizar hierro y/o magnetita nanométricos como núcleo magnético, de acuerdo con los objetivos descritos; en el caso del hierro, nuestra hipótesis es que la nanoestructura así obtenida debe presentar una imanación superior a la magnetita o maghemita normalmente utilizadas, participando además de todas sus ventajas, mencionadas en el capítulo anterior. Hemos sintetizado tres tipos de partículas:

- ✓ En el que llamaremos diseño I el hierro resultante adquiere una capa de pasivación de magnetita de manera espontánea.
- ✓ El diseño II produce directamente partículas mixtas hierro/magnetita.
- ✓ Dado que la magnetita es un material magnético ampliamente utilizado en este campo, la hemos utilizado también a modo de comparación por su reconocida aplicabilidad. Este tipo de NPMs nos ha permitido realizar un estudio directo con células tumorales.
- ✓ Finalmente, en algunos experimentos hemos empleado partículas de hierro disponibles comercialmente; aunque el fabricante no da detalles, creemos que el recubrimiento que limita la oxidación del hierro en medio acuoso es una capa de carbono.

3.2. Procedimientos de síntesis de nanopartículas

3.2.1 Hierro/magnetita

El punto de partida de nuestras preparaciones es el pentacarbonilo de hierro $\text{Fe}(\text{CO})_5$. Este compuesto se forma por la reacción de partículas finas de hierro con

monóxido de carbono, y se trata de uno de los carbonilos metálicos donde el CO es el único complejo ligado con el hierro. En condiciones normales es un líquido de color amarillento con un olor acre. La mayoría de carbonilos metálicos tienen 18 electrones de valencia, y el $\text{Fe}(\text{CO})_5$ se ajusta a este patrón con ocho electrones de valencia en el hierro y cinco pares de electrones proporcionados por los ligandos de CO. Por otra parte es uno de los complejos metálicos más frecuentes en estado líquido, adoptando una estructura trigonal bi-piramidal con el átomo de Fe rodeado por cinco ligandos de CO: tres en posiciones ecuatoriales y dos enlaces axiales consolidados. Los enlaces Fe-C-O son todos lineales.

En ambos diseños se trata de un método de descomposición térmica a bajas temperaturas. Esta descomposición, llevada a cabo en presencia de tensioactivos y/o polímeros, permite la obtención de NPs metálicas muy bien controladas y con una distribución muy estrecha del tamaño de la partícula, buena cristalinidad y sin presencia de agregados (la capa adsorbida que recubre las NPs impide su agregación). La forma y el tamaño de las NPs depende de la velocidad de calentamiento, la temperatura de reacción (habitualmente mayor que la temperatura de ebullición del disolvente) y la relación polímero-surfactante en la reacción. A continuación se describen los diseños (protocolos) utilizados:

Diseño I

La síntesis está basada el protocolo desarrollado por [Shao y cols., 2005], que consta de las siguientes etapas. En un matraz de tres bocas de 500 mL, se mezclaron 90 mL de queroseno (0.8 g/mL, Sigma-Aldrich, USA) como solvente y 1.023 g de oleilamina (Sigma-Aldrich) como surfactante. El sistema se mantuvo durante 10 min con borboteo de N_2 con el fin de eliminar cualquier resto de O_2 . Posteriormente se calentó en una manta eléctrica hasta su temperatura de reacción (160° C, temperatura medida en el líquido con un termómetro digital Crison con sonda de platino), en cuyo momento se añadieron 3.02 mL de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ (Sigma-Aldrich), manteniéndose la reacción durante 10 min. Durante todo el proceso experimental, se siguió borboteando N_2 al sistema, mientras dos de las bocas del matraz se mantenían refrigeradas mediante dos serpentines condensadores de agua, conectados a un baño termostático. Después de terminar la reacción, las nanopartículas magnéticas fueron

lavadas en n-hexano (Sigma-Aldrich) y acetona (Panreac, España) para eliminar cualquier remanente del agente tensioactivo.

Las nanopartículas obtenidas directamente de la síntesis no son estables en medio acuoso, dado que el tensioactivo utilizado, oleilamina, es soluble solo en disolventes orgánicos. Ello hizo necesario intercambiar estas moléculas superficiales por otras más adecuadas para disolución acuosa. Con este fin, las NPs estuvieron 48 h en citrato sódico tribásico 1 mM ($\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich) para sustituir el tensioactivo hidrofóbico por citrato, lo que permitió dispersar las partículas en agua (Milli-Q Academic, Millipore, Francia) sin perder sus propiedades magnéticas y formando una suspensión estable.

Diseño II

La síntesis es una modificación del protocolo del Diseño I planteada por [Peng y cols., 2008]. En ella hay dos modificaciones importantes en relación al Diseño I. Por una parte, el empleo de octadeceno (en vez de queroseno) como solvente; y por otro la oxidación controlada de las NPs resultantes con el fin de obtener una capa de magnetita (Fe_3O_4) que recubra al núcleo de hierro. Debe recordarse que el hierro metal es extremadamente reactivo y forma óxidos de manera rápida en presencia de un medio oxidante. Si la capa de óxido que se forma es no magnética (con frecuencia, hematites, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), se producirá una importante reducción de la respuesta magnética de nuestras partículas. Aunque los datos que ofreceremos después muestran que esto no ocurre con el Diseño I, preferimos asegurar el resultado utilizando un procedimiento que asegure la formación de la capa externa de material magnético. Recuérdese que la magnetita tiene una imanación de saturación menor que la del hierro (485 kA/m frente a 1710 kA/m), pero aun así notable y aplicable en procedimientos de transporte de fármacos, como ya se ha descrito en esta Memoria.

La síntesis se llevó a cabo utilizando los reactivos comerciales mencionados antes, excepto que el disolvente fue, como se ha dicho, 1-octadeceno (ODE, Sigma-Aldrich, 90%). En un matraz de tres bocas de 500 ml se mezclaron 20 ml de ODE y 0.3 ml de oleilamina (0.9 mmol) bajo un borboteo constante de N_2 para eliminar cualquier resto de O_2 . El matraz se calentó en una manta térmica hasta alcanzar los

120 °C y se mantuvo en esa temperatura durante 30 min. Pasado ese tiempo la temperatura se elevó a 180 °C, siempre en presencia de N₂, se añadieron 0.7 ml de Fe(CO)₅ (5.2 mmol). La mezcla se mantuvo a 180 °C durante 20 minutos antes de dejarla enfriar a temperatura ambiente. El sobrenadante de la reacción se decantó y las nanopartículas resultantes se lavaron con hexano (3 ciclos de lavado con 15 ml de hexano) en una tienda de N₂. El producto se concentró en 15 ml y fue precipitado mediante la adición de etanol absoluto (25 ml). Tras repetir este procedimiento, el producto purificado se dispersó en 15 ml de hexano bajo una atmósfera de N₂ para su almacenamiento a largo plazo en un recipiente de vidrio. Antes de emplear las nanopartículas en los experimentos se mantuvieron durante 48 h en citrato sódico tribásico 1mM ($\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich) con objeto de sustituir el tensioactivo hidrofóbico oleilamina por citrato, lo que permitió dispersar las partículas en agua, como se describió para el Diseño I.

Magnetita

Las partículas de magnetita se sintetizaron de acuerdo con el método de coprecipitación de Massart (1981) [Viota et al., 2013]: de modo resumido, el procedimiento consiste sencillamente en mezclar 40 mL de una disolución 1 M de FeCl₃ y 10 mL de una de FeCl₂ en HCl (2 mol/L de cloruro ferroso en 2 mol/L HCl) con 500 mL de una 0.7 M de amonio. En segundos se produce la formación de un precipitado negro, que se mantiene en agitación ligera en el medio de síntesis durante 20 min. Después, se limpia repetidamente mediante repetidamente mediante decantación magnética y redispersión en agua Milli-Q.

3.2.2. Recubrimiento con Fe₃O₄ mediante oxidación controlada

Se empezó por añadir 15 ml de ODE al matraz en presencia constante de N₂, y calentando el conjunto en una manta eléctrica hasta alcanzar los 130 °C, manteniendo la muestra a dicha temperatura durante 30 min. A continuación se añadieron mediante una jeringa las nanopartículas de Fe obtenidas anteriormente (80 mg dispersados en 2 ml de hexano, nunca expuestas al aire) y se calentó la muestra durante 2 horas. Pasado ese tiempo la solución se calentó hasta los 250 °C durante 30

minutos; durante todo el proceso el flujo de N₂ fue constante. Una vez concluido el procedimiento se eliminó la fuente de calor y la solución obtenida, de color negro-marrón, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se añadió isopropanol (25 ml) y la mezcla se centrifugó (8000 rpm, 10 minutos). El precipitado se dispersó en hexano y posteriormente en etanol. El producto purificado se recubrió de citrato, como se describió antes.

3.2.3. Recubrimiento con poli(etilenglicol)

Después de la síntesis, las NPs sin modificar son estables tanto en soluciones con pH alto como bajo, pero su uso *in vivo* requiere que sean recubiertas. Como se ha mencionado, estos recubrimientos superficiales, que por lo general son pequeñas moléculas orgánicas y polímeros, tienen varias funciones: (1) Protegen contra la aglomeración de los núcleos de óxido de hierro, (2) proporcionan el espacio químico necesario para la unión de las moléculas del fármaco y ligandos, y, finalmente, (3) limitan las interacciones inespecíficas con otras líneas celulares. Por otra parte, los recubrimientos poliméricos han sido diseñados para mejorar la farmacocinética de las NPs, favorecer la liberación endosómica, y regular los comportamientos de liberación de los fármacos. Diversos grupos de polímeros han sido investigados para cumplir con estas funciones de revestimiento, incluyendo PEG [Butterworth y cols., 2001; Chen y cols., 2008; Herve y cols., 2008; Koller y cols., 2004; Park y cols., 2008; Sun y cols., 2008; Xie y cols., 2007; Zhang y cols., 2002], dextrano [Bulte y cols., 1993; Molday y cols., 1982; Mornet y cols., 2005; Shen y cols., 1993], chitosan [Donadel y cols., 2008; Ho y cols., 2008; Kim y cols., 2007; Sasaki y cols., 2008], PEI [Duan y cols., 2008; McBain y cols., 2008; Steitz y cols., 2007] y fosfolípidos [Duan y cols., 2008; McBain y cols., 2008; Plassat y cols., 2007; Shtykova y cols., 2007].

El recubrimiento de las NPs se puede lograr mediante diversos procedimientos, incluyendo recubrimiento *in situ*, adsorción e injerto post-síntesis [Laurent y cols., 2008]. La modificación *in situ* y post-síntesis, con polisacáridos y copolímeros, genera recubrimientos que de manera uniforme encapsulan a los núcleos magnéticos. Por otra parte, los polímeros injertados al final (por ejemplo, PEG) se anclan a la superficie de las NPs por los grupos terminales del polímero. Liposomas y micelas crean una capa alrededor del núcleo de las NPs. Estas

estructuras conservan regiones hidrofóbicas, las cuales se pueden utilizar para la encapsulación de medicamentos. Cada una de ellas presenta determinadas ventajas y desventajas dependiendo del polímero y el fármaco empleados.

El polietilenglicol (Fig. 3.1) es un poliéter sintético lineal biocompatible que puede ser preparado en una amplia gama de tamaños y de grupos funcionales terminales [Mahato., 2005]. Se han utilizado distintas variantes de este polímero en clínica durante décadas como excipientes en formulaciones farmacéuticas aprobadas por la FDA [Fuertges y Abuchowski., 1990]. En fluidos biológicos son moléculas neutras e hidrofílicas, que ayudan a mejorar la dispersión y el tiempo de circulación en sangre de las NPs a las cuales están ancladas [Illum y cols., 2001; Kim y cols., 2001; Kohler y cols., 2004; Moghimi y cols., 2001; Tiefenauer y cols., 1996; Xie y cols., 2007; Zhang y cols., 2002]. Las NPs recubiertas con PEG no son fácilmente reconocidas por el sistema reticuloendotelial y esta característica las hace ideales para su empleo en células diana específicas después de su modificación con ligandos [Chen y cols., 2008; Harris y Chess., 2003; Sun y cols., 2008a,b;].

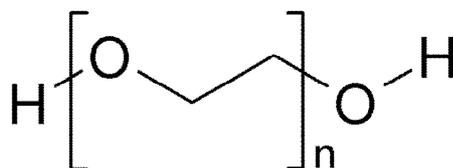


Fig. 3.1. Cadena de polietilenglicol.

En tamaños por debajo de los 100 kDa los polímeros de PEG se consideran anfifílicos y son solubles en agua, así como en muchos disolventes orgánicos (incluyendo cloruro de metileno, etanol, tolueno, acetona y cloroformo). Esto permite al PEG ensamblarse en la superficie de las NPs usando cualquier disolvente acuoso u orgánico. Por ejemplo, Lutz y cols. [Lutz y cols., 2006] demostraron la existencia de un recubrimiento *in situ* de PEG en un precipitado de NPs en condiciones acuosas, mientras que Kohler y cols. [Kohler y cols., 2004] injertaron PEG a NPs a través de un grupo silano en el disolvente orgánico tolueno.

Metodología

El recubrimiento de NPs de hierro con PEG se hizo adecuando el protocolo de Chatterjee *y cols.*, [Chatterjee *y cols.*, 2005] y consta de dos fases:

1. Preparación de la fase acuosa.

En 1 mL de agua destilada se dispersaron 0.25 g de PEG (Sigma-Aldrich; se probaron recubrimientos con pesos moleculares 200, 400, 2000 y 35000) y se añadieron 0.08 g de las nanopartículas (30% del peso del polímero). Esta mezcla se sometió a ultrasonidos durante 7 min.

2. Preparación de la fase oleosa.

30 ml de n-hexano (Sigma-Aldrich) se mezclaron con 10 mL de aceite mineral y 0.05 mL de sorbitansesquioleato (0.989 g/mL, Sigma).

3. Mezcla de fases

Posteriormente ambas fases se mezclaron mientras se sometían a ultrasonidos (1-5 min). Se añadieron a la emulsión 10 mL de glutaraldehído (grado II, 25 %, Sigma-Aldrich) y se mezclaron durante 2 h. Se separaron las fases del producto terminado y las NPs recubiertas se lavaron con agua destilada y acetona. Para eliminar cualquier remanente de glutaraldehído libre en la solución se volvieron a lavar en agua destilada.

3.2.4. Recubrimiento de magnetita con carbopol/chitosán

La preparación de complejos carbopol/magnetita se realizó añadiendo 1 mL de suspensión de nanomagnetita en agua a una disolución acuosa de C-934 o C-941 (Noveon Inc., USA) conteniendo en cada caso 1 g/L de polímero. Para facilitar la dispersión se empleó un vórtex a 3000 rpm (Heidolph DiAx 900, Alemania) y se ajustó el pH a 3, para así evitar la elevada viscosidad que presentan las soluciones de Carbopol al neutralizar. Dadas las estructuras moleculares de Carbopol y chitosán (Fig. 3.2), el recubrimiento con el primero dará lugar a carga neta negativa, que deja a las partículas en las mejores condiciones para aceptar una capa (de carga positiva) del segundo. El siguiente paso por tanto consistió en el recubrimiento con chitosán, para lo cual, tras la separación magnética de los agregados de magnetita/Carbopol estos se redispersaron en 2 mL de disolución y se añadieron a 1 mL de disolución de chitosán

conteniendo 1 g/L de polisacárido. El pH final se ajustó a 5.5 con el fin de favorecer la atracción electrostática entre los grupos amino del chitosán y los carboxilo del carbopol [Liu y cols., 2005]. Al final se pudo observar una considerable mejora de la estabilidad que permitió la limpieza por decantación magnética y redispersión ya mencionadas.

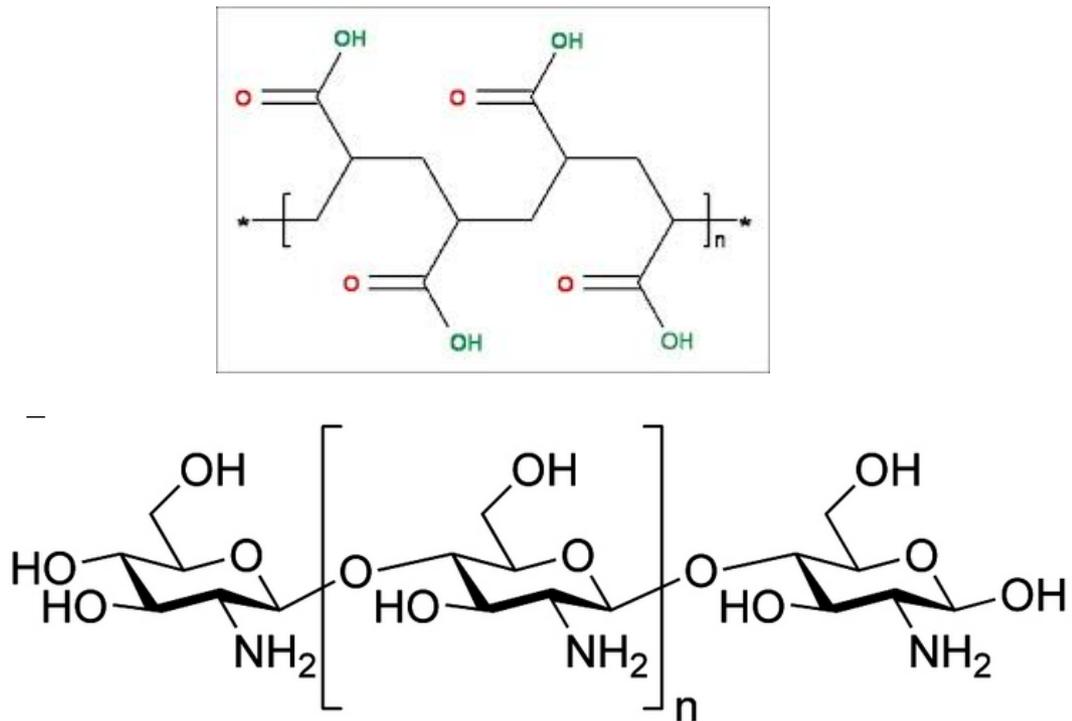


Fig. 3.2. Estructuras de Carbopol (arriba) y chitosán (abajo).

3.3. Estudio morfológico

3.3.1. Diseños I y II

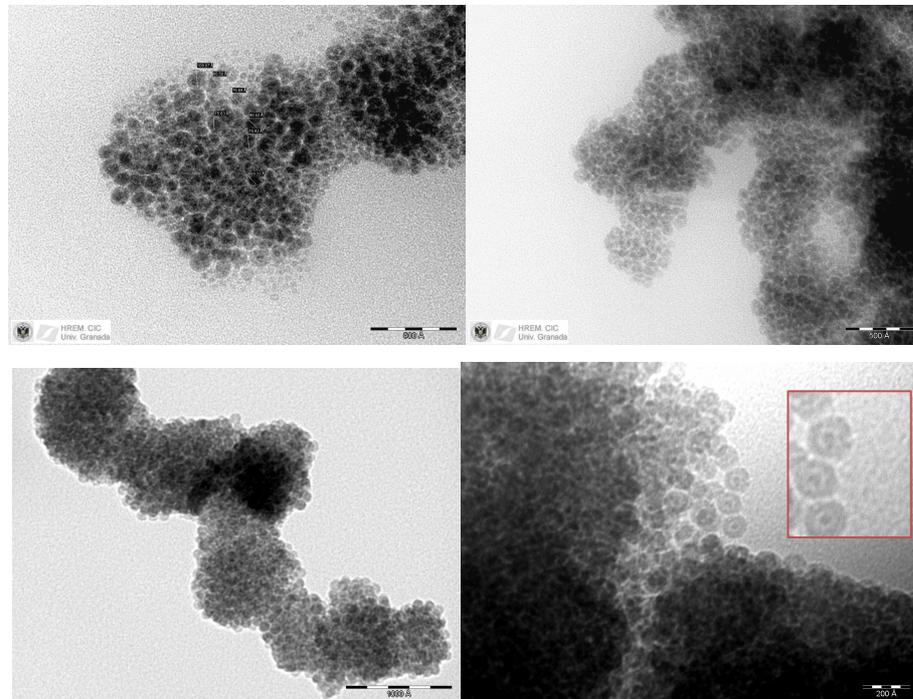


Fig. 3.3. Ejemplos de fotografías HR-TEM de las partículas de hierro según el diseño I.

La Fig. 3.3 muestra algunas de las fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución. Es clara la forma muy aproximadamente esférica de las partículas y una distribución de tamaños muy estrecha. El tamaño promedio es 12 ± 1 nm, valor obtenido mediante medidas realizadas en las fotografías, con una muestra de 100 partículas. Nótese cómo en detalle de la imagen inferior permite observar la formación de una capa alrededor del núcleo más oscuro, presumiblemente de hierro. Dicha capa debe de ser óxido de hierro, como después discutiremos.

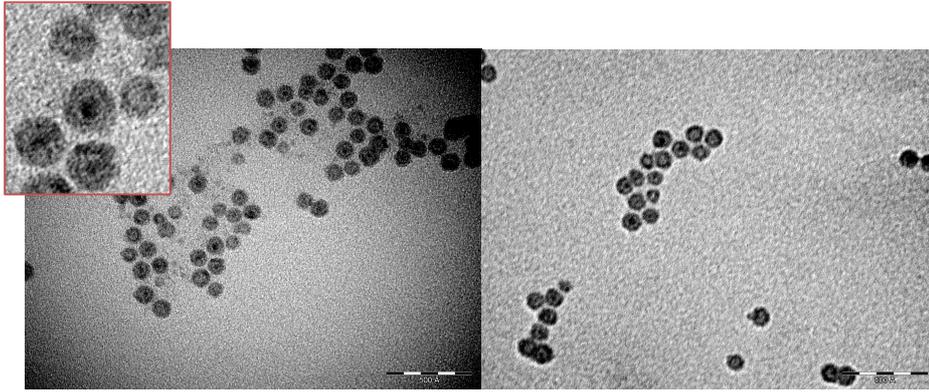


Fig. 3.4. Ejemplos de fotografías HR-TEM de las partículas de hierro/magnetita según el diseño II. Izquierda: detalle de la estructura resultante.

La existencia de esa estructura núcleo/recubrimiento es aún más notable en la Fig. 3.4, correspondiente al segundo diseño. A falta de confirmación estructural, estas imágenes confirman la formación de la capa densa de material magnético, como se perseguía. El tamaño resultante, deducido de medidas sobre las fotografías, fue de 10 ± 2 nm, con un núcleo de unos 5 nm.

3.3.2. Nanopartículas comerciales de hierro

Como se ha mencionado, la dificultad de preparación de las nanopartículas hierro/magnetita, sugirió la necesidad de ampliar nuestro estudio a partículas accesibles comercialmente. El fabricante (Nanoiron, República Checa) envió amablemente las muestras (Nanofer 25S) sin cargo. Se trata de partículas estabilizadas con un surfactante, siguiendo un método no declarado, con tamaño entre 80 y 120 nm. Aunque diseñadas para el tratamiento de suelos, encontramos muy interesante su uso en nuestro caso. La Fig. 3.5 ofrece una visión adecuada del aspecto de las partículas: nótese que las partículas no tienen forma controlada, y presentan cierto grado de aglomeración tras secarlas para la preparación microscópica.

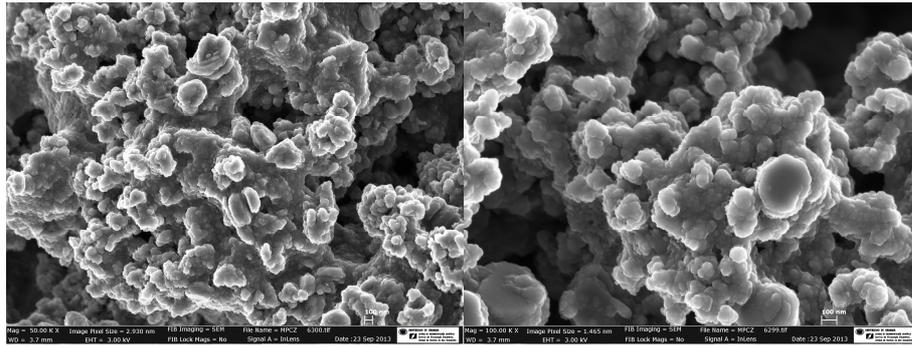


Fig. 3.4. Ejemplos de fotografías HR-TEM de las partículas de hierro Nanofer S-25.

3.3.3. Partículas compuestas: Fe/PEG

Se usó de nuevo HRTEM o FESEM para verificar que el recubrimiento se había producido y analizar la geometría de las partículas obtenidas. La Fig. 3.5 muestra algunos ejemplos, referentes a nanopartículas de hierro. Como se puede apreciar, el procedimiento seguido ha permitido obtener, como se deseaba, partículas cuya estructura consiste esencialmente en una matriz polimérica de PEG en cuyo interior se ordenan de modo aproximadamente homogéneo los núcleos de hierro. Se tienen así partículas magnéticas biocompatibles, con una elevada potencialidad como vehículos de transporte de fármacos. Nótese igualmente que el recubrimiento protege al hierro de la oxidación en el plasma y el medio extracelular, y ello además se consigue sin perder las propiedades magnéticas ni el tamaño medio adecuado: la Fig. 3.6 muestra partículas en el entorno de los 200 nm.

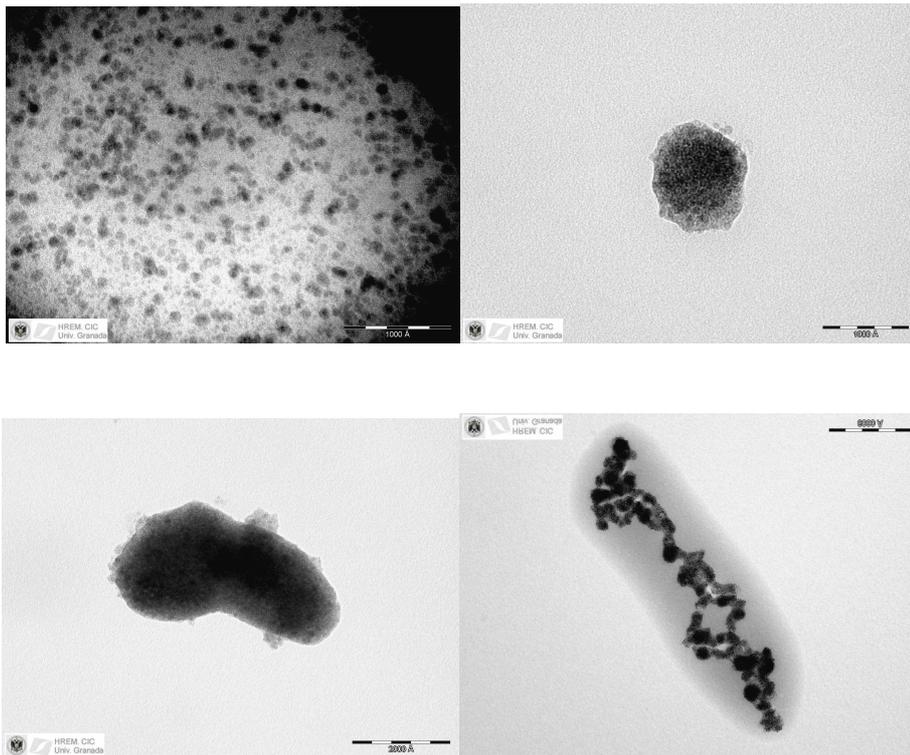


Fig. 3.6. Ejemplos de fotografías HR-TEM de las partículas de hierro/PEG 2000.

En el caso de las partículas Fe/magnetita, también se hace patente el recubrimiento de polímero, como indican las fotografías TEM y SEM de la Fig. 3.7. Como se observará, cuando se emplea el polímero de más alto peso molecular, la apariencia es más bien la de una masa de PEG que contiene las nanopartículas. Por el contrario, con PEG 400 y, sobre todo, PEG 200, el recubrimiento ocurre más bien en torno a las partículas cuya geometría permanece cuando se produce la capa de polímero.

Lo mismo puede decirse de las partículas de hierro comerciales Nanofer. Como se observará en la Fig. 3.8, los recubrimientos con PEG 200 y 400 son los de mejor calidad, en el sentido de homogeneidad de la capa y control de la geometría final por la forma y el tamaño de los núcleos y no por la masa de polímero.

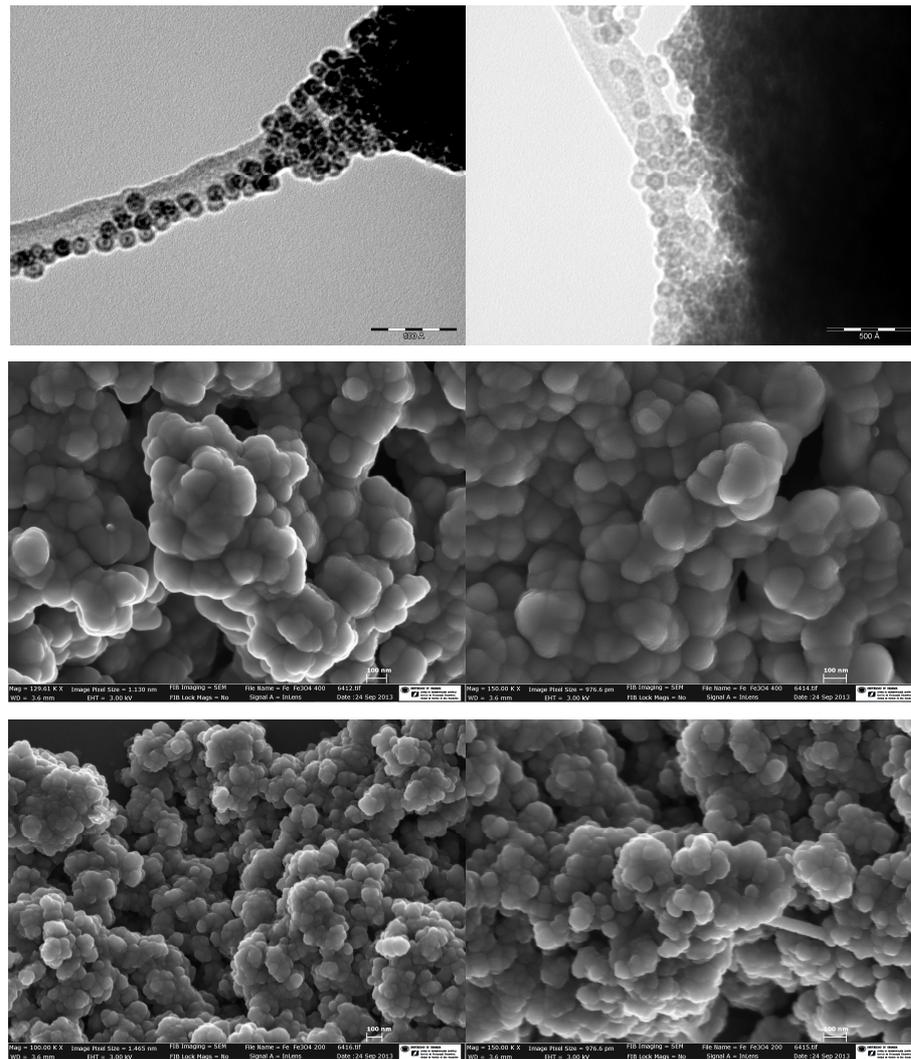


Fig. 3.7. Ejemplos de fotografías HR-TEM y FESEM de las partículas de hierro/magnetita recubiertas de PEG 2000 (arriba), PEG 400 (centro) y PEG 200 (abajo).

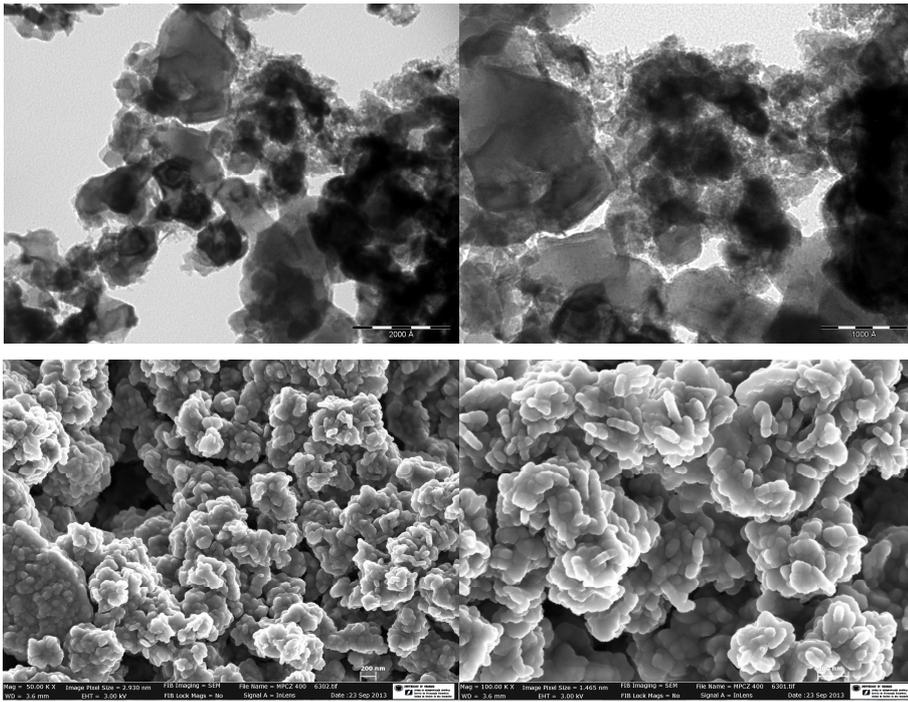


Fig. 3.8. Ejemplos de fotografías HR-TEM y FESEM de las partículas de hierro comercial Nanofer 25-S recubiertas de PEG 2000 (arriba) y PEG 400 (abajo)..

3.3.4. Magnetita/Carbopol/chitosán

La Fig. 3.9 muestra que los núcleos magnéticos quedan atrapados en una capa de la matriz polimérica. Las medidas de tamaño llevadas a cabo en el dispositivo Malvern NanoZS de Malvern Instruments (UK) indicaron que el tamaño medio de los núcleos (14 ± 3 nm) aumentó a 85 ± 9 nm tras recubrir con Carbopol 934 y a 92 ± 12 nm con C-941. El mismo tipo de medidas indicó que la capa de Chitosán induce un crecimiento aún mayor del tamaño, hasta llegar, respectivamente, a 115 ± 22 y 164 ± 23 nm.

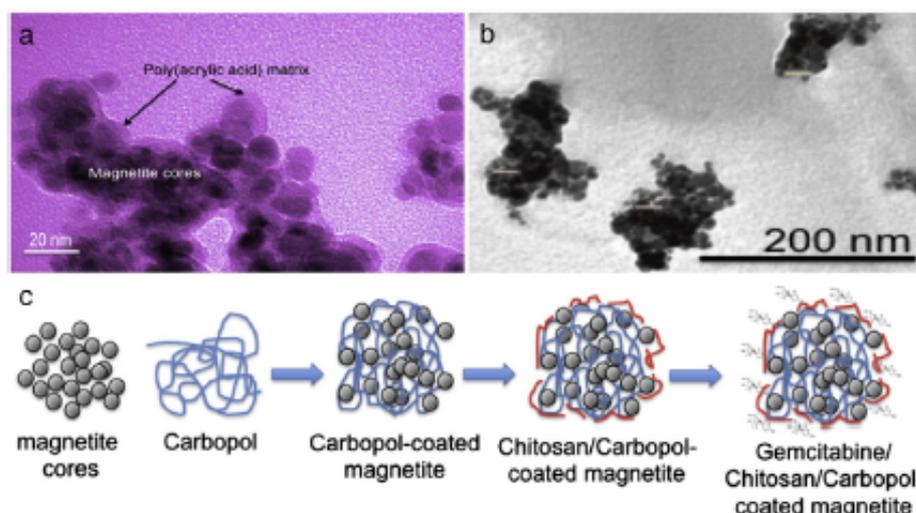


Fig. 3.9. Fotografías HRTEM de nanopartículas de magnetita/Carbopol (a) y magnetita/Carbopol 934/chitosán (b). (c): Esquema de la formación de las nanoestructuras (incluyendo la capa de fármaco adsorbida).

3.4. Difracción de rayos X

Se partía en este caso de la hipótesis de que tanto el hierro del diseño I como el del diseño II (y en este material, también la cubierta de magnetita) serían cristalinos, y podrían identificarse mediante difracción de rayos X por el método del polvo, obtenido a partir de muestras desecadas. Sin embargo, tanto la Fig. 3.10 como la 3.11 (diseños I y II, respectivamente) demuestran que el hierro del núcleo es prácticamente amorfo, dado que no se muestran los máximos característicos del hierro α , que se esperarían en las posiciones mostradas en la Fig. 3.10. La razón de este comportamiento no se conoce, pero probablemente se deba a que la temperatura de las síntesis sea demasiado alta como para permitir una ordenación cristalina de largo alcance.

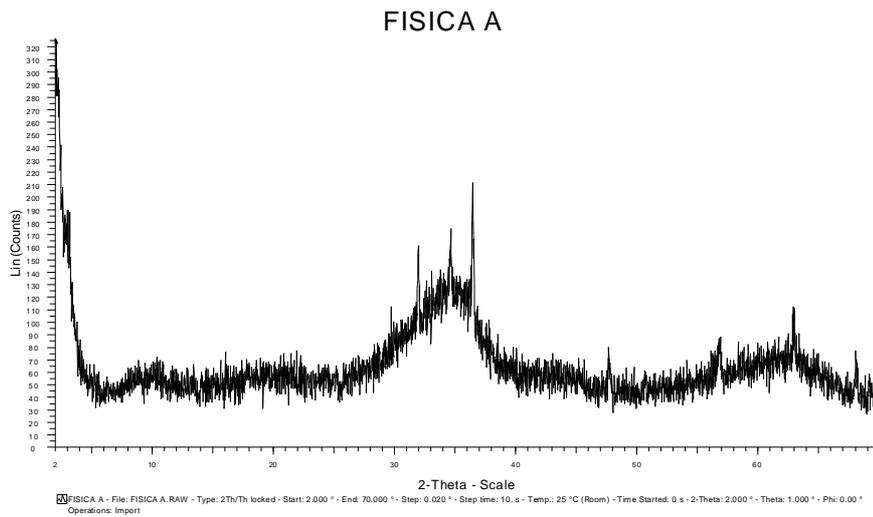


Fig. 3.10. Diagrama de difracción de rayos X de la muestra de nanopartículas de Fe^0 . Se han incluido las posiciones de los máximos esperados para $\text{Fe-}\alpha$.

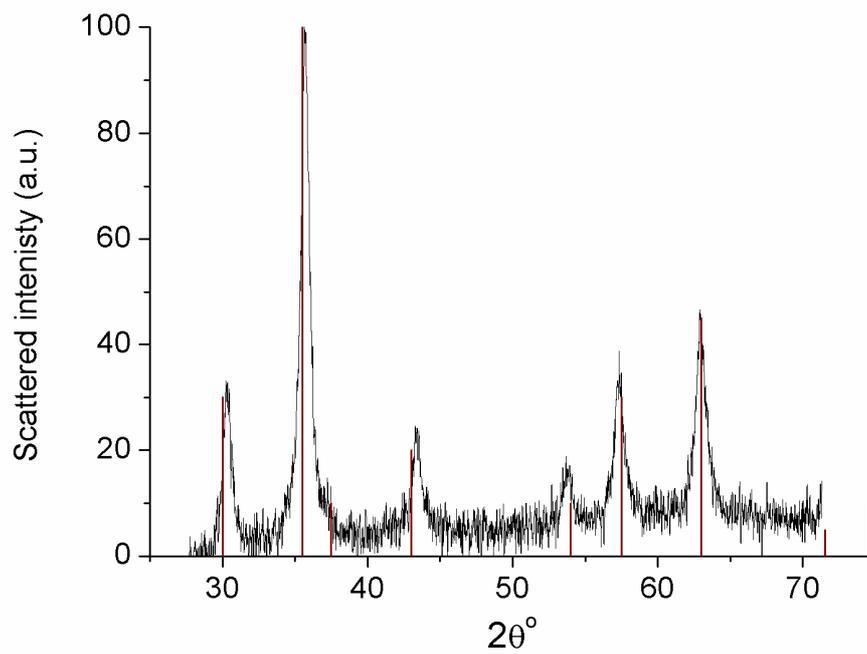


Fig. 3.11. Como Fig. 3.10, pero para las nanopartículas del diseño II. Se incluyen los máximos tabulados para magnetita.

En el diseño II, sin embargo, se aprecia claramente la cristalinidad, y, además, se trata de los máximos característicos de la magnetita. Este hecho es importante, dado que demuestra que se consigue por el método aplicado que la capa de óxido sea precisamente magnetita, optimizando así la constitución de las partículas.

3.5. Propiedades magnéticas

3.5.1 Generalidades

El magnetismo de una muestra material está asociado ante todo a los momentos magnéticos netos de sus átomos individuales, determinados por el momento magnético total \mathbf{J} del átomo. En el caso de los materiales que nos interesan, el campo cristalino produce quenching o bloqueo del momento angular orbital, dejando por tanto al espín \mathbf{S} toda la contribución al momento magnético. Dependiendo de la existencia o no de momento magnético neto y de la posible interacción entre momentos vecinos se podrán producir distintos modos generales de comportamiento magnético macroscópico, todas ellas bien conocidas: *diamagnetismo*, *paramagnetismo* y *ferromagnetismo* (con sus variedades asociadas, *antiferromagnetismo* y *ferrimagnetismo*) (v. detalles en Callister, 1996; Ashcroft y Mermin., 1976).

Este último caso es el que nos interesa. La interacción de canje entre ellos produce una tendencia a la alineación paralela de momentos vecinos, base del ferromagnetismo. Cabe recordar que la mutua alineación de los espines se presenta en volúmenes relativamente grandes del cristal denominados *dominios* y que los materiales ferromagnéticos tienen una susceptibilidad magnética χ positiva, muy grande y que depende del campo aplicado. En el caso del hierro metal, cuya última capa está constituida por electrones d ($3d^64s^2$), las reglas de suma de momentos angulares arrojan un valor de 4 magnetones de Bohr (el magnetón de Bohr es el momento magnético de espín de electrón libre, dado por $\mu_B = e\hbar / 2m_e = 9.27 \times 10^{-24}$ J/T) por átomo libre. Sin embargo, los datos experimentales indican que dicho valor es $2.2 \mu_B$; se da en este caso el fenómeno de *magnetismo debido a electrones itinerantes* (Ashcroft y Mermin., 1976), consistente en la separación de los electrones de Bloch en dos bandas de distinta energía ($3d^\uparrow$ y $3d^\downarrow$). Como consecuencia, el número de electrones $3d$ con espines \downarrow y \uparrow es diferente, y de

aquí la imanación espontánea. El cálculo indica que en el caso del hierro, de los 8 electrones de conducción 4.8 van a $3d^{\uparrow}$ y 2.6 a $3d^{\downarrow}$; los restantes 0.6 van a $4s^{\uparrow}$ y $4s^{\downarrow}$.

Si el canje produce alineación antiparalela se tienen los materiales *antiferromagnético ferrimagnéticos*, caso del otro material de interés, constituyente de nuestras partículas, la magnetita. Esta ferrita tiene una fórmula química que corresponde a la mezcla de los óxidos de hierro (II) y (III): FeOFe_2O_3 . Los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} tienen un momento magnético neto de 5.4 y 5.9 magnetones de Bohr, pero en este caso, la estructura cristalina y el modo en que se produce el canje determinan el momento neto: las ferritas pertenecen a la familia de estructuras de la *espinela* (MgAl_2O_4), en la que los oxígenos forman una red fcc, con los iones metálicos en huecos tetraédricos y octaédricos (16 y 8, respectivamente). En la magnetita (espinela inversa), los iones Fe^{2+} se sitúan en posiciones O y los Fe^{3+} se distribuyen por igual entre T y O, es decir:

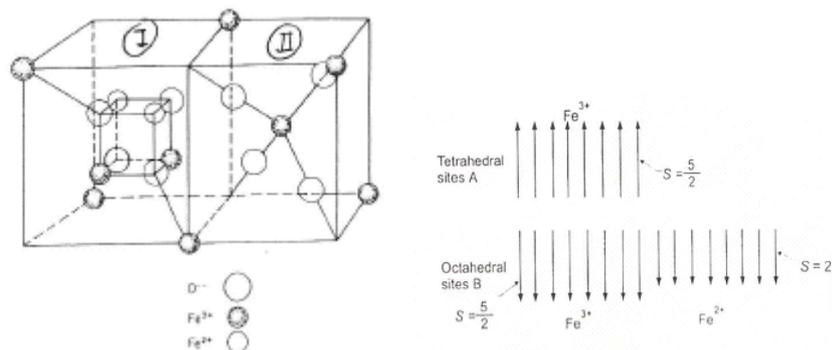
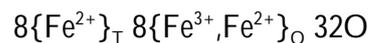


Fig. 3.12. Estructura cristalina y distribución de momentos magnéticos en la magnetita.

Tratándose de sólidos esencialmente iónicos, podríamos esperar que la imanación de saturación se calculara a partir del número de espines no apareados de los iones. Por ejemplo, en la magnetita esperaríamos (Fig. 3.12):



TOTAL: $14\mu_B$ por molécula

En realidad, los datos experimentales indican $4\mu_B$ por molécula, es decir, como si solo los divalentes contribuyeran a la imanación. Puede darse una explicación a este hecho admitiendo que en las espinelas inversas las dos sub redes de Fe^{3+} se acoplan antiferromagnéticamente entre sí (mediante supercanje a través de los oxígenos), dejando solo la contribución de los divalentes, como se indica en la Figura.

A ello se añade que los materiales de recubrimiento y las estrategias de inmovilización influyen en las propiedades magnéticas de las nanopartículas de diferentes maneras. Varios estudios han revelado que el espesor del recubrimiento y la hidrofobicidad pueden alterar de forma drástica las propiedades magnéticas [Arias y cols., 2001 y Arias, 2003]. Comprobaremos que este hecho se presenta también con nuestras muestras.

Tanto el ferromagnetismo como el ferrimagnetismo de muestras de tamaño suficiente presentan un comportamiento característico en cuanto a la relación imanación **M**-intensidad de campo **H**. A temperaturas inferiores a la temperatura de Curie cualquier material ferromagnético o ferrimagnético está formado por pequeñas regiones tridimensionales en las que todos los momentos magnéticos se encuentran alineados en la misma dirección [Callister, 1996; Mercouroff, 1969]. Cada una de estas regiones está magnetizada hasta la saturación y se denominan dominios. La dirección de imanación de los dominios adyacentes cambia gradualmente a través de las paredes de dominio. Debido al movimiento de los límites de dominio conforme se aplica el campo **H** los dominios cambian de forma y tamaño. La representación esquemática de las distribuciones típicas de los dominios en varias fases de magnetización puede verse en la Fig. 3.13. En un principio, la orientación aleatoria de los momentos de los dominios constituyentes hace que no exista una inducción neta **B** (o imanación no nula **M**); pero, conforme un campo externo es aplicado, aquellos dominios cuya orientación es favorable al campo aplicado crecerán a expensas de aquellos que no están orientados o alineados con él. Si se continúa aumentando la intensidad del campo se llegará a un punto en el que la muestra macroscópica tendrá un solo dominio, que estará casi alineado con el campo en su totalidad. Cuando este dominio gira y se orienta con el campo **H** entonces se llegará a la saturación, como puede verse en la figura (punto S). A partir de dicho punto y a medida que disminuye

el campo \mathbf{H} , se produce un efecto de histéresis, ya que la curva no invierte su camino original. Sucede entonces que el campo \mathbf{B} disminuye más lentamente con respecto al campo aplicado \mathbf{H} , retrasándose con respecto a éste. Existe un campo residual de \mathbf{B} (punto R de la curva) cuando el campo \mathbf{H} es cero, que se conoce como remanencia o densidad de flujo remanente, B_r , y es por ello que incluso en ausencia de un campo externo el material permanece imanado.

En el caso de los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos la imanación (M) [o la densidad de flujo (B)] y la intensidad del campo magnético (H) no son proporcionales. Como se muestra en la Fig. 3.13, la imanación M varía en función de H si el material está inicialmente no imanado.

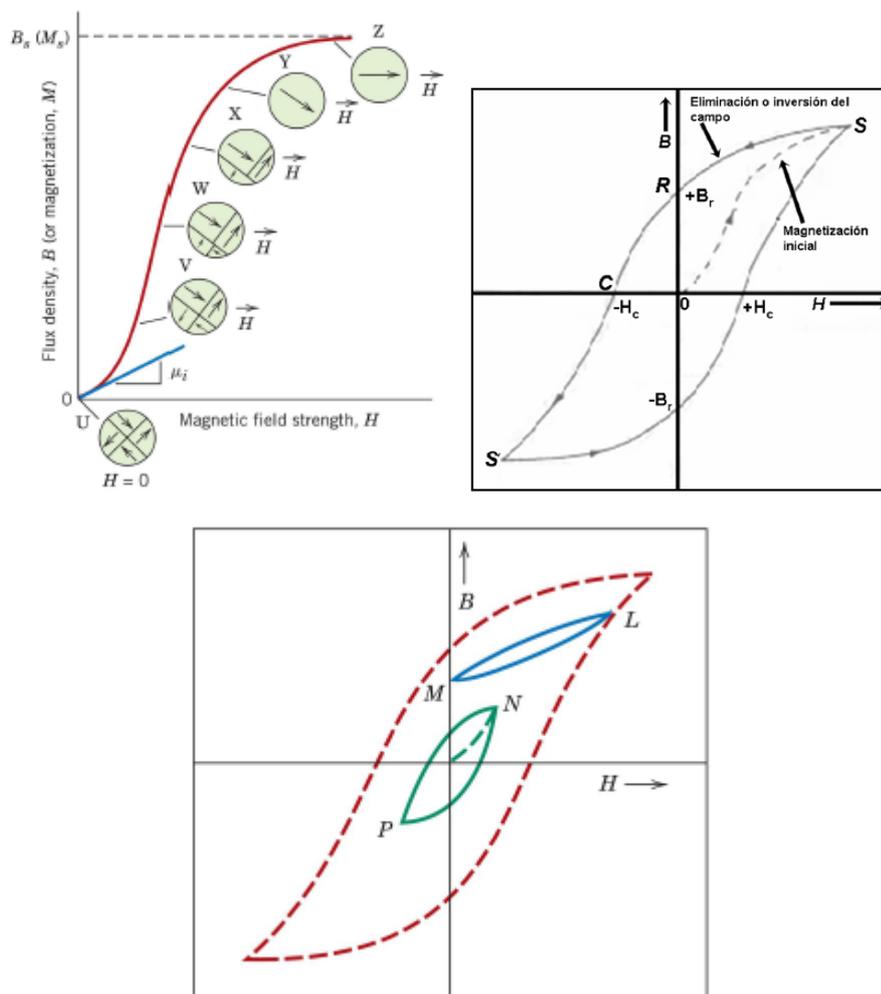


Fig. 3.13. Curvas de imanación y evolución de dominios en un ferromagnético.

3.5.2. Superparamagnetismo

Se trata de un comportamiento magnético muy característico en muestras de materiales ferromagnéticos o ferrimagnéticos de tamaño de partícula suficientemente pequeño. El diámetro crítico por debajo del cual se produce este comportamiento depende del material y de su geometría, pero su valor típico está en torno a los 10 nm [Qiao y cols., 2009]. Para estos tamaños es energéticamente favorable que las partículas solo contengan un dominio magnético, desapareciendo las paredes de dominio y dando así nombre a estos materiales: *monodominio*. La Fig. 3.14 lo ilustra. Conviene hacer notar que no todas las partículas monodominio son superparamagnéticas: si el tamaño del cristalito crece, el tiempo de relajación de Neel crece exponencialmente con el cubo de dicho tamaño, de modo que podría ser de años, lo que significa que las partículas durante el tiempo de la medida aparecen magnetizadas y con coercitividad.

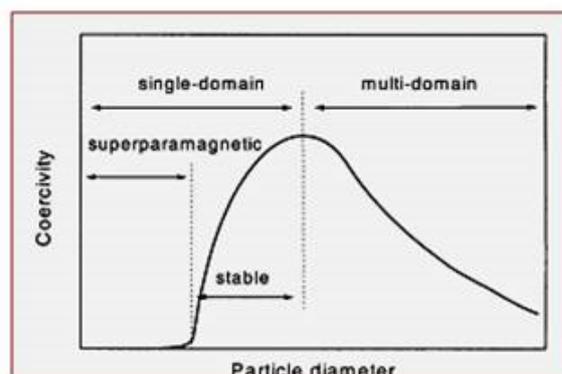
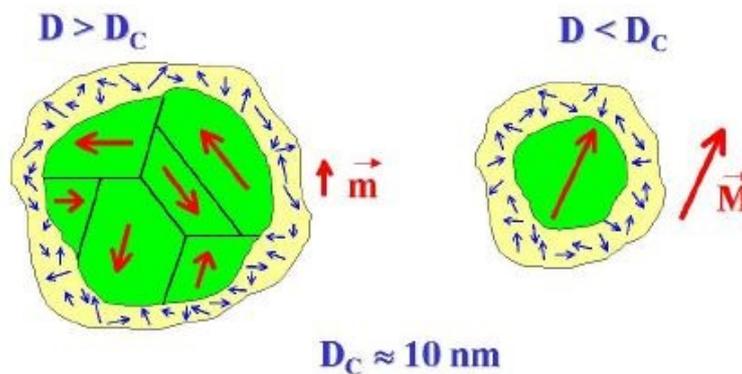


Fig. 3.14. Arriba: Esquema de la estructura magnética de partículas multi- y mono-dominio. Abajo: Coercitividad (o campo coercitivo) en función del tamaño..

A pesar de este pequeño tamaño, el número de momentos magnéticos atómicos contenidos en el volumen de una partícula monodominio es muy elevado (en torno a 10^4), por lo que el momento magnético total es muy elevado. Nótese, sin embargo, que la imanación de la nanopartícula puede cambiar térmicamente desde una dirección fácil a su opuesta, si la temperatura es suficiente para sobrepasar la barrera de energía que separa ambas orientaciones (Fig. 3.15). El tiempo que tarda en producirse la inversión (relajación de Néel) depende fuertemente del tamaño, pero si, en ausencia de campo hacemos una medida de imanación veremos que si el tiempo de la medida es superior al tiempo de relajación de Néel, la imanación promedio es cero (el momento magnético puede apuntar con igual probabilidad en una dirección y en la opuesta), y lo mismo ocurrirá con una suspensión de estas partículas en cualquier fluido.

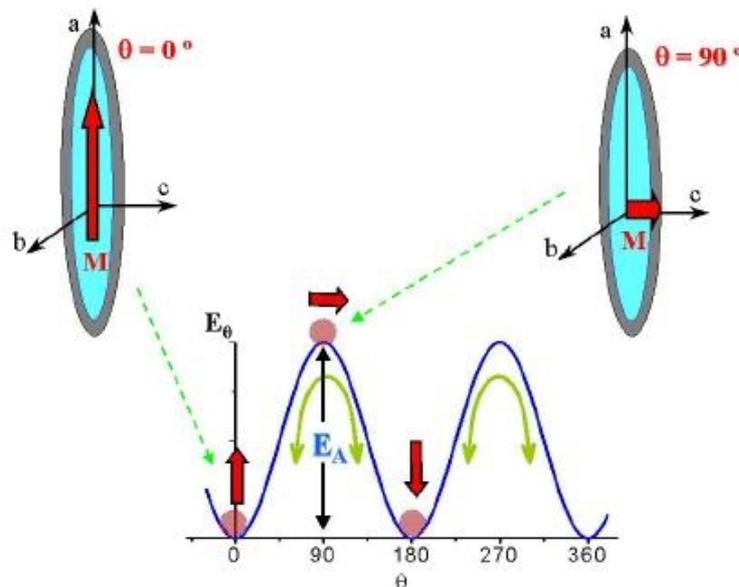


Fig. 3.15. Esquema del proceso de cambio de orientación de la imanación desde uno a otro sentido de la dirección fácil, pasando por la barrera de potencial representada por la dirección no-fácil (90°) para una partícula alargada.

3.5.3. Propiedades magnéticas y aplicaciones biomédicas

Conviene ahora preguntarse qué propiedades magnéticas son las adecuadas para la aplicación biomédica que se pretende. Debe tenerse en cuenta (Fig. 3.16) que en la sangre las partículas magnéticas inyectadas coexistirán con sustancias paramagnéticas (como la hemoglobina, por el Fe que transporta) y diamagnéticas (las proteínas, compuestas primordialmente por C, H, N y O). La respuesta magnética de la hemoglobina será despreciable en comparación con la de las partículas, y esta selectividad intensificada se puede considerar como una de las características beneficiosas de las partículas inyectadas. Por otro lado, el comportamiento superparamagnético será claramente preferible en estas, dado que su ausencia de remanencia hará que no pueda producirse agregación magnética espontánea, con el consiguiente riesgo de formación de trombos.

3.5.4. Metodología experimental

Las propiedades magnéticas de las partículas utilizadas se determinaron en usando el magnetómetro SQUID (Quantum Design MPMS XL, USA) del Centro de Instrumentación Científica de la UGR, trabajando a temperatura ambiente.

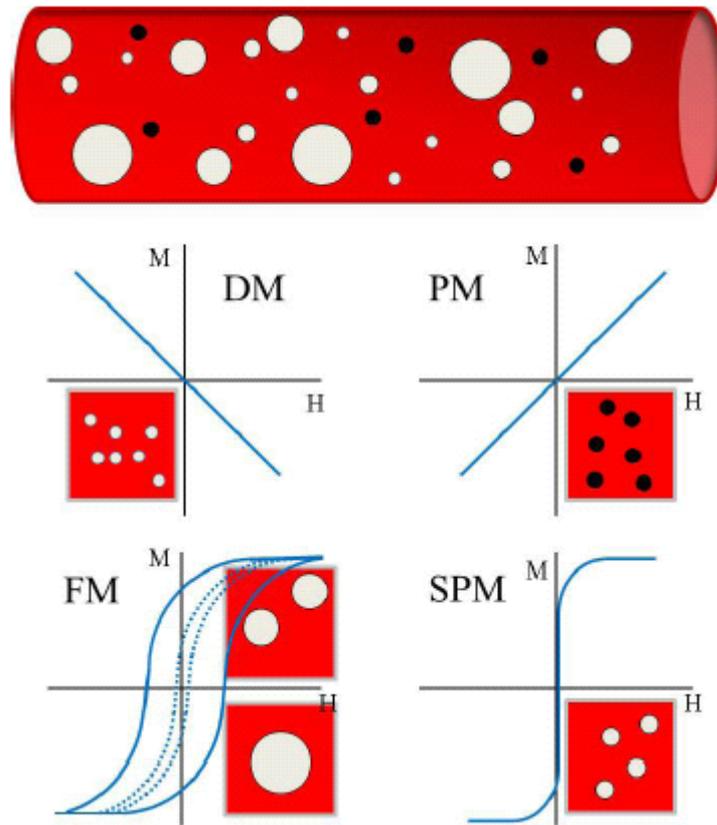


Fig. 3.16. En este esquema se presenta una situación hipotética en la que se han inyectado por vía intravenosa partículas de distintos tamaños (desde los nm a los μm), siempre con carácter ferromagnético. Se compara el comportamiento diamagnético (DM) y paramagnético (PM) de las biomoléculas de la sangre con el de las partículas inyectadas: ferromagnéticas (FM; multidominio, línea continua; monodominio, línea de puntos) y superparamagnéticas (SPM).

3.5.5. Resultados y Discusión

La Fig. 3.17 muestra el ciclo de imanación de las nanopartículas de los diseños I y II y de las comerciales. Es claro el hecho de que la histéresis está ausente en todos los casos, manifestación de la naturaleza superparamagnética de los núcleos nanométricos de hierro. Usando la ecuación de Fröhlich [Bothorz, 1968] pueden ajustarse los datos para obtener los parámetros básicos de la curva de primera imanación, es decir, imanación de saturación, M_s , y la susceptibilidad inicial, χ_i . De

acuerdo con la ecuación citada, la imanación M se relaciona con el campo magnético H como sigue:

$$M = \frac{M_s \chi_i H}{M_s + \chi_i H} \quad [1]$$

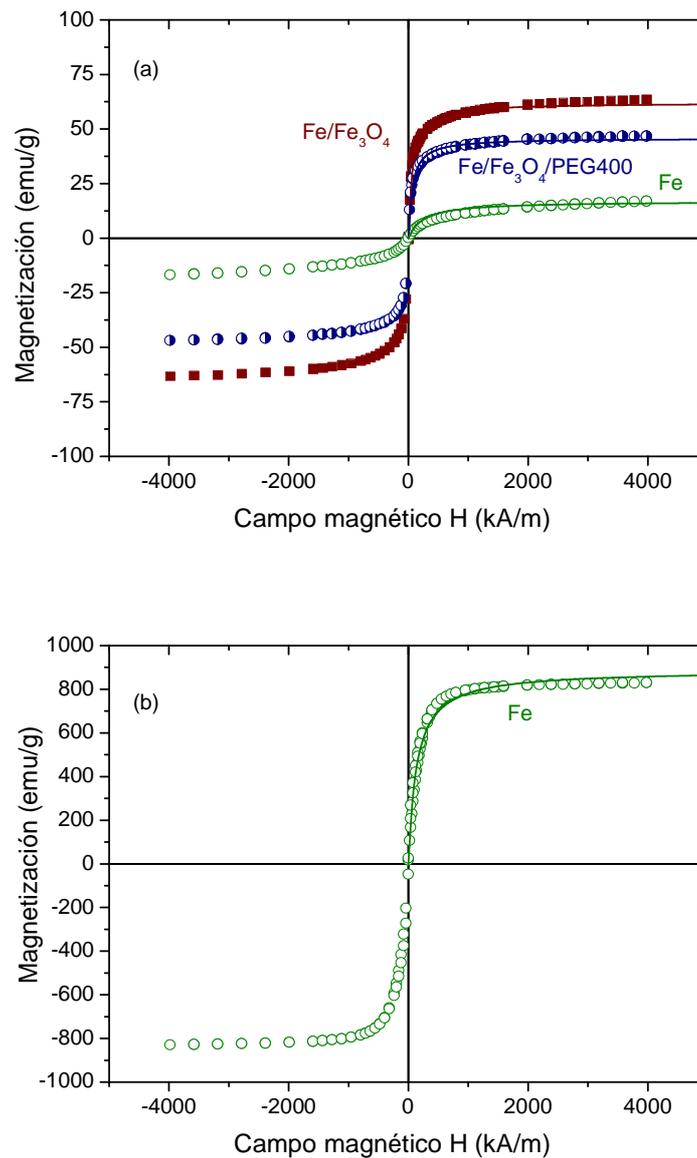


Fig. 3.17. Curvas de imanación de las nanopartículas de hierro, según los diseños I, II y II recubiertas con PEG400 (a) y comerciales (b). Los puntos corresponden a los datos experimentales. Las líneas continuas corresponden a los ajustes a la ec. [1].

Tabla 3.1. Imanación de saturación (M_s) y susceptibilidad inicial (χ) de las nanopartículas indicadas.

Material	Imanación de saturación (emu/g)	Susceptibilidad inicial (emu/g/kA/m)
Fe diseño I	16.9±0.5	0.069±0.006
Fe/Magnetita diseño II	62.0±0.4	1.02±0.04
Fe/Magnetita/PEG400	45.8±0.3	0.73±0.03
Hierro comercial	887±7	6.6±0.2

Los datos de la Fig. 3.17 indican que el comportamiento es superparamagnético el caso de las partículas sintetizadas (Fe, Fe/magnetita), mientras que las de hierro comerciales, sin que puedan considerarse realmente superparamagnéticas, muestran un ciclo de histéresis muy estrecho, lo que las haría igualmente muy útiles para nuestros objetivos. La Tabla 3.1 indica los valores de los parámetros de primera imanación. Todas las partículas indicadas muestran por tanto la respuesta magnética buscada: destacamos en particular la elevada imanación de saturación del hierro comercial (su mayor tamaño hace que el efecto de su recubrimiento sea poco notable) y el hecho de que la capa de PEG 400, si bien reduce la imanación no tiene un efecto excesivamente negativo.

4.

Propiedades eléctricas superficiales

La estabilidad de las partículas en suspensión, sus interacciones con células y proteínas del plasma, así como su capacidad para adsorber y transportar determinados fármacos, están controladas en gran medida por la distribución de carga eléctrica en su superficie. Este Capítulo se dedica a la evolución de dichas propiedades usando para ello técnicas electroforéticas.

4.1. Introducción

Como hemos mencionado repetidas veces en este trabajo, se han ideado diversos métodos para conseguir enlazar moléculas de interés terapéutico a la superficie de las NPs. La selección de uno u otro método está determinada por las propiedades químicas y grupos funcionales que se encuentran en la superficie de las NPs y que están vinculadas al ligando que se decida emplear. El objetivo principal es anclar dichos agentes terapéuticos sin comprometer su funcionalidad una vez ya acoplados. La funcionalidad de tales enlaces viene impuesta por la naturaleza del ligando (por ejemplo, la conformación de biomoléculas) y la manera en la que éste se adjunta a la superficie de la NP. Por ejemplo, si un anticuerpo se une a una NP de forma tal que su sitio de reconocimiento es impenetrable, puede perder su capacidad de ligarse a las células diana. Por otra parte, este tipo de sistemas terapéuticos llevan la carga adicional de abordar, dentro de sus esquemas de integración, los mecanismos de liberación necesarios en el diseño de las NPs.

En la mayoría de los casos, los fenómenos implicados en los procesos de funcionalización, carga de fármaco, liberación de este, ligandos específicos, etc. están controlados por las propiedades de superficie. Ello es en buena medida así porque las nanopartículas tienen relaciones superficie/volumen muy altas en comparación con partículas de mayor tamaño, y por lo tanto el control adecuado de sus propiedades superficiales es muy importante [Boyd, 2008]. En efecto, Si consideramos una partícula sólida esférica de 1 cm de diámetro, su superficie S y su volumen V son, respectivamente, $3,14 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ y $5,24 \times 10^{-7} \text{ m}^3$, y la relación superficie/volumen será $S/V \approx 600 \text{ m}^{-1}$. 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, provocará que la superficie sea de $15,7 \text{ m}^2$ y la relación $S/V \approx 3 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$. Con este ejemplo se explica cómo 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. 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 $F^{EL} \approx 2.12 \times 10^{-12} \text{ N}$. Esta fuerza tiene que compararse con otras interacciones que deben o pueden existir entre

ellas. Así, su atracción gravitatoria a la misma distancia será $F^G \approx 6,3 \times 10^{-15}$ N, si su densidad es 103 kg/m^3 ; y la atracción de van der Waals $F^{LW} \approx 8 \times 10^{-13}$ N, utilizando los valores típicos de la constante de Hamaker [Illum y cols., 2001]. 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 particular, el destino final de las nanopartículas en el organismo puede estar determinado por su interacción con el medio ambiente local, que depende de una combinación de las propiedades de tamaño y de superficie. Las NPs que son estéricamente estabilizadas (por ejemplo, con PEG en su superficie) y que tienen cargas superficiales que son ligeramente negativas o positivas, tienden a tener un mínimo de interacciones entre ellas. Además, la superficie interior de los vasos sanguíneos y la superficie de las células contienen muchos componentes con carga negativa, que repelerán NPs con carga negativa. A medida que la carga superficial se hace más grande (ya sea positiva o negativa), la actividad de los macrófagos aumenta y puede conducir a una mayor eliminación por parte del sistema fagocítico nuclear. Por lo tanto, minimizar interacciones inespecíficas, a través de estabilización estérica y control de las cargas superficiales, ayuda a prevenir la pérdida de NPs en lugares no deseados. Sin embargo, la eliminación completa de interacciones inespecíficas es imposible en la actualidad, por lo que siempre hay una cierta pérdida de NPs; la clave es reducir al mínimo estas interacciones tanto como sea posible.

Si la pérdida de NPs pudiera evitarse, se esperaría que la distribución de las NPs en el organismo fuera uniforme. Sin embargo, hay numerosos lugares dentro del cuerpo restringidos por motivos de tamaño. Mediante la adecuada comprensión de los requisitos de tamaño y de las propiedades eléctricas superficiales se puede lograr la orientación de las NPs hacia estos sitios.

La evaluación de las propiedades eléctricas superficiales está sin embargo dificultada por la inexistencia, salvo en algunos casos (Delgado, 2001; Lyklema, 1995), de métodos de medida directa de la carga o el potencial eléctrico superficiales. Los conocidos como *fenómenos electrocinéticos* y las técnicas asociadas a ellos son manifestaciones de las propiedades eléctricas de la interfase, y además son una fuente de información de estas propiedades eléctricas, ya que pueden ser accesibles experimentalmente. De entre ellos, el más útil y ampliamente empleado cuando se trabaja con nano- o micropartículas es sin duda la *electroforesis*. En este trabajo de

investigación se ha estudiado la movilidad electroforética (u_e) de las NPs sintetizadas y de sus recubrimientos, como un método de evaluación de la calidad y eficiencia del recubrimiento. Esto es posible dado que el comportamiento eléctrico superficial del hierro y del PEG son diferentes. Por lo tanto, existe la posibilidad de que una NP de hierro recubierta adecuadamente de PEG se pueda diferenciar de una no recubierta, analizando su comportamiento electroforético.

4.2 Descripción clásica de la doble capa eléctrica

Por lo general se admite como un hecho experimental que la mayoría de los sólidos, cuando se dispersan en un disolvente polar (en particular en una disolución de electrolito), adquieren una carga eléctrica superficial. Los orígenes de esta carga son diversos [Chen y cols., 2008; Illum y cols., 2001; Sun y cols., 2008a; Sun y cols., 2008b;]:

1. *Adsorción preferente de iones en disolución.* Este es el caso de la adsorción de tensioactivo iónico. Las entidades cargadas deben tener una elevada afinidad por la superficie, para evitar la repulsión electrostática por los iones ya adsorbidos.
2. *Adsorción/desorción de iones de la red.* El ioduro de plata es ejemplo arquetípico: el encaje de los iones en la red cristalina del sólido expuesta al exterior es muy fácil por tratarse de iones estructurales. Su adsorción en sitios de red lleva consigo la generación de carga superficial, función de las concentraciones relativas de cationes y aniones, que se llaman por ello *iones determinantes del potencial (idps)*.
3. *Disociación o ionización de grupos superficiales.* Muy frecuente en látexes y óxidos inorgánicos. En este último caso, la carga puede depender fuertemente del pH, por lo que H^+ y OH^- son en este caso *idps*.
4. *Red de carga incompleta: sustitución isomórfica.* Pueden citarse las arcillas como ejemplo de este mecanismo: el déficit estructural de Si sustituido por Al produce una carga negativa estructural, en buena medida independiente de las condiciones del medio.

Cualquiera que sea el mecanismo (en algunas situaciones participa más de uno), la carga neta superficial debe estar compensada por iones en torno a la partícula para mantener la electro neutralidad del sistema. La carga superficial y su contra carga compensadora en disolución forman la doble carga eléctrica (DCE). El hecho que sea "doble" no significa que no pueda tener en su estructura tres o más capas, que se extiendan a lo largo de distancias variables desde la superficie del sólido. En efecto, se pueden encontrar cargas responsables de la carga superficial σ_0 cerca de la superficie o sobre ella. Además, cabe la posibilidad de que existan iones capaces de interaccionar específicamente con la superficie; tales iones se localizarán a una distancia típica de esta que será del orden de un radio iónico no hidratado, dado que se puede suponer que han perdido su capa de hidratación, al menos en la dirección de la superficie del sólido. Se asocia a esa capa una densidad de carga superficial σ_i (Fig. 4.1), y un potencial con relación al seno de la disolución de valor ψ_i . A una distancia mayor se inicia la llamada capa difusa, en la que los iones están sometidos a interacciones puramente electrostáticas con la superficie y a procesos difusivos asociados a gradientes de concentración. La densidad de carga en este nivel se denota σ_d y su potencial (potencial difuso o de Stern) es ψ_d . Se inicia a esa distancia un volumen de líquido cargado, susceptible de desplazarse respecto de la interfase en presencia de un campo externo adecuado. En realidad, la región móvil se inicia a cierta distancia del plano de ψ_d y la zona más interna se denomina capa de estancamiento. Se detalla esta descripción a continuación.

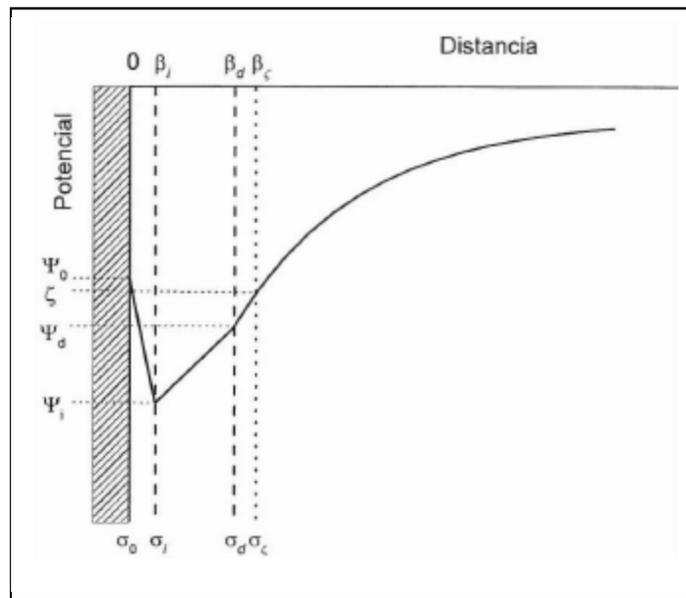


Fig. 4.1. Representación esquemática de la distribución de carga y potencial en una interfase cargada negativamente.

4.3 Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta

Supongamos que a la interfase sólido/disolución de la Fig. 4.1 se le aplica un campo eléctrico paralelo a dicha interfase y que la superficie sólida está fija en el sistema de referencia del laboratorio. Como hemos mencionado, el líquido adyacente al sólido tiene una carga eléctrica neta opuesta a σ_0 . Los iones y el líquido externo podrán ser desplazados por el campo externo, puesto que la fuerza eléctrica actuará sobre los iones (sobre todo contraiones), que arrastrarán líquido en su movimiento. Esto producirá un movimiento relativo entre el sólido y el líquido siendo éste es el fundamento del fenómeno electrocinético.

El potencial electrocinético o potencial zeta (ζ) es el existente en el límite entre las fases móvil e inmóvil. La localización exacta (en la Fig. 4.1 sería la distancia β_j) del también llamado *plano de cizalladura* o *plano de deslizamiento* es todavía tema de investigación y, de hecho, incluso la existencia de este plano y del mismo potencial zeta son estrictamente una abstracción [Shtykova y cols., 2007], 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. De manera

formal se resuelve esta salvedad suponiendo una variación gradual de la viscosidad η desde la superficie hasta el inicio de la parte difusa [Duan y cols., 2008, Shtykova y cols., 2007], pero la verificación experimental cuantitativa de tal variación no es accesible. Se supondrá el modelo de la variación de la viscosidad como verdadero puesto que todos los tratamientos del fenómeno electrocinético se basan en la existencia del potencial zeta; ello trae como consecuencia que las técnicas electrocinéticas aplicadas darán información sobre el potencial zeta, donde quiera que esté localizado [Duan y cols., 2008]. Los diferentes fenómenos electrocinéticos pueden distinguirse mediante las fases móvil-inmóvil, la naturaleza del campo aplicado y la magnitud que debe ser determinada de manera experimental. Como mencionamos, solo consideraremos el caso de la electroforesis, única técnica utilizada en este trabajo.

4.4 Electroforesis

Se llama así al movimiento de las partículas en suspensión debido a la acción de un campo eléctrico aplicado \mathbf{E} sobre la carga de la partícula y sobre la del líquido, que a su vez afecta al movimiento de aquella. Para los valores de campo utilizados en la práctica, la velocidad estacionaria alcanzada por la partícula (velocidad electroforética, v_e) es proporcional al campo, y la constante de proporcionalidad es la movilidad electroforética, u_e :

$$\mathbf{v}_e = u_e \mathbf{E} \quad (4.1)$$

La relación entre la movilidad (accesible experimentalmente) y el potencial zeta que la determina es especialmente sencilla si el espesor κ^{-1} de la atmósfera iónica difusa es mucho menor que el tamaño de la partícula a ($\kappa a \gg 1$):

$$u_e = \frac{\varepsilon_m}{\eta_m} \zeta \quad (4.2)$$

donde ε_m, η_m son, respectivamente, la permitividad eléctrica y viscosidad del medio de suspensión. La ec. (4.2) se conoce como ecuación de Helmholtz-Smoluchowski y se usa con gran frecuencia para estimar el potencial eléctrico en el plano de deslizamiento, casi la única aproximación experimental al valor del potencial superficial. La deducción de la ec. (4.2) se puede consultar en la bibliografía

[Lyklema, 1995]. Mencionamos esta ecuación a título ilustrativo de la dependencia esperable entre movilidad y potencial; dado el pequeño tamaño de nuestras partículas, habremos de utilizar modelos más elaborados, en los que se establezcan limitaciones a los valores de tamaño, potencial zeta de las partículas o composición iónica del medio. Como norma utilizaremos el modelo de aplicación casi universal de [O'Brien y White, 1978].

A pesar de su generalidad, la teoría de O'Brien y White no es aplicable al caso de partículas recubiertas de polímero, como en algunas de las estructuras diseñadas en este trabajo. Ello se debe a que el modelo citado supone que la interfase sólido/líquido es indeformable o rígida. Claramente esa hipótesis no puede suponerse cierta si la capa más externa está constituida por cadenas poliméricas más o menos compactas o extendidas hacia el medio líquido, en las que la noción de plano de deslizamiento simplemente carece de significado (Duval y Ohshima, 2006, Ohshima, 2007, Ahualli y cols, 2009). La Fig. 4.2 nos permite comparar esquemáticamente ambos modelos: nótese cómo en las partículas recubiertas aparecen nuevos parámetros, entre los que mencionaremos el espesor de la capa polimérica y su carga, así como el coeficiente de arrastre de fluido entre las cadenas poliméricas. En el siguiente apartado se describen brevemente el modelo y sus resultados. Posteriormente, se considerará su aplicación a nuestras partículas.

Los fundamentos del modelo están detallados en (Ahualli y cols, 2010). Para nuestros objetivos aquí bastará con tener en cuenta las ecuaciones básicas y la base del procedimiento de cálculo. Las ecuaciones que han de resolverse, usando condiciones de contorno adecuadas y admitiendo siempre simetría esférica, son:

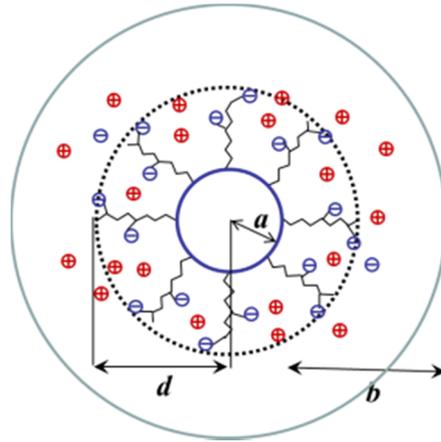


Fig. 4.2. Representación esquemática de una partícula esférica recubierta de una capa de polímero. a es el radio del núcleo o *core*; d es el espesor de la capa polimérica, y b es el espesor de la capa de disolución usada para construir la celda representativa de las interacciones con otras partículas (Ahualli y cols, 2009).

1. Ecuación de Poisson para el potencial electric (se suponen N especies iónicas con valencias z_j y concentraciones n_j . El término ρ_{pol} representa la densidad volúmica de carga de la capa polimérica.:

$$\nabla^2 \Psi(\mathbf{r}) = \begin{cases} -\sum_{j=1}^N \frac{ez_j n_j(\mathbf{r})}{\epsilon_m} & \text{si } d < r < b \\ -\sum_{j=1}^N \frac{ez_j n_j(\mathbf{r})}{\epsilon_m} - \frac{\rho_{pol}}{\epsilon_m} & \text{si } a < r < d \end{cases} \quad (4.3)$$

2. La ecuación de Nernst-Planck para cada especie iónica:

$$\frac{\partial n_j}{\partial t} = -\nabla \cdot \left(-D_j \left(\nabla n_j + \frac{n_j ez_j \nabla \Psi}{kT} \right) + n_j \mathbf{u} \right) \quad (4.4)$$

siendo D_j el coeficiente de diffusion de la especie iónica j y \mathbf{u} la velocidad del fluido en cada punto.

3. Ecuaciones de Navier-Stokes para el movimiento del fluido, supuesto incompresible:

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} = \begin{cases} -\nabla P + \eta \nabla^2 \mathbf{u} - \sum_{j=1}^N e z_j n_j \nabla \Psi & \text{si } d < r < b \\ -\nabla P + \eta \nabla^2 \mathbf{u} - \sum_{j=1}^N e z_j n_j \nabla \Psi - \gamma \mathbf{u} & \text{si } a < r < d \end{cases} \quad (4.4)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0$$

con P la presión en cada punto. Nótese que la presencia de la capa polimérica induce un arrastres extra sobre el fluido, representado por el coeficiente de fricción γ .

Para nuestros objetivos en este trabajo será conveniente considerar aquellas condiciones de contorno que involucran a la velocidad de la partícula y el campo, y que nos permitirán encontrar su relación. Tales son:

$$\begin{aligned} \delta \Psi(\mathbf{r}) \Big|_{r \rightarrow \infty} &= -E r \cos \theta \\ v_r \Big|_{r \rightarrow \infty} &= -v_e \cos \theta \end{aligned} \quad (4.6)$$

donde $\delta \Psi(\mathbf{r})$ es la perturbación de potencial eléctrico inducida por el campo y r, θ son las coordenadas esféricas radial y azimutal.

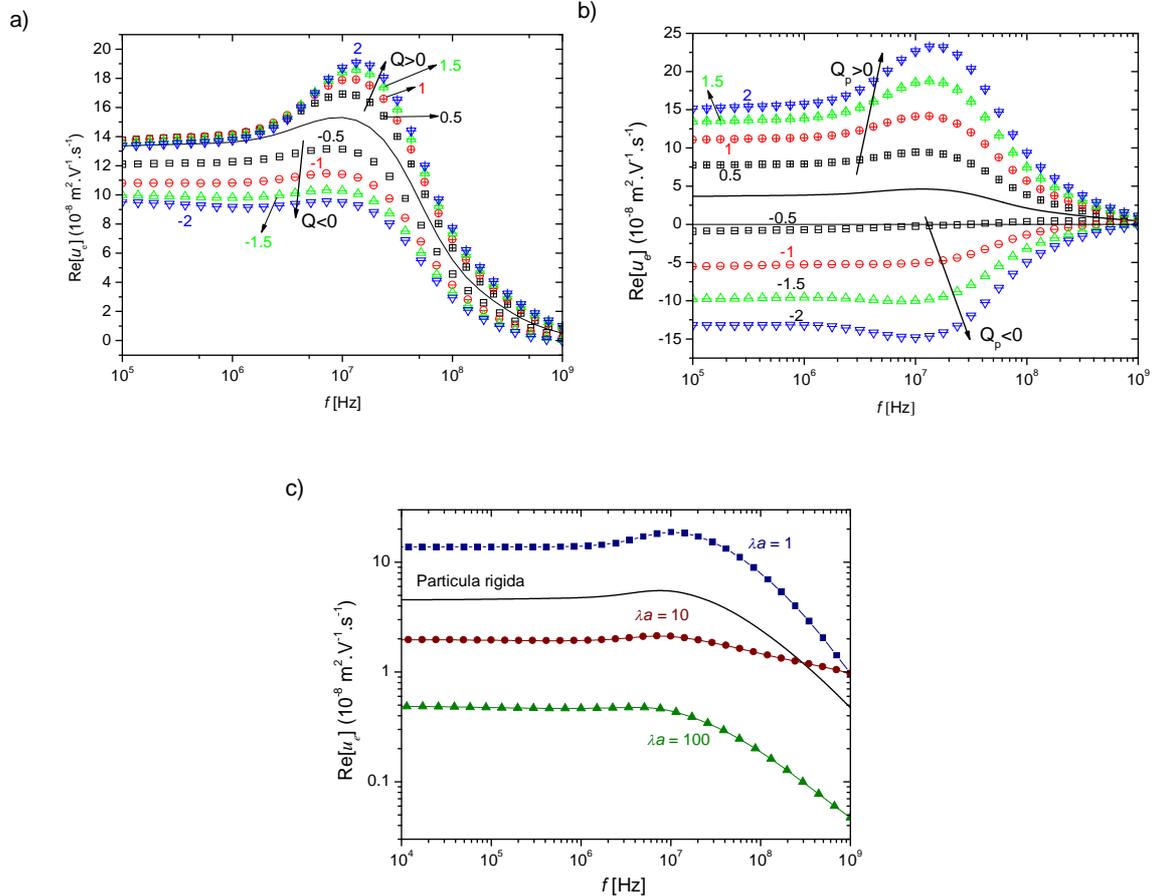


Fig. 4.3. Algunas predicciones del modelo de Ahualli y cols. (Ahualli y cols., 2009) sobre la movilidad electroforética de esferas. a) Efecto de la carga de la partícula, Q ; b) efecto de la carga de la cadena polimérica, Q_p ; c) efecto del coeficiente de fricción de la capa $\lambda = (\gamma / \eta_m)^{1/2}$.

Los datos se presentan (para distintas frecuencias del campo externo aplicado) en la Fig. 4.3. Como se puede apreciar, la movilidad es extremadamente sensible tanto a la carga de la partícula como a la del polímero: en el caso de que este sea neutro, la respuesta será probablemente debida exclusivamente a la carga del propio núcleo de la nanoestructura, si bien modulada por la viscosidad de la capa polimérica y su espesor.

4.5. Metodología experimental

La movilidad electroforética (u_e) se determinó en todos los casos mediante el dispositivo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). La Fig. 4.4 ilustra el dispositivo y su principio de funcionamiento. La movilidad se obtiene a partir del análisis de la función de autocorrelación de la luz láser dispersada por las partículas, realizando el estudio en términos de la variación de fase (no de frecuencia como en la electroforesis Doppler) de la luz dispersada por las partículas (*PALS* o *Phase Analysis Light Scattering*)

Previo a la preparación de las suspensiones se partió de disoluciones de la fuerza iónica y pH deseados. Cuando fue necesario ajustar el pH, se adicionaron gotas de disoluciones de HNO_3 o NaOH (0.01 o 0.1 M). A 50 mL de estas disoluciones se adicionaron gotas de la suspensión madre de nanopartículas, de los distintos diseños, hasta obtener una ligera turbidez a simple vista, lo que aseguraba la concentración de partículas adecuadas para el dispositivo. Las suspensiones se mantuvieron en reposo durante 24 horas y a continuación se determinó la movilidad electroforética, reajustando previamente el pH en caso necesario. Por cada suspensión se realizaron, como mínimo, 3 medidas de 3 ciclos (repeticiones) cada una. La temperatura de medida (25 °C) se mantuvo constante (± 0.2 °C).

Para el estudio de las suspensiones en función de la concentración (con diferentes fuerzas iónicas), éstas se prepararon mediante la adición de una pequeña cantidad de las suspensiones madre de nanopartículas a soluciones de KNO_3 que contenían la cantidad específica de electrolito, en un rango de concentración que iba de 10^{-4} M hasta 0.1 M. Una vez preparadas las suspensiones se dejaron igualmente reposar durante 24 horas.

Las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas compuestas de un núcleo de hierro con recubrimiento polimérico se realizaron siguiendo la misma metodología descrita anteriormente.

4.6. Efecto del pH y de la fuerza iónica sobre la movilidad electroforética

Debido a la alta sensibilidad que presentan los óxidos de hierro a las variaciones del pH, viéndose así comprometida la estabilidad de sus suspensiones [Arias et al., 2001; Plaza et al., 2002], se hizo necesario analizar el efecto del mismo sobre la movilidad y el potencial zeta. Por otro lado, la dependencia u_e -pH o ζ -pH constituye una huella característica de las propiedades superficiales y permite el seguimiento de la variación de las mismas.

4.6.1. Partículas de hierro

La Fig. 4.4 muestra el efecto del pH sobre la movilidad electroforética de las nanopartículas de hierro y de hierro/ magnetita tras su tratamiento con citrato sódico para estabilizarlas en medio acuoso. Dado que en los experimentos in vitro posteriores del trabajo habrá que poner las nanopartículas en contacto con una solución nutriente para las células, se analizó también el comportamiento en dicho medio. Se eligió la solución DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) por ser uno de los medios de cultivo celular más utilizados. Recuérdese que dicha solución

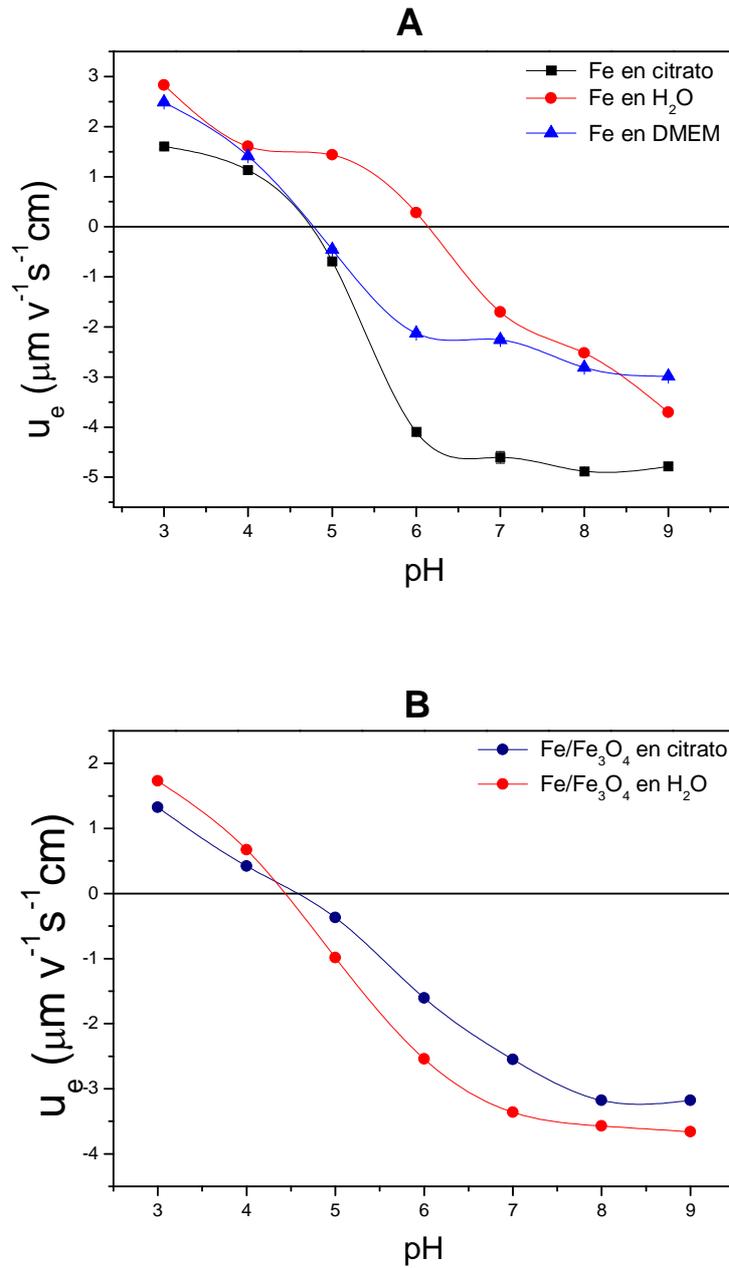


Fig. 4.4. Efecto del pH sobre la movilidad electroforética de nanopartículas estabilizadas con citrato sódico, en H₂O y en DMEM. A) Diseño I (hierro); B) Diseño II (hierro/magnetita).

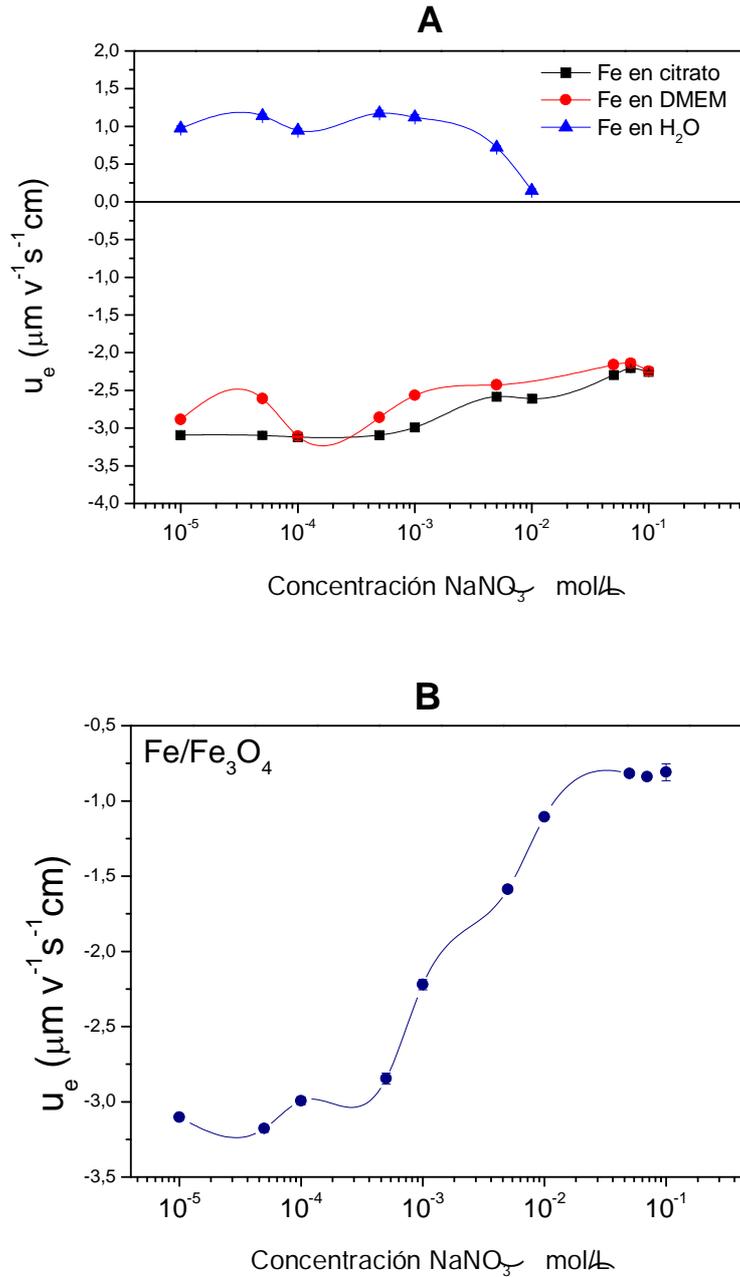


Fig. 4.5. Efecto de la fuerza iónica sobre la movilidad electroforética de nanopartículas de A) hierro (diseño I) en citrato, DMEM y H_2O ; B) Hierro/magnetita (diseño II)

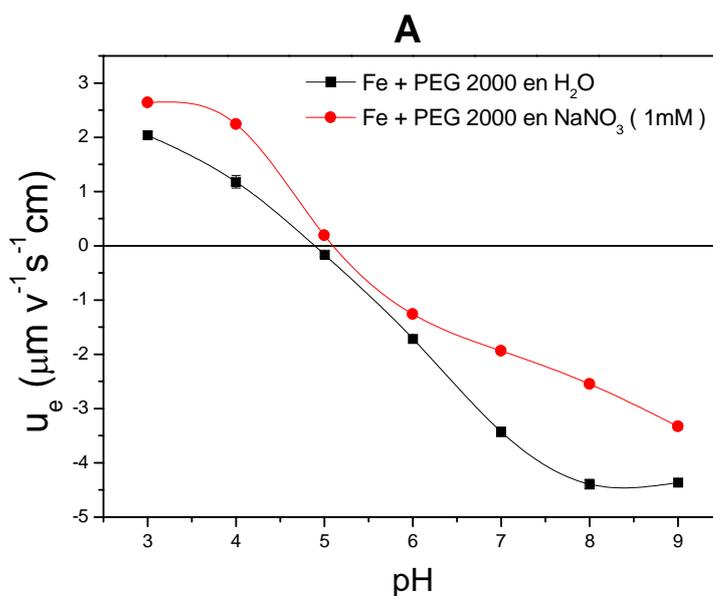
contiene 1 g/L de bicarbonato sódico (además de glucosa y piridoxina –vitamina B6).

Como se puede observar, las nanopartículas de ambos diseños presentan un punto isoeléctrico bien definido, en torno a pH 5. El recubrimiento con citrato, en el diseño I, debe dar lugar a una movilidad más negativa que la que se espera para el óxido de hierro que, presumiblemente recubrirá las nanopartículas cuando se ponen

en agua (pH en torno a 6). Este hecho no ocurre en el diseño II. Es igualmente interesante observar que la presencia de DMEM en el medio contribuye a disminuir la movilidad, manifestación del hecho de que la doble capa se comprime por la presencia de los iones (sodio y bicarbonato) del medio. Como tales iones no se espera que interaccionen específicamente con el hierro (recubierto o no), la adición de DMEM no altera el punto isoeléctrico de modo significativo. En efecto, la Fig. 4.5. muestra que el comportamiento de la movilidad en presencia de concentraciones crecientes de NaNO_3 corresponde a un simple decrecimiento en valor absoluto, consecuencia del apantallamiento creciente de la carga superficial.

4.6.2. Electroforesis de partículas recubiertas de PEG

La adición del polímero usado para encapsular las nanopartículas de hierro (diseño I) al medio acuoso, PEG 2000 y 35000, modifica ligeramente la dependencia de la movilidad con el pH pero no así con la fuerza iónica, como muestran las Figs. 4.6 y 4.7, respectivamente. La primera de ellas nos indica que el polímero hace la movilidad más negativa conforme mayor es el peso molecular del mismo. Aunque la carga de este polímero debe ser muy baja (negativa, por disociación de los grupos OH terminales), parece suficiente para producir ese efecto sobre la movilidad.



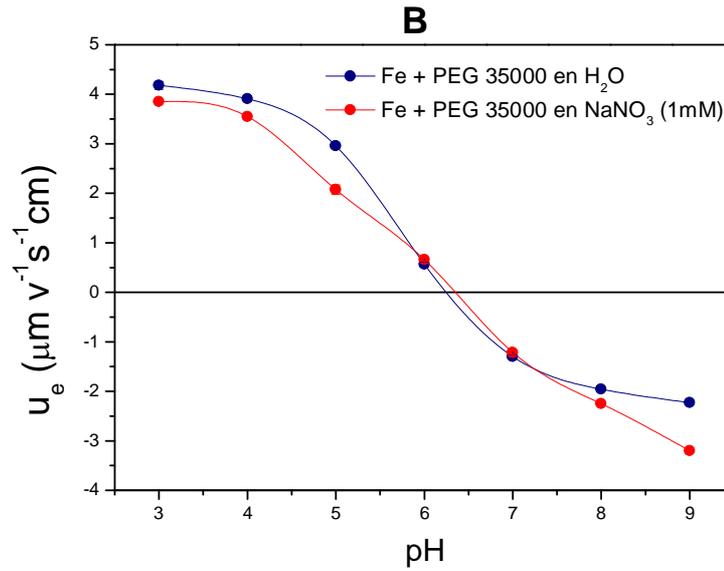


Fig. 4.6. Efecto del pH sobre la movilidad electroforética de nanopartículas de hierro (diseño I) recubiertas con PEG 2000 (A) y 35000 (B) en H₂O y en NaNO₃.

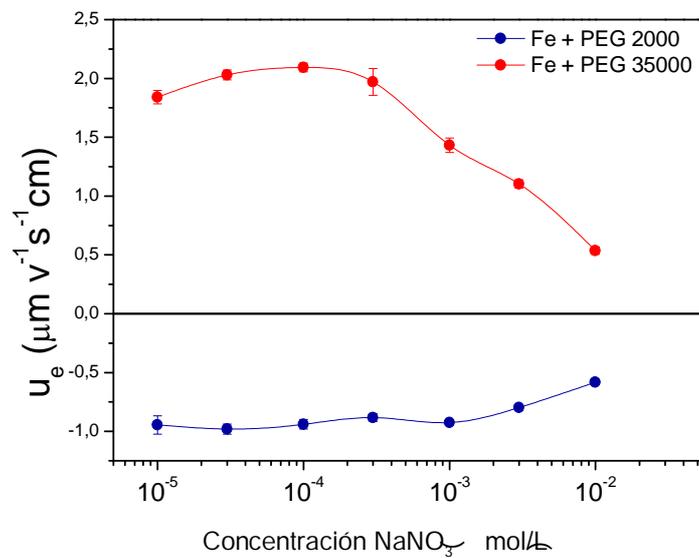


Fig. 4.7. Efecto de la fuerza iónica sobre la movilidad electroforética de partículas de hierro (diseño I) recubiertas de PEG (M.W. 2000 y 35000) en distintas concentraciones de NaNO₃.

Sin embargo, el efecto de la fuerza iónica es claramente diferente, de modo que se puede afirmar que u_e es independiente de la concentración de iones, un hecho

esperable en el caso de partículas recubiertas de una capa polimérica de suficiente espesor.

El punto isoeléctrico del diseño II, hierro/magnetita, recubierto con PEG se encuentra en las proximidades del pH 4 independientemente del peso molecular del recubrimiento polimérico, como bien puede verse en la Fig. 4.8.

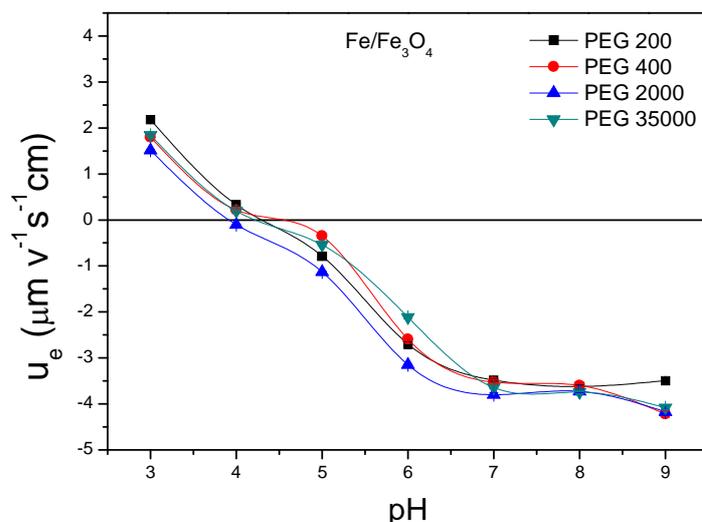


Fig. 4.8. Efecto del pH sobre la movilidad electroforética de nanopartículas de $\text{Fe}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ (diseño II) recubiertas con PEG en distintos pesos moleculares; (■) PEG 200, (●) PEG 400, (▲) PEG 2000 y (▼) PEG 35000.

De hecho, al revisar el comportamiento de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEG}$ con aquellas que no fueron recubiertas (Figura 4.2. (B)) se puede observar un comportamiento casi idéntico; por lo tanto se puede asumir que, aunque el recubrimiento polimérico oculta eficazmente al núcleo magnético, no afecta de manera significativa sus propiedades eléctricas superficiales, haciendo que la superficie de las nanopartículas sin recubrir sea indistinguible de aquellas recubiertas con polímero.

Para confirmar estos resultados se determinó la movilidad de nanopartículas de hierro de una casa comercial; siguiendo para ello el mismo protocolo de

recubrimiento polimérico así como la misma metodología técnica para analizar sus propiedades eléctricas superficiales. La Fig. 4.9 muestra los valores del efecto del pH sobre la movilidad electroforética de las nanopartículas de hierro comerciales sin recubrir y recubiertas con PEG.

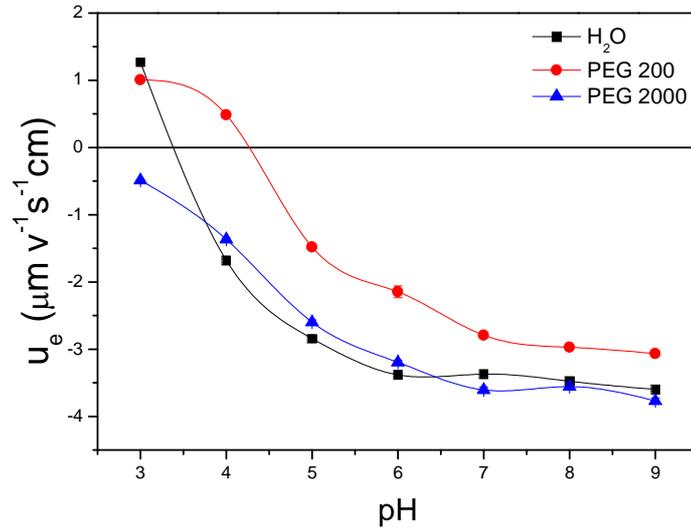


Fig. 4.9. Efecto del pH sobre la movilidad electroforética de nanopartículas comerciales de Fe recubiertas con PEG en distintos pesos moleculares; (■) sin recubrimiento, (●) PEG 200, (▲) PEG 2000.

Como bien se puede observar su comportamiento discrepa mucho respecto a aquellas sintetizadas en el laboratorio. El punto isoeléctrico cuando no han sido recubiertas se encuentra en torno a $\text{pH} = 3.5$; mientras que, como ya se ha mencionado, en el diseño I se localiza en $\text{pH} = 6.2$ y en $\text{pH} = 4.5$ para el diseño II. Esta divergencia es sólo aparente, puesto que la misma casa comercial comunica, en las especificaciones técnicas del producto, que una vez expuestas al aire las nanopartículas sufren un proceso de oxidación, máxime si estas entran en contacto con un medio acuoso (lo cual de hecho ocurre cuando son estabilizadas con citrato sódico para posteriormente dejarlas en H_2O para su almacenamiento) provocando que el núcleo (magnético) de hierro se recubra de una capa de óxido. Viéndolo de esta forma los resultados de las nanopartículas comerciales se asemejan más a las del diseño II. Una vez recubiertas con PEG el comportamiento es diferente y es dependiente del peso molecular. Las partículas comerciales recubiertas con PEG

2000 presentan una electrocinética negativa en toda la escala de pH analizada, mientras que el punto isoeléctrico en el diseño I está en torno a $\text{pH} = 5$ y en el diseño II a $\text{pH} = 4$. Por otra parte los valores obtenidos con PEG 200 son similares a los del diseño II, (con el punto isoeléctrico cercano a $\text{pH} = 4$). Por lo tanto y desde una perspectiva electroforética, se puede justificar el empleo de diferentes formulaciones de recubrimientos poliméricos. Las diferencias electrocinéticas encontradas entre los núcleos en ambos tipos de diseño, antes y después de recubrirlas con PEG, comprueban cualitativamente la eficacia de dicho recubrimiento independientemente de las variantes que del peso molecular se analizaron; convirtiendo así a la electroforesis en una herramienta idónea para demostrar que, efectivamente, el recubrimiento se llevó a cabo. Con lo expuesto se puede argumentar que, para ambos tipos de diseño, se produce entre las nanopartículas una interacción electrostática atractiva entre los núcleos de hierro y hierro/magnetita (con carga positiva) y el polímero (con carga negativa); propiciada, seguramente, por las condiciones ácidas que prevalecieron una vez que las nanopartículas fueron estabilizadas con citrato sódico y que determinan estas cargas eléctricas superficiales [Arias y cols., 2001, 2008a,b,d].

4.6.3. Nanoestructuras basadas en magnetita

Como en los ejemplos anteriores, los sucesivos recubrimientos de la magnetita también se pueden seguir mediante medidas electroforéticas. La Fig. 4.10 es un claro ejemplo al respecto. Como se puede apreciar, las nanopartículas de magnetita no tratadas presentan un punto isoeléctrico próximo a $\text{pH} 6.5$, mientras que el recubrimiento con polímero produce una caída de $|u_e|$ para todos los valores de pH, y un desplazamiento del punto isoeléctrico a $\text{pH} 5$. Esto es una clara indicación de la adsorción de las cadenas de ácido poliacrílico sobre la superficie de las partículas magnéticas.

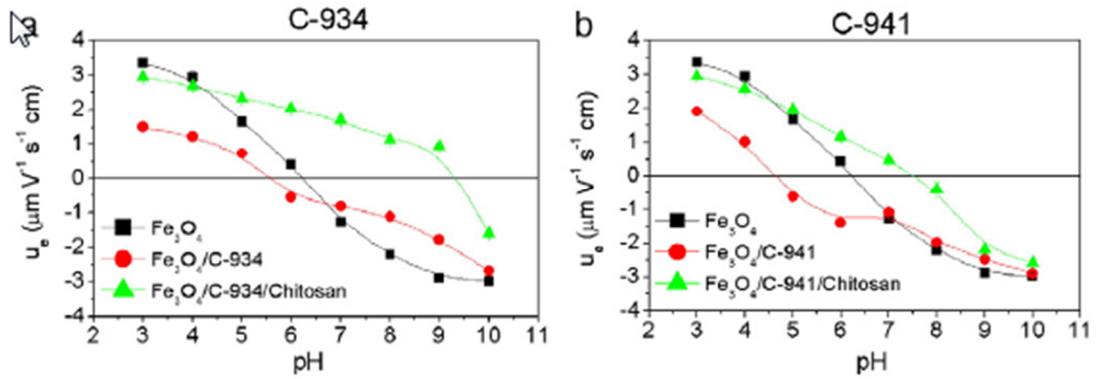


Fig. 4.10. Movilidad electroforética de nanopartículas de magnetita, no tratadas y recubiertas de C-934 y C-934/chitosán (a), y de C-941 y C-941/chitosán (b).

La adsorción de las moléculas de chitosán también es observable por electroforesis (Fig. 4.10), dado que produce un considerable incremento de movilidad: dado el valor de pK_a del chitosán (6.5), cabe esperar que la adsorción en el intervalo de pH 5-7 se verá favorecida por atracción electrostática, produciéndose una movilidad más positiva. Por el contrario, para pH inferior a 5 o superior a 7 la repulsión electrostática debe de ser significativa, por lo que la adsorción solo se podrá justificar por atracción hidrofóbica entre cadenas, explicando así la tendencia de la movilidad hacia valores más positivos. La interacción es probablemente más débil a pH básico, y de hecho las movilidades de magnetita/Carbopol y magnetita/Carbopol/chitosán difieren menos mientras mayor es el pH. Nótese que el punto isoeléctrico aumenta de pH 5 a pH 7.5 en el caso de C-941 (peso molecular 1.25×10^6 g/mol) y de pH 5 a pH 9.5 en el caso de C-934 (1.25×10^6 g/mol). Parece pues que la adsorción es mayor en este último caso, abundando en la hipótesis de la importancia del efecto hidrofóbico.

5.

Evaluación de la capacidad de vehiculización de fármacos

Es esencial delimitar la aplicabilidad de las partículas descritas como vehículos magnéticos de fármacos. En este Capítulo se usan técnicas electrocinéticas y espectrofotométricas para evaluar la adsorción y liberación de los antitumorales 5-fluorouracilo, doxorubicina y gemcitabina.

5.1. Introducción

Como se ha mencionado, lo que realmente da sentido a esta investigación (aparte de la propia producción de las nanoestructuras) es la búsqueda de aplicaciones de alto valor añadido, en las que se haga patente el verdadero interés de los procedimientos descritos. Se describirá por ello en este Capítulo la investigación de las posibilidades de uso de las nanopartículas de hierro/magnetita como vehículos de transporte de fármaco, en concreto, 5-fluorouracilo (5-FU) y doxorubicina (DOX).

En los capítulos 1 y 2 se han mencionado los beneficios que cabe esperar del empleo de nanopartículas compuestas por un núcleo magnético (hierro/magnetita) y un recubrimiento polimérico (PEG) como sistemas de vehiculización de fármaco hasta el tejido diana [Durán y cols., 2008]. De igual forma, se han comentado las principales características individuales de los fármacos 5-fluorouracilo y doxorubicina. Se propone en este trabajo que estas características pueden ser mejoradas al combinarse con las nanopartículas recubiertas de polímero, en aspectos relacionados no solo con su direccionalidad, sino igualmente con su estabilidad y minimización de efectos secundarios, principalmente los asociados a su efecto sobre tejidos sanos, o la cardiotoxicidad inherente a su degradación [Katzung, 2007; Lemaire y cols., 1994]. Al mismo tiempo, la vehiculización propuesta mejora el perfil farmacocinético e induce una rápida metabolización [Flórez, 1997a, b, c].

En esta investigación se realizó en primer lugar un estudio de la absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo y doxorubicina, dado que esta es la técnica que se usará para evaluar cantidades de fármaco adsorbidas. La metodología se basa en una extensión de la ley de Beer para mezclas de sustancias absorbentes. En efecto, el procedimiento seguido será comparar la concentración de fármaco en la disolución inicial y en la disolución sobrenadante después de mantener las partículas en contacto con la disolución durante intervalos de tiempo especificados. Para ello es preciso determinar para cada uno de los fármacos la longitud de onda de máxima absorbancia, de la cual se desprende el coeficiente de absortividad molar. La adsorción superficial del fármaco en las nanopartículas recubiertas será estudiada por medio de dos técnicas: espectrofotometría UV-Vis y electroforesis, abarcando así aspectos cuantitativos y cualitativos. La primera de las técnicas mencionadas se empleará para el análisis de la cinética de liberación de los fármacos estudiados.

5.2. Espectrofotometría UV-Vis

5.2.1. Fundamentos

La espectroscopia de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia óptica T o de la absorbancia A de disoluciones. En el intervalo adecuado de concentración c , esta es proporcional a la absorbancia

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (5.1)$$

Esta ecuación es la forma matemática de la ley de Beer, y en ella ϵ es la absorptividad molar y b es el espesor de la muestra [Skoog y cols., 1998].

Se debe tener presente que la ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de la absorbancia en un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas. A concentraciones altas cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas; de modo aproximado puede afirmarse que para concentraciones superiores a 10^{-2} M, la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye, pudiendo alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación de una determinada longitud de onda. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración. Debe recordarse que este efecto puede aparecer a concentraciones inferiores o para moléculas orgánicas grandes.

La espectroscopia de absorción molecular permite identificar grupos funcionales en una molécula; ello es debido a que la absorción de radiación ultravioleta o visible resulta, por lo general, de la excitación de los electrones de enlace; permitiendo que los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio. Este hecho es clave para la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes.

5.2.2. Absorbancia óptica de las disoluciones de fármaco antitumoral

En este trabajo de investigación se utilizó un espectrofotómetro Dynko 8500 UV-Vis (España) 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. Se empleó una cubeta de cuarzo, transparente en la región espectral de interés, y con un camino óptico de 1 cm. Se realizó una limpieza completa, con agua destilada y acetona, antes y después de cada medida.

La preparación de una curva de calibrado, que relaciona la absorbancia con la concentración de la especie a estudiar, se hizo como primera etapa del análisis espectrofotométrico. Para que las medidas obtenidas tengan una mejor correlación con la ley de Beer, así como para evitar que las mismas sean sensibles a las variaciones intrínsecas provocadas por las limitaciones del instrumento de medición, las medidas de absorbancia espectrofotométricas se llevaron a cabo siempre a una 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, produciendo una máxima sensibilidad [Skoog y cols., 2001].

Las disoluciones preparadas se conservaron en recipientes cubiertos por papel de aluminio debido a la fotosensibilidad de los fármacos estudiados [Florey, 1973a, b, 1980]. Además, se tuvieron en cuenta factores experimentales condicionantes tales como la concentración de fármaco de las disoluciones empleadas, el pH y la temperatura [Arias y cols., 2005; Sáez, 2011].

Para el caso de 5-fluorouracilo se preparó la curva de calibrado a partir de una batería de disoluciones del fármaco (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} , $1.1 \cdot 10^{-4}$, $1.3 \cdot 10^{-4}$, $1.6 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$ y $5 \cdot 10^{-4}$) disuelto en agua destilada. Cada muestra fue ultrasonicada para la completa disolución de los cristales de 5-FU. Además para evitar los posibles procesos de degradación [Arias y cols., 2005], las disoluciones se mantuvieron siempre a una temperatura de 4 °C hasta su uso. No se utilizaron concentraciones de fármaco superiores a 10^{-2} M, para evitar la inestabilidad mencionada más arriba, que aparece a grandes concentraciones, y que se ha observado por otros autores para este mismo fármaco [Arias y cols., 2005; Barberi-Heyob y cols., 1995]. De esta manera, se

determinó la longitud de onda de máxima absorbancia y se realizó el cálculo del coeficiente de absorción molar.

Para la determinación del espectro de absorción ultravioleta-visible de cada una de las muestras, se realizó un barrido de longitudes de onda desde 1100 a 180 nm, con intervalos de 1.0 nm. Para eliminar las posibles interferencias en el espectro del fármaco, generadas por el medio de disolución, se empleó agua destilada como blanco en la calibración previa del aparato. Los resultados de este estudio se recogen en la Fig. 5.1, donde sólo se observa la señal por debajo de los 310 nm y se aprecia cómo la absorbancia aumenta al incrementar la concentración de fármaco en el medio. Son claros los dos picos en el espectro de las disoluciones de 5-FU, si bien el único que presenta una longitud de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones es el que aparece a 265 nm. Por lo tanto, se descarta el pico que se genera a menor longitud de onda y los espectros a concentraciones superiores a 0.4 mM, ya que a partir de esta concentración se aprecia una irregularidad manifiesta del espectro de estas altas concentraciones que hace imposible plantear cualquier tipo de medida. En caso necesario, tales disoluciones deben diluirse antes de llevar a cabo determinaciones espectrofotométricas.

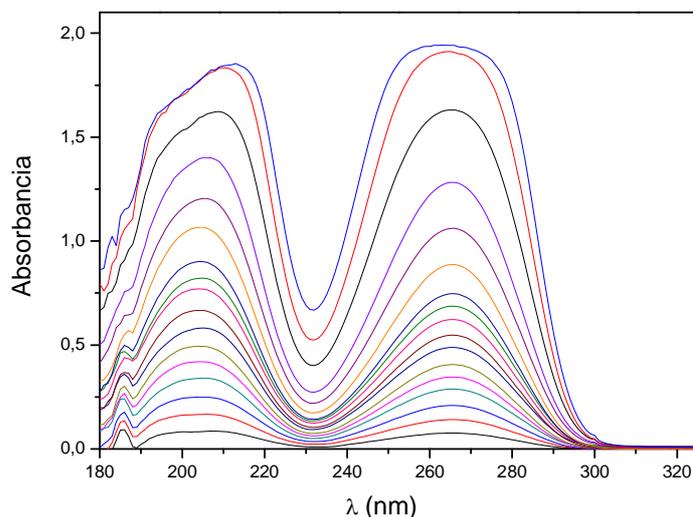


Fig. 5.1. Espectro de absorción ultravioleta-visible de disoluciones de 5-fluorouracilo. Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $1.1 \cdot 10^{-4}$, $1.3 \cdot 10^{-4}$, $1.6 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$ y $5 \cdot 10^{-4}$.

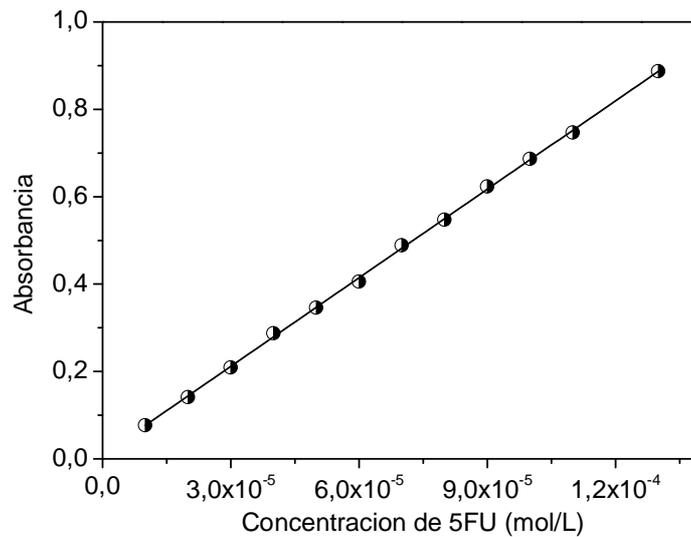


Fig. 5.2. Determinación del coeficiente de absorción molar de las disoluciones de 5-fluorouracilo para la longitud de onda de máxima absorbancia (265 nm).

Usando la absorbancia correspondiente a 265 nm de longitud de onda fue posible obtener una recta de calibrado, que nos permitirá obtener el coeficiente de absorción molar, y, en consecuencia, estimar la concentración de una disolución de 5-FU conocida su absorbancia. La Fig. 5.2 muestra el resultado: nótese la linealidad de la dependencia en el intervalo de concentraciones seleccionado, de acuerdo con la ley de Beer. El ajuste por mínimos cuadrados de la recta mostrada nos da el siguiente resultado:

$$A = (0.009 \pm 0.003) + (6760 \pm 40) c(\text{mol/L})$$

Para el caso de la doxorubicina se siguió la misma metodología experimental y de conservación de las muestras descritas para 5-FU, con la única diferencia de que la máxima concentración utilizada fue $4 \cdot 10^{-4}$ M. En concreto, la curva de calibrado de las disoluciones de doxorubicina 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} , $1.1 \cdot 10^{-4}$, $1.3 \cdot 10^{-4}$, $1.6 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$ y $4 \cdot 10^{-4}$. En la Fig. 5.3 se observan los resultados de este estudio. De ella se desprende que sólo hay señal por debajo de 600 nm y se aprecia

cómo, al aumentar la concentración de fármaco en el medio, la absorbancia de la muestra se incrementa. Aunque se tienen dos longitudes de onda de máximo en el espectro, de nuevo solo hay una que permanece inalterada al variar la concentración: se trata de 489 nm, que será por ende la longitud de onda que se empleará para el cálculo del coeficiente de absorción molar. A concentraciones superiores a $2 \cdot 10^{-4}$ M, se aprecia una irregularidad manifiesta del espectro. Debido a que el rango de concentraciones posibles para un valor de absorbancia determinado es muy variable no es factible una estimación fiable mediante espectrofotometría UV-Vis a estas elevadas concentraciones. Ajustando los datos de absorbancia y concentración mediante el método de los mínimos cuadrados se realizó la determinación del coeficiente de absorción molar. El resultado obtenido fue (v. Fig. 5.4):

$$A = (0.083 \pm 0.027) + (9600 \pm 300) c(\text{mol/L})$$

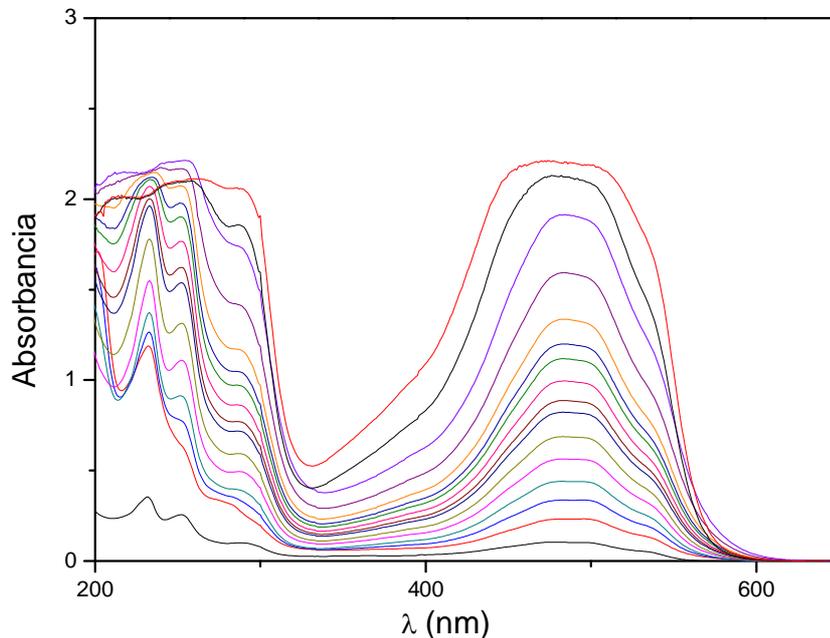


Fig. 5.3. Espectro de absorción ultravioleta-visible de disoluciones de doxorubicina. Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $1.1 \cdot 10^{-4}$, $1.3 \cdot 10^{-4}$, $1.6 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$ y $4 \cdot 10^{-4}$.

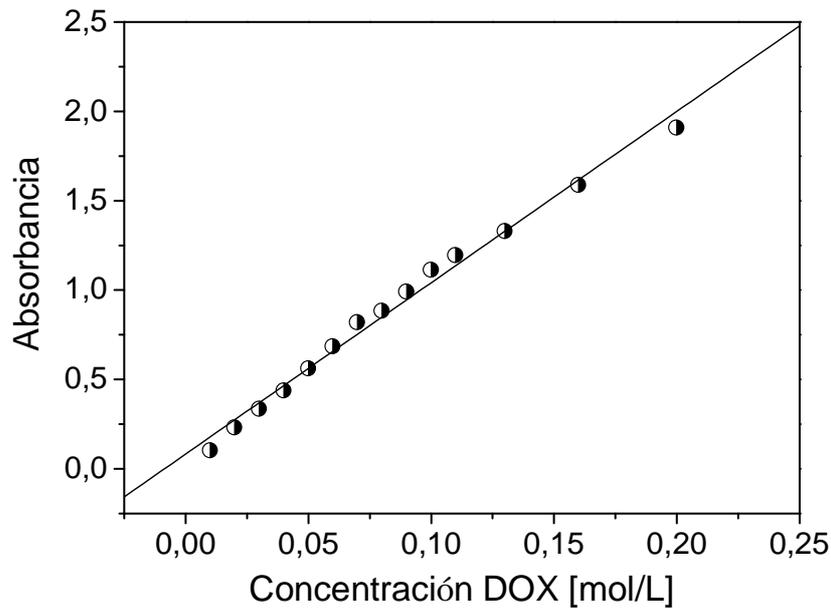


Fig. 5.4. Determinación del coeficiente de absorción molar de las disoluciones doxorubicina para la longitud de onda de máxima absorbancia (489 nm).

Finalmente, los datos usados para evaluar la adsorción de gemcitabina se muestran en la Fig. 5.5, en la que representamos la absorbancia, para la longitud de onda de máxima absorbancia (272 nm), en función de la concentración de fármaco en disolución. Con estos datos, se calculó la recta de calibrado que permite obtener la concentración de gemcitabina en disolución a partir de medidas de absorbancia:

$$A = (0.083 \pm 0.027) + (9600 \pm 300) c(\text{mol/L})$$

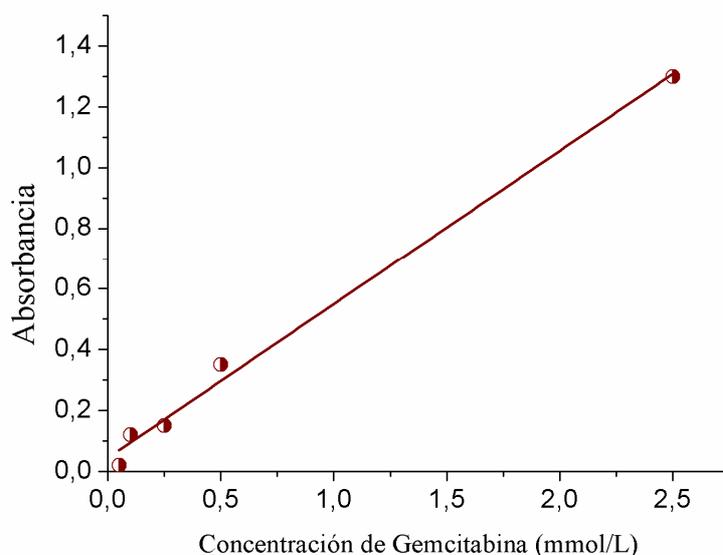


Fig. 5.5. Como Fig. 5.4, pero para disoluciones de gemcitabina, a 272 nm.

5.3. Incorporación superficial del fármaco en las nanopartículas recubiertas

Para la vehiculización de un fármaco en sistemas coloidales se han empleado, en términos generales, principalmente dos métodos. El primero consiste en la adsorción superficial tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de principio activo. En el segundo, por otro lado, se adiciona el fármaco cuando las nanopartículas son sintetizadas (método de absorción), esperando que el principio activo quede atrapado en la matriz del coloide. Para esta tesis doctoral se empleará el primero de los dos métodos descritos.

La cantidad adsorbida se determinará cualitativamente por medio de la evaluación electroforética de la adsorción en la superficie de los núcleos magnéticos, y cuantitativamente, mediante el método espectrofotométrico descrito anteriormente.

5.3.1. Metodología

Para proceder a la adsorción de fármaco, se mezclaron disoluciones de concentración adecuada de fármaco (5-FU, doxorubicina o gemcitabina) con suspensiones de nanopartículas de manera que la concentración final de partículas fuese siempre 0.5 mg/mL. Las celdas conteniendo las suspensiones se mantenían en

rotación orbital (a 100 rpm) durante 24 horas, periodo que se consideró suficiente, considerando datos anteriores, para llegar al estado estacionario de cantidad adsorbida. Posteriormente, las partículas se separaban magnéticamente y se analizaba la absorbancia del sobrenadante a la longitud de onda mencionada. Se realizó igualmente un experimento en blanco (solo partículas con la concentración adecuada) para restar el fondo de las medidas obtenidas con sobrenadantes. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones de fármaco.

Como se ha mencionado, se han llevado a cabo determinaciones de electroforesis de las partículas con y sin fármaco con el doble objetivo de intentar discernir posibles mecanismos de adsorción y de llevar a cabo un seguimiento cualitativo de la adsorción. Nos basamos para ello en la gran sensibilidad que la electroforesis (y, en general, los fenómenos electrocinéticos) presentan a variaciones incluso pequeñas de la carga superficial o de la posición del plano de cizalladura, β_{ζ} .

A continuación se muestran los resultados obtenidos con las distintas partículas y recubrimientos y con los dos fármacos ensayados.

5.3.2. *Fe/magnetita/PEG con 5-FU*

Consideraremos en primer lugar la adsorción de 5-FU sobre las partículas mixtas Fe/Fe₃O₄/PEG200. La Tabla 5.1 nos proporciona indicaciones acerca de la cantidad de fármaco adsorbida en función de adsorbido en función de la concentración inicial de 5-FU. Los datos sugieren que nuestras partículas son vehículos adecuados de este antitumoral y que son capaces de adsorber una cantidad bastante considerable de 5-FU. Con objeto de evaluar el peso de la interacción electrostática en el mecanismo de adsorción, se midió la movilidad de las partículas en función del pH, con y sin 5-FU en el medio. Los datos de la Fig. 5.6 sugieren que el mecanismo no puede ser puramente electrostático, considerando el pequeño efecto del 5-fluorouracilo sobre la movilidad. No es sorprendente este resultado, por otro lado, dado que la molécula de 5-FU debe ser prácticamente neutra en un amplio intervalo de pH, dada la ausencia de grupos ionizables en su estructura. Cabe pues sugerir que la adsorción se origine principalmente por medio de atracciones hidrofóbicas o puentes de hidrógeno entre las cadenas de PEG y el fármaco.

Tabla 5.1.

Concentración inicial de 5-FU (mol/L)	Densidad de adsorción Γ (mmol/g)
2×10^{-5}	0.018
2×10^{-4}	0.17
2×10^{-3}	0.85

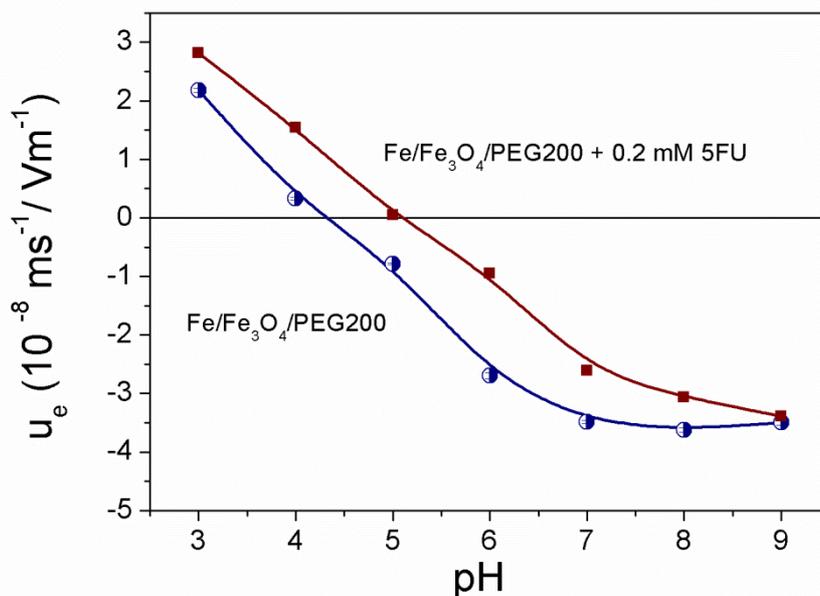


Fig. 5.6. Movilidad electroforética de nanopartículas de hierro/magnetita recubiertas de PEG200, en ausencia (círculos semillenos) y presencia (símbolos llenos) de 0.2 mM 5-FU, en función del pH, en disoluciones 1 mM NaNO_3 .

Estos resultados se confirmaron mediante experimentos de electroforesis con partículas de Fe del diseño que denominamos I, recubiertas en este caso con PEG2000. La Fig. 5.7 muestra la dependencia de su movilidad con el pH, tanto en agua como en 1 mM NaNO_3 en presencia de 0.1 mM de 5-FU: el punto isoeléctrico y de hecho la variación con el pH en su conjunto no se modifican por la adición de 5-FU (compárense con los datos obtenidos en ausencia de fármaco en Fig. 4.4). Parece confirmarse que el 5-fluorouracilo queda *atrapado* en la red polimérica que recubre al núcleo magnético y que su inclusión en la misma no afecta de forma significativa sus propiedades electroforéticas.

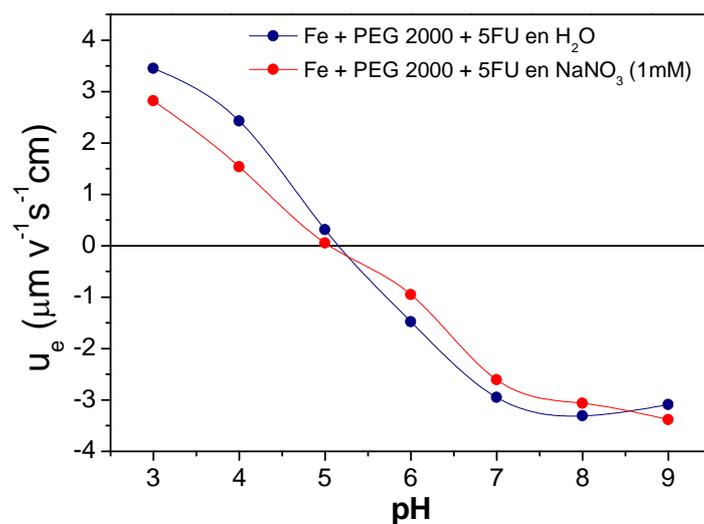


Fig. 5.7. Efecto del pH sobre la movilidad electroforética de nanopartículas de Fe (diseño I) recubiertas con PEG 2000 + 5-Fluorouracilo adicionado en la fase acuosa (0.2 mM). Los datos fueron obtenidos en NaNO_3 1mM y en agua.

Cuando se considera el efecto de la concentración de fármaco se obtienen resultados coherentes con lo mencionado: la movilidad fluctúa en torno a cero, sin un efecto claro de este fármaco sobre ella (Fig. 5.8). Se concluye razonablemente que no se debe esperar efecto de las interacciones electrostáticas sobre la adsorción de fármaco sobre estas partículas.

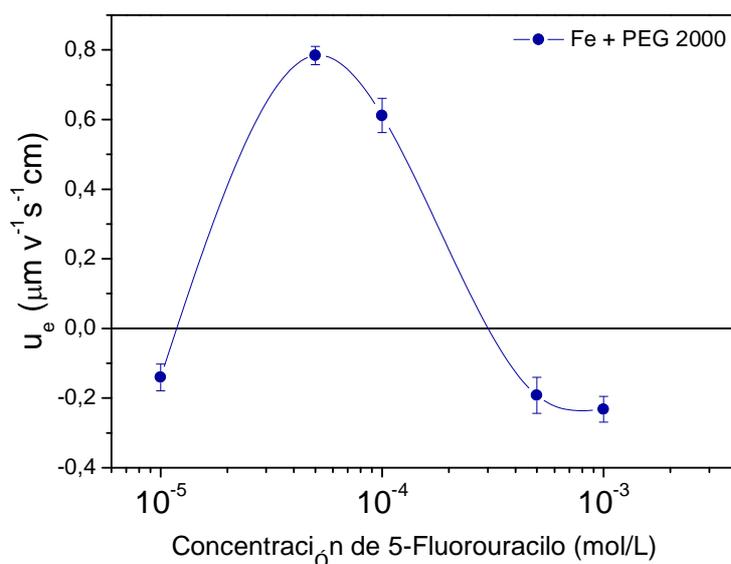


Fig. 5.8. Efecto de la concentración de 5-FU sobre la movilidad de nanopartículas del diseño I a pH natural (5.5).

5.3.3. Fe/magnetita/PEG con doxorubicina

Cabe esperar que los mecanismos de adsorción y el comportamiento de esta sea considerablemente diferente en el caso de DOX, cuya estructura molecular puede dar lugar a carga neta positiva en un amplio intervalo de pH. En efecto, la Fig. 5.9 muestra que la movilidad de las partículas aumenta hacia valores cada vez más positivos cuando las partículas Fe/Fe₃O₄/PEG200 se mantienen en contacto con concentraciones crecientes de DOX. La inversión de carga (y la considerable sobrecarga –“overcharging”-, es decir, el cambio de signo de la carga superficial de las partículas y su posterior aumento más allá de la neutralidad) son evidentes en esta Figura, y sugieren que la adsorción de DOX no solo está justificada por la interacción electrostática, sino también probablemente por atrapamiento en la corona de PEG.

La determinación espectrofotométrica de la cantidad adsorbida arrojó los datos de la Fig. 5.10. El acuerdo cualitativo entre estos resultados y los de Fig. 5.9 es claro: la adsorción progresa a medida que aumenta la concentración de DOX en solución, sin observarse saturación para las concentraciones ensayadas, por lo que la movilidad mantiene su tendencia hacia valores cada vez más altos en la zona positiva.

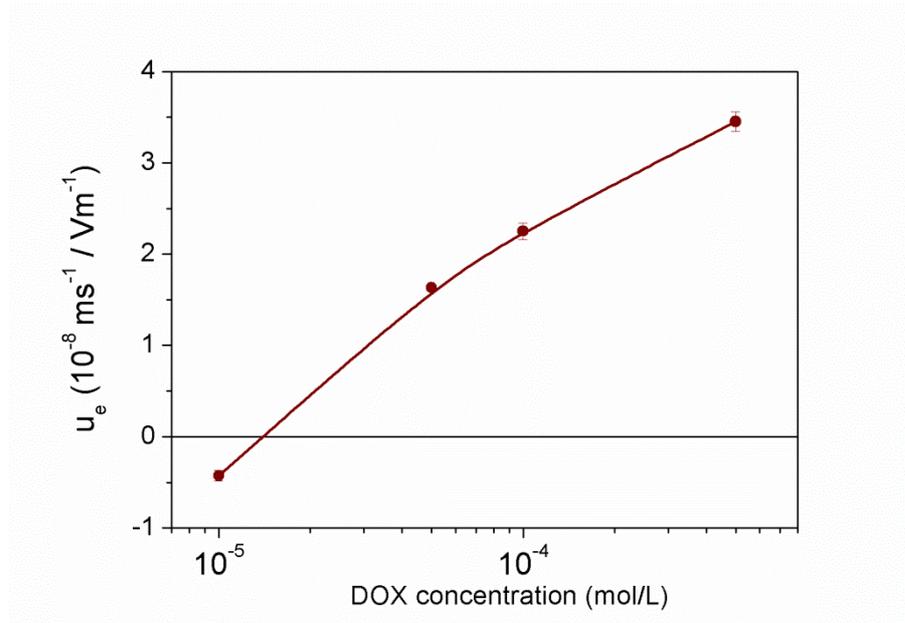


Fig. 5.9. Movilidad electroforética de nanopartículas de hierro/magnetita/PEG200 en función de la concentración de DOX en disoluciones 1 mM de NaNO_3 a pH 5.

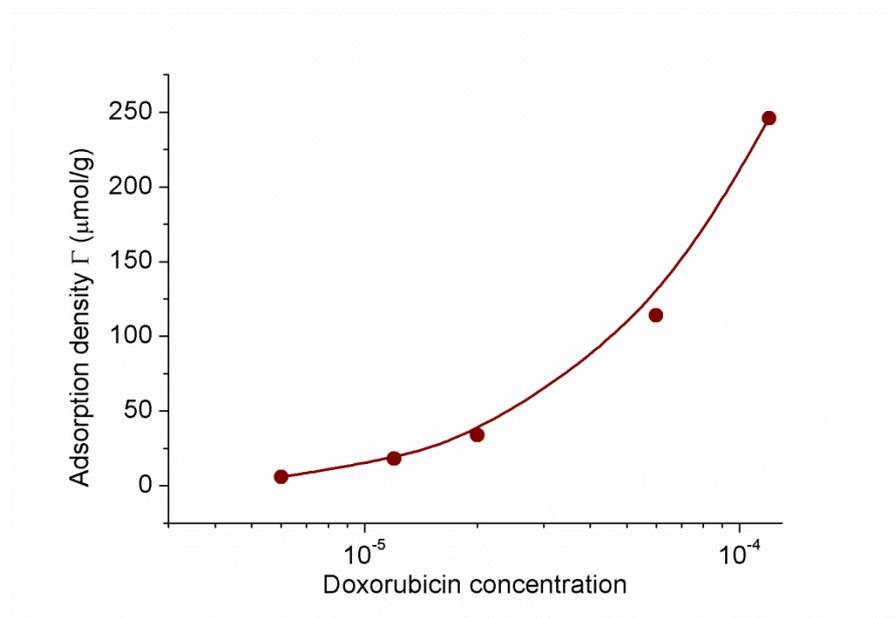


Fig. 5.10. Densidad de adsorción de DOX sobre partículas de hierro/magnetita/PEG200 en función de la concentración de fármaco.

5.3.4. NPCZ/PEG con 5-FU

La difícil adsorción de 5-fluorouracilo sobre las nanopartículas recubiertas de PEG, que ya se describió con las nanopartículas de hierro/magnetita, se repite en el caso de las nanopartículas comerciales, NPCZ. La Fig. 5.11 muestra claramente que

la adsorción es prácticamente nula si se usa PEG de peso molecular superior a 200 para recubrir, y que incluso en este caso solo se inicia si la concentración de fármaco en equilibrio supera el valor relativamente alto de 1 mM.

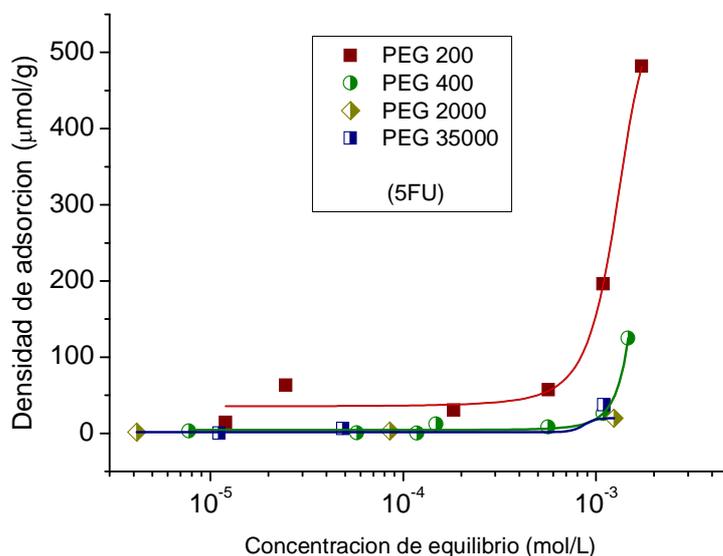


Fig. 5.11. Densidad de adsorción de 5-fluorouracilo sobre las nanopartículas comerciales de hierro (NPCZ) recubiertas de PEG de diferentes pesos moleculares.

5.3.5. NPCA/PEG con DOX

La ventaja del recubrimiento de PEG200 frente a formas de mayor peso molecular es también evidente en el caso de la adsorción de DOX, cuyos datos se representan en la Fig. 5.12. Pero, a diferencia de lo encontrado con 5-FU, la adsorción es significativa en las mejores condiciones, y se inicia para concentraciones mucho más pequeñas de fármaco (en torno a unos pocos micromoles por litro, mil veces por debajo de la necesaria para adsorber 5-FU).

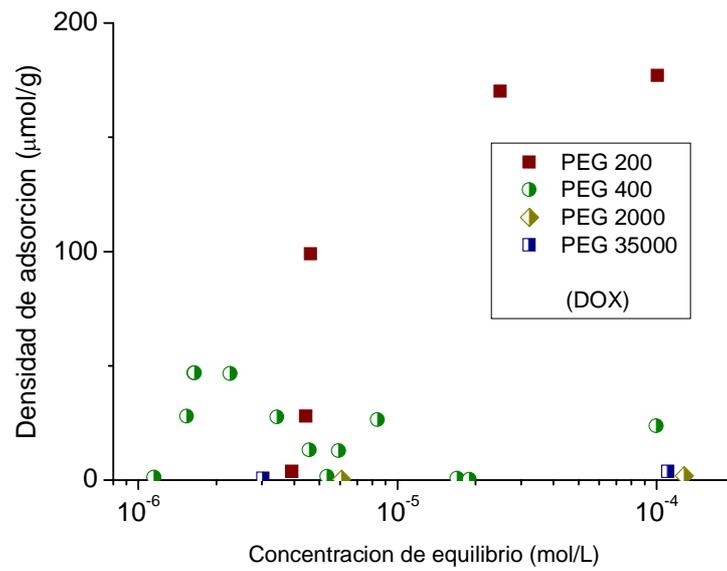


Fig. 5.12. Densidad de adsorción de Doxorubicina sobre las nanopartículas comerciales de hierro (NPCZ) recubiertas de PEG de diferentes pesos moleculares.

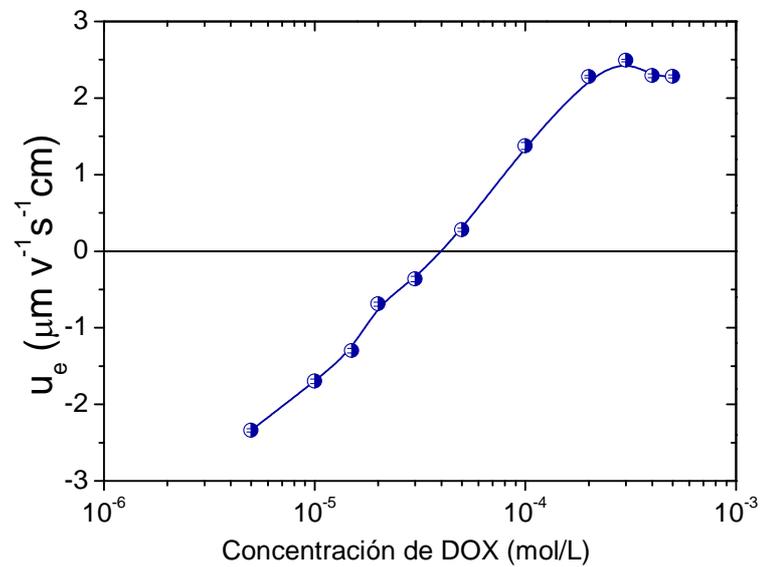


Fig. 5.13. Movilidad electroforética de nanopartículas de hierro NPCZ en función de la concentración de DOX en solución, en presencia de 1 mM NaNO₃. Recubrimiento de PEG200, pH 7.

Los datos de movilidad electroforética son este caso igualmente coherentes (Fig. 5.13): la adición de DOX produce de nuevo un cambio de signo de la movilidad u_e y un claro efecto de sobrecarga, que produce valores de movilidad superiores a 2.5 (valor inicial -2.5) $\mu\text{m/s/V/cm}$ incluso para concentraciones de antitumoral inferiores a 1 mmol/L.

5.3.6. Complejos magnetita/Carbopol/Chitosán (M/C/CH) con gemcitabina

La Fig. 5.14 muestra la densidad de adsorción de gemcitabina sobre M/C934/CH y M/C941/CH en función de la concentración de equilibrio del fármaco. En todos los casos, se añadió ácido fólico en superficie para aumentar la especificidad de las nanoestructuras frente a células tumorales, y la eficiencia de su captura, como ha sido demostrado en diferentes estudios (por ejemplo, [Majoros y cols., 2006; Stella y cols., 2000; Viota y cols., 2013]). Nótese que no se observa saturación para las concentraciones estudiadas, lo que sugiere que no se dan interacciones electrostáticas en este fenómeno.

Este hecho se pone una vez más de manifiesto en el estudio de la movilidad electroforética, mostrada en la Fig. 5.15. Como se puede observar, la adición de ácido fólico tiene escaso efecto sobre la movilidad, pero el fármaco, por el contrario, sí produce una tendencia hacia movilidades más negativas en C934 y prácticamente ningún efecto en partículas con C941. Se sugiere que la interacción electrostática atractiva solo se podrá producir entre las zonas no cubiertas de chitosán y la gemcitabina cargada positivamente.

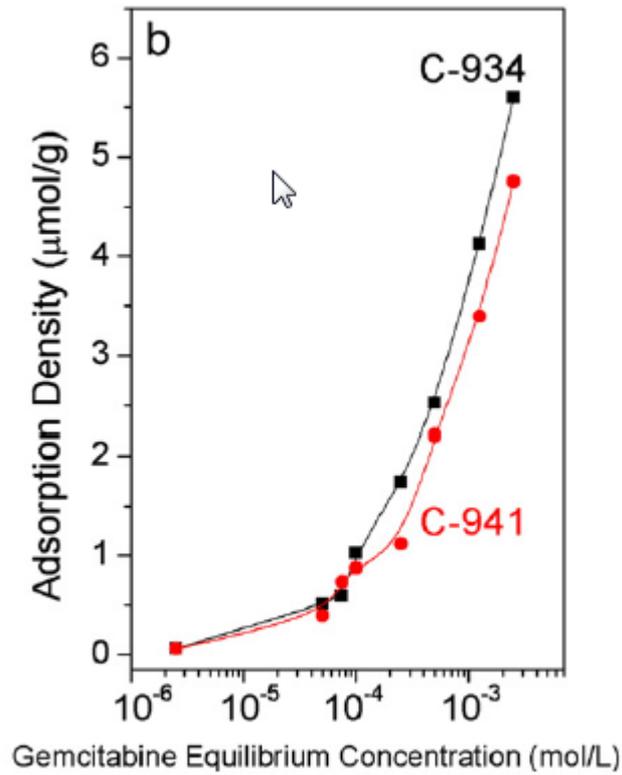


Fig. 5.14. Densidad de adsorción de gemcitabina sobre los complejos magnetita/C934 (C941)/chitosán en función de la concentración de equilibrio del fármaco.

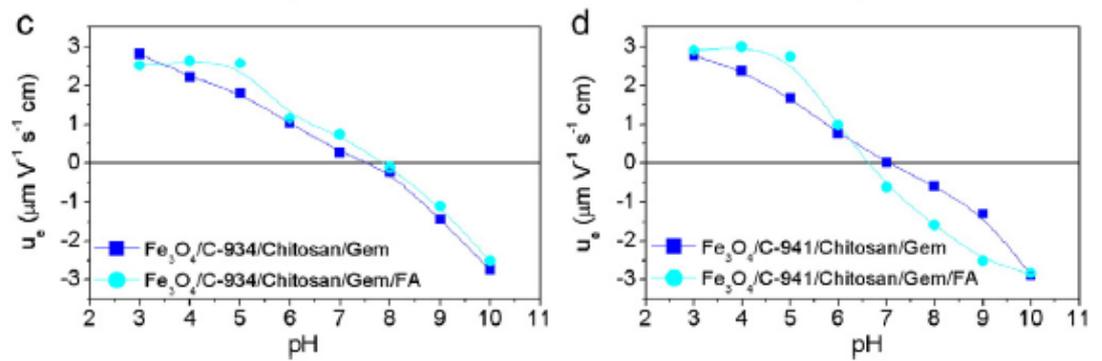


Fig. 5.15. Movilidad electroforética de complejos M/C934/CH y M/C941/CH en función del pH en presencia de gemcitabina (0.75 mmol/L) y gemcitabina/ácido fólico (0.75/0.1 mmol/L).

5.4. Liberación de antitumorales

5.4.1. 5-Fluorouracilo

Como hemos mencionado repetidamente en esta Tesis, tan importante como el estudio de la adsorción de los fármacos es el de su liberación: solo si se consigue la liberación del agente terapéutico en un periodo extendido de tiempo tendrá sentido emplear el esfuerzo de síntesis descrito frente a la mera administración del fármaco por la vía tradicional de disolución. Sin embargo, los experimentos de liberación de 5-Fu indicaron que tal liberación es prácticamente nula (menor del 1 % de la cantidad adsorbida, al cabo de 24 h) en el caso de las nanopartículas mixtas del diseño II. En el caso de las comerciales, NPCZ, la Fig. 5.16 muestra que la liberación alcanza solo el 1.2 % de la cantidad adsorbida, y ello al cabo de 120 horas.

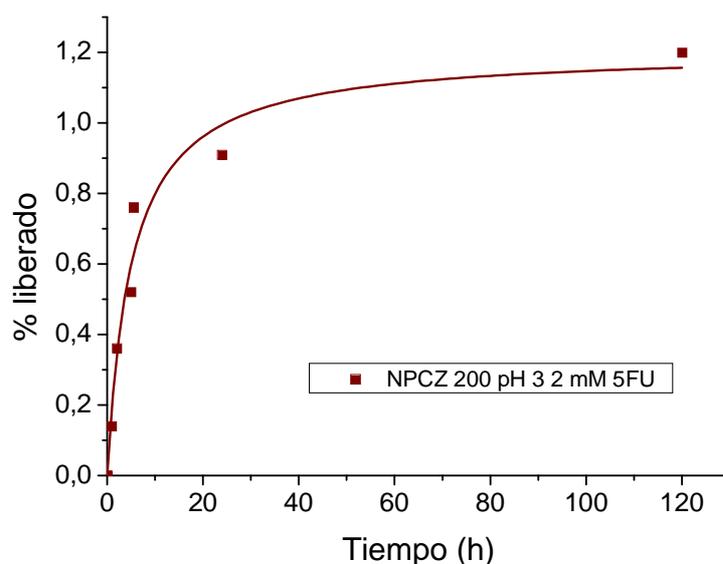


Fig. 5.16. Liberación de 5-FU (expresada en porcentaje de la cantidad adsorbida) en función del tiempo, para partículas comerciales NPCZ recubiertas de PEG 200. El pH de los experimentos fue 3.2, y la concentración inicial de fármaco 2 mmol/L.

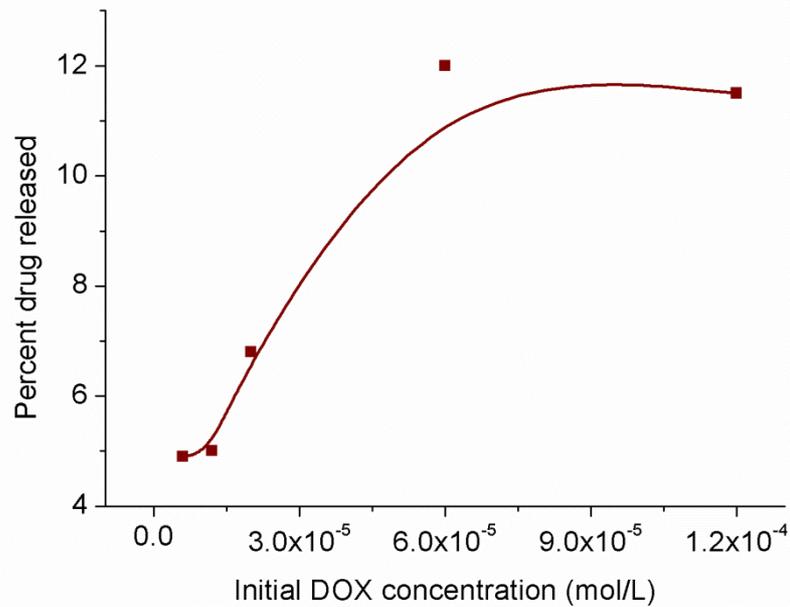


Fig. 5.17. Liberación de DOX (relativa a la cantidad de fármaco adsorbida) por partículas de Fe/Fe₃O₄/PEG200 en función de la concentración usada para adsorber (adsorción a pH 3). El medio de liberación fue buffer PBS a pH 7.4. Datos correspondientes a 24 horas.

5.4.2. Doxorubicina

Por el contrario, y como era de esperar, las posibilidades de liberación de DOX son mucho más significativas. La Fig. 5.17 muestra la liberación de DOX por partículas del diseño II al cabo de 24 h en una solución tampón de PBS a pH 7.4. Nótese que, con vistas a optimizar nuestros resultados, se seleccionó pH 3 para la adsorción (en estas condiciones el fármaco es claramente positivo y las partículas solo ligeramente positivas (Figuras 4.4, 4.6), y pH 7.4 para la liberación, no solo para aproximarnos al pH sanguíneo, sino para minimizar las interacciones electrostáticas entre las moléculas de DOX y las partículas, dado que el pH de DOX está próximo a 7.6 [Raghunand y cols., 1999]. Los resultados de la Fig. 5.17 indican que las nanopartículas del diseño II son ciertamente adecuadas para el propósito de liberación controlada de DOX [Gómez-Sotomayor y cols., 2014].

Con el objetivo de evaluar las posibilidades de empleo de las partículas aprovechando sus propiedades magnéticas se realizaron también experimentos de liberación en presencia de un gradiente de campo magnético. Se emplearon en este caso las partículas de comerciales previamente tratadas con 1 mM DOX. La Fig. 5.18

muestra los datos de liberación, basados en muestras de hierro comercial NPCZ. Como se puede observar, en ausencia de campo la liberación alcanza el 24 % al cabo de unos tres días, y ya no crece más. El efecto del campo es claro, si bien ocurre en el sentido de disminuir la liberación máxima y el ritmo de liberación. Este hecho es consecuencia probablemente de la agregación que experimentan las partículas NPCZ, en las que, como se discutió en el cap. 3, el recubrimiento produce agregados de varias partículas, con elevado momento magnético por agregado. Aunque el efecto pueda parecer negativo, debe tenerse en cuenta que en la práctica no se aplicarán gradientes tan elevados (100 mT/cm), y además el flujo sanguíneo dificultará esa agregación. Sin embargo, el hecho de que el campo tenga efecto sobre la liberación tiene el aspecto claramente positivo de que se puede usar ese mismo campo para controlar el ritmo de liberación, objetivo último de nuestro trabajo.

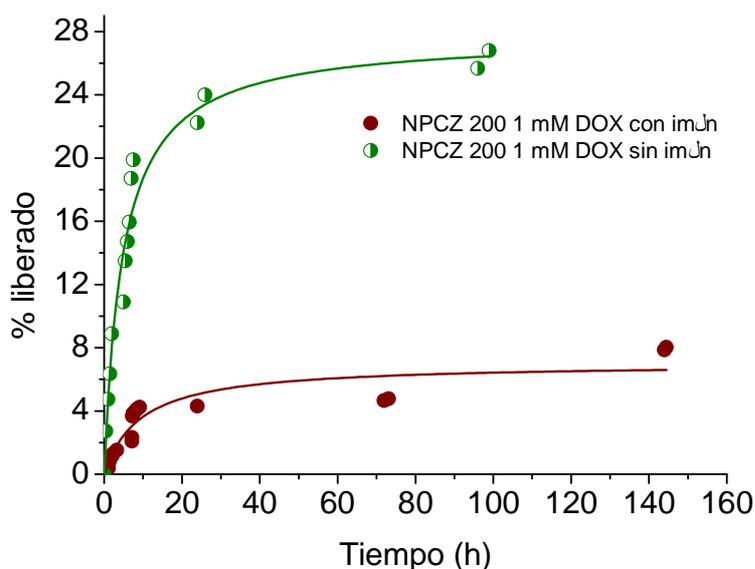


Fig. 5.15. Liberación de DOX (relativa a la cantidad de fármaco adsorbida) por nanopartículas comerciales NPCZ/PEG200 en función del tiempo, en presencia (símbolos llenos) y ausencia (símbolos medio llenos) de un gradiente de campo magnético de 100 mT/cm. El medio de liberación fue buffer PBS a pH 7.4 y la concentración de DOX usada para adsorber 1 mmol/L.

5.4.3. Gemcitabina

Los resultados de la determinación espectrofotométrica de la liberación de gemcitabina se muestran en la Fig. 5.16. Como se puede apreciar, casi un 80 % del fármaco disponible en las partículas se puede liberar al cabo de 48 h, aunque ya a las 10 h se libera en torno al 75 %. Los datos sugieren también que la velocidad de liberación a tiempos cortos es algo mayor en el caso de Carbopol de menor peso molecular (C941), por lo que podemos especular que esto es consecuencia del menor atrapamiento del antitumoral en las cadenas más cortas de este Carbopol.

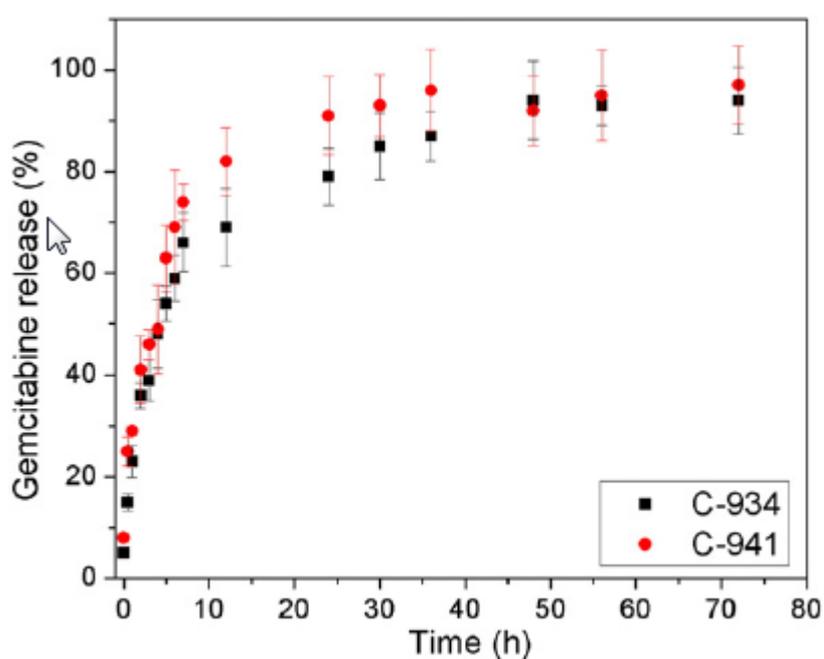


Fig. 5.16. Liberación de gemcitabina en función del tiempo por partículas de magnetita recubiertas de Carbopol y Chitosán en medio de cultivo RPMI. La suspensión de partículas contenía 1 % de sólidos y las partículas permanecieron 72 h en contacto con una disolución 0.1 mM del fármaco.

6.

Interacción con células sanguíneas y tumorales

En este capítulo se pretende el estudio preliminar de las interacciones entre nuestras partículas y las células sanguíneas y células de tumores humanos, como prueba de concepto de su empleo como herramientas de tratamiento.

6.1. Introducción

Como se ha mencionado, las nanopartículas para aplicaciones médicas con frecuencia son administradas por vía parenteral. De inmediato son consideradas por el organismo como un cuerpo extraño, lo que conlleva una respuesta inmunológica para intentar eliminarlas mediante una "corona" de proteínas que condiciona la respuesta biológica del cuerpo. En este trabajo de investigación realizamos en primer lugar un experimento *in vitro* para ver microscópicamente cómo interactuaban las nanopartículas de hierro (recubiertas y no recubiertas con polímero) con las células sanguíneas.

La oportunidad de colaboración entre nuestro grupo y el Centro de Investigación de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd, Hospital Clínico Universitario de Granada) nos permitió además analizar *in vitro* la interacción de las partículas M/C/CH con células tumorales hepáticas. A pesar de que se trata de un estudio limitado en extensión por razón de nuestro acceso limitado a este tipo de estudios, constituye una etapa de gran significado para nuestra investigación.

6.2. Metodología

6.2.1. Nanopartículas de hierro y células sanguíneas

Procedimientos

Se utilizó una muestra de sangre periférica obtenida mediante venopunción, en un tubo de hemograma con anticoagulante tipo etilendiaminotetraacético (EDTA). La identificación de las células se llevó a cabo utilizando tinción panóptica rápida para frotis sanguíneos de carácter urgente, que consta de tres soluciones:

- Sol.1: Metanol (Merck).
- Sol. 2 (color rojo): Disolución tamponada de xanteno, ref. QCA 994878.
- Sol. 3 (color azul): Colorante hematológico, ref.: QCA 990091.

También se utilizó tinción May-Grünwald-Giemsa (MGG) para frotis sanguíneos de carácter normal. Consta de:

- Eosina-azul de metileno en solución según May-Grünwald modificada (contiene Metanol). Merck art. N° 1.01424.0500.
- Sol. Azur-eosina-azul de metileno según Giemsa en solución (contiene Metanol). Merk art. N° 1.09204.0500.

Se añadieron 2 mL de NPs (diseño 1, concentración 2 mg/mL, recubiertas y no recubiertas con PEG, respectivamente) en agua a 5 mL de sangre periférica y se dejaron incubar durante 2 horas. Se prepararon 2 portaobjetos de vidrio limpios. Con la ayuda de una pipeta Pasteur o un capilar, se recogió una gota de sangre. Se depositó una gota en cada porta, en uno de los extremos (aproximadamente a 1 cm del extremo) y se colocó otro porta (que se utiliza como extensor) frente a la gota con un ángulo de 30° con el portaobjetos; se deslizó hacia atrás hasta conseguir la extensión de la gota a lo largo de la línea de contacto. Con un movimiento firme de la mano, se extendió la gota a lo largo del portaobjetos. Tras secar “totalmente” los frotis con ayuda de una fuente de calor, se colocó en el soporte para tinción.

En el caso de tinción rápida, con la ayuda de las pinzas de manipulación, se sumergieron ambos frotis aproximadamente 3 min en sol. 1, 2 min en sol. 2 y 1 min en sol. 3. A continuación se procedió a lavar con agua destilada y se volvió a secar con la ayuda de la fuente de calor.

Observación al microscopio

La Fig. 6.1 muestra los resultados en el caso de partículas no recubiertas. La Fig. 6.2 corresponde a las partículas con PEG200. En ambos casos, se observa claramente cómo las nanopartículas, recubiertas y no recubiertas con PEG, entran en las células del torrente sanguíneo, tanto en los eritrocitos como en los neutrófilos. Los resultados preliminares indican que las recubiertas tienen más fácil acceso a las células, sin que de momento se pueda afirmar si el proceso de incorporación es por fagocitosis o algún otro mecanismo. La cubierta hidrofílica y neutra de PEG claramente favorece la introducción de las nanopartículas en las células: como se ha mencionado en esta Memoria, las condiciones de carga superficial ideales son la neutralidad, y, en caso de desviación, hacia la carga negativa. La neutralidad asociada al PEG parece confirmar que este en nuestro caso.

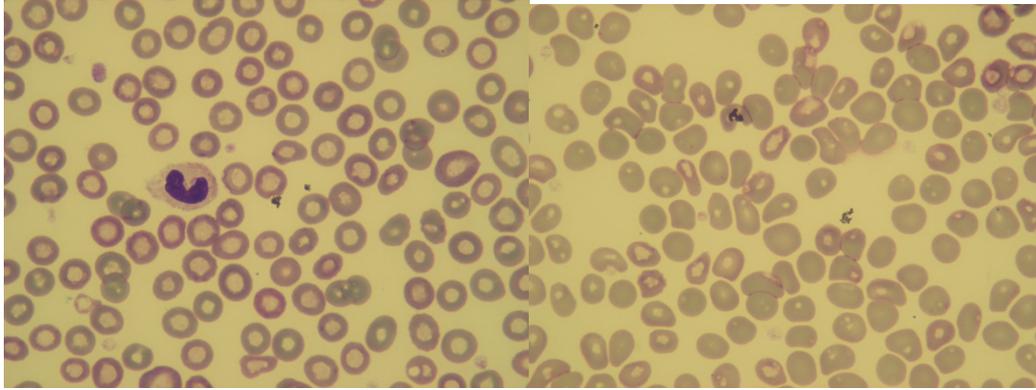


Fig. 6.1. Observación al microscopio óptico de nanopartículas de hierro (diseño I) no recubiertas, en contacto con células sanguíneas.

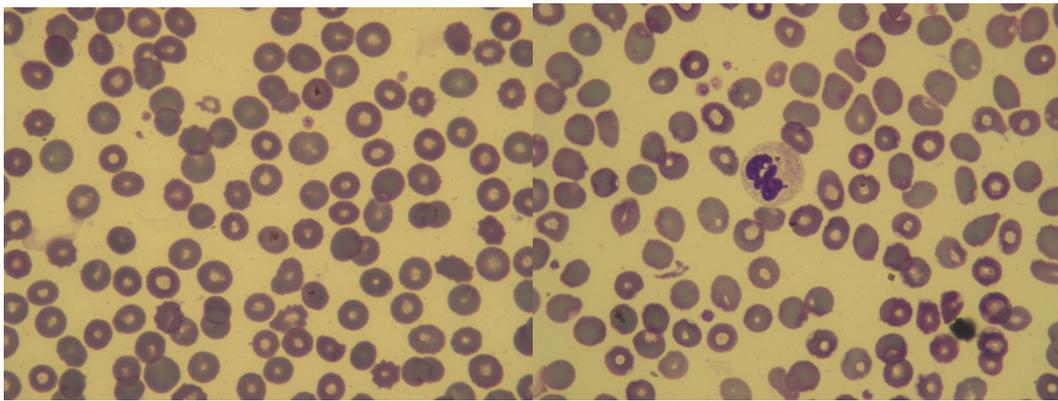


Fig. 6.2. Como Fig. 6.1, pero para partículas recubiertas de PEG 200.

6.2.2. *Nanopartículas M/C/CH y células tumorales*

La Fig. 6.3 (Viota y cols., 2013) identifica la importancia de la adición de ácido fólico en la incorporación celular: sin la capa final de este compuesto, no se observan partículas en el interior celular, mientras que con él se puede observar un número considerable de clusters de partículas distribuidas en torno a los núcleos de las células PLC-PRF-5, de cáncer hepático. Con objeto de confirmar estos resultados, se tomaron también imágenes con microscopía confocal, mostradas en la Fig. 6.4.

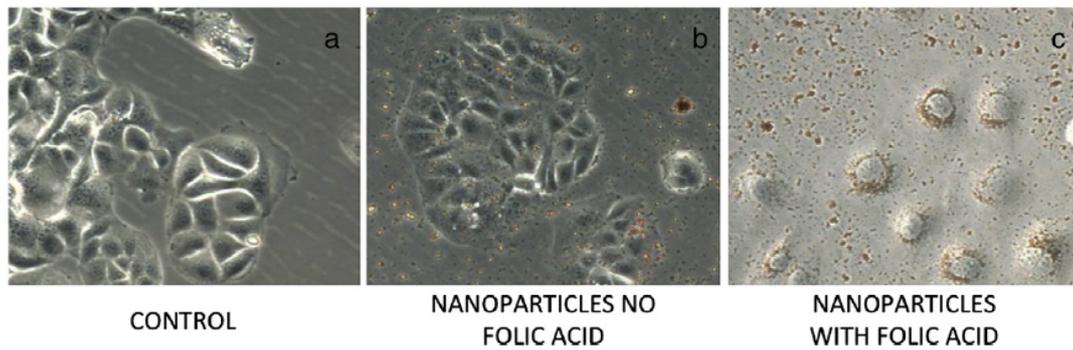


Fig. 6.3. Imágenes de microscopía de contraste de fase de células tumorales hepáticas PLC-PRF-5 (a) en contacto con nanopartículas sin (b) y con (c) ácido fólico.

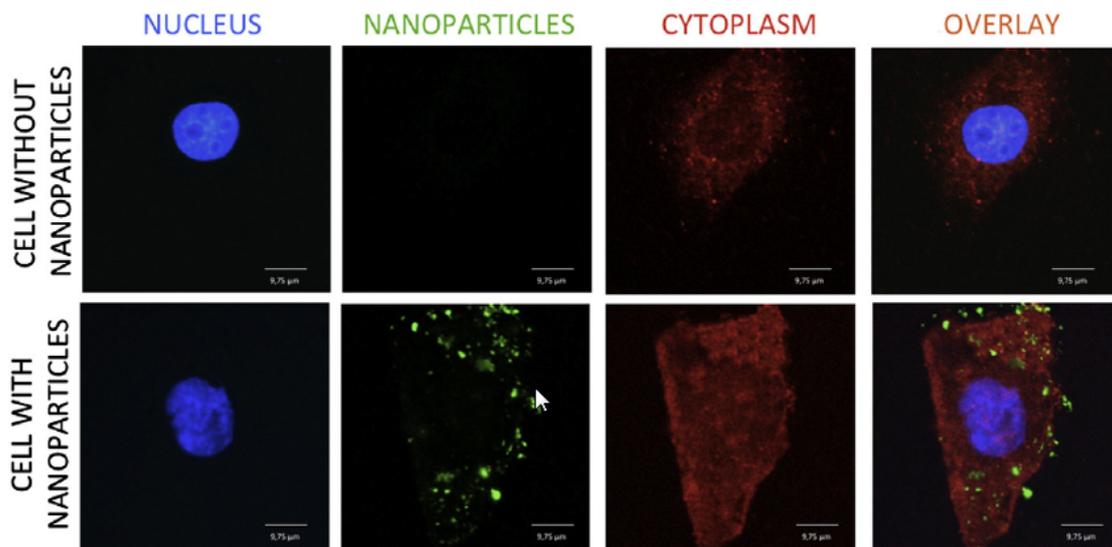


Fig. 6.4. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de células tumorales PLC-PRF-5 con y sin tratamiento con nanopartículas.

La liberación de gemcitabina desde las partículas se estudió también mediante microscopía de fluorescencia, como en la Fig. 6.5. La fluorescencia de las células de tumor hepático indica que el fármaco se libera en efecto en el interior de las mismas. Después de 1 h la diferencia entre la intensidad de fluorescencia proveniente del núcleo y del resto de la célula es claramente observable. Es decir, la gemcitabina no solo es capaz de entrar al citoplasma, sino que de hecho al cabo de 2 h está

concentrada principalmente en los núcleos. Se obtuvieron resultados similares con otras células de tumores colorrectales y de mama (Viota y cols., 2013).

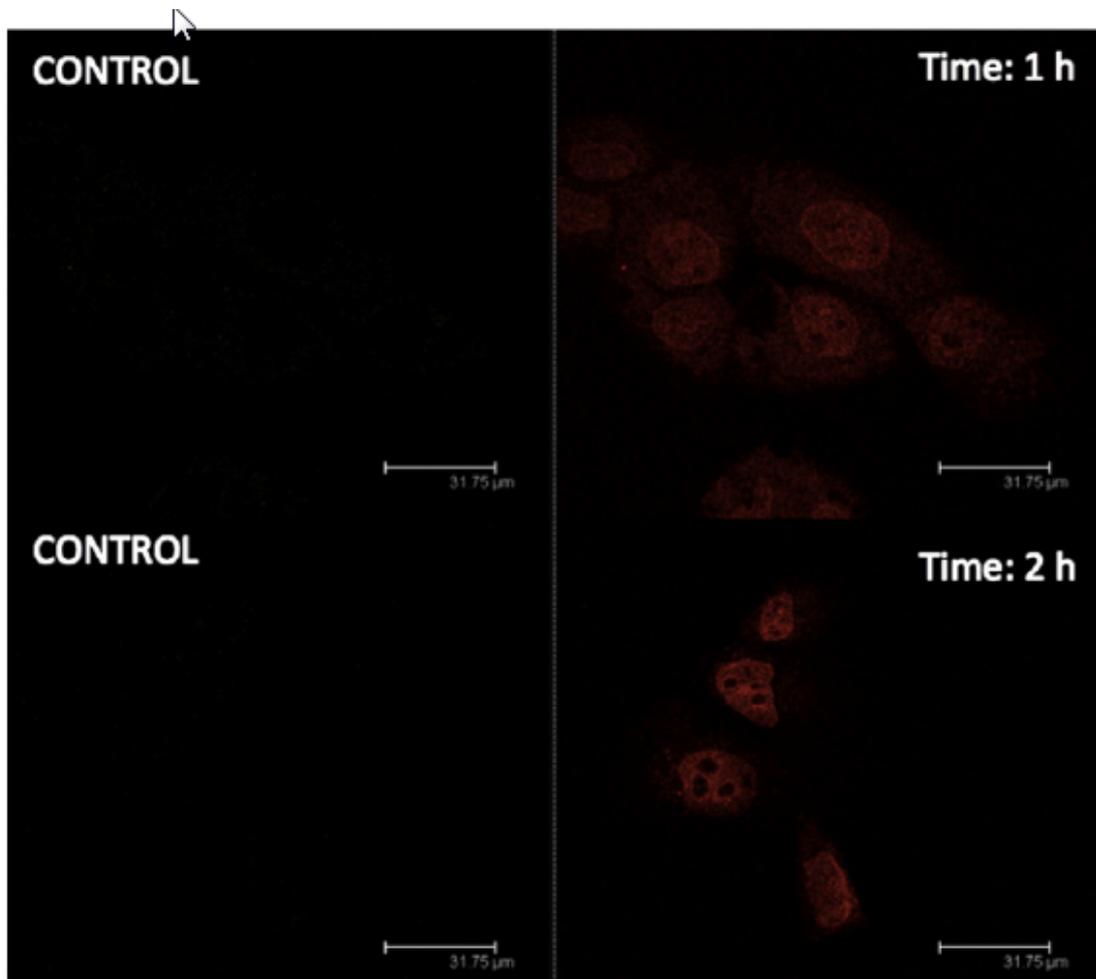


Fig. 6.5. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de células tumorales PLC-PRF-5 sin tratamiento (panel izquierdo) y tratadas (panel derecho) con nanopartículas (magnetita/ C-934) portadoras de gemcitabina y ácido fólico. Concentración de partículas: 0.1 %; duración del contacto indicada en cada caso.

7.

Resumen y Conclusiones

Pueden resumirse los resultados más significativos de este trabajo en las siguientes conclusiones:

En relación con la preparación y caracterización de nanoestructuras magnéticas:

1. Se han sintetizado núcleos de hierro y de hierro/magnetita con tamaño inferior a los 20 nm, que por primera vez se han empleado en dispositivos de aplicación biomédica.
2. Se ha puesto a punto un método para recubrir esas partículas con un polímero no iónico de demostrada eficacia como protector de las partículas frente al ataque del sistema fagocítico mononuclear. En estos ensayos, se han probado distintas longitudes de cadena.
3. Con el objetivo de comparar las prestaciones de nuestras partículas se han utilizado también nanopartículas comerciales de hierro y se han sintetizado también nanopartículas de magnetita, ampliamente utilizadas. Con estas últimas se prepararon transportadores con la estructura en multicapa magnetita/ácido poliacrílico (Carbopol)/chitosán.
4. La microscopía electrónica de transmisión y barrido de alta resolución muestra que las partículas se recubren efectivamente de los polímeros seleccionados.
5. Se determinaron los ciclos de histéresis magnética de las partículas de hierro, demostrándose su naturaleza superparamagnética. La imanación de saturación y la susceptibilidad inicial son claramente mayores para las partículas de hierro/magnetita, lo que sugiere que las partículas de hierro se recubren espontáneamente de un óxido no magnético, si no se fuerza la formación de óxido magnético.

En relación con las propiedades eléctricas superficiales:

1. En términos generales, se confirma que las propiedades electrocinéticas (en particular, la electroforesis) constituyen una excelente herramienta de seguimiento de los tratamientos superficiales aplicados a las partículas.
2. Las nanopartículas de hierro de ambos diseños presentan un punto isoeléctrico bien definido en torno a pH 5.
3. Aunque el recubrimiento con PEG oculta eficazmente al núcleo magnético, no afecta de manera significativa a sus propiedades electrocinéticas, dado el carácter neutro de la capa polimérica.
4. Este mismo hecho se observa con las partículas comerciales, aunque sus propiedades superficiales difieren de las sintetizadas por nosotros, debido a su diferente tratamiento superficial
5. En el caso de las nanopartículas de magnetita, su punto isoeléctrico, originalmente en pH 6.5, se modifica por adición de carbopol, que lo reduce hasta 5. La adición posterior de la capa de chitosán eleva la movilidad a valores más positivos y fuerza un pH hasta 9.5 como punto isoeléctrico.

En relación con la capacidad de vehiculización de fármacos:

1. Se ha investigado esa capacidad para tres fármacos antitumorales (5-fluorouracilo [5-FU] y doxorubicina [DOX] con hierro y hierro/magnetita; gemcitabina [GEM] con magnetita/carbopol/chitosan [M/C/CH]).
2. Los métodos utilizados han sido espectrofotométricos (cuantitativos) y electroforéticos (cualitativos).
3. Se han encontrado considerables dificultades para adsorber 5-FU sobre Fe o Fe/magnetita recubiertos de PEG. La ausencia de carga en el fármaco y en la cadena polimérica parece ser la causa de este hecho. Aunque se da la adsorción, su cuantía es muy baja.
4. Muy diferentes son los resultados encontrados con DOX. La movilidad de las partículas cambia de signo (de negativo a positivo) e incluso se produce sobrecarga. La densidad de adsorción es muy elevada en este caso.

5. Debe mencionarse que se prefiere el PEG de menor peso molecular para esta aplicación.
6. También hay adsorción notable de GEM sobre los complejos M/C/CH.
7. Los experimentos de liberación *in vitro* muestran de nuevo las dificultades con 5-FU, del que se libera un escaso porcentaje de la cantidad, de por sí pequeña, adsorbida.
8. De nuevo, se tiene una liberación de DOX mucho más eficiente. Se ha comprobado que la aplicación de un gradiente de campo magnético disminuye el ritmo de liberación, como consecuencia de la agregación y consiguiente reducción de superficie accesible.
9. Los complejos M/C/CH son por el contrario excelente vehículos de GEM, capaces de liberar cantidades próximas al 100 % al cabo de unos tres días de contacto con el medio de cultivo.

En relación con la interacción vehículo/célula:

1. Se han realizado experimentos que, como prueba de concepto, muestran una buena compatibilidad de los vehículos Fe/mag/PEG con células sanguíneas, en las que no inducen daño aparente y en cuyo citoplasma son capaces de penetrar.
2. Las partículas M/C/CH aumentan su capacidad de interacción con las células tumorales hepáticas si contienen ácido fólico en superficie, demostrando la especificidad de este.
3. La microscopía de fluorescencia demuestra que liberan su carga de GEM en el citoplasma de las células mencionadas, y que al cabo de solo dos horas de contacto los núcleos ya contienen cantidades observables del antitumoral.

8.

Bibliografía

- Aggarwal P, JB Hall, CB McLeland, MA Dobrovolskaia, SE McNeil. 2009. "Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy." *Adv. Drug Delivery Rev.* 61:428–37.
- Ahualli, S, ML Jimenez, F Carrique, AV Delgado. 2009. "AC Electrokinetics of Concentrated Suspensions of Soft Particles." *Langmuir* 25:1986-97.
- Ahualli, S, M Ballauff, FJ Arroyo, AV Delgado, ML Jimenez, ML. 2012. "Electrophoresis and Dielectric Dispersion of Spherical Polyelectrolyte Brushes." *Langmuir* 28:16372-81.
- Alexiou C, W Arnold, RJ Klein, FG Parak, P Hulin, C Bergemann, W Erhardt, S Wagenpfeil, AS Lübbe. 2000. "Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting." *Cancer Res.* 60:6641–48.
- Alexiou, C, W Arnold, P Hulin, RJ Klein, H Renz, FG Parak, C Bergemann, A Stephan. 2001. "Magnetic mitoxantrone nanoparticle detection by histology, X-ray and MRI after magnetic tumor targeting." *J. Magn. Magn. Mater.* 225:187–93.
- Allen, TM. 1994. "Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery." *Trends in Pharm. Sci.* 15:215–20.
- Allen, TM, PR Cullis. 2004. "Drug delivery systems: entering the mainstream." *Science (New York, N.Y.)* 303:1818–22.
- Ang, KL, S Venkatraman, RV Ramanujan. 2007. "Magnetic PNIPA hydrogels for hyperthermia applications in cancer therapy." *Mater. Sci. Eng. C* 27:347–51.
- Arias, J L. 2011. "Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview." *Mini Rev. Med. Chem.* 11:1–17.
- Arias, J L, V Gallardo, S A Gómez-Lopera, R C Plaza, A V Delgado. 2001. "Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core." *J. Control. Rel.* 77:309–21.
- Arias, JL. 2008. "Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems." *Molecules (Basel, Switzerland)* 13:2340–69.
- Arias, JL, V Gallardo, MA Ruiz, A V Delgado. 2008a. Magnetite-poly-(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-Fluorouracil delivery systems for active targeting." *Eur. J. Pharm. Sci.* 69:54–63.
- Arias, JL, F Linares-Molinero, V Gallardo, AV Delgado. 2008b. "Study of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) (core/shell) particles as anticancer drug delivery systems Loading and release properties." *Eur. J. Pharm. Sci.* 33:252–61.
- Arias, JL, M López-Viota, B Clares, and M A Ruiz. 2008c. "Stability of fenbendazole suspensions for veterinary use. Correlation between zeta potential and sedimentation." *Eur. J. Pharm. Sci.* 34:257–62.
- Arias, JL, LH Reddy, P Couvreur. 2008d. "Magnetoresponsive squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting." *Langmuir* 24:7512–19.

- Arias, JL, LH Reddy, P Couvreur. 2009. "Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine." *J. Drug Target.* 17:586–98.
- Arias, JL, LH Reddy, P Couvreur. 2011. "Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system." *Biomacromolecules* 12:97–104.
- Arruebo, M, R Fernandez-Pacheco, M R Ibarra, J Santamaria. 2007. "Magnetic nanoparticles for drug delivery." *Nano Today* 2:22–32.
- Banerjee, T, SMitra, A K Singh, R KSharma, A Maitra. 2002. "Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles." *Int. J. Pharm.* 243:93–105.
- Barberi-Heyob M, M Watelet. 1995. "Stability of 5-fluorouracil solutions according to different parameters" *Bull. Cancer* 82: 1025-31.
- Bareford, LM, PW Swaan. 2007. "Endocytic mechanisms for targeted drug delivery." *Adv. Drug delivery Rev.* 59:748–58.
- Begley, DJ 2004. "Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities." *Pharmacol. Therapeutics* 104:29–45.
- Bellocq, NC, H Suzie, SH Pun, GS Gregory, S Jensen, ME Davis. 2003. "Transferrin-containing, cyclodextrin polymer based particles for tumor targeted gene delivery." *Bioconjugate Chem.* 14:1122–32.
- Belting, M, SSandgren, A Wittrup. 2005. "Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers." *Adv. Drug Delivery Rev.* 57:505–27.
- Bertolini A, Fiumanò M, Muffatti A, Pedroncelli S, Doria A, Codazzi G, Giustiniani S, Scarinci A, Redaelli G. 1999. "Acute cardiotoxicity from 5-fluorouracil: underestimated toxicity". *Minerva Cardioangiol.* 47 (7-8), 269
- Betancourt, T, B Brown, L Brannon-Peppas. 2007. "Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation." *Nanomedicine* 2:219–32.
- Bhadra, D, S Bhadra, S Jain, N K Jain. 2003. "A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil." *Int. J. Pharm.* 257:111–24.
- Bisby, R H, C Mead, and C G Morgan. 2000. "Active uptake of drugs into photosensitive liposomes and rapid release on UV photolysis." *Photochem. Photobiol.* 72:57–61.
- Blagoeva PM, RM Balansky, TJ Mircheva, MI Simeonova. 1992. "Diminished genotoxicity of mitomycin C and famorubicin included in polybutylcyanoacrylate nanoparticles". *Mutat. Res.* 268: 77-82
- Boyd, B J 2008. "Past and future evolution in colloidal drug delivery systems." *Expert Opin. Drug Delivery* 5:69–85.
- Brannon-Peppas, L, JO Blanchette. 2004. "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy." *Adv. Drug Delivery Rev.* 56:1649–59.
- Brigger, I, C Dubernet, P Couvreur. 2002. "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis." *Adv. Drug Delivery Rev.* 54:631–51.

Bulte JW, LD Ma, RL Magin, RL Kamman, CE Hulstaert CE, KG Go, TH The, L de Leij. 1993. "Selective MR imaging of labeled human peripheral blood mononuclear cells by liposome mediated incorporation of dextran-magnetite particles." *Magn. Reson. Med.* 29:32–37.

Butterworth, M, L Illum, S Davis. 2001. "Preparation of ultrafine silica- and PEG-coated magnetite particles." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 179:93–102.

Callister W D. 1996 "Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales (tomo II)", Reverté, Barcelona, pp. 685-717.

Cappuzzo, F, G Finocchiaro, R Trisolini, L Toschi, S Bartolini, G Metro, L Crino. 2005. "Perspectives on salvage therapy for non-small-cell lung cancer". *Oncology-New York* 19: 989-95.

Chan, CF, DB Kirpotin, PA Bunn. 1993. "Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer." *J. Magn. Mater.* 122:374–78.

Charles S W, J Popplewell. 1980. "Ferromagnetic liquids" *Ferromagnetic Materials* 12, E.P. Wohlfarth Ed., Amsterdam, North-Holland Publishing Co., pp. 509-559

J Chatterjee, M Bettge, Y Haik, C J Chen. 2005. "Synthesis and characterization of polymer encapsulated Cu–Ni magnetic nanoparticles for hyperthermia applications." *J. Magn. Mater.* 293:303–9.

Chavanpatil, MD, H Handa, G Mao, J Panyam. 2007. "Incorporation of phospholipids enhances cellular uptake and retention of surfactant-polymer nanoparticles." *J. Biomed. Nanotechnol.* 3:291–96.

Chen TJ, TH Cheng, YC Hung, KT Lin, GC Liu, YM Wang. 2008. "Targeted folic acid-PEG nanoparticles for noninvasive imaging of folate receptor by MRI." *J. Biomed. Mater. Res. A* 87:165–75.

Chen, X, W Zhang, J Laird, SL Hazen, RG Salomon. 2008. "Polyunsaturated phospholipids promote the oxidation and fragmentation of gamma-hydroxyalkenals: formation and reactions of oxidatively truncated ether phospholipids." *J. Lipid Res.* 49:832–46.

Chertok B, BA Moffat, AE David, F Yu, C Bergemann, BD Ross, VC Yang. 2008. "Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors." *Biomaterials* 29:487–96.

Chertok B, AE David, BA Moffat, F Yu, BD Ross, VC Yang. 2009. "Substantiating in vivo magnetic brain tumor targeting of cationic iron oxide nanocarriers via adsorptive surface masking." *Biomaterials* 30:6780–87.

Chertok B, AE David, BD Ross, VC Yang. 2010. "Polyethyleneimine-modified iron oxide nanoparticles for brain tumor drug delivery using magnetic targeting and intra-carotid administration." *Biomaterials* 31:6317–24.

Cho, K, X Wang, S Nie, Z G Chen, DM Shin. 2008. "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer." *Clin. Cancer Res.* 14:1310–16.

- Choi HS, W Liu, P Misra, E Tanaka, JP Zimmer, IB Itty, MG Bawendi, JV Frangioni. 2007. "Renal clearance of quantum dots." *Nature Biotechnol.* 25:1165–70.
- Chomoucka J, J Drbohlavova, D Huska, V Adam, R Kizek, J Hubalek. 2010. "Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering." *Pharmacol. Res.* 62:144–49.
- Chorny M, B Polyak, IS Alferiev, K Walsh, G Friedman, RJ Levy. 2007. "Magnetically driven plasmid DNA delivery with biodegradable polymeric nanoparticles." *FASEB J.* 21:2510–19.
- Chouly C, D Pouliquen, I Lucet, JJ Jeune, P Jallet. 1996. "Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution" *J. Microencapsul.*; 13:245-255
- Ciofani, G, C Riggio, V Raffa, A Menciasci, A Cuschieri. 2009. "A bi-modal approach against cancer: magnetic alginate nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia." *Medical Hypotheses* 73:80–82.
- Corot, C, R Philippe, J Idée, M Port. 2006. "Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging." *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:1471–1504.
- Couvreur, P, C Vauthier. 2006. "Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease." *Pharm. Res.* 23:1417–50.
- Cummings L, G Richardson, L Hazelwood. 2000 . "Drug delivery by magnetic microspheres" *Proc. Mathematics in Medicine Study Group.* 69.
- Dash BC, G Réthoré, M Monaghan, K Fitzgerald, W Gallagher, A Pandit. 2010. "The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility." *Biomaterials* 31:8188–97.
- Davis, ME. 2002. "Non-viral gene delivery systems." *Current OPin. Biotechnol.* 13:128–31.
- Davis, ME, GC Zhuo, DM Shin. 2008. "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer." *Nature Rev. Drug Discovery* 7:771–82.
- Davis SC, FC Szoka. 1998. "Cholesterol phosphate derivatives: Synthesis and incorporation into a phosphatase and calcium-sensative triggered release liposome." *Bioconj. Chem* 9: 783-792.
- Decuzzi, P, F Causa, M Ferrari, and PA Netti. 2006. "The effective dispersion of nanovectors within the tumor microvasculature." *Annals Biomed. Eng.* 34:633–41.
- Decuzzi, P, M Ferrari. 2006. "The adhesive strength of non-spherical particles mediated by specific interactions." *Biomaterials* 27:5307–14.
- Decuzzi, P, S Lee, B Bhushan, M Ferrari. 2005. "A theoretical model for the margination of particles within blood vessels." *Annals Biomed. Eng.* 33:179–90.
- Delgado AV (Ed.). 2001. *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis.* Marcel Dekker, New York.
- Dewhirst MW, L Prosnitz, D Thrall, D Prescott, S Clegg, C Charles, J MacFall, G Rosner, T Samulski, E Gillette, S LaRue. 1997. "Hyperthermic treatment of malignant diseases: current status and a view toward the future." *Seminars in oncology* 24:616–25.

Dobrovolskaia MA, Patri AK, Zheng J, Clogston JD, Ayub N, Aggarwal P, Neun BW, Hall JB, McNeil SE.. 2008. "Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles." *Nanomedicine* 5: 106-17.

Dobson, J. 2006. "Magnetic nanoparticles for drug delivery." *Drug Development Res.* 67:55–60.

Donadel K, MDV Felisberto, VT Fávere, M Rigoni, NJ Batistela, MCM Laranjeira. 2008. "Synthesis and characterization of the iron oxide magnetic particles coated with chitosan biopolymer." *Mater. Sci. Eng. C* 28:509–14.

Duan, H, M Kuang, X Wang, YA Wang, H Mao, S Nie. 2008. "Reexamining the effects of particle size and surface chemistry on the magnetic properties of iron oxide nanocrystals: New insights into spin disorder and proton relaxivity." *J. Phys. Chem. C* 112:8127–31.

Dukhin, SS. 1974. "Development of notions as to the mechanism of electrokinetic phenomena and the structure of the colloid micelle". *Surface and Colloid Science (Vol. VII)*, Ed.: Matijevic E., Wiley, New York, pp. 1-47

Durán, JDG, JL Arias, V Gallardo, AV Delgado. 2008. "Magnetic colloids as drug vehicles." *J. Pharm. Sci.* 97:2948–83.

Duval, JFL, H Ohshima. 2006. "Electrophoresis of diffuse soft particles." *Langmuir* 22: 3533-3546.

Esmaeili F, MH Ghahremani, SN Ostad, F Atyabi, M Seyedabadi, MR Malekshahi, M Amini, R Dinarvand. 2008. "Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate." *J. Drug Targeting* 16:415–23.

Farokhzad OC, J Cheng, BA Teply, I Sherifi, S Jon, PW Kantoff, JP Richie, R Langer. 2006. "Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6315–20.

Farokhzad, OC, R Langer. 2006. "Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities." *Adv. Drug delivery Rev.* 58:1456–59.

Fawaz F, F Bonini, M Guyot, AM Lagueny, H Fessi, JP Devissaguet. 1993. "Influence of poly(DL-lactide) nanocapsules on the biliary clearance and enterohepatic circulation of indomethacin in the rabbit." *Pharm. Res.* 10:750–56.

Fernández-Pacheco R, JG Valdivia, MR Ibarra. 2007. "Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants." *J. Magn. Magn. Mater.* 311:318–22.

Ferrari, M. 2005. "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges." *Nature Rev. Cancer* 5:161–71.

Fischer, HC, WCW Chan. 2007. "Nanotoxicity: the growing need for in vivo study." *Current Opin. Biotechnol.* 18:565–71.

Flenniken ML, LO Liepold, BE Crowley, DA Willits, MJ Young, T Douglas. 2005. "Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture." *Chemical Communications* 447–49.

- Flórez J, 1997. "Quimioterapia antineoplásica I. Principios fundamentales. "Antimetabolitos, fijadores de tubulina, inhibidores de topoisomerasas" *Farmacología humana* 3:1019-1038
- Florey K. 1973. "Fluorouracil." *Analytical profiles of drug substances*. Academic Pres, New York, pp. 221-244.
- Forge, D, S Laurent, Y Gossuin, A Roch, L Vander Elst, RN Muller. 2011. "An original route to stabilize and functionalize magnetite nanoparticles for theranosis applications." *J. Magn. Magn. Mater.* 323:410–15.
- Fowler, WC, L van Le. 2003. "Gemcitabine as a single-agent treatment for ovarian cancer." *Gynecol. Oncol.* 90:S21-S23.
- Frullano, L, BTejerina, TJ Meade. 2006. "Synthesis and characterization of a doxorubicin-Gd(III) contrast agent conjugate: a new approach toward prodrug-procontrast complexes." *Inorganic Chem.* 45:8489–91.
- Fuertges, F, A Abuchowski. 1990. "The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins." *J. Control. Rel.* 11:139–48.
- Gaber MH, NZ Wu, K Hong, SK Huang, MW Dewhirst, D Papahadjopoulos. 1996. "Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks." *Int. J. rad. Oncol. Biol. Phys.* 36:1177–87.
- Gabizon, A, HShmeeda, AT Horowitz, S Zalipsky. 2004. "Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates." *Adv. Drug Delivery Rev.* 56:1177–92.
- Gallo, J M, P K Gupta, C T Hung, D G Perrier. 1989. "Evaluation of drug delivery following the administration of magnetic albumin microspheres containing adriamycin to the rat." *J. Pharm. Sci.* 78:190–94.
- Gerasimov, OV, JA Boomer, MM Qualls, DH Thompson. 1999. "Cytosolic drug delivery using pH- and light-sensitive liposomes." *Adv. Drug Delivery Rev.* 38:317–38.
- Glöckl G, R Hergt, M Zeisberger, S Dutz, S Nagel, W Weitschies. 2006. "The effect of field parameters, nanoparticle properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia." *J. Phys. Condensed Matter* 18:S2935–S2949.
- Gómez-Sotomayor, R, S Ahualli, JL Viota, K Rudzka, AV Delgado. 2014. "Iron/magnetite nanoparticles as magnetic delivery systems for antitumor drugs." *J. Nanosci. Nanotechnol.* En prensa.
- Goren D, AT Horowitz, D Tzemach, M Tarshish, S Zalipsky, A Gabizon. 2000. "Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump." *Clinical cancer Res.* 6:1949–57.
- Goya, G F, V Grazu, M R Ibarra. 2008. "Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy." *Current Nanoscience* 4:1–16.
- Grainger DW. 2009. "Nanotoxicity assessment: All small talk." *Adv. Drug Delivery Rev.* 61: 419-421.

- Gref, R. et al. 2001. "Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51:111–18.
- Gua FX, R Karnikc, AZ Wangb, F Alexis, E Levy-Nissenbaumb, S Honga, RS Langera, OC Farokhzad. 2007. "Targeted nanoparticles for cancer therapy." *Nano Today* 2:14–21.
- Guo, X, FC Szoka. 2003. "Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery." *Accounts Chem. Res.* 36:335–41.
- Gupta, AK, M Gupta. 2005. "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications." *Biomaterials* 26:3995–4021.
- Gupta, AK, RR Naregalkar, VD Vaidya, M Gupta. 2007. "Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications." *Nanomedicine* 2:23–39.
- Gupta, P K, C T Hung. 1989. "Albumin Microspheres II: Applications in Drug Delivery." *J. Microencapsulat.* 6:463–72.
- Gupta, P K, C T Hung. 1989. "Magnetically controlled targeted micro-carrier systems." *Life Sci.* 44:175–86.
- Gupta, P K, C T Hung, F C Lam, D G Perrier. 1988. "Albumin microspheres. III. Synthesis and characterization of microspheres containing adriamycin and magnetite." *Int. J. Pharm.* 43:167–77.
- Haley, B, E Frenkel. 2008. "Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment." *Urol. Oncol.* 26:57–64.
- Han, SK, N Kun, YH Bae. 2003. "Sulfonamide based pH-sensitive polymeric micelles: physicochemical characteristics and pH-dependent aggregation." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 214:49–59.
- Harris, JM, RB Chess. 2003. "Effect of pegylation on pharmaceuticals." *Nature Rev Drug Discovery* 2:214–21.
- Hau P, K Fabel, U Baumgart, P Rümmele, O Grauer, A Bock, C Dietmaier, W Dietmaier, J Dietrich, C Dudel, F Hübner, T Jauch, E Drechsel, I Kleiter, C Wismeth, A Zellner, A Brawanski, A Steinbrecher, J Marienhagen, U Bogdahn. 2004. "Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma". *Cancer* 100:1199-207.
- Hauck, M L, M W Dewhirst, D D Bigner, M R Zalutsky. 1997. "Local hyperthermia improves uptake of a chimeric monoclonal antibody in a subcutaneous xenograft model." *Clinical Cancer Res.* 3:63–70.
- Hergt, R, S Dutz, R Müller, M Zeisberger. 2006. "Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy." *J. Phys.: Condensed Matter* 18:S2919–S2934.
- Hervé K, Douziech- L Eyrolles, E Munnier, Cohen- S Jonathan, M Soucé, H Marchais, P Limelette, F Warmont, ML Saboungi, P Dubois, I Chourpa. 2008. "The development of

- stable aqueous suspensions of PEGylated SPIONs for biomedical applications." *Nanotechnology* 19:465608.
- Hilgenbrink, AR, PS Low. 2005. "Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics." *J. Pharm. Sci.* 94:2135–46.
- Hilger, I, E Dietmar, W Linß, S Streck, WA Kaiser. 2006. "Developments for the minimally invasive treatment of tumours by targeted magnetic heating." *J. Phys.: Condensed Matter* 18:S2951–S2958.
- Ho, KM, L Pei. 2008. "Design and synthesis of novel magnetic core-shell polymeric particles." *Langmuir* 24:1801–7.
- Hood JD, M Bednarski, R Frausto, S Guccione, RA Reisfeld, R Xiang, DA Cheresch. 2002. "Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature." *Science* 296:2404–2407.
- Huber, DL. 2005. "Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles." *Small* 1:482–501.
- Hunter, RJ 1989. "Foundations of Colloid Science" *Clarendon Press*, Oxford, Vol. 2.
- Hunter, RJ 1987. "Zeta Potential in Colloid Science" *Academic Press*, London.
- Huwylar, J, J Drewe, S Krähenbuhl. 2008. "Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs." *Int. J. Nanomed.* 3:21–29.
- Ibrahim A, P Couvreur, M Roland, P Speiser. 1983 "New magnetic drug carrier." *J. Pharm. Pharmacol.* 35: 59-61.
- Illum L, AE Church, MD Butterworth, A Arien, J Whetstone, SS Davis. 2001. "Development of systems for targeting the regional lymph nodes for diagnostic imaging: in vivo behaviour of colloidal PEG-coated magnetite nanospheres in the rat following interstitial administration." *Pharm. Res.* 18:640–45.
- Imai, K, A Takaoka. 2006. "Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer." *Nature Rev. Cancer* 6:714–27.
- He J, H F VanBrocklin, B L Franc, Y Seo, E F Jones, 2008 "Nanoprobes for medical diagnosis: Current status of nanotechnology in molecular imaging", *Current Nanosci.* 4, 17-29.
- Jain T, M Morales, S Sahoo, D Leslie-Pelecky, V Labhasetwar. 2005 "Iron-oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents." *Mol. Pharm.* 2:194-9.
- Jeong, JH, WK Sung, TG Park. 2003. "A new antisense oligonucleotide delivery system based on self-assembled ODN-PEG hybrid conjugate micelles." *J. Control. Rel.* 93:183–91.
- Jurgons R, C Seliger, A Hilpert, L Trahms, S Odenbach, C Alexiou. 2006. "Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy." *J. Physics: Condensed Matter* 18:S2893–S2902.
- Kallumadil M, M Tada, T Nakagawa, M Abe, P Southern, QA Pankhurst. 2009. "Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia." *J. Magn. Magn. Mater* 321: 1509-1513.
- Kam, N, S Wong, M O'Connell, JAWisdom, H Dai. 2005. "Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell

- destruction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11600–605.
- Karanth, H, R S R Murthy. 2007. "pH-sensitive liposomes. Principles and applications in cancer therapy." *J. Pharm. Pharmacol.* 59:469–83.
- Karlsson, HL, J Gustafsson, P Cronholm, L Möller. 2009. "Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size." *Toxicology letters* 188:112–18.
- Kim, DK, Y Zhang, J Kehr, T Klason, B Bjelke, M Muhammed, M. 2001. "Characterization and MRI study of surfactant-coated superparamagnetic nanoparticles administered into the rat brain." *J. Magn. Magn. Mater.* 225:256–61.
- Kim, D, ES Lee, K Park, IC Kwon, YH Bae. 2008. "Doxorubicin loaded pH-sensitive micelle: antitumoral efficacy against ovarian A2780/DOXR tumor." *Pharm. Res.* 25:2074–82.
- Kim, EH, Y Ahn, HS Lee. 2007. "Biomedical applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated within chitosan." *J. Alloys and Compounds* 434-435:633–36.
- Kim IY, YS Kang, DS Lee, HJ Park, EK Choi, YK Oh, HJ Son, JS Kim. 2009. "Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice." *J. Control. Release* 140:55–60.
- Kim, SH, JH Jeong, KW Chun, TG Park. 2005. "Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate." *Langmuir* 21:8852–57.
- Kohler, N, GE Fryxell, M Zhang. 2004. "A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents." *J. Amer. Chem. Soc.* 126:7206–11.
- Kong G, MW Dewhirst. 1999. "Hyperthermia and liposomes." *Int. J. Hyperther* 15: 345-370.
- Kong G, G Anyarambhatla, WP Petros, RD Braun, OM Colvin, D Needham, MW Dewhirst. 2000. "Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release." *Cancer Res.* 60:6950–57.
- Kos, J, N Obermajer, B Doljak, P Kocbek, J Kristl. 2009. "Inactivation of harmful tumour-associated proteolysis by nanoparticulate system." *Int. J. Pharm.* 381:106–12.
- Kost, J, R Noecker, E Kunica, R Langer. 1985. "Magnetically controlled release systems: effect of polymer composition." *J. Biomed. Mater. Res.* 19:935–40.
- Kukowska-Latallo JF, KA Candido, Z Cao, SS Nigavekar, IJ Majoros, TP Thomas, LP Balogh, MK Khan, JR Baker Jr. 2005. "Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer." *Cancer Research* 65:5317–24.
- Kumar A, B Sahoo, A Montpetit, S Behera, RF Lockey, SS Mohapatra. 2007. "Development of hyaluronic acid-Fe₂O₃ hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of peptides." *Nanomedicine* 3:132–37.

- Kunzmann, Andrea et al. 2011. "Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation." *Biochimica et biophysica acta* 1810:361–73.
- LaConte LE, N Nitin, O Zurkiya, D Caruntu, CJ O'Connor, X Hu, G Bao. 2007. "Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R2 relaxivity." *J. Magn. Reson. Imaging* 26:1634–41.
- Lai, TY, WC Lee. 2009. "Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles." *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 204:148–53.
- Larina IV, BM Evers, TV Ashitkov, C Bartels, KV Larin, RO Esenaliev. 2005. "Enhancement of drug delivery in tumors by using interaction of nanoparticles with ultrasound radiation." *Technol. Cancer Res. Treatment* 4:217–26.
- Laurent, S, JL Bridot, LV Elst, RN Muller. 2010. "Magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications." *Future Medicinal Chem.* 2:427–49.
- LaVan, DA., T McGuire, R Langer. 2003. "Small-scale systems for in vivo drug delivery." *Nature Biotechnol.* 21:1184–91.
- Lee JH, YM Huh, YW Jun, JW Seo, JT Jang, HT Song, S Kim, EJ Cho, HG Yoon, JS Suh, J Cheon 2007. "Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging." *Nature Medicine* 13:95–99.
- Lemaire L, M Arellano, MC Malet-Martino, R Martino, M De Forni. 1994. "Cardiotoxicity of 5-fluorouracil: a question of formulation" *Bulletin Du Cancer* 81: 1057
- Levy-Nissenbaum E, AF Radovic-Moreno, AZ Wang, R Langer, OC Farokhzad. 2008 "Nanotechnology and aptamers: Applications in drug delivery." *Trends Biotechnol.* 26: 442-449.
- Lewinski, N, V Colvin, R Drezek. 2008. "Cytotoxicity of nanoparticles." *Small* 4:26–49.
- Liang B, ML He, CY Chan, YC Chen, XP Li, Y Li, D Zheng, MC Lin, HF Kung, XT Shuai, Y Peng. 2009. "The use of folate-PEG-grafted-hybranched-PEI nonviral vector for the inhibition of glioma growth in the rat." *Biomaterials* 30:4014–20.
- Liburdy, R P, T S Tenforde, R L Magin. 1986. "Magnetic field-induced drug permeability in liposome vesicles." *Radiation Res.* 108:102–11.
- Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL, Wang LF Lin, Jia-Jyun et al. 2009. "Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications." *Biomaterials* 30:5114–24.
- Liu X, MD Kaminski, H Chen, M Torno, L Taylor, AJ Rosengart. 2007. "Synthesis and characterization of highly-magnetic biodegradable poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres." *J. Control. Rel.* 119:52–58.
- Liu, WG, SJ Sun, ZQ Cao, Z Xin, KD Yao, WW Lu, KDK Luk. 2005. "An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes." *Biomaterials* 26: 2705-11.

Lo, CL, KM Lin, GH Hsiue. 2005. "Preparation and characterization of intelligent core-shell nanoparticles based on poly(D,L-lactide)-g-poly(N-isopropyl acrylamide-co-methacrylic acid)." *J. Control. Rel.* 104:477–88.

Longmire, M, PL Choyke, H Kobayashi. 2008. "Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats." *Nanomedicine (London, England)* 3:703–17.

Lowery, AR, AM Gobin, ES Day, NJ Halas, JL West. 2006. "Immunonanoshells for targeted photothermal ablation of tumor cells." *Int. J. Nanomed.* 1:149–54.

Lu, Y, PS Low. 2002. "Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents." *Adv. Drug Delivery Rev.* 54:675–93.

Lübbe AS, C Bergemann, H Riess, F Schriever, P Reichardt, K Possinger, M Matthias, B Dörken, F Herrmann, R Gürtler, P Hohenberger, N Haas, R Sohr, B Sander, AJ Lemke, D Ohlendorf, W Huhnt, D Huhn. 1996. "Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors." *Cancer Res.* 56:4686-93.

Lübbe AS, C Bergemann, W Huhnt, T Fricke, H Riess, JW Brock, D Huhn. 1996. "Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy." *Cancer Res.* 56:4694–4701.

Lübbe, AS, C Bergemann, J Brock, DG McClure. 1999. "Physiological aspects in magnetic drug-targeting." *J. Magn. Magn. Mater.* 194:149–55.

Lutz JF, S Stiller, A Hoth, L Kaufner, U Pison, R Cartier. 2006. "One-pot synthesis of pegylated ultrasmall iron-oxide nanoparticles and their in vivo evaluation as magnetic resonance imaging contrast agents." *Biomacromolecules* 7:3132–38.

Lyklema, J. 1991. "Foundations of Interface and Colloid Science, vol. II." *Academic Press*, London.

Lyklema, J. 2005. "Fundamentals of Interface and Colloid Science, Vol IV: Particulate Colloids." *Wiley*, London.

Lynch, I, KA Dawson. 2008. "Protein-nanoparticle interactions." *Nano Today* 3:40–47.

Maeda, H, G Y Bharate, J Daruwalla. 2009. "Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71:409–19.

Majoros, IJ, A Myc, T Thomas, CB Mehta, JR Baker. 2006. "PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: Synthesis, characterization, and functionality." *Biomacromolecules* 7:572-9.

Maruyama K, T Takizawa, T Yuda, SJ Kennel, L Huang, M Iwatsuru. 1995. "Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies." *Biochim. Biophys. Acta* 1234:74–80.

Massart, R. 1981. "Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media." *IEEE Trans. Magn.* 17:1247-48.

- Matsumura, N, JA Rowlands. 2008. "Towards new functional nanostructures for medical imaging." *Medical Phys.* 35:4474–87.
- McBain SC, U Griesenbach, S Xenariou, A Keramane, CD Batich, EW Alton, J Dobson. 2008. "Magnetic nanoparticles as gene delivery agents: enhanced transfection in the presence of oscillating magnet arrays." *Nanotechnology* 19:405102.
- McBain, S C, H H P Yiu, A El Haj, J Dobson. 2007. "Polyethyleneimine functionalized iron oxide nanoparticles as agents for DNA delivery and transfection." *J. Mater. Chem.*17:2561.
- McCarthy, JR, KA Kelly, EY Sun, R Weissleder. 2007. "Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles." *Nanomedicine (London, England)* 2:153–67.
- McCarthy, JR, R Weissleder. 2008. "Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy." *Adv. Drug Delivery Rev.* 60:1241–51.
- Mercoureff W. 1969. "Propriétés Magnétiques des solides et propriétés similaires" *Aspects modernes de la physique des solides*, Masson & Cie, Paris, pp. 75-103
- Mitra, S, U Gaur, P C Ghosh, and A N Maitra. 2001. "Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier." *J. Control. Rel.* 74:317–23.
- Moghimi, SM. 1995a. "Exploiting bone marrow microvascular structure for drug delivery and future therapies." *Adv. Drug Delivery Rev.* 17:61–73.
- Moghimi, SM. 1995b. "Mechanisms of splenic clearance of blood cells and particles: towards development of new splenotropic agents." *Adv. Drug Delivery Rev.* 17:103–15.
- Moghimi, S M, A C Hunter. 2001. "Capture of stealth nanoparticles by the body's defences." *Critical Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst. Adv. Drug Delivery Rev.* 18:527–50.
- Moghimi, S M, A C Hunter, J C Murray. 2001. "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice." *Pharmacol. Rev.* 53:283–318.
- Moghimi, S M, J Szebeni. 2003. "Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties." *Progress in Lipid Res.* 42:463–78.
- Molday, R S, D MacKenzie. 1982. "Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells." *J. Immunol. Methods* 52:353–67.
- Momparler, R L, M Karon, S E Siegel, F Avila. 1976. "Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells." *Cancer Res.* 36:2891–95.
- Montet, X, KMontet-Abou, F Reynolds, R Weissleder, L Josephson. 2006. "Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 8:214–22.
- Mornet S, S Vasseur, F Grasset, E Duguet 2006. "Magnetic nanoparticle design for medical applications." *Progress in Solid State Chemistry* 34:237–47.
- Mornet, S, J Portier, E Duguet. 2005. "A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran." *J. Magn. Mater.* 293:127–34.

- Moroz P, SK Jones, BN Gray. 2002. "Magnetically mediated hyperthermia: Current status and future directions." *Int. J. Hyperthermia* 18: 267-284
- Müller RH, C Lherm, J Herbort, P Couvreur. 1991 "Propidium-iodide-loaded polyalkylcyanoacrylate particles: Labelling conditions and loading capacity." *Colloid Polymer Sci.* 269: 147-152.
- Müller, R. 1996. "Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles." *Int. J. Pharm.* 138:85–94.
- Na, K, ES Lee, YH Bae. 2003. "Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity in vitro." *J. Control. Rel.* 87:3–13.
- Needham, D, M W Dewhirst. 2001. "The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors." *Adv. Drug Delivery Rev.* 53:285–305.
- O'Brien RW, LR White. 1978. "Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle." *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* 74:1607-26.
- Ohshima, H 2006. "Electrophoresis of soft particles: analytic approximations." *Electrophoresis* 27:526–33.
- Ohshima, H. 2007. "Electrokinetics of soft particles." *Colloid Polymer Sci.* 285: 1411-1421.
- Ohshima, H. 2009. "Theory of electrostatics and electrokinetics of soft particles." *Sci. Technol. Advanced Mater.* 10:063001.
- Onyüksel, H, PS Mohanty, I Rubinstein. 2009. "VIP-grafted sterically stabilized phospholipid nanomicellar 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin: a novel targeted nanomedicine for breast cancer." *Int. J. Pharm.* 365:157–61.
- Otsuka, H, Y Nagasaki, K Kataoka. 2003. "PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications." *Adv. Drug Delivery Rev.* 55:403–19.
- Pan, J, SS Feng. 2009. "Targeting and imaging cancer cells by folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers." *Biomaterials* 30:1176–83.
- Pankhurst, Q, J Connolly, SK Jones, J Dobson. 2003. "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine." *J. Phys. D: Applied Physics* 36:R167–R181.
- Park, EK, SY Kim, SB Lee, YM Lee. 2005. "Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery." *J. Control. Rel.* 109:158–68.
- Park, IK, CP Nga, J Wanga, B Chub, C Yuanb, S Zhangb, SH Puna. 2008. "Determination of nanoparticle vehicle unpackaging by MR imaging of a T(2) magnetic relaxation switch." *Biomaterials* 29:724–32.
- Park, JY, P Daksha, GH Lee, S Woo, Y Chang. 2008. "Highly water-dispersible PEG surface modified ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles useful for target-specific biomedical applications." *Nanotechnology* 19:365603.

- Park JW, K Hong, DB Kirpotin, G Colbern, R Shalaby, J Baselga, Y Shao, UB Nielsen, JD Marks, D Moore, D Papahadjopoulos, CC Benz. 2002. "Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery." *Clinical Cancer Res.* 8:1172–81.
- Park, JW 2002. "Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment." *Breast Cancer Res.: BCR* 4:95–99.
- Patil, YB, US Toti, A Khair, L Ma, J Panyam. 2009. "Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery." *Biomaterials* 30:859–66.
- Peng S, Wang C, Xie J, Sun. 2006. "Synthesis and Stabilization of Monodisperse Fe Nanoparticles." *J. Am. Chem. Soc.* 128 10626-7.
- Peng S, C Wang, J Xie, S Sun. 2008. "Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy." *Int. J. Nanomed.* 3:311–21.
- Perez, JM, L Josephson, T O'Loughlin, D Högemann, R Weissleder. 2002. "Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions." *Nature Biotechnology* 20:816–20.
- Perrault, SD, C Walkey, T Jennings, HC Fischer, WCW Chan. 2009. "Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design." *Nano Letters* 9:1909–15.
- Plassat, V, M S Martina, G Barratt, C Ménager, S Lesieur. 2007. "Sterically stabilized superparamagnetic liposomes for MR imaging and cancer therapy: pharmacokinetics and biodistribution." *Int. J. Pharm.* 344:118–27.
- Poore GA, AE Senyei. 1983. "Selective targeting of magnetic albumin to the Yoshida sarcoma: Ultrastructural evaluation of microsphere disposition." *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19: 141-48.
- Qiao, R, Y Chunhui, M Gao. 2009. "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications." *J. Mater. Chem.* 19:6274-9.
- Rapoport, N Y, D A Christensen, H D Fain, L Barrows, Z Gao. 2004. "Ultrasound-triggered drug targeting of tumors in vitro and in vivo." *Ultrasonics* 42:943–50.
- Rapoport, N. 2007. "Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery." *Progress in Polymer Science* 32:962–90.
- Reddy, LH. 2005. "Drug delivery to tumours: recent strategies." *J. Pharm. Pharmacol.* 57:1231–42.
- Reschel, T, C Konák, D Oupický, LW Seymour, K Ulbrich. 2002. "Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations." *J. Control. Rel.* 81:201–17.
- Rosengart, Axel J. et al. 2005. "Magnetizable implants and functionalized magnetic carriers: A novel approach for noninvasive yet targeted drug delivery." *J. MAgn. Magn. Mater.* 293:633–38.
- Sandler, AB, J Nemunaitis, C Denham, J von Pawel, Y Cormier, U Gatzemeier, K Mattson, C Manegold, MC Palmer, A Gregor, B Nguyen, C Niyikiza, LH Einhorn, LH. 2000. "Phase

- III trial of gemcitabine plus cisplatin versus cisplatin alone in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer". *J. Clin. Oncol.* 18:122-30.
- Sanvicens, N, MP Marco. 2008. "Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine." *Trends in Biotechnology* 26:425–33.
- Sapra, P, T M Allen. 2003. "Ligand-targeted liposomal anticancer drugs." *Progress in Lipid Research* 42:439–62.
- Sarin H, AS Kanevsky, H Wu, KR Brimacombe, SH Fung, AA Sousa, S Auh, CM Wilson , K Sharma, MA Aronova, RD Leapman, GL Griffiths, MD Hall. 2008. "Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain tumor barrier into malignant glioma cells." *J. Translational Med.* 6:80-6.
- Sasaki T, N Iwasaki, K Kohno, M Kishimoto, T Majima, S Nishimura, A Minami. 2008. "Magnetic nanoparticles for improving cell invasion in tissue engineering." *J. Biomed. Mater. Res. A* 86:969–78.
- Saslowski, O, C Weingarten, J P Benoit, P Couvreur. 1988. "Magnetically responsive microspheres for the pulsed delivery of insulin." *Life Sciences* 42:1521–28.
- Schütt W, C Grüttner, U Häfeli, M Zborowski, J Teller, H Putzar, C Schümichen. 1997. "Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy – possibilities and limitations. A mini-review." *Hybridoma* 16: 109-117.
- Senyei, A, K Widder, G Czerlinski. 1978. "Magnetic guidance of drug-carrying microspheres." *J. Appl. Phys.* 49:3578–83.
- Service, RF. 2005. "Materials and biology. Nanotechnology takes aim at cancer." *Science (New York, N.Y.)* 310:1132–34.
- Shao, K, H Lee, Y Huang, I Yong Ko, C Kim 2005. "Control of Iron Nanoparticles Size and Shape by Thermal Decomposition Method." *IEEE Trans. Magn.* 41:3388–90.
- Shen, T, R Weissleder, M Papisov, A Bogdanov, T J Brady 1993. "Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties." *Magn. Reson. Med.* 29:599–604.
- Shenoy, DB, MM Amiji. 2005. "Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer." *Int. J. Pharm.* 293:261–70.
- Shmeeda, H, L Mak, D Tzemach, P Astrahan, M Tarshish, A Gabizon. 2006. "Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors." *Molecular Cancer Therapeutics* 5:818–24.
- Shtykova, EV, X Huang, N Remmes, D Baxter, B Stein, B Dragnea, DI Svergun, LM Bronstein. 2007. "Structure and Properties of Iron Oxide Nanoparticles Encapsulated by Phospholipids with Poly(ethylene glycol) Tails." *J. Phys. Chem. C* 111:18078–86.
- Shubayev, VI, TR Pisanic, S Jin. 2009. "Magnetic nanoparticles for theragnostics." *Adv. Drug Delivery Rev.* 61:467–77.
- Shum, P, J M Kim, and D H Thompson. 2001. "Phototriggering of liposomal drug delivery systems." *Adv. Drug Delivery Rev.* 53:273–84.
- Sikora, K 1999. "Developing a global strategy for cancer." *Eur. J. Cancer* 35:1870–77.

- Sikora K, S Advani, V Korolitchouk, I Magrath, L Levy, H Pinedo, G Schwartzmann, M Tattersall, S Yan. 1999. "Essential drugs for cancer therapy: a World Health Organization consultation." *Annals of Oncology* 10:385–90.
- Skoog, DA, Fj Holler, TA Nieman. 2008. *Principios de análisis instrumental*.
- Solanki, A, JD Kim, KB Lee. 2008. "Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging." *Nanomedicine (London, England)* 3:567–78.
- Steinke, F, WAndrä, RHeide, C Werner, ME Bellemann. 2007. "Rotating magnetic microspheres as heating mechanism for remote controlled drug release." *J. Magn. Magn. Mater.* 311:216–18.
- Steitz, B, H Hofmann, SW Kamau, PO Hassa, MO Hottiger, B von Rechenberg, M Hofmann-Antenbrink, A Petri-Fink. 2007. "Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction." *J. Magn. Magn. Mater.* 311:300–305.
- Stella B, S Arpicco, MT Peracchia, D Desmaële, J Hoebeke, M Renoir, J D'Angelo, L Cattel L, P Couvreur. 2000. "Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting." *J. Pharm. Sci.* 89:1452–64.
- Stella B, S Arpicco, F Rocco, V Marsaud, JM Renoir, L Cattel, P Couvreur. 2007. "Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules." *Int. J. Pharm.* 344: 71-77.
- Stevens, PJ, M Sekido, RJ Lee. 2004. "A folate receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug." *Pharm. Res.* 21:2153–57.
- Stubbs, M, P M McSheehy, J R Griffiths, C L Bashford. 2000. "Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment." *Molecular Medicine Today* 6:15–19.
- Subramani, K, H Hosseinkhani, A Khraisat, M Hosseinkhani, Y Pathak. 2009. "Targeting Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Cancer Treatment." *Current Nanoscience* 5:135–40.
- Sun, B, B Ranganathan, SS Feng. 2008. "Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer." *Biomaterials* 29:475–86.
- Sun C, O Veiseh, J Gunn, C Fang, S Hansen, D Lee, R Sze, RG Ellenbogen, J Olson, M Zhang. 2008. "In vivo MRI detection of gliomas by chlorotoxin-conjugated superparamagnetic nanoprobos." *Small* 4:372–79.
- Sun, C, C Fang, Z Stephen, O Veiseh, S Hansen, D Lee, RG Ellenbogen, J Olson, M Zhang. 2008. "Tumor-targeted drug delivery and MRI contrast enhancement by chlorotoxin-conjugated iron oxide nanoparticles." *Nanomedicine (London, England)* 3:495–505.
- Sun, C, JSH Lee, M Zhang. 2008. "Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery." *Adv. Drug Delivery Rev.* 60:1252–65.
- Sunderland, CJ, M Steiert, JE Talmadge, AM Derfus, and SE Barry. 2006. "Targeted Nanoparticles for Detecting and Treating Cancer." *Drug Devel. Res.* 67:70–93.

Sutton, D, N Nasongkla, E Blanco, J Gao. 2007. "Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery." *Pharmaceutical Res.* 24:1029–46.

Tanaka, K, A Ito, T Kobayashi, T Kawamura, S Shimada, K Matsumoto, T Saida, H Honda. 2005. "Heat immunotherapy using magnetic nanoparticles and dendritic cells for T-lymphoma." *J. Biosci. Bioeng.* 100:112–15.

Tartaj, Pedro, María del Puerto Morales, Sabino Veintemillas-Verdaguer, Teresita González-Carretero, and Carlos J. Serna. 2003. "The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine." *Journal of Physics D: Applied Physics* 36:R182–R197.

Thiesen, B, A Jordan. 2008. "Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia." *Int. J. Hyperthermia* 24:467–74.

Tiefenauer, L X, A Tschirky, G Kühne, R Y Andres. 1996. "In vivo evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI." *Magn. Reson. Imaging* 14:391–402.

Torchilin, VP. 2006. "Multifunctional nanocarriers." *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:1532–55.

Veiseh, O, JW Gunn, M Zhang. 2010. "Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging." *Adv. Drug Delivery Rev.* 62:284–304.

Veiseh, O, FM Kievit, JW Gunn, BD Ratner, and M Zhang. 2009. "A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells." *Biomaterials* 30:649–57.

Veronese, FM, G Pasut. 2005. "PEGylation, successful approach to drug delivery." *Drug Discovery Today* 10:1451–58.

Viota, JL, A Carazo, JA Muñoz-Gamez, K Rudzka, R Gómez-Sotomayor, R Ruiz-Extremera, J Salmerón, AV Delgado. 2013. "Functionalized magnetic nanoparticles as vehicles for the delivery of the antitumor drug gemcitabine to tumor cells. Physicochemical in vitro evaluation." *Materials Sci. Eng. C* 33:1183–92.

Viota, JL, J de Vicente, JDG Durán, AV Delgado. 2005. Stabilization of Magnetorheological Suspensions by Polyacrylic Acid Polymers. *J. Colloid Interface Sci.* 284:527-41.

Voltairas, P A, D I Fotiadis, and L K Michalis. 2002. "Hydrodynamics of magnetic drug targeting." *J. Biomech.* 35:813–21.

Vyas SP, SK Jain. 1994. "Preparation and in vitro characterization of a magnetically responsive ibuprofen-loaded erythrocytes carrier" *J. Microencapsulation* 11: 141

Wagner, E. 2007. "Programmed drug delivery: nanosystems for tumor targeting." *Expert Opin. Biol. Therapy* 7:587–93.

Wang, S, YZhou, W Sun. 2009. "Preparation and characterization of antifouling thermosensitive magnetic nanoparticles for applications in biomedicine." *Materials Sci. Eng. C* 29:1196–1200.

Widder, K. J, PA Marino, RM Morris, DP Howard, GA Poore, AE Senyei. 1983. "Selective targeting of magnetic albumin microspheres to the Yoshida sarcoma: ultrastructural evaluation of microsphere disposition." *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19:141–47.

Xie, J, C Xu, N Kohler, Y Hou, S Sun 2007 "Controlled PEGylation of Monodisperse Fe₃O₄ Nanoparticles for Reduced Non-Specific Uptake by Macrophage Cells." *Advanced Materials* 19:3163–66.

Yellen, B , ZG Forbes, DS Halverson, G Fridman, KA Barbee, M Chorny, R Levy, G Friedman. 2005. "Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications." *J. Magn. Magn. Mater.* 293:647–54.

Zamboni, WC. 2008. "Concept and clinical evaluation of carrier-mediated anticancer agents." *The Oncologist* 13:248–60.

Zara, GP, R Cavalli, A Bargoni, A Fundarò, D Vighetto, MR Gasco. 2002. "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.* 10:327–35.