

**DESARROLLO Y ESTUDIO DE  
MAGNETOLIPOSOMAS  
TRANSPORTADORES DE  
5-FLUOROURACILO ÚTILES EN  
TERAPIA CONTRA EL CÁNCER**



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

**Tesis Doctoral**

*Rafael Alejandro Biedma Ortiz*

**Granada, 2014**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Rafael Alejandro Biedma Ortiz  
D.L.: GR 1881-2014  
ISBN: 978-84-9083-065-9



El doctorando Rafael Alejandro Biedma Ortiz y los directores de la tesis, Dra. Dña. Beatriz Clares Naveros y Dr. D. José Luis Arias Mediano. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores 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, 01 Septiembre de 2014

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Beatriz Clares Naveros

Fdo.: Rafael Alejandro Biedma Ortiz

Fdo.: José Luis Arias Mediano



Dña. Beatriz Clares Naveros, Profesora Contratada Doctora, y D. José Luis Arias Mediano, Profesor Titular, pertenecientes al Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo de investigación que se presenta en esta memoria titulado

**“Desarrollo y estudio de magnetoliposomas transportadores de 5-fluorouracilo  
útiles en terapia contra el cáncer”**

ha sido realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada bajo nuestra dirección, por el Licenciado de Grado D. Rafael Alejandro Biedma Ortiz, y constituye su *Tesis Doctoral*.

Con la presente fecha autorizamos su presentación ante el Comité de Dirección de la Escuela de Doctorado de la Universidad de Granada.

Directores,

Granada, septiembre de 2014.

Fdo. Dña.: Beatriz Clares Naveros.

El doctorando,

Fdo. D.: José Luis Arias Mediano.

Fdo. D.: Rafael Alejandro Biedma Ortiz.

Tutor,

Fdo.D.: José Luis Arias Mediano.



# ÍNDICE

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN ..... 1**

1.1. Cáncer.....	3
1.1.1. Origen.....	5
1.1.2. Tipos de cáncer.....	8
1.1.3. Abordaje farmacológico.....	13
1.1.3.1. Tipos de fármacos antitumorales.....	15
1.1.3.2. 5-fluorouracilo.....	18
1.2. Transporte de fármacos.....	22
1.2.1. Estrategias de transporte selectivo de fármacos al lugar de acción.....	25
1.2.1.1. Estrategias de transporte pasivo de fármacos.....	26
1.2.1.2. Estrategias de transporte activo de fármacos.....	29
1.3. Nanopartículas magnéticas en el transporte de fármacos. Hipertermia.....	46

## **CAPÍTULO 2. CONTRIBUCIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN..... 55**

2.1. Objetivos.....	57
2.2. Contribución.....	59

## **CAPÍTULO 3. DISEÑO y CARACTERIACIÓN FÍSICOQUÍMICA ..... 63**

3.1. Síntesis y estudio geométrico.....	65
3.1.1. Óxido de hierro superparamagnético. Nanopartículas de Magnetita.....	65
3.1.2. L- $\alpha$ -fosfatidilcolina. Liposomas.....	77
3.1.3. Nanopartículas Magnetita/Liposomas. Magnetoliposomas.....	98
3.2. Estructura y composición química.....	110
3.2.1. Difractometría de Rayos X.....	110
3.2.2. Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier.....	114

## **CAPÍTULO 4. PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES . 121**

4.1. Descripción clásica de la doble capa eléctrica .....	124
4.2. Fenómenos electrocinéticos. Potencial Zeta.....	133
4.2.1. Electroforesis: teoría elemental.....	134
4.2.2. Electroforesis: tratamientos más elaborados .....	138
4.3. Metodología experimental.....	140
4.4. Efectos del pH y de la fuerza iónica sobre las propiedades eléctricas superficiales .....	141
4.5. Análisis electrocinético de la estabilidad del recubrimiento lipídico.....	150

## **CAPÍTULO 5. TERMODINÁMICA SUPERFICIAL ..... 153**

5.1. Interacciones superficiales .....	155
5.1.1. Interacciones dispersivas.....	156
5.1.2. Interacciones no-DLVO .....	158
5.1.3. Contribuciones a la energía libre superficial. Teoría de van Oss, Good y cols. .....	160
5.2. Metodología experimental.....	165
5.3. Componentes de la energía libre superficial de las nanopartículas.....	170
5.4. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba .....	172

## **CAPÍTULO 6. PROPIEDADES MAGNÉTICAS..... 177**

6.1. Propiedades magnéticas .....	179
6.2. Ciclo de histéresis.....	181
6.3. Prueba <i>in vitro</i> a nivel macroscópico y microscópico.....	188

## **CAPÍTULO 7. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE LAS NANOPARTÍCULAS..... 193**

7.1. Hemocompatibilidad .....	195
7.2. Estudios de proliferación <i>in vitro</i> .....	197

**CAPÍTULO 8. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE VEHICULIZACIÓN DE 5-FLUOROURACILO ..... 201**

8.1. Caracterización del 5-fluorouracilo por espectrofotometría UV-Vis..... 206

    8.1.1. Absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo..... 206

    8.1.2. Validación del método espectrofotométrico..... 216

    8.1.3. Metodología espectrofotométrica para la determinación de la incorporación de 5-fluorouracilo en las nanopartículas ..... 220

8.2. Incorporación superficial del 5-fluorouracilo..... 221

    8.2.1. Determinación espectrofotométrica ..... 222

    8.2.2. Análisis electrocinético ..... 226

8.3. Incorporación matricial del 5-fluorouracilo ..... 228

    8.3.1. Estabilidad del fármaco vehiculizado ..... 231

8.4. Liberación de fármaco..... 233

    8.4.1. Influencia del fenómeno de hipertermia en la liberación ..... 243

**CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES ..... 257**

**CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA ..... 265**



# **Capítulo 1.**

## **INTRODUCCIÓN**



El manejo clínico del cáncer, considerado hoy día como una enfermedad severa, continua siendo uno de los principales problemas de salud pública de la actualidad. Por tanto, la detección precoz y no invasiva de la enfermedad es crucial para un buen pronóstico del paciente. Asimismo, resulta igualmente importante el uso de una terapia segura, selectiva y sin efectos secundarios. Sin embargo, en numerosas ocasiones, los principios activos utilizados encuentran condicionada su actividad terapéutica por *i)* la inespecificidad de acción por las células o tejido diana; y, *ii)* el desarrollo de reacciones adversas severas consecuencia de su actividad farmacológica, entre otros factores.

Desde la década de 1980 ha sido investigado con gran interés el desarrollo de diferentes coloides como sistemas transportadores de fármacos antitumorales, para así lograr la optimización de su efecto farmacológico [Ibrahim y cols., 1983; Couvreur y Vauthier, 2006]. Dentro de este marco teórico se encuentra englobado nuestro trabajo de investigación. En concreto, y como podrá concluirse tras la lectura de la presente memoria, el sistema coloidal que hemos desarrollado debe resultar potencialmente útil para la mejora del tratamiento del cáncer, como el cáncer de colon, gracias a dos aspectos: el transporte selectivo de fármacos a través del guiado magnético y el fenómeno de hipertermia, ambos desarrollados y explicados más adelante.

### **1.1. CÁNCER**

Un organismo sano está constituido por un conjunto de células que se dividen de forma regular con el fin de reemplazar a las ya envejecidas o muertas. Sólo de esta manera puede garantizarse la integridad y el correcto funcionamiento de los distintos órganos y tejidos del cuerpo humano. El proceso de división de las células está regulado por una serie de mecanismos de control que indican a la célula cuándo comienza a dividirse y cuándo permanece estática. Cuando se produce un daño celular que no puede ser reparado, se ponen en marcha una serie de procesos de autodestrucción celular que impiden que el daño sea heredado por las células descendientes. Cuando estos

## Capítulo 1. Introducción

---

mecanismos de control se alteran en una célula, ésta y sus descendientes inician una división incontrolada, que con el tiempo dará lugar a una masa tumoral.

Una de las características más relevante de los tumores malignos es la propagación a distancia o metástasis. La metástasis (meta = transformación, stasis = residencia) se define como la propagación del tumor por invasión, de modo tal que se forma una masa o masas tumorales secundarias discontinuas en el sitio de alojamiento. Las metástasis y la invasividad son las dos características más importantes que distinguen los tumores malignos de los benignos, los tumores benignos no metastatizan, mientras que todos los tumores malignos, con algunas excepciones, como p.ej., los gliomas del sistema nervioso central y el carcinoma basocelular de la piel, pueden dar metástasis. En general, es más probable que produzcan metástasis los tumores más grandes, más agresivos y de crecimiento más rápido, pero existen numerosas excepciones. Aproximadamente un tercio de los tumores malignos, en el momento de la presentación, tienen depósitos metastásicos evidentes, mientras que otro 20 % tienen metástasis ocultas [Mohan, 2010].

En la Tabla 1.1. se muestran de forma resumida las diferencias entre tumores benignos y malignos:

CARACTERÍSTICAS	TUMORES BENIGNOS	TUMORES MALIGNOS
Estructura y diferenciación	Frecuentemente típica del tejido de origen	Frecuentemente atípica, poco diferenciado
Modo de crecimiento	Expansivo, con formación de cápsula	Infiltrativo no encapsulado
Velocidad de crecimiento	Generalmente lento: pocas mitosis normales	Generalmente rápido: muchas mitosis anormales
Progresión del crecimiento	Lento y progresivo puede detenerse o regresar	Raramente cesa, casi siempre es rápido y progresivo hasta la muerte
Metástasis	Ausentes	Generalmente presentes
Recurrencia después de extirpación	Rara	Frecuente
Cromatina Nuclear	Normal	Aumentada
Invasión a vasos	No	Frecuente
Divisiones Nucleares	Pocas y casi normales	Muchas divisiones
Cromosomas anormales	Pocos	Muchos

**Tabla 1.1.** Diferencias generales entre tumores benignos y malignos

No todos los tipos de cáncer se caracterizan por la presencia de una masa sólida tumoral. Por ejemplo, en el caso de la leucemia, las células malignas invaden y son desarrolladas en la médula ósea, para finalmente invadir la sangre y otros órganos. La evolución de cada cáncer está sujeta a múltiples factores que van a interactuar entre sí, los cuales dependen tanto del tipo de tumor como del propio paciente. De forma general, la malignidad de un tumor viene determinada por la agresividad de sus células, es decir, por la capacidad de éstas de invadir tejidos sanos [Mohan, 2010].

### 1.1.1. ORIGEN

El cáncer ha acompañado siempre al hombre, por lo menos, parece tan antiguo como éste. De hecho han sido encontradas lesiones tumorales en huesos del *Pithecanthropus erectus* y mucho antes de la aparición del *Homo Sapiens* fue comprobada la existencia de lesiones en los huesos de dinosaurios. Debemos recordar que el cáncer no es solamente una enfermedad del ser humano, sino que también aparece en el reino animal y en el reino vegetal. La palabra cáncer, se remonta a la

## Capítulo 1. Introducción

---

antigua Grecia, este término es atribuido a Hipócrates (460 a.C.-377 a.C.), quien bautizó esta enfermedad como cáncer en alusión a la forma con que se propagaba, semejando las patas del cangrejo. En el año 1775, el doctor Sir Percival Pott señaló la asociación que existía entre el cáncer y la presencia de polvo de carbón en la ropa y piel de los deshollinadores. Este hecho, reconoció la asociación causa-efecto de una sustancia capaz de provocar esta enfermedad, estableciéndose así el conocimiento de la carcinogénesis química. En 1911, Peyton Rous logró aislar un virus del sarcoma producido en pollos y lo transmitió a otros animales de la misma especie, mostrando que un virus era capaz de provocar tumores en animales. Julios Cohnhein (1839-1884), propuso en 1877, la teoría del residuo embrionario sobre el cáncer. En ella señalaba que restos embrionarios de células indiferenciadas persisten como tales en el organismo de una persona, esperando el impulso que ha de surgir y permitir, para así manifestar su capacidad ilimitada de proliferar o crecer [Boveri, 2008; Grange y cols., 2002; Mohan, 2010].

El término cáncer, tumor o neoplasia significa crecimiento nuevo, sin embargo, no todos los crecimientos nuevos son neoplasias, dado que también existen ejemplos de crecimiento nuevo en el caso de tejidos y células en procesos de embriogénesis, regeneración, reparación, hiperplasia y/o estimulación hormonal. La proliferación y maduración de las células en los adultos normales está controlada; por lo cual algunas células proliferan durante toda la vida (células lábiles), algunas proliferan de manera limitada (células estables), mientras que otras no se reproducen (células permanentes). Por otra parte, las células tumorales pierden el control y la regulación de la replicación y forman una masa anormal de tejido.

Por lo tanto, una definición satisfactoria de cáncer, neoplasia o tumor sería, masa de tejido formada como resultado de la proliferación anómala, excesiva, no coordinada, autónoma y sin propósito de las células, incluso después de suspendido el estímulo para el crecimiento que la produjo. Las neoplasias pueden ser benignas cuando el crecimiento es lento y son localizadas sin producir mucha dificultad en el huésped; o

malignas cuando proliferan rápidamente, se propagan en todo el cuerpo y, finalmente, pueden provocar la muerte del huésped. El término común utilizado para todos los tumores malignos es cáncer. Hay que recordar que el mecanismo de inducción de un cáncer es denominado carcinogénesis, oncogénesis o tumorigénesis, este es un proceso complejo, de tipo múltiple y donde suelen confluir varios factores. Los agentes que pueden inducir un cáncer son denominados carcinógenos, los cuales pueden ser agentes químicos (benceno), físicos (radiaciones), biológicos (virus) e incluso moleculares, como genes (oncogenes) [Epstein y cols., 1964; Mohan, 2010]. Para la conversión de una célula normal en una neoplásica se requiere de una iniciación, o cambio de esa célula que era normal hacia una alterada o cancerosa y del desarrollo posterior mediante promoción de esa célula para proliferar y dar lugar a un cáncer clínicamente invasor. Aclarando esto un poco más, se diría que en los procesos requeridos para la aparición de un cáncer, se han reconocido dos estadios diferentes llamados iniciación y promoción, que varían para cada tipo de cáncer y según el agente que lo provoque. La iniciación abarca la interacción entre un carcinógeno y el material genético celular, que da lugar a una alteración molecular o una mutación que puede transformar las células en anormales; sin embargo, en dicho proceso, no suele producirse la aparición de un tumor, a menos que actúe un agente promotor. Por tanto, si la alteración en el material genético no puede ser reparada, se produce la etapa de promoción; donde la célula dañada se divide, produciéndose un cambio permanente en la base nitrogenada recién producida, generando una mutación muy peligrosa si los genes afectados son del grupo de los oncogenes celulares. De esta manera se inicia así la carcinogénesis. La acción debida a un agente conocido como promotor puede transformar las células ya lesionadas inicialmente y hacerlas proliferar para formar posteriormente un tumor, o bien, simplemente facilitar la multiplicación de células ya cancerosas latentes o inactivas, para formar un cáncer [Mohan, 2010].

### 1.1.2. TIPOS DE CÁNCER

Existen muchas denominaciones para detallar los diferentes tipos de tumores benignos y malignos pertenecientes a los diferentes tejidos y sistemas corporales según su anatomía patológica, y sería muy complejo elaborar un listado completo. De forma general, puede hablarse de alteraciones típicas benignas o premalignas en las células cancerosas. Estas alteraciones más comunes son:

- ANAPLASIA: un grado menor de diferenciación celular, o sea regresión en la diferenciación celular de un tejido, las células tienden a semejar a las embrionarias, el cáncer puede ser ejemplo de esto.
- APLASIA: desarrollo insuficiente de un órgano o tejido de manera congénita
- AGENESIA: esbozo de un órgano que no creció de manera congénita; detención del desarrollo.
- ATROFIA: disminución en el tamaño o número de las células de un tejido o ambos factores; en realidad es la disminución en la cantidad de protoplasma vivo después de que un tejido haya alcanzado su desarrollo normal.
- HIPERPLASIA: aumento en el número de células de un tejido.
- HIPERTROFIA: aumento en el tamaño de dichas células, es reversible si cesa el estímulo que la produjo.
- METAPLASIA: consiste en la mayor diferenciación de un tejido, especialmente, si dicho tejido se ve sometido a irritación crónica. Nunca es un fenómeno natural; por ejemplo, la leucoplasia es la transformación del epitelio de revestimiento de una

mucosa en epitelio queratinizado. La mayor parte ocurre en tejidos que se encuentran proliferando, ya sea epidermoides o glandulares como bronquio, cérvix, mucosas, boca, estómago, etc. Por ejemplo en cérvix, el epitelio cilíndrico monoestratificado es reemplazado por otro poliestratificado.

- DISPLASIA: es la aparición y proliferación de células atípicas en un tejido, sin formar un tumor. La displasia es considerada una alteración que afecta el tamaño, la forma y las relaciones de orientación de las células adultas en particular las epiteliales. Estas células exhiben pleomorfismo o sea que varían en cuanto a tamaño.

Algunos cánceres están compuestos por células sumamente indiferenciadas y se denominan tumores malignos indiferenciados. Aunque esta es una generalización amplia, existen algunos ejemplos contrarios a este concepto como el melanoma para el carcinoma de los melanocitos, hepatoma para el carcinoma de los hepatocitos, linfoma para el tumor maligno del tejido linfoide y seminoma para el tumor maligno del testículo. Leucemia es el término utilizado para el cáncer de las células formadoras de sangre. Las siguientes categorías de tumores mostradas a continuación son una generalización en la nomenclatura descrita más arriba:

1. Tumores mixtos. Cuando dos tipos de tumores se combinan en el mismo tumor, se denomina tumor mixto. Por ejemplo:
  - i. El carcinoma adenoepidermoide es la combinación de un adenocarcinoma y un carcinoma de células pavimentosas en el endometrio.
  - ii. El adenoacantoma es la mezcla de un adenocarcinoma y de elementos epidermoides benignos en el endometrio.
  - iii. El carcinosarcoma es la rara combinación de un tumor maligno del epitelio (carcinoma) y de tejido mesenquimatoso (sarcoma), como en el tiroides.

## Capítulo 1. Introducción

---

- iv. Tumor de colisión es el término utilizado para dos cánceres morfológicamente diferentes en el mismo órgano que no se mezclan entre sí.
  - v. Tumor mixto de la glándula salival (o adenoma pleomorfo) es el término utilizado para el tumor benigno que tiene una combinación de elementos tanto de tejidos epiteliales como mesenquimáticos.
2. Teratomas. Estos tumores están formados por una mezcla de distintos tipos de tejidos que se originan en las células pluripotenciales derivadas de las tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo. Los sitios más frecuentes para los teratomas son los ovarios y el testículo (teratomas gonadales). Pero también se presentan en sitios extragonadales, principalmente en la línea media del cuerpo como en la región de la cabeza y del cuello, el mediastino, el retroperitoneo, la región sacrococcígea, etc. Los teratomas pueden ser benignos o maduros (en la mayoría de los teratomas ováricos) o malignos o inmaduros (en la mayoría de los teratomas testiculares).
3. Blastomas (embriomas). Los blastomas o embriomas representan un grupo de tumores malignos que se originan en las células embrionarias o parcialmente diferenciadas que, normalmente, formarían el blastema de los órganos y tejidos durante la embriogénesis. Estos tumores ocurren más frecuentemente en lactantes y niños (menores de 5 años) e incluyen algunos ejemplos de tumores de este grupo de edad: neuroblastoma, nefroblastoma (tumor de Wilms), hepatoblastoma, retinoblastoma, meduloblastoma y blastoma pulmonar.
4. Hamartoma. Tumor benigno formado por células maduras pero desorganizadas de tejidos propios del órgano particular; por ejemplo, el hamartoma del pulmón consiste en cartílago maduro, músculo liso y epitelios maduros. Por lo tanto, todos los elementos tisulares diferenciados maduros que comprenden el bronquio están presentes en él, pero están mezclados en una masa.

5. Coristoma. El coristoma es el nombre dado a los islotes ectópicos del tejido normal. Por lo tanto, el coristoma es una heterotopía, pero no es un verdadero tumor, aunque se parece a él.

Actualmente, la clasificación resumida de los tipos de tumores es mostrada en la Tabla 1.2. y se basa en la histogénesis, es decir, en las células de origen. Las clasificaciones detalladas de los tumores benignos y malignos pertenecientes a los diferentes tejidos y sistemas corporales, junto con sus características morfológicas no es motivo de esta memoria [Mohan 2010].

## Capítulo 1. Introducción

TEJIDO DE ORIGEN	BENIGNOS	MALIGNOS
<b>I. TUMORES DE UN TIPO CELULAR PARENQUIMATOSO</b>		
<b>A. Tumores Epiteliales</b>		
Epitelio pavimentoso	Papiloma de células epidermoides	Carcinoma de células pavimentosas (epidermoide)
Epitelio transicional	Papiloma de células transicionales	Carcinoma de células transicionales
Epitelio glandular	Adenoma	Adenocarcinoma
Piel de la capa celular basal	-	Carcinoma basocelular
Neuroectodermo	Nevo	Melanoma (melanocarcinoma)
Hepatocitos	Adenoma de células hepáticas	Hepatoma (Carcinoma hepatocelular)
Placenta (Epitelio coriónico)	Mola hidatiforme	Coriocarcinoma
<b>B. Tumores no epiteliales (mesenquimáticos)</b>		
Tejido adiposo	Lipoma	Liposarcoma
Tejido fibroso del adulto	Fibroma	Fibrosarcoma
Tejido fibroso embrionario	Mixoma	Mixosarcoma
Cartílago	Condroma	Condrosarcoma
Hueso	Osteoma	Osteosarcoma
Sinovio	Sinovioma benigno	Sarcoma sinovial
Músculo liso	Leiomioma	Leiomiomasarcoma
Músculo esquelético	Rabdomioma	Rabdomiosarcoma
Mesotelio	-	Mesotelioma
Vasos sanguíneos	Hemangioma	Angiosarcoma
Vasos linfáticos	Linfangioma	Linfangiosarcoma
Glomo	Tumor glómico	-
Meninges	Meningioma	Meningioma invasivo
Células hematopoyéticas	-	Leucemias
Tejido linfoide	Seudolinfoma	Linfomas malignos
Vaina del nervio	Neurilemoma, Neurofibroma	Sarcoma neurogénico
Células nerviosas	Ganglioneuroma	Neuroblastoma
<b>II. TUMORES MIXTOS</b>		
Glándulas salivales	Adenoma pleomorfo (tumor mixto de las glándulas salivales)	Tumor mixto de las glándulas salivales
<b>III. TUMORES CON MÁS DE UNA CAPA DE CÉLULAS GERMINALES</b>		
Células totipotenciales en gonadas o en restos embrionarios	Teratoma maduro	Teratoma inmaduro

**Tabla 1.2.** Clasificación de los diferentes tipos de tumores benignos y malignos según el tejido de origen.

### **1.1.3. ABORDAJE FARMACOLÓGICO**

Entre las diferentes estrategias terapéuticas contra el cáncer, se encuentran la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la inmunoterapia y las combinaciones de éstas. Durante muchos años, la cirugía fue la única solución utilizada, en ocasiones tan radical que tenía una alta morbilidad y mortalidad. Posteriormente, la introducción y el desarrollo del resto de estrategias fueron posibles gracias a los importantes avances logrados en el conocimiento de la biología molecular y fisiopatología de esta enfermedad.

Aunque en los comienzos se pretendía eliminar hasta la última célula cancerosa, mediante devastadores procedimientos quirúrgicos, siempre se pensó que debía existir una posibilidad medicamentosa para lograr el mismo fin. Sin embargo, una de las grandes limitaciones de la farmacoterapia del cáncer estriba en la inespecificidad de acción de los principios activos por la célula tumoral, resultando así también dañadas las células sanas. Por este motivo la farmacología del siglo XX centró sus esfuerzos en el desarrollo de principios activos específicos para una patología, que no dañarán los tejidos sanos del paciente. El concepto de quimioterapia fue reformulado por el científico alemán Paul Ehrlich. Precisamente la especificidad de acción de los anticuerpos por los antígenos de un microorganismo, y como estos anticuerpos eran letales para el patógeno, sin dañar el resto de los tejidos del enfermo fue el inicio de una propuesta revolucionaria a la que llamó “balas mágicas” y sobre la que se asienta el concepto de vectorización.

Durante los primeros años de investigación y práctica clínica, los agentes quimioterápicos eran principalmente antibióticos. En 1887 se descubrieron las propiedades vesicantes de la mostaza sulfurada y del azufre, y su efecto sistémico tóxico caracterizado por leucopenia, aplasia de la médula ósea, disolución del tejido linfoide y ulceración del aparato digestivo. Debido a la acción citotóxica de las mostazas

## Capítulo 1. Introducción

---

nitrogenadas sobre el tejido linfoide, se estudió su utilidad en el tratamiento de linfomas. En 1942 se realizaron los primeros estudios clínicos, los cuáles se consideran el inicio de la quimioterapia. Simultáneamente, se pusieron en marcha diversas investigaciones que permitieron desarrollar la química farmacéutica de las mostazas nitrogenadas. Esto dio lugar a una serie de compuestos muy utilizados en la quimioterapia moderna, como la ciclofosfamida, el clorambucilo, la tiotepa, el busulfano, las nitrosoureas y el cisplatino. En 1948 se descubrieron los análogos del ácido fólico. Este grupo de antifólicos (p.ej., el metotrexato) permitían obtener remisiones de la leucemia. También se descubrió el efecto inmunosupresor de los corticosteroides y sus posibilidades en el tratamiento de la leucemia. El desarrollo de la terapia de rescate con ácido folínico permitió una mayor supervivencia de ciertos pacientes oncológicos, la mayoría niños. Todos estos esfuerzos en investigación dieron lugar al desarrollo de los agentes antimetabolitos, donde destaca la cincuentenaria 6-mercaptopurina o la primera molécula quimioterápica para tumores sólidos, el 5-fluorouracilo.

Por otro lado, el manejo clínico del cáncer de mama y del cáncer de próstata comenzó a beneficiarse del uso de las hormonas sexuales. Los estrógenos se administraban para retardar el desarrollo del cáncer de próstata, mientras que los andrógenos se usaron en el cáncer de mama. Este tipo de terapia se actualizó con la introducción clínica de los antagonistas androgénicos, los moduladores de los receptores estrogénicos y las gonadorrelinas de larga duración. La farmacognosia también contribuyó al desarrollo de la quimioterapia contra el cáncer. Por ejemplo, se describió la actividad antilinfocítica de ciertos alcaloides extraídos de la planta *Vinca rosea*. Esta permitió la utilización clínica de la vinblastina y de la vincristina en el tratamiento de linfomas y leucemias. Estos principios activos se utilizaron generalmente en combinación con otros quimioterápicos. Se estudió también el uso de enzimas como la L-asparaginasa, o de los antibióticos derivados de *Streptomyces* spp. como la actinomicina D, la bleomicina o la doxorubicina.

### **1.1.3.1. TIPOS DE FÁRMACOS ANTITUMORALES**

En la actualidad se acepta que los fármacos antitumorales son aquellos principios activos que se utilizan para el tratamiento, tanto curativo como paliativo del cáncer. Estos agentes se pueden utilizar solos o en regímenes poliquimioterápicos, o como coadyuvantes de la cirugía o radioterapia. Los tipos de fármacos antitumorales se clasifican principalmente en: agentes antimetabolitos, antibióticos citotóxicos, agentes alquilantes, alcaloides de plantas y otros productos naturales, sales de platino, hormonas y antagonistas hormonales, inhibidores enzimáticos, modificadores de la respuestas biológica y otros [Flórez, 2008; Rubin, 2003].

Entre los agentes antimetabolitos destacan los antagonistas del ácido fólico (p.ej., metotrexato, raltitrexed, pemetrexed), los análogos de las purinas (p.ej., 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, pentostatina, cladribina, nelarabina, clofarabina) y los análogos de las pirimidinas (p.ej., 5-fluorouracilo, tegafur, capecitabina, citarabina, gemcitabina, azacitidina, decitabina). Estos principios activos son análogos estructurales de metabolitos celulares (falsos sustratos) que disminuyen la biodisponibilidad de los precursores de los nucleótidos de purina o pirimidina e interfieren en la síntesis de ARN (ácido ribonucleico) y ADN (ácido desoxirribonucleico). Son fármacos específicos de la fase *S* del ciclo celular.

Los antibióticos citotóxicos y sustancias relacionadas actúan sobre el ADN y ARN inhibiendo su duplicación o transcripción. En este grupo destacan las antraciclinas (p.ej., doxorubicina, daunorrubicina, idarubicina, epirubicina, mitoxantrona), antibióticos que rompen el ADN al generar radicales libres o al actuar sobre la topoisomerasa II. Dentro de este grupo también destacan la bleomicina, mitomicina y la actinomicina D, capaz de actuar sobre la topoisomerasa II e impedir la transcripción de ADN. Su utilidad clínica queda limitada considerablemente por la cardiotoxicidad (irreversible) que producen.

## Capítulo 1. Introducción

---

Entre los agentes alquilantes destacan las mostazas nitrogenadas (p.ej., ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida, melfalán), las nitrosoureas (carmustina, lomustina, semustina, fotemustina, estreptozocina), los alquilsulfonatos (busulfano), metilhidrazinas (procarbazina) y otros (tiotepa, dacarbazina, temozolamida). Su acción citotóxica se debe a la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y los grupos nucleofílicos del ADN, lo que impide la replicación de este. También pueden reaccionar con grupos fosfato, lo que les permite alquilar las bases del ARN.

Dentro del grupo de los alcaloides de plantas y productos naturales destacan, los derivados del *Podofilo* (p.ej., etopósido y tenipósido), los alcaloides de la *Vinca* y análogos (p.ej., vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina), los cuales penetran en la célula tumoral e interaccionan con la tubulina, proteína que forma los microtúbulos del huso acromático en la mitosis e impiden su polimerización para formar los microtúbulos, de esta manera se detiene la mitosis en la metafase (fase *M*) y, por lo tanto, la división celular. Dentro de este grupo también destacan los derivados del taxano (p.ej., docetaxel, paclitaxel, cabazitaxel, larotaxel) y los derivados de la *Camptotecina* (p.ej., irinotecán y topotecán), los cuales constituyen el grupo de los inhibidores de las topoisomerasas. Los taxanos se unen a la tubulina permitiendo su polimerización en microtúbulos estables pero poco funcionales, lo cual detiene el proceso de división celular. Además, la inhibición de las enzimas topoisomerasas desencadena la producción de ADN afuncional o la ruptura de la doble hélice de ADN, deteniéndose el ciclo celular en la fase *S-G2*. Destacan otros alcaloides de plantas y productos naturales como la eribulina, ixabepilona y trabectedina.

Dentro de las sales de platino, el cisplatino es el más representativo de este grupo, actúa como un agente bifuncional produciendo enlaces irreversibles entre las dos hebras del ADN que interfirieren en su replicación. Son fármacos considerados específicos de la fase *S* del ciclo celular. Sus derivados son el carboplatino, oxaliplatino y el satraplatino que mejoran su toxicidad.

El tratamiento hormonal del cáncer se basa en la utilización de hormonas y antagonistas hormonales como los glucocorticoides (p.ej., prednisona, prednisolona, triamcinolona, dexametasona, betametasona, fludrocortisona, prednicarbato), progestágenos (p.ej., medroxiprogesterona, megestrol), estrógenos (p.ej., fosfestrol, dietilestilbestrol, etinilestradiol), andrógenos (p.ej., noretisterona), antiestrógenos (p.ej., tamoxifeno, toremifeno, fulvestrant), antiandrógenos (p.ej., ciproterona, flutamida, nilutamida, bicalutamida), agonistas análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas GnRH o LHRH (p.ej., buserelina, goserelina, leuprorelina, triptorelina), antagonistas de GnRH (p.ej., abarelix, degarelix) y otros (p.ej., abiraterona). Este tipo de tratamiento se basa en el hecho de que las células tumorales conservan, al menos en parte, la memoria biológica de las células de los tejidos sanos de los que provienen. A grandes rasgos, un tratamiento hormonal puede consistir en una supresión hormonal, una adición hormonal o en la utilización de hormonas como potenciadores de otros tratamientos terapéuticos.

Dentro de los inhibidores enzimáticos destacan aquellos que inhiben la aromatasa (p.ej., formestano, aminoglutetimida, anastrozol, exemestano, letrozol) o los inhibidores de la proteinquinasa (p.ej., dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, sunitinib, gefitinib, vandetanib, pazopanib, temsirolimus).

En los modificadores de la respuesta biológica aparecen fármacos que actúan sobre dianas biológicas a nivel del sistema inmunológico. Destacan los inmunoestimulantes (p.ej., glatirámico acetato, glicofosfopeptical, tasonermina, levamisol, filgastrim, lenograstim, pegfilgrastrim), interferones (p.ej., interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón gamma, peginterferón alfa-2a, peginterferón alfa-2b), interleukinas (p.ej., aldesleukina), anticuerpos monoclonales (p.ej., trastuzumab, alemtuzumab, rituximab, cetuximab, panitumumab, bevacizumab), inmunosupresores (p.ej., abatacept, eculizumab, everolimus, leflunomida, micofenólico ácido, natalizumab, sirolimús, azatioprina, lenalidomida), inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (p.ej., adalimumab, etanercept, infliximab), inhibidores de la

## Capítulo 1. Introducción

---

interleucina (p.ej., anakinra, basiliximab) e inhibidores de la calcineurina (p. ej., ciclosporina, tacrolimus).

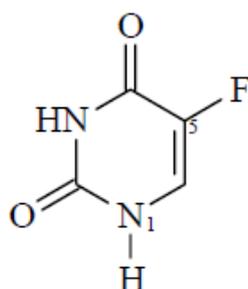
Destacan otros fármacos antitumorales como p.ej., anagrelida, L-asparaginasa, la vacuna *BCG* (Bacilo de Calmette Guerin), bortezomib, celecoxib, estramustina, hidroxycarbamida, miltefosina, tretinoína, alitretinoína, bexaroteno, mitotano, vemurafenib, hidroxiurea, amasacrina, altretamina, trióxido de arsénico. Existen fármacos sensibilizadores usados en terapia fotodinámica y radiación como p.ej., porfimer, temoporfin, aminolevulinato de metilo [Vademécum, 2013].

De todo lo expuesto hasta el momento sobre los agentes quimioterápicos debe concluirse que en la actualidad existen numerosas moléculas antitumorales a disposición clínica para el tratamiento del cáncer. La enorme variedad de sustancias y mecanismos de acción descritos para esos principios activos permite incluso un uso combinado que potencia aún más la eficacia terapéutica. Queda lejos de los objetivos de esta memoria la descripción detallada de todos los fármacos antitumorales, si bien es fundamental resaltar dos ideas: *i*) existe un muy amplio arsenal de moléculas anticancerosas, lo que permite abordar con ciertas garantías el tratamiento de la mayoría de los procesos cancerosos descritos; y, *ii*) a pesar de esto, la inespecificidad de acción de los fármacos antitumorales, su importante toxicidad (incluso dosis-limitante) y el frecuente desarrollo de resistencias por las células malignas, determinan el frecuente fracaso en el tratamiento del cáncer [Rubin, 2003; Flórez, 2008].

### **1.1.3.2. 5-FLUOROURACILO**

El 5-fluorouracilo (5-fluoropirimidina-2,4-diona) es un agente antineoplásico perteneciente al grupo de los fármacos antimetabolitos análogos de las pirimidinas. En su estructura química incorpora un átomo de flúor en la posición 5 en lugar del hidrógeno (Figura 1.1.). Es un antimetabolito de la uridina que actúa como falso sustrato

en el proceso de síntesis de los constituyentes esenciales de los ácidos nucleicos, principalmente en la fase *S* del ciclo celular, provocando la síntesis de un ADN anómalo o incluso la detención del proceso. El 5-fluorouracilo lesiona las células mediante dos mecanismos de acción, cuya contribución a la acción citotóxica varía según el tipo de tumor: la inhibición de la timidilato sintetasa, que provoca la depleción de la timidina monofosfato (d-TMP), un nucleótido indispensable para la síntesis de ADN y la incorporación progresiva al ARN, interfiriendo así con su procesamiento y su función específica, inutilizándolo. Para ello, debe transformarse inicialmente en el desoxirribonucleótido correspondiente, el ácido 5-fluorodesoxiuridílico (5-FdUMP).



**Figura 1.1.** Estructura química del 5-fluorouracilo.

En términos generales se describe que su eficacia antitumoral es máxima cuando la proliferación celular es rápida. Este principio activo, presenta un amplio espectro de actividad, solo o en combinación con otros quimioterápicos. Se emplea principalmente en el tratamiento de determinados adenocarcinomas del tubo digestivo (colon, páncreas, estómago y recto) y de mama y, con menor frecuencia, en carcinomas de ovario, próstata, cuello uterino, vejiga y orofaringe [Vademécum, 2013]. Tiene limitado su uso en clínica, debido al desarrollo de resistencias por parte de las células cancerosas; además, su alta metabolización en el organismo hace necesario administrar altas dosis de forma continua para conseguir concentraciones terapéuticas eficaces en el lugar de acción, ocasionando una toxicidad severa. Es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de muchos tumores sólidos. En particular, es todavía fundamental en la

## Capítulo 1. Introducción

---

clínica del cáncer colorrectal avanzado, aunque en este caso presenta limitada eficacia, con una respuesta del 5-fluorouracilo inferior al 10 % y que es incrementado hasta un 45 % cuando es usado en combinación con otros agentes antitumorales [Zhang y cols., 2008].

El 5-fluorouracilo también se utiliza como tratamiento paliativo en pacientes no curados por cirugía o radioterapia, y ha sido empleado en el tratamiento del cáncer de la cubierta externa de la glándula adrenal, de endometrio, de esófago, de pene, de vulva y en el hepatoblastoma.

La absorción por vía oral de esta molécula es errática, por lo que el 5-fluorouracilo presenta una baja biodisponibilidad oral. De esta manera, su vía de administración habitual es la intravenosa continua durante 120 horas (20-30 mg/Kg/día); si bien en el tratamiento de tumores de cabeza y cuello se asocia al cisplatino en infusión de 92 horas. En ocasiones, se ha utilizado en infusión intraarterial (p. ej., en metástasis hepática del carcinoma de colon). Por vía tópica este agente antitumoral puede provocar fotosensibilización y eritema, exfoliación, ulceración, necrosis y reepitelización. No obstante, es empleada esta vía de administración para la administración de formas farmacéuticas tópicas para el tratamiento de la psoriasis y en queratosis premaligna de la piel [Vademécum, 2013].

Este principio activo atraviesa sin dificultad y con rapidez el espacio extracelular, el líquido cefalorraquídeo, el líquido pleural y el líquido ascítico. La semivida plasmática de este fármaco es aproximadamente de 20 minutos, si bien puede variar este valor en función de cómo sea su aclaramiento plasmático. Cuando se administra por vía intravenosa en forma de bolo, la concentración de 5-fluorouracilo alcanzada en plasma y en la médula ósea en las primeras horas es muy superior a la que se obtiene mediante infusión intravenosa, lo que lleva asociada una mayor incidencia de mielosupresión. La metabolización es eminentemente hepática mediante sistemas enzimáticos saturables y se elimina principalmente en orina [Flórez, 2008].

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

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

Las principales reacciones adversas asociadas a la administración de este agente quimioterápico se producen a nivel gastrointestinal y en la médula ósea. En el primero, las reacciones iniciales son náuseas y vómitos, y las diferidas son estomatitis y ulceraciones en diversas localizaciones del tubo digestivo. En la médula ósea provoca mielosupresión, en la que predomina leucopenia, cuando la administración parenteral es en forma de bolo, y disminuye si se administra en infusión intravenosa. Puede producir también alopecia, conjuntivitis, ectropión (plegamiento del borde de uno de los párpados en dirección opuesta a la superficie del ojo) y síntomas neurológicos agudos (somnolencia, parestesias y ataxia cerebelosa). Las reacciones adversas más graves se deben a la cardiotoxicidad producida, como dolor torácico, alteraciones en el electrocardiograma y aumento de los niveles de enzimas cardíacas (signo de problemas cardíacos), en definitiva cardiotoxicidad. Esta sintomatología se atribuye 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 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.

Este fármaco no está exento de contraindicaciones (hipersensibilidad, embarazo y lactancia) e interacciones farmacológicas significativas (los niveles plasmáticos incrementados por cimetidina; eficacia y toxicidad disminuida por alopurinol; aumento de efecto con anticoagulantes orales; inhibición de su acción citotóxica con paclitaxel; con tiazidas aumenta su efecto mielosupresor, entre otras), las cuales condicionan seriamente su utilización en clínica [Rubin, 2003, Vademécum, 2013].

### **1.2. TRANSPORTE DE FÁRMACOS**

La actividad biológica de un fármaco depende, ante todo, de la naturaleza de su interacción con la célula, tejido u órgano diana. Para que esta interacción se produzca, es necesario que el principio activo esté en la biofase o lugar de acción en cantidad y el tiempo suficiente como para conseguir la respuesta deseada. Aunque la mayoría de los agentes terapéuticos son administrados mediante formas de dosificación convencionales (cápsulas, comprimidos, soluciones inyectables, etc.), hay ocasiones en que éstas son inapropiadas para lograr un efecto farmacológico óptimo. En el caso de tratamientos crónicos, con formas de dosificación convencionales, puede resultar un inconveniente para el paciente, ya que estos requieren una administración repetida para mantener la concentración plasmática de fármaco a un nivel suficientemente alto como para asegurar un efecto terapéutico. Esto puede conllevar a fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas de fármaco entre dosis, lo que puede originar efectos tóxicos o secundarios por una respuesta inadecuada al principio activo si las

concentraciones plasmáticas se encuentran por encima del nivel terapéutico tolerado [Couvreur y Vauthier, 2006].

Actualmente han aumentado las líneas de investigación para encontrar tratamientos eficaces contra el cáncer, encaminadas al desarrollo de nuevos fármacos, sin embargo dichas moléculas no son capaces de llegar en cantidad y velocidad (biosponibilidad) eficientes hasta el lugar de acción donde se halla la masa tumoral, lo que conlleva al fracaso farmacológico. Uno de los principales factores que conducen a la limitada acción de la quimioterapia es la propia fisiopatología del tumor. En concreto la gran presión hidrostática intersticial que impide un aporte sanguíneo homogéneo a la masa tumoral y la llegada de los fármacos, ocasionando una distribución heterogénea e ineficaz de los agentes antineoplásicos. Otros factores relacionados con el fármaco que conducen al fracaso de la quimioterapia son [Allen y Cullis, 2004; Arias, 2008a, 2011a; Durán y cols., 2008; Pankhurst y cols., 2003]: *i*) unas propiedades farmacocinéticas desfavorables (rápida biodegradación y rápido aclaramiento, lo que conduce a una corta vida plasmática) y fisicoquímicas inapropiadas (por ejemplo, alta hidrofobia, lo que permite una escasa acumulación en la región diana), que determinan el uso de altas dosis con la correspondiente toxicidad y una pauta de tratamiento rigurosa para conseguir el efecto terapéutico deseado; *ii*) una extensa biodistribución, extravasación y acumulación del agente antitumoral en tejidos y órganos sanos, lo que determinan efectos adversos; *iii*) pobre selectividad de acción sobre las células tumorales y *iv*) susceptibilidad de desarrollar mecanismos de resistencia a los fármacos antitumorales por parte de las células tumorales.

Quizás, de todos los factores que determinan una actividad farmacológica ineficaz e insegura destacan la poca selectividad de los antitumorales por las células cancerosas y su extensa distribución en tejidos y órganos sanos tras su administración. Estos factores motivaron el comienzo de las investigaciones hacia el diseño de sistemas transportadores de fármacos, más concretamente, el concepto de vectorización. La vectorización de un principio activo se define como la operación tecnológica dirigida a

## Capítulo 1. Introducción

---

modular y, en el caso ideal, dirigir un fármaco en el organismo hasta el lugar de acción específico. La mayoría de estos vectores son coloides y se pretende con un apropiado diseño tecnológico que los principales beneficios que aporten a la farmacoterapia sean [Reddy, 2005; Couvreur y Vauthier, 2006; Reddy y Couvreur, 2008]:

- Protección de la sustancia activa contra procesos de inactivación (química, enzimática o inmunológica), desde el lugar de administración hasta la biofase. También contra procesos de degradación que puedan ocurrir durante el almacenamiento previo a la utilización del medicamento.
- Máxima acumulación de la dosis de fármaco en la región diana, independientemente de la localización de ésta.
- Aumento de la especificidad de acción y eficacia a nivel celular permitiendo que el principio activo venza incluso fenómenos de resistencia a su acción.
- Incremento de la semivida plasmática del fármaco al retrasar los fenómenos de aclaramiento plasmático y eliminación.
- Mejora de las propiedades fisicoquímicas desfavorables del agente terapéutico, como la baja hidrosolubilidad.
- Minimización de la toxicidad e inmunogenicidad de la molécula activa.
- Mejora de la producción a gran escala del medicamento.

Los sistemas transportadores de fármacos pertenecientes al grupo de los coloides pueden tener una naturaleza química muy variable (orgánica o inorgánica). Sin embargo, deben ser siempre biodegradables y biocompatibles, y además deben presentar

una excelente capacidad para la vehiculización de fármacos [Reddy, 2005; Couvreur y Vauthier, 2006].

Dentro de los sistemas coloidales destacan sistemas compuestos con cubierta polimérica para el tratamiento del cáncer y enfermedades parasitarias [Arias y cols., 2007b, 2010a, 2010b, 2010d; Pérez-Artacho y cols., 2012; Sáez-Fernández y cols., 2009]; y sistemas vesiculares con cubierta lipídica (liposomas y niosomas) [Arias y cols., 2011a; Pradhan y cols., 2007; Schröder y cols., 2009] y núcleos magnéticos, como es el caso de magnetoliposomas [Clares y cols., 2013; Zhu y cols., 2009] para conseguir el transporte eficaz de cualquier antitumoral a la zona diana [Arias, 2011a, 2011b; Cho y cols., 2008].

### **1.2.1. ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE SELECTIVO DE FÁRMACOS AL LUGAR DE ACCIÓN**

Para solucionar los problemas relacionados con la quimioterapia actual se han vehiculizado fármacos antitumorales en diferentes sistemas coloidales [Arias, 2011a; Reddy, 2005]. Dicha asociación persigue acumular toda la dosis de fármaco administrado, incrementar el contacto íntimo con la célula diana (tumoral), minimizar su distribución por todo el organismo, mejorar su perfil farmacocinético y disminuir la toxicidad asociada por inespecificidad de acción. Además, la asociación del fármaco con el sistema transportador puede lograr una protección adecuada de estas moléculas tanto *in vitro* (en almacenamiento) como *in vivo* (frente a fenómenos de biodegradación dentro del organismo), lo que reducirá la formación de productos de degradación potencialmente tóxicos [Arias, 2008a; Davis y cols., 2008]. No obstante, recientes investigaciones llevadas a cabo con estudios preclínicos *in vivo* e incluso clínicos mostraron la ausencia de mejoría real con la utilización de coloides, debido a la intensa y rápida interacción de estos transportadores con el sistema retículo-endotelial (SRE) [Brannon-Peppas y cols., 2004; Brigger y cols., 2004; Couvreur y Vauthier, 2006;

Reddy, 2005]. Esta tendencia natural de los nanosistemas a ser fagocitados por los macrófagos del hígado y bazo, es una de las estrategias que conforman el “transporte pasivo” de fármacos, pero sólo, utilizada en el tratamiento de hepatocarcinomas o metástasis hepáticas procedentes de tumores ginecológicos, broncopulmonares o del tracto digestivo. En caso de que las células malignas se encuentren en cualquier otra localización, el nanotransportador carecerá de utilidad. Para obviar este problema, las últimas investigaciones se han centrado en el “transporte activo” de antineoplásicos con el desarrollo de nanosistemas multifuncionales que permiten dirigir el principio activo hacia dianas específicas [Arias, 2011b].

### **1.2.1.1. TRANSPORTE PASIVO DE FÁRMACOS**

El perfil de seguridad de un fármaco vehiculizado en un sistema coloidal suele ser mayor que el correspondiente a su administración en solución intravenosa [Haley y Frenkel, 2008]. No obstante, el sistema coloidal también es susceptible de ser atacado por el SRE, por lo que en la mayoría de los casos presenta un tiempo de semivida plasmática ( $t_{1/2}$ ) demasiado corto y no es posible su acceso a tumores localizados en otras zonas del organismo. Por tanto, estos sistemas quedan reservados para el tratamiento de tumores localizados en órganos del SRE [Brannon-Peppas y cols., 2004; Brigger y cols., 2002]. Por este motivo las nanoplataformas para la vehiculización de agentes antitumorales deberán ser capaces de escapar a los procesos de reconocimiento llevados a cabo por el SRE, el cual incluye monocitos sanguíneos y macrófagos tisulares.

La velocidad con la que es retirado el sistema coloidal de la circulación sanguínea dependerá de su tamaño y de sus características superficiales. En este sentido la llegada de estos fármacos a zonas más específicas [Arias 2011b] estará condicionada por las propiedades de la masa e intersticio tumoral [Gu y cols., 2007; Maeda y cols., 2013], como son: a) las irregularidades existentes en el endotelio que constituye los vasos

sanguíneos que irrigan el tumor (espacios entre las células endoteliales de entre 100 y 600 nm), las cuales incrementan la permeabilidad de los vasos sanguíneos a las macromoléculas (y nanopartículas) que circulan en sangre comparado con los vasos sanguíneos que irrigan un tejido sano y b) la existencia de un sistema de drenaje linfático afuncional, lo que origina una mayor acumulación y retención de macromoléculas en el espacio intersticial.

Para retrasar en la medida de lo posible el ataque del SRE y en definitiva permitir que el sistema transportador de fármacos alcance su destino biológico y se acumule específicamente en la masa tumoral [Maeda y cols., 2009; Mitra y cols., 2001] el sistema transportador deberá reunir una serie de características como una geometría adecuada, es decir, forma esférica y tamaño lo suficientemente grande como para que no haya extravasación a zonas sanas y lo suficientemente pequeño para escapar al SRE y carga eléctrica superficial mínima (independientemente de su signo).

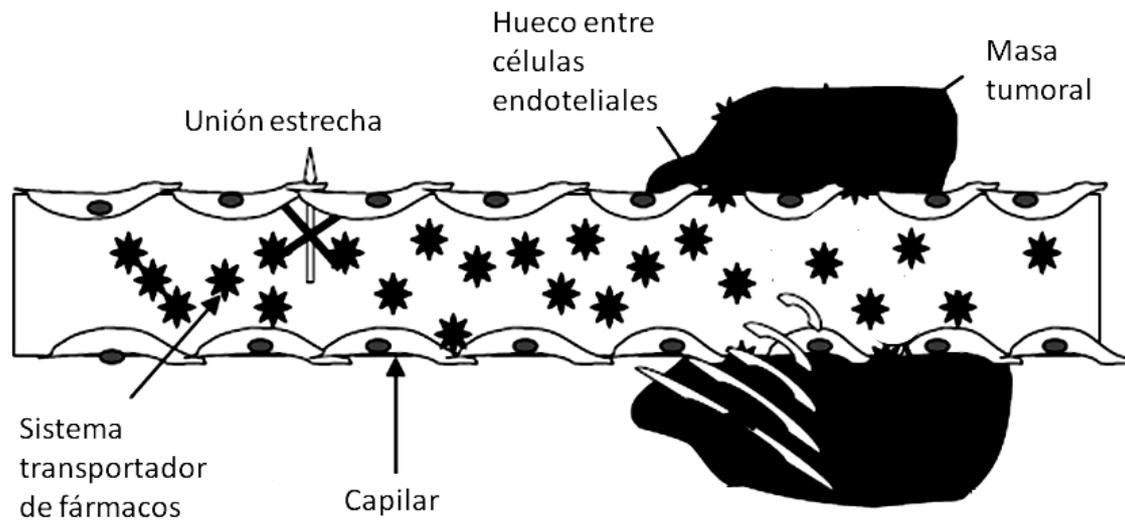
Además de estas características se deberá lograr una superficie lo más hidrófila posible mediante el recubrimiento (por adsorción física o conjugación química) con polímeros o copolímeros como los poloxámeros, las poloxaminas, los polisacáridos o, muy habitualmente, los polietilénóxidos (p.ej., el polietilenglicol). Estas modificaciones superficiales reducen significativamente el carácter hidrófobo del sistema coloidal y además les dota de una protección estérica frente a la interacción con opsoninas [Cho y cols., 2008; Couvreur y Vauthier, 2006; Patil y cols., 2009; Venkatasubbu y cols., 2013], que evitará la identificación por parte del SRE y posterior endocitosis por parte de los macrófagos. Sólo así se conseguirá que el coloide tenga un tiempo de semivida plasmática extensa, lo cual le permitirá llegar hasta el lugar de acción [Reddy, 2005].

Liposomas con cadenas de PEG en su superficie (denominados Liposomas *Stealth*) [Etzerodt y cols., 2012; Li y cols., 2010] presentan 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]. La diferencia en todos estos parámetros farmacocinéticos incrementan su tiempo de circulación en plasma, de tal manera que el liposoma puede aprovechar la mayor permeabilidad de los capilares que irrigan la masa de células malignas para acceder al intersticio tumoral [Moreira y cols., 2001].

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]. La incorporación de polímeros hidrófilos en la superficie de nanopartículas lipídicas también ha permitido prolongar significativamente su permanencia en el organismo ( $t_{1/2} > 48$  horas) [Moghimi y Szebeni, 2003; Park, 2002]. Otras investigaciones muestran como el incremento de  $t_{1/2}$  puede lograrse mediante el uso de fosfolípidos sintéticos (conjugados con gangliósidos) [Huwlyer y cols., 2008].

Los sistemas transportadores que poseen ambas propiedades (tamaño nanométrico e hidrofilia), presentan un elevado valor de  $t_{1/2}$ , por lo que puede sufrir un proceso de extravasación selectivo o específico en aquellas zonas del organismo alteradas por una inflamación, una infección o un fenómeno de crecimiento tumoral. Esto permitirá dirigir el fármaco directamente a los tumores localizados fuera de las regiones del SRE. Este fenómeno se conoce con el nombre de efecto de permeabilidad y retención aumentada (*EPR*) y está basado, en el caso del cáncer, en la mayor permeabilidad de los capilares sanguíneos que irrigan el tumor, consecuencia de un crecimiento (fenómeno de angiogénesis) acelerado y defectuoso (Figura 1.1.) [Brannon-Peppas y cols., 2004; Cho y cols., 2008; Decuzzi y cols., 2009; Maeda y cols., 2009; Maeda y cols., 2013; Moghimi y cols., 2001; Rapoport, 2007].



**Figura 1.1.** Extravasación selectiva de los nanosistemas transportadores de fármaco a través de los defectos existentes en la microvasculatura tumoral. El coloide sólo abandona la circulación sanguínea cuando alcanza esta zona capilar alterada. Adaptado de Rapoport, 2007. Copyright Elsevier (2007).

### **1.2.1.2. ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE ACTIVO DE FÁRMACOS**

No cabe duda que la particular fisiología del tumor aporta una ventaja a la liberación de nanosistemas transportadores de fármacos antitumorales ya que éstos pueden acumularse en la masa tumoral a través del efecto EPR, descrito anteriormente. Sin embargo este tipo de vectorización pasiva hacia células tumorales sólo ha permitido la utilización clínica de algunos de ellos. Así pues esta estrategia constituye un éxito parcial con la que no todos los citostáticos difunden eficientemente en la masa tumoral haciendo difícil un control de la cantidad de fármaco que llega a las células diana, que si es insuficiente puede traducirse en la aparición de un efecto de resistencia múltiple a dichos fármacos.

Si bien las estrategias de transporte pasivo contribuyen al logro de una mayor localización de los fármacos en el lugar de acción, la especificidad por la masa tumoral puede no estar totalmente asegurada, dando lugar a un tiempo prolongado de circulación de la nanoplateforma en otros lugares del organismo donde, si se produce la liberación del fármaco, pueden desarrollar efectos secundarios. De todo lo cual surge la necesidad de focalizar la distribución e interacciones biológicas de los nanosistemas transportadores de fármacos con circulación plasmática extendida. Con este objetivo, se desarrollaron las estrategias de transporte activo de fármacos, las cuales se basan en la incorporación sobre el coloide de ligandos específicos de receptores localizados en la superficie de las células tumorales. Entre los diferentes tipos de ligandos investigados destacan los anticuerpos monoclonales, péptidos (principalmente integrinas), aptámeros, ácido fólico, folatos y transferrinas [Arias y cols., 2011a; Arias y cols., 2011b; Ding y Ma, 2012; Kedar y cols., 2010; Moreira y cols., 2002;]. De forma alternativa, estas estrategias también están basadas en el diseño de nanopartículas de diferente naturaleza pero con capacidad para responder a estímulos externos aplicados exclusivamente en el lugar de acción. La utilización de estímulos (p.ej., reacciones redox, luz, ultrasonidos, cambios de pH, temperatura, gradientes magnéticos o sistemas enzimáticos) logrará que el nanosistema transportador se concentre totalmente en la región deseada y sólo allí liberará la dosis de fármaco antitumoral [Arias y cols., 2011a; Cho y cols., 2008; Couvreur y Vauthier, 2006; Önyüksel y cols., 2009; Reddy, 2005; Schröder y cols., 2009; Wang y cols., 2011].

### ***ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACO BASADAS EN INTERACCIONES LIGANDO-RECEPTOR***

En este tipo de estrategia, las nanopartículas transportadoras diseñadas presentan en su superficie biomoléculas que permiten la interacción específica con las células diana y posterior entrada a través del proceso de endocitosis. De esta manera, se consigue que toda la dosis de fármaco vehiculizada sea liberada selectivamente en la región deseada [Arias, 2011a]. La unión específica del sistema coloidal a la célula diana, p.ej., célula

tumoral, se logra mediante mecanismos de reconocimiento molecular (unión ligando-receptor o interacción antígeno-anticuerpo) [Brigger y cols., 2002; Decuzzi y cols., 2009; Ding y Ma., 2012; Xu y cols., 2013]. Para ello, la superficie de la nanopartícula debe ser modificada mediante la adsorción química o física de anticuerpos monoclonales [Kocbek y cols., 2007], integrinas [Hallahan y cols., 2003] o restos de folato [Zhang y cols., 2011], por citar algunos ejemplos.

### *a.- Transporte mediado por anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos monoclonales son biomoléculas aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA). Son diseñadas para su interacción específica y unión con antígenos y receptores de las células cancerosas [Cirstoiu-Hapca y cols., 2007]. Un ejemplo muy representativo de nanopartículas modificadas superficialmente con anticuerpos lo constituyen los inmunoliposomas [Park y cols., 2004]. Estos sistemas son liposomas cuya superficie está funcionalizada con cadenas poliméricas de carácter hidrófilo, por ejemplo PEG y con anticuerpos monoclonales modificados con grupos polares del coloide mediante unión química de estos últimos (p. ej., restos de fosfolípidos) [Gao y cols., 2009]. Han sido desarrollados inmunoliposomas específicos que interaccionan con el factor de crecimiento epidérmico-2 (HER-2) presente en la superficie de células tumorales. La utilización de estos liposomas con cadenas de PEG y moléculas de anticuerpos anti-HER-2 a nivel superficial, permite el tratamiento eficaz de ciertos tumores en comparación con los tratamientos control (fármaco administrados en solución y liposomas con cadenas de PEG en superficie) [Gao y cols., 2009; Park y cols., 2001, 2002].

Se ha propuesto también el diseño de nanoplataformas poliméricas con moléculas de anticuerpos monoclonales incorporados en su superficie para el transporte activo de fármacos antitumorales. En un reciente estudio se han diseñado nanopartículas compuestas por un bloque copolimérico formado por biotina (B) unida a Pluronic<sup>®</sup> F-127 y ácido poliláctico, con anticuerpos monoclonales anti-CA125 unidos a avidina y

biotina, dichas nanopartículas transportan paclitaxel para el tratamiento de células humanas de carcinoma de ovario [Xiong y cols., 2012].

### *b.- Transporte mediado por péptidos*

Determinados péptidos y macromoléculas peptidomiméticas, por ejemplo, la secuencia RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), constituyen un sistema de reconocimiento importante para la adhesión celular, permitiendo que estas biomoléculas tengan una alta afinidad de unión por las integrinas que se encuentran sobreexpresadas en los vasos tumorales [Danhier y cols., 2012; Temming y cols., 2005]. Por lo tanto, la unión de estas macromoléculas a un sistema nanotransportador, incrementará la acumulación específica de éste en los vasos sanguíneos que irrigan la masa tumoral [Herringson y cols., 2011].

El tipo de péptido a utilizar dependerá de la clase de integrina que se encuentre en la superficie de la célula tumoral. Por ejemplo, un reciente estudio ha demostrado que puede ser retardado el crecimiento tumoral y prolongar la supervivencia en ratones cuando son tratados con paclitaxel vehiculizado en nanopartículas compuestas con poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) con PEG en superficie, el cual fue modificado con péptidos de secuencia RGD y que interaccionan específicamente con integrinas  $\alpha(v)\beta(3)$  presentes en células endoteliales humanas de la vena umbilical. En este estudio también utilizaron doxorubicina para confirmar los efectos provocados por el paclitaxel vehiculizado [Danhier y cols., 2009]. Se ha propuesto también el diseño de liposomas con cadenas de PEG en su superficie (Liposomas *Stealth*) y el ligando peptídico p18-4 localizado a nivel superficial para el transporte de doxorubicina. El ligando peptídico incorporado en la formulación liposomal interacciona con líneas celulares de cáncer de mama como MDA-MB-435, el ligando no tiene un efecto notable en el tamaño de los liposomas ni liberación de doxorubicina. No obstante, esta interacción coloide-célula tumoral se traduce en un proceso de endocitosis de la

nanopartícula y, así, una mayor acción citotóxica de la doxorubicina vehiculizada en las células MDA-MB-435 [Shahin y cols., 2012].

Otro ejemplo muy interesante es la formulación de liposomas modificados superficialmente con el péptido PH1, el cual presenta una gran especificidad de unión por las integrinas Tie2 [Mai y cols., 2009]. En este trabajo puede comprobarse que la vehiculización del antitumoral cisplatino incrementa la actividad citotóxica de este principio activo sobre las células tumorales que presentan en su superficie la biomacromolécula Tie2. En otros trabajos se demostró que el diseño de nanopartículas de ácido poliglutámico modificadas superficialmente con el péptido H2009.1 (biomolécula que presenta una gran afinidad por los receptores de integrinas  $\alpha_v\beta_6$ ) permite el transporte específico de doxorubicina a las células cancerosas que presentan abundantemente receptor en su superficie [Guan y cols., 2008]. Así, estos nanosistemas aumentan claramente la selectividad de la acción antitumoral de la doxorubicina, minimizando las reacciones adversas asociadas a su administración.

Las grandes posibilidades que ofrece esta estrategia de transporte activo han determinado su aplicación en terapia génica contra el cáncer. Numerosos estudios han demostrado que la utilización de sistemas coloidales modificados superficialmente con macromoléculas de tipo peptídico permite aumentar la eficiencia del proceso de transfección a células cancerosas de genes, secuencias de oligonucleótidos o porciones de ARN y ADN [Bolhassani 2011; Tanaka y cols., 2010]. Una investigación muestra la transfección de complejos de ADN a células tumorales mediante su vehiculización en nanopartículas poliméricas de polietilenimina (PEI) con PEG en superficie modificados con péptidos específicos, como la clorotoxina, que se unen específicamente a los receptores de células cancerosas de glioma (C6) y meduloblastoma (DAOY) presentes a nivel superficial [Veiseh y cols., 2009].

### *c.- Transporte mediado por aptámeros*

Los aptámeros son secuencias de ácidos nucleicos (oligonucleótidos de ADN o ARN), capaces de unirse selectivamente a determinados antígenos que se localizan en la superficie de las células tumorales. Estas biomoléculas se caracterizan por poder sintetizarse químicamente de forma muy sencilla y por presentar un pequeño tamaño. En oncología, los aptámeros pueden ser utilizados por sí mismos como agentes antitumorales [Zhu y cols., 2012], pero también pueden acoplarse a nanosistemas transportadores de fármacos para aumentar su especificidad por las células cancerosas [Li y cols., 2012a, 2012b].

Se ha comprobado que la eficacia de acción del antitumoral paclitaxel puede mejorarse significativamente mediante su vehiculización en nanopartículas de PLGA modificadas con cadenas de PEG y con el aptámero AS1411. Este aptámero de ADN es específico de la nucleolina, una proteína que está fuertemente expresada en la membrana plasmática de las células cancerosas y células del endotelio de la neovasculatura tumoral. En este estudio [Guo y cols., 2011] se observó que la interacción del aptámero con la nucleolina mejoraba significativamente la asociación entre las células de glioma C6 y las nanopartículas, lo que provocaba un incremento muy significativo en la citotoxicidad de células tumorales, en comparación con la actividad desarrollada por las nanopartículas que carecían de este ligando en su superficie, debido a la acumulación del fármaco antitumoral en la masa tumoral. Además, los ratones con este tipo de tumor inducido y tratados con las nanopartículas funcionalizadas con el aptámero prolongaban su supervivencia en comparación con aquellos tratados con la nanopartícula sin el aptámero.

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

Los receptores de folato aparecen de forma abundante sobre la superficie de las células cancerígenas como consecuencia del incremento de sus necesidades de ácido

fólico para la síntesis de ADN. La interacción de 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 [Ai y cols., 2012; Garcia-Bennett y cols., 2011; Gonen y cols., 2012]. 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 de este. [Lai y Lee, 2009; Low y Kularatne, 2009; Yang y cols., 2012]. 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 [Pan y Lee, 2005; Shmeeda y cols., 2006; Xiong y cols., 2011].

Además, se ha puesto de manifiesto la eficacia de esta estrategia de transporte incluso ante los fenómenos de resistencia a fármacos que desarrollan las células tumorales [Bavetsias y cols., 2000; Das y Sahoo., 2012; Gonen y cols., 2012]. Se ha comprobado que la vehiculización de daunorrubicina en liposomas recubiertos de folato permite su mejor captación *in vitro* por células L1210JF del modelo murino de tumor ascítico para la eficacia terapéutica *in vivo* en células tumorales B6D2F1 de ratón [Pan y Lee., 2005]. Otro ejemplo lo encontramos en la vehiculización de los fármacos antitumorales mitoxantrona, paclitaxel y metotrexato en nanopartículas sólidas lipídicas [Zhuang y cols., 2012], consiguiendo una citotoxicidad significativa de células tumorales MCF-7 del modelo murino de cáncer de mama. Moléculas de folato en superficie (en concreto, glucosilfosfatilinositol), también se ha utilizado en el diseño de nanopartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona-*co*-4-maleato- $\epsilon$ -caprolactona) para la mejora de actividad antitumoral del agente quimioterápicos 5-fluorouracilo [Zhang y cols., 2011]. De manera similar han sido utilizadas nanopartículas de poli(etilenimina) pegiladas con moléculas de folato para el transporte de genes en diferentes líneas celulares, como células tumorales C6 de gliomas [Liang y cols., 2009].

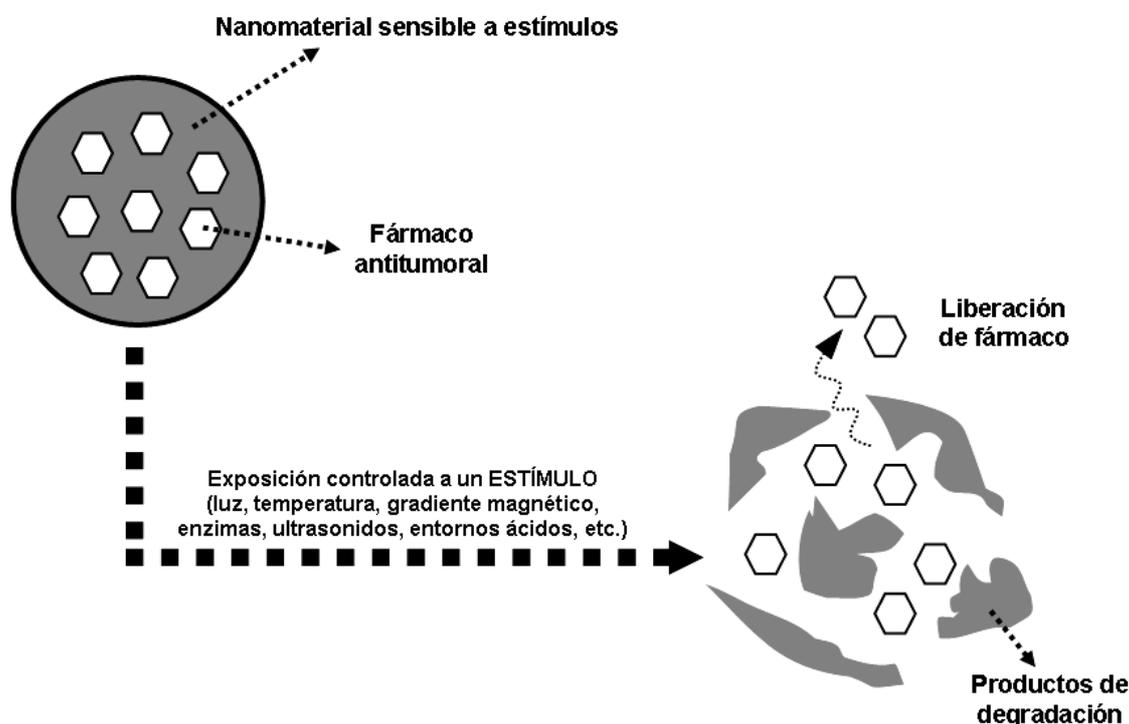
### *e.- Transporte mediado por receptores de transferrina.*

Los receptores de transferrina están localizados ampliamente en la superficie de una gran cantidad de células cancerosas. Debido a la posibilidad de saturación de estos receptores como consecuencia de la interacción de transferrina endógena en plasma, se ha sugerido la administración de las nanopartículas modificadas superficialmente con esta biomolécula directamente en el interior de la región diana [Daniels y cols., 2012]. La transferrina ha demostrado una actividad muy prometedora ante la resistencia desarrollada hacia algunos fármacos por diferentes células cancerosas y que está relacionada con la glicoproteína-P [Arora y cols., 2012]. La transferrina ha sido conjugada directamente con fármacos anticancerosos asegurando una mayor focalización de la acción de éstos [Shah y cols., 2009], y también con sistemas coloidales para mejorar la biodistribución del fármaco transportado y lograr así una mayor acumulación de éste en el tumor [Sahoo y Labhasetwar., 2005].

Un reciente estudio *in vitro* ha demostrado que la conjugación de transferrina con nanopartículas de PLGA cargadas con paclitaxel, origina una captación tres veces mayor de este fármaco por células de cáncer de próstata humano (PC3) en comparación con las nanopartículas poliméricas sin esta modificación superficial. Una simple inyección intratumoral de nanopartículas (dosis de paclitaxel: 24 mg/Kg) en animales con tumores subcutáneos inducidos con esta línea celular permite la completa regresión del tumor. Dichas nanopartículas también han demostrado ser muy eficaces frente a la línea de células de cáncer de mama MCF-7 [Sahoo y cols., 2004; Sahoo y Labhasetwar, 2005]. Este tipo de estrategias ha sido propuesto para el tratamiento de tumores localizados a nivel cerebral, ya que las nanopartículas así diseñadas atraviesan muy fácilmente la barrera hematoencefálica mediante endocitosis utilizando temozolomida vehiculizada en nanoplataformas de poli( $\beta$ -L-ácido málico) con trileucina, un anticuerpo monoclonal al receptor de transferrina (TfR) [Patil y cols., 2010]. Asimismo ha permitido incluso mejorar la fototerapia antitumoral [Derycke y cols., 2004] y el diagnóstico del cáncer mediante resonancia magnética de imagen [Jiang y cols., 2012a].

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

Los nanosistemas transportadores con capacidad de respuesta a estímulos (internos o externos) presentan esencialmente un diseño de carácter polimérico o lipídico, y son sensibles frente a pequeñas variaciones de su entorno; dichas variaciones, modificaciones o alteraciones provocan rápidamente cambios en la estructura y propiedades físicas en las nanopartículas transportadoras (p. ej., degradación, hinchamiento, etc.). Algunos de estos cambios son reversibles y, por lo tanto, el material puede volver a su estado inicial tan pronto como desaparece el estímulo. Dichos estímulos pueden ser agrupados en tres categorías: físicos (luz, eléctricos, magnéticos, ultrasonidos, mecánicos y temperatura), químicos (pH, fuerza iónica, soluto/disolvente y electroquímicos) y biológicos (enzimas y receptores) [Delcea y cols., 2011]. Los estímulos responsables de este proceso pueden generarse en el interior del organismo (p. ej., cambios de pH en zonas del organismo por procesos patológicos, cambios de temperatura, interacción con determinados sistemas enzimáticos, etc.), o bien puede tener un origen externo (p. ej., campos magnéticos, campos eléctricos, luz, ultrasonidos, etc.). Para conseguir el objetivo de esta estrategia de transporte activo el estímulo debe producirse en la región diana. De esta manera, estará asegurada la acumulación selectiva de las moléculas activas en el tejido diana y, podrá disminuir la incidencia y la severidad de las reacciones adversas asociadas a la extensa biodistribución del principio activo (Figura 1.2.). Adicionalmente, con esta estrategia puede conseguirse la modulación de la duración e intensidad del efecto farmacológico [Arias 2011a; Cheng y cols., 2013; Bawa y cols., 2009; Fleige y cols., 2012; Lee y cols., 2013; Pavlukhina y Sukhishvili 2011; Torchilin, 2009; Zhu y Torchilin, 2013].



**Figura 1.2.** Liberación de un fármaco antitumoral activada por la exposición de la nanopartícula a un estímulo. La destrucción de la nanopartícula facilita la cesión de la dosis de fármaco vehiculado en la masa tumoral.

### *a.- Control del proceso de liberación de fármaco mediante cambios del pH*

En este caso los materiales, empleados para la formulación del coloide, son extremadamente sensibles a pequeños cambios de pH, con respecto al sanguíneo (pH = 7.4). Así pues y dado que el intersticio tumoral presenta un pH aproximadamente de 6.6, debido a alteraciones de tipo metabólico (glucólisis aeróbica y anaeróbica) y de los flujos sanguíneo y linfático, el sistema transportador empezará a descomponerse y liberará al mismo tiempo el principio activo vehiculado. Es previsible que este tipo de nanopartículas presenten una distribución extensa por el organismo y sólo cuando alcancen la región de pH al que son sensibles, se destruirán, controlando así la liberación de la dosis de fármaco vehiculado [Chen y cols., 2011; Elizondo y cols.,

2011; Xing y cols., 2012; Zheng y cols., 2011]. 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 [Jiang y cols., 2012b; Mo y cols., 2013; Shi y cols., 2002; Soares y cols., 2012].

De forma general, los materiales poliméricos y lipídicos que son sensibles a pHs ácidos contienen grupos carboxílicos, fosfatos 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 [Dehousse y cols., 2010; Shalviri y cols., 2012; Shalviri y cols., 2013].

Por ejemplo, un reciente estudio ha utilizado un polímero pH-sensible basado en polietilenglicol-poli(L-histidina)-poli(L-lactida) (PEG-PH-PLLA) para diseñar y desarrollar un sistema transportador del agente antitumoral doxorrubicina. La unión entre ambas estructuras químicas provoca que la liberación sea más rápida a pH (ácido) 5.0 frente al pH (sanguíneo) 7.4 en células tumorales HepG2 y fibroblastos NIH 3T3. Este trabajo muestra como la utilización de este coloide permite un notable incremento de la actividad antitumoral del fármaco *in vitro* en comparación con la administración del fármaco libre en solución [Liu y cols., 2011]. Por otro lado, la utilización de partículas hidrófobas de poli( $\beta$ -amino éster) (PbAE) fueron empleadas para la vehiculización del profármaco paclitaxel oleato, debido a la dificultad que presenta dicho fármaco en formulaciones para administración por vía parenteral. En concreto, las nanopartículas obtenidas fueron comparadas con paclitaxel oleato transportado en

poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), las cuales no eran pH-sensibles, para el tratamiento de células de leucemia linfoblástica. Se concluyó que el profármaco vehiculizado en las nanopartículas de PbAE mostraban una actividad mayor con respecto a la formulación con PCL, mejorando la distribución de la molécula activa en el tumor [Lundberg, 2011].

Por último, diversas investigaciones han demostrado que los sistemas liposomales sensibles a variaciones de pH permiten un mejor transporte no sólo de fármacos antitumorales hasta la zona diana, en comparación con liposomas convencionales y liposomas de liberación prolongada, por sus propiedades fusogénicas [Karanth y Murthy, 2007; Simões y cols., 2004], sino que también permite el transporte de antibióticos, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, plásmidos, proteínas y péptidos [Simões y cols., 2004]. Este tipo de formulaciones pueden ser también modificadas superficialmente con polímeros y permiten la liberación intracelular de la carga útil de fármaco encapsulado bajo condiciones levemente ácidas encontradas en endosomas celulares. En este sentido la nanoplataforma emplea moléculas de alto peso molecular unidas a la superficie de liposomas, en este caso poli(estireno-*co*-ácido maleico), un copolímero cuya conformación cambia en medio ácido y genera una desestabilización de los liposomas debido a la fusión con la membrana celular. Estos liposomas modificados superficialmente presentan interesantes posibilidades en el transporte del agente quimioterápico 5-fluorouracilo para el tratamiento de células de cáncer de colon HT-29 en comparación con liposomas puros [Banerjee y cols., 2012].

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

Los coloides elaborados con materiales afectados por cambios térmicos (termosensibles), se caracterizan por sufrir un proceso de desestabilización/destrucción ante un ligero aumento de temperatura. Este comportamiento es típico de nanosistemas cuya estructura química contiene un elevado número de grupos hidrófobos, (p. ej., metilo, etilo y propilo). Se caracterizan por presentar una temperatura crítica de

disolución por debajo de la cual una mezcla binaria existe como disolución de una fase homogénea a cualquier concentración, y al calentarla por encima de ella se produce la separación de fases. Al superar esta temperatura, determina su disolución y la consiguiente liberación del fármaco transportado. 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 un intervalo de 39 - 42 °C, intervalo de temperatura característico de la masa tumoral [Tagami y cols., 2012].

La poli(*N*-isopropilacrilamida-*co*-acrilamida) es quizás el polímero más estudiado para el diseño de este tipo de nanosistemas, pues su temperatura crítica de disolución se encuentra muy próxima a la fisiológica (37 °C) [Eeckman y cols., 2004; Eeckman y cols., 2001]. Es más, puede ajustarse fácilmente a  $\approx 42$  °C mediante la incorporación del monómero hidrófilo *N,N*-dimetilacrilamida. También se han estudiado otros polímeros termosensibles como la poli(*N*-(1)-1-hidroximetil-propilmetacrilamida), la poli(2-carboxi-isopropilacrilamida), la *N,N*-didodecilacrilamida, la poli(*N*-acril-*N'*-alquilpiperacina), *N*-*tert*-butilacrilamida, poli(*N*-acriloxisuccinimida), poli(*N*-isopropilacrilamida-*co*-ácido propilacrílico) o la poli(*N,N'*-dietilacrilamida) [Bajpai y cols., 2008; Kono, 2001, 2002; Maeda y cols., 2006; Malonne y cols., 2005; Szilágyi y Zrínyi, 2005; Robb y cols. 2007; Ta y cols., 2010].

El estímulo térmico también se genera externamente, con un dispositivo adecuado; por tanto, la principal limitación de esta estrategia es la focalización de su acción exclusivamente a nivel de la masa tumoral sobre todo si se desconoce su ubicación [Li y cols., 2013]. En la terapéutica del cáncer, esta estrategia aparece con grandes posibilidades ya que permite aumentar la permeabilidad de los sistemas transportadores y sustancias activas hacia la masa tumoral, gracias a una extravasación selectiva sobre el lugar de acción [Clares y cols., 2013; Stover y cols., 2008; Tagami y cols., 2011]. Además el calentamiento ha demostrado cierta toxicidad *per se* sobre las células cancerosas [Wust y cols., 2006]. La técnica implica 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. 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  $\approx 7 - 20$  nm a más de 400 nm. De esta manera, el proceso 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 [May y Li, 2013]. Para ello, es muy importante definir la temperatura a utilizar y el tiempo de calentamiento.

En base a este mecanismo se han 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 [Hossann y cols., 2010; Koning y cols., Li y cols., 2010]. Existen diferentes estudios donde han sido utilizados diferentes compuestos fosfolípidicos para la formación de liposomas termosensibles, como DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina).

Algunas de dichas formulaciones presentan sustancias adicionales de carácter lipídico para aumentar la permeabilidad de la membrana cuando se alcanza la temperatura de transición, como p. ej., lisolípido u oligoglicerol, para la vehiculización de sustancias hidrosolubles [Koning y cols., 2010]. Asimismo algunos de los fosfolípidos utilizados no sólo favorecen la liberación selectiva del principio activo sino que prolongan el tiempo de circulación de estos nanosistemas termosensibles. Así lo ha demostrado el uso de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfoglicerol (DPPGOG) en la vehiculización de doxorubicina [Hossann y cols., 2007]. Una estrategia muy interesante para aumentar la termosensibilidad de los liposomas es la introducción de polímeros termosensibles en su estructura, p. ej., la poli(*N*-isopropilacrilamida) o la poli(*N*-isopropilacrilamida-*co*-ácido propilacrílico) [Ta y cols., 2010; Han y cols., 2006; Szilágyi y cols., 2005].

### *c.- Control del proceso de liberación mediante la luz.*

El diseño de materiales capaces de responder a estímulos luminosos (luz ultravioleta, visible e infrarrojos) ha suscitado poco interés en los últimos años. Sin embargo, los sistemas transportadores de fármacos capaces de degradarse ante este tipo de estímulo (principalmente luz visible), liberando así el fármaco transportado, son realmente interesantes por su seguridad, bajo coste y fácil manipulación. La estructura de la nanopartícula cuenta entonces con grupos cromóforos sensibles a la luz visible, como las sales trisódicas de clorofilina y cobre. Además, el estímulo luminoso puede ser administrado en cantidades bien definidas y de forma muy precisa [Bawa y cols., 2009; Bédard y cols., 2010]. Existen diferentes estudios que demuestran la aplicabilidad de diferentes polímeros fotosensibles. 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.

### *d.- Control mediante ultrasonidos*

Esta estrategia está basada en la exposición de la región tumoral a la acción de los ultrasonidos (ondas acústicas que oscilan rápidamente en un campo eléctrico alterno con una frecuencia de más de 20 kHz). 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; Frenkel, 2008]. De forma general, se puede decir que el sistema transportador llega a la región tumoral gracias al efecto de EPR característico de la masa tumoral (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 [Husseini y Pitt, 2008]. Esta estrategia se considera no invasiva, ya que los ultrasonidos tienen una

muy adecuada capacidad de penetración corporal. El control de la acción de los ultrasonidos en el lugar deseado se logra ajustando parámetros como la frecuencia, la potencia o el tiempo de aplicación.

Esta técnica ha sido utilizada con gran éxito en el tratamiento de ratones con cáncer de mama. En este caso el sistema coloidal utilizado para el transporte de doxorubicina estaba constituido por nanopartículas de copolímeros de perfluorocarbono [Rapoport y cols., 2007]. Recientemente también se ha publicado la utilización de liposomas constituidos por dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) cargados con doxorubicina, en combinación con ultrasonidos de baja frecuencia ( $\approx 40$  kHz). Las nanopartículas fueron administradas en el lugar diana y, 6 minutos después, aproximadamente el 95 % del fármaco vehiculado era liberado [Evjen y cols., 2011].

### *e.- Control del proceso de liberación de fármaco mediante la utilización de enzimas*

En esta estrategia las enzimas presentes de forma natural en la región tumoral provocan la liberación del fármaco vehiculado desde el sistema transportador [Mahato y cols., 2011; Meers, 2001]. Una de las principales aplicaciones de esta estrategia es el transporte activo de fármacos antitumorales en el cáncer de colon [Fleige y cols., 2012].

En un reciente estudio se ha comprobado que nanopartículas a base de lípidos funcionalizadas con PEG2000 logran transportar eficientemente plásmido ADN (pDNA) hasta la masa cancerosa, lugar donde son degradadas por enzimas como elastasa o 2-metaloproteasa, liberando la sustancia activa [Yingyuad y cols., 2013]. Se ha propuesto también la utilización de liposomas susceptibles a análogos de la fosfolipasa A(2), dichos nanosistemas vehiculizan metotrexato para el tratamiento de células humanas de cáncer de colon HT-29 y KATO III. Esta enzima se encuentra en gran cantidad en el intersticio tumoral y es capaz de hidrolizar los lípidos de la membrana de los liposomas [Andresen y cols., 2004; Andresen y cols., 2005]. Otras

enzimas que han sido propuestas para esta estrategia son la fosfatasa alcalina [Yin y cols., 2011], la transglutaminasa [Zhang y cols., 2002], la fosfatidilinositol-fosfolipasa C [Villar y cols., 2001] y gelatinasa y Dnasa [Dong y cols., 2010].

### *f.- Transporte de fármaco mediante la utilización de gradientes magnéticos*

Manteniéndolo en este lugar durante el tiempo necesario para que toda la dosis de fármaco vehiculizado sea liberado [Ciofani y cols., 2009]. La utilización de nanopartículas magnéticas, constituidos por núcleos de óxidos de hierro superparamagnéticos (principalmente, magnetita o maghemita) se caracteriza por una muy limitada capacidad de incorporación de principios activos en matriz, junto con una liberación de éstos excesivamente rápida [Arias, 2008a; Arias y cols., 2001; Durán y cols., 2008]. Por su parte, los polímeros biodegradables y los sistemas vesiculares de carácter lipídico tienen una excelente capacidad para el transporte de fármacos en matriz, con una gran vehiculización, junto con una liberación modificada y controlable de fármaco gracias a su biodegradación. Debido a ello, todos los estudios están centrados en el desarrollo de nanoplataformas constituidas por un núcleo magnético, y un recubrimiento biodegradable de origen polimérico o lipídico. El núcleo magnético conducirá a la acumulación del coloide en el lugar diana en respuesta al gradiente magnético externo aplicado. Mientras que el material de recubrimiento [p. ej., chitosan, poli(D,L-lactida-co-glicolida), poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(alquilcianoacrilato) en el caso de polímeros o L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, dipalmitoilofosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina en el caso de lípidos] mejorará la biodegradabilidad y biocompatibilidad de la nanoplataforma, y permitirá el transporte de principios activos [Durán y cols., 2008; Cho y cols., 2008]. Dado que el gradiente magnético disminuye con la distancia, la principal limitación de esta estrategia es asegurar el mantenimiento de la fuerza del campo magnético para que el coloide magnético permanezca en el lugar diana, o para activar la liberación del fármaco.

Para solventar este problema, ha sido propuesta la colocación estratégica de implantes constituidos por pequeños imanes en el interior o las proximidades del lugar diana mediante cirugía menor [Arias, 2011a; Fernández-Pacheco y cols., 2007]. La utilización de implantes magnéticos combinados con un gradiente magnético externo podría acrecentar aún más si cabe la acumulación de las nanoplataformas magnéticas en la región diana, es este caso la zona tumoral [Chorny y cols., 2012; Fernández-Pacheco y cols., 2007; Rosengart y cols., 2005; Yellen y cols., 2005]. Junto con el uso de implantes magnéticos, puede potenciarse la llegada selectiva del coloide magnético por medio de la modificación de la superficie de la nanopartícula magnética con ligandos específicos de receptores presentes en la superficie de las células tumorales [Dehvari y Lin, 2012; Lin y cols., 2009; Shen y cols., 2013]. También se han propuesto este tipo de modificaciones para aumentar la selectividad de las nanopartículas magnéticas por los nuevos vasos sanguíneos tumorales [Coenegrachts y cols., 2010; Reddy y cols., 2006; Yan y cols., 2013; Zhang y cols., 2007].

### **1.3. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS. HIPERTERMIA**

Dentro de las diferentes nanopartículas diseñadas para el transporte específico de fármacos destacan, por sus grandes posibilidades, los transportadores magnéticos coloidales. De las aplicaciones biológicas de esta tecnología destacan algunas como el tratamiento de aguas residuales, la inmovilización enzimática, la separación magnética por afinidad de biomoléculas, la selección de un tipo de células entre una población celular y la terapia celular (separación y etiquetado celular) [Pankhurst y cols., 2003].

Los coloides magnéticos basados en nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético presentan numerosas posibilidades en biomedicina, ya que pueden actuar como, *i*) biosensores, *ii*) agentes de contraste por ser visualizados en resonancia magnética nuclear (RMN) debido a su capacidad para disminuir los tiempos de

relajación  $T_1^*$  y  $T_2^*$ , *iii*) agentes de hipertermia en el tratamiento de tumores por generar calor en el lugar deseado bajo la influencia de un campo electromagnético alterno, *iv*) sistemas útiles en la reparación y regeneración tisular y, *v*) particularmente, transportadores de fármacos, ya que permiten acumular el fármaco vehiculizado en el lugar diana mediante la utilización de un gradiente magnético externo adecuado [Arias y cols., 2007b]. En referencia a la última aplicación enumerada, podemos añadir que diversos estudios demuestran que estos nanosistemas modifican de forma eficiente las propiedades farmacocinéticas de los principios activos y su biodistribución en el organismo. De esta manera, la nanoplataforma magnética logra dirigir y 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 características fisicoquímicas de los coloides magnéticos pueden modificarse fácilmente mediante un procedimiento de síntesis adecuado, para así controlar su geometría (forma y tamaño), capacidad de humectación o mojabilidad (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 (*in vitro*), estabilidad en fluidos biológicos (*in vivo*), y capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados. Asimismo para evitar su 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 [Arias y cols., 2001; Gupta y Gupta, 2005; Durán y cols., 2008]: *i*) forma esférica y pequeño tamaño (< 200 nm), para permitir la distribución a nivel capilar y la perfusión uniforme al órgano o tejido diana; *ii*) capacidad para transportar una amplia variedad de agentes terapéuticos en cantidad suficiente como para permitir el transporte de dosis activas biológicamente, sin hacer que el organismo se cargue demasiado de material magnetizable; *iii*) una respuesta magnética adecuada a los gradientes magnéticos aplicados, a pesar de la velocidad de flujo sanguíneo presente en los sistemas

## Capítulo 1. Introducción

---

fisiológicos, sólo así podrá garantizarse el perfecto control del destino biológico del coloide magnético; *iv*) velocidad de liberación del fármaco controlable (o activable) en la región diana; *v*) propiedades superficiales que permitan una máxima biocompatibilidad y una mínima antigenicidad. En cuanto a las propiedades eléctricas superficiales, debe presentar una densidad de carga eléctrica superficial suficiente para asegurar una repulsión electrostática entre las partículas que evite su agregación, y por último *vi*) una fácil y barata producción a gran escala del sistema.

En la actualidad y a pesar de las características idóneas anteriormente descritas, la introducción definitiva en clínica de estos los coloides magnéticos debe vencer una serie de barreras, las cuáles requieren de importantes esfuerzos investigadores. En concreto:

- La necesidad de utilizar intensos campos magnéticos para asegurar la perfecta acumulación del coloide magnético en el lugar diana. Debido a la pobre respuesta a gradientes magnéticos de estos sistemas en zonas no tan superficiales del organismo ( $> 2$  cm de profundidad). Hay que indicar con respecto a la seguridad asociada a la utilización de gradientes magnéticos en humanos, que los organismos competentes como la FDA señalan que no pueden utilizarse campos superiores a 7 Teslas (T).
- No hay certeza absoluta de que los más que prometedores resultados logrados en animales pequeños (ratones, ratas, conejos, etc.) sean extrapolables al ser humano. Además, la exposición del ser humano a un campo magnético externo generado por un imán, debe producirse durante un tiempo prolongado para asegurar la acción del coloide magnético, con lo que puede ser poco operativo y molesto para el paciente.
- El destino biológico del fármaco vehiculizado debe todavía asegurarse completamente mediante el perfecto control de los procesos de liberación, ya que

puede existir una escasa retención del sistema transportador en el lugar diana cuando se retira el gradiente magnético.

- Las nanopartículas magnéticas podrían agregarse en el torrente sanguíneo, generando una embolia y efectos secundarios en los órganos donde quedan atrapadas (principalmente, a nivel hepático). Sin embargo, este fenómeno podría transformarse en una ventaja si se pretende el tratamiento selectivo de tumores localizados en alguno de esos órganos.
- No hay suficientes estudios que aseguren su fácil producción a gran escala, su estabilidad y los beneficios económicos asociados a este tipo de terapia.

No obstante, cada vez hay un mayor número de ensayos clínicos que respaldan la eficacia y las posibilidades de los coloides magnéticos como sistemas transportadores de fármacos [Dobson, 2006; Durán y cols., 2008; Lübbe y cols., 2001; Rudge y cols., 2000]. Los primeros estudios sobre estos sistemas en animales, aparecen en la década de los 80 [Poore y Senyei, 1983; Senyei y Widder, 1981; Widder y cols., 1979; Widder y cols., 1981]. En estas primeras investigaciones fue demostrada que la vehiculización de adriamicina en microesferas magnéticas de albúmina permitía mejorar su actividad antitumoral en ratas con sarcoma de Yoshida. Más tarde fue estudiada la eficacia de la epirrubicina (4'-epidoxorubicina) vehiculizada en coloides magnéticos 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 utilizaron imanes constituidos por tierras raras como el neodimio (Nd) capaces de crear una fuerza magnética de hasta 500 miliTeslas (mT) [Lübbe y cols., 1996b].

El primer ensayo realizado en fase I con este tipo de materiales se llevó a cabo en pacientes con cáncer con estadios de la enfermedad avanzados y sin respuesta a la quimioterapia convencional [Lübbe y cols., 1996a]. Este estudio fue de los primeros en

## Capítulo 1. Introducción

---

realizarse dentro de su campo y demostró que la utilización de los coloides magnéticos como vehículos de agentes antitumorales parecía ser seguro para el organismo humano. De hecho, se conseguía concentrar de forma selectiva la dosis de fármaco en la región tumoral, minimizando una extensa biodistribución sistémica. Este estudio puso de manifiesto que era necesario aplicar imanes potentes que crearan campos magnéticos lo suficientemente intensos como para conseguir la completa acumulación del coloide en el lugar de acción. El resultado más claro e interesante de este trabajo fue la observación de una marcada disminución del volumen del tumor en 4 de los 14 pacientes incluidos en el ensayo clínico. A partir de este momento, numerosas investigaciones se centraron en establecer una “prueba de concepto” para tratar de demostrar la evidencia de la acumulación del coloide magnético en la masa cancerosa, como p.ej., una tinción histológica [Alexiou y cols., 2001; Lübbe y cols., 1999].

Finalmente, parece interesante insistir en la versatilidad de estos coloides para el transporte y la liberación controlada de fármacos. De hecho, este tipo de nanomateriales no sólo permite la vehiculización de un amplio abanico de agentes antitumorales, sino que también tienen un gran potencial para el transporte de otro tipo de sustancias como fármacos antiinflamatorios (como el diclofenaco sódico) [Arias y cols., 2009a], y material genético [Chorny y cols., 2013], etc.

Podemos decir que el fármaco vehiculizado no estará biodisponible mientras siga incorporado en la nanopartícula magnética. De esta forma, cuando el coloide magnético llegue al lugar de acción dirigido por el gradiente magnético externamente aplicado, liberará el fármaco transportado en la región diana 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 [Ak y cols., 2013], mientras que una cinética de liberación demasiado lenta podría limitar seriamente la actividad farmacológica en el lugar diana [Park y cols., 2012]. El transporte del 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].

El transporte de fármacos a través de coloides magnéticos también está relacionado con las estrategias de transporte pasivo, ya que la biodistribución de los coloides magnéticos puede verse también beneficiada por el efecto EPR de la región tumoral [Allen y Cullis, 2004; Arruebo y cols., 2007; Oh y cols., 2013; Pankhurst y cols., 2003; Prashant y cols., 2010]. Incluso, el diseño de la nanopartícula permite llevar a cabo las estrategias de transporte activo anteriormente comentadas, consiguiendo una mayor acumulación y potencia del coloide en la región diana, con lo que la acción farmacológica del agente antitumoral será mucho mayor. De esta forma, se alcanzará un efecto farmacológico óptimo, sin la necesidad de utilizar grandes dosis de principio activo. Por todo esto, se ha propuesto el diseño de coloides magnéticos con capacidad de respuesta a estímulos físicos (diferentes a los estímulos magnéticos) de muy diverso origen (cambio de temperatura, pH, luz, etc.) y con modificaciones a nivel superficial (introducción de cadenas de PEG, biotina, péptidos, anticuerpos monoclonales, etc.) que potencian aún más si cabe la acción de las nanopartículas magnéticas [Borlido y cols., 2013; Brigger y cols., 2002; Hodenius y cols., 2002; Lee y cols., 2013; Li y cols., 2012b; Vauthier y cols., 2003].

A continuación, es descrita una aplicación de los coloides magnéticos que está dando lugar a un gran número de trabajos de investigación; hablamos del fenómeno de hipertermia [Cervadoro y cols., 2013; Ito y cols., 2013; Jiang y cols., 2012c; Sadhukha y cols., 2013; Sivakumar y cols., 2013]. Esta aplicación puede potenciar el tratamiento llevado a cabo por el transporte del agente antitumoral hasta el lugar de acción [Babincov y cols., 2008; Clares y cols., 2013; Kumar y cols., 2011; Laurent y cols., 2011; May y cols., 2013]. La hipertermia aparece como consecuencia de la vibración de los momentos magnéticos de las nanopartículas, debido a la acción de un gradiente electromagnético alterno que oscila en un rango de frecuencia entre 50 - 500 kHz [Viota y cols., 2013]. Se ha descrito que este fenómeno es consecuencia de la pérdida de

## Capítulo 1. Introducción

---

histéresis magnética de las nanopartículas [Gupta y Gupta, 2005; Huber, 2005; Ito y cols., 2005]. La vibración generada en los coloides magnéticos genera disipación de energía en forma de calor, lo que provoca el aumento de temperatura en la zona donde se encuentren, en este caso la masa tumoral, alcanzando un intervalo de temperatura aproximadamente entre 42 - 45 °C, rango de temperatura suficiente como para provocar daños irreversibles y conducir la destrucción de las células cancerosas [Glöckl y cols., 2006; Hergt y cols., 2006; Huber, 2005; Tanaka y cols., 2005].

Dicha temperatura deberá mantenerse durante  $\approx$  30 minutos y ello inducirá la muerte de las células tumorales [Clares y cols., 2013; Glöckl y cols., 2006; Hergt y cols., 2006; Hilger y cols., 2006; Pankhurst y cols., 2003]. Además, este calentamiento alterará/destruirá el recubrimiento de los núcleos magnéticos, permitiendo el comienzo de la liberación controlada del fármaco [Clares y cols., 2013; 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; Giustini y cols., 2011], 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.

Dependiendo de si la vía de administración es local o sistémica, se pueden distinguir dos procesos principales de hipertermia. En primer lugar, las partículas magnéticas pueden producir hipertermia después de su administración en una pequeña zona en el tejido tumoral. Este enfoque fue investigado por el grupo japonés de

Kobayashi mediante el diseño de liposomas catiónicos magnéticos [Shinkai y cols., 1999]. En este estudio fueron inyectados magnetoliposomas catiónicos intratumoralmente en gliomas provocados en ratas, y se observó que las cargas positivas retenían los liposomas en el sitio de la inyección, probablemente debido a interacciones electrostática con las membranas celulares. El resultado fue la completa regresión de los tumores en el 90 % de las ratas tratadas después de tres periodos de hipertermia de 30 minutos cada uno [Yanase y cols., 1998]. En un estudio similar se llevó a cabo la inyección directa de este tipo de coloides en ratones con cáncer de mama subcutáneo y se obtuvieron resultados similares de completa regresión de los tumores por calentamiento de la masa tumoral [Hilger y cols., 2001]. En segundo lugar, tras administración sistémica de los coloides magnéticos, la hipertermia se produce en el interior de las células tumorales, lo que implica que se produzca un transporte específico a las células cancerosas y un mayor daño sobre las estructuras vitales. Las posibilidades de este calentamiento intracelular fueron estudiadas en nanopartículas magnéticas incubadas con monocitos humanos y macrófagos de ratón, a concentraciones a las que no son capaces de producir por si solas un calentamiento significativo cuando se les aplica un gradiente magnético alterno. Sin embargo, se observó una citólisis inducida magnéticamente, probablemente debido a la generación de hipertermia intracelular tras la captación de las nanopartículas magnéticas [Halbreich y cols., 1998].

Un ejemplo de nanopartículas magnéticas con capacidad de generar el fenómeno de hipertermia, son aquellas constituidas por un núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas por el polímero dextrano-*g*-poli(*N*-isopropilacrilamida-*N,N'* dimetilacrilamida); dichos nanosistemas logran aumentar claramente la liberación selectiva de doxorubicina en el tumor. En concreto, el calentamiento específico de este nanomaterial provoca la degradación del polímero y la liberación del agente antitumoral [Zhang y Misra, 2007]. De forma similar, los geles magnéticos de poli(*N*-isopropilacrilamida) también permiten la acumulación específica y la liberación controlada de fármaco mediante hipertermia [Ang y cols., 2007].

## Capítulo 1. Introducción

---

De entre todos los coloides magnéticos estudiados hasta el momento destacan por su biocompatibilidad y biodegradabilidad los magnetoliposomas. Precisamente magnetoliposomas hipertérmicos transportadores de 5-fluorouracilo [Clares y cols., 2013] han sido desarrollados por nuestro grupo de investigación.

Coloides de este tipo constituidos por 1,2 dipalmitol-glicero-3-fosfolina y colesterol son capaces de vehicular más del 80 % de metotrexato y liberarlo cuando se incrementa la temperatura de 37 °C a 41 °C. Además, consiguen 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].

## **Capítulo 2.**

# **CONTRIBUCIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO DE DE INVESTIGACIÓN**



### **2.1. OBJETIVOS**

La presente *Tesis Doctoral* tiene como objetivo central el diseño de magnetoliposomas transportadores de 5-fluorouracilo con capacidad de respuesta a campos magnéticos externos aplicados y como agente hipertérmico con actividad adecuada en el posible tratamiento del cáncer. Con este fin, se ha realizado un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas biodegradables y biocompatibles constituidas por núcleos magnéticos de óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y un recubrimiento lipídico (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina). La capacidad del transporte y liberación controlada de fármaco en la región diana también ha sido objeto de estudio.

La eficacia del recubrimiento lipídico de los núcleos magnéticos y las ventajas que aporta a la capacidad de estas nanopartículas para transportar el fármaco objeto de estudio, se determinarán mediante un análisis comparativo de la estructura y composición química de los tres tipos de materiales [magnetita, lípido y magnetoliposomas], así como la caracterización de las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales de éstos.

El análisis de las propiedades magnéticas de los núcleos de óxido de hierro y de los magnetoliposomas permitirá determinar la capacidad de estos sistemas para responder a gradientes magnéticos aplicados y el grado de influencia del recubrimiento lipídico sobre estas propiedades. En este sentido, hemos realizado un análisis *in vitro* a nivel macro y microscópico de una suspensión de las nanopartículas magnéticas.

Una parte fundamental de la investigación es la determinación de la capacidad de vehiculización (transporte y liberación controlada) de 5-fluorouracilo que tienen los magnetoliposomas diseñados. Para ello, se investigarán extensamente dos métodos convencionales de incorporación de fármacos en este tipo de nanosistemas: adsorción superficial y absorción en matriz. Se utilizarán técnicas cuantitativas

## Capítulo 2. Contribución y Objetivos del Trabajo de Investigación

---

(espectrofotometría UV-Visible) y cualitativas (electroforesis) para caracterizar el 5-fluorouracilo en las nanopartículas diseñadas.

Otro objetivo básico ha sido el análisis *in vitro* del proceso de liberación del agente antitumoral por medio del fenómeno de hipertermia a través de las nanopartículas, determinando espectrofotométricamente la cantidad liberada y caracterizando el tipo de vehiculización en las nanopartículas.

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

- 1- Síntesis de nanopartículas biodegradables y biocompatibles constituidas por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento lipídico (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina). Nos basaremos en un procedimiento modificado del método de hidratación de la capa fina que simplifica la metodología previamente desarrollada para la formulación de este tipo de nanoplateformas.
- 2- Caracterización de la geometría, composición y estructura química de los coloides simples (liposomas y nanopartículas magnéticas) y coloides mixtos (magnetoliposomas).
- 3- Estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de nanomateriales [magnetita, L- $\alpha$ -fosfatidilcolina y magnetoliposomas] mediante electroforesis. Uso de modelos teóricos para evaluar el potencial eléctrico superficial de las nanopartículas. Control del mismo en función de las características del medio de dispersión (pH y fuerza iónica).
- 4- Análisis comparativo de las propiedades termodinámicas superficiales de las nanopartículas mediante la determinación del ángulo de contacto de líquidos

seleccionados. Uso de modelos teóricos para evaluar dichas propiedades. Estudio de la naturaleza hidrófila/hidrófoba de las nanopartículas.

- 5- Prueba *in vitro* sobre la toxicidad de los tres tipos de materiales en células tumorales en ausencia del agente quimioterápico.
- 6- Caracterización de las propiedades magnéticas de los magnetoliposomas en comparación con los núcleos de magnetita puros.
- 7- Determinación de la capacidad de vehiculización de 5-fluorouracilo por los magnetoliposomas mediante métodos espectrofotométricos y electrocinéticos. Estudio de los principales factores que condicionan este proceso (procedimiento de incorporación y cantidad de fármaco utilizada), para así identificar las condiciones óptimas de vehiculización.
- 8- Evaluación de la liberación de fármaco desde los magnetoliposomas. Análisis del efecto del método de incorporación (absorción/adsorción) sobre la liberación. Influencia del fenómeno de hipertermia en la liberación del fármaco. Estudio cinético.

### **2.2. CONTRIBUCIÓN**

La aportación principal de la presente *Tesis Doctoral*, en el campo de la investigación y el desarrollo de coloides como sistemas transportadores de fármacos, es el desarrollo y estudio preliminar de una nanoplataforma biodegradable y biocompatible, con potencial aplicación en el transporte dirigido de 5-fluorouracilo combinado con el fenómeno de hipertermia para el tratamiento del cáncer. El diseño del nanosistema pretende dirigir toda la dosis de fármaco hacia el lugar de acción y retener el agente quimioterápico en la masa tumoral, mediante la aplicación de un campo

magnético externo. El nanosistema estará constituido por núcleos de óxido de hierro superparamagnéticos (magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) embebidos en una matriz lipídica o liposomal (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina). El resultado de dicha asociación da lugar a un nanosistema denominado magnetoliposoma. Su empleo en clínica permitirá minimizar los efectos secundarios derivados de la extensa biodistribución y pobre especificidad de acción de este tipo de principios activos por las células cancerosas. De esta forma, serán precisas dosis de fármaco claramente inferiores para conseguir la misma acción terapéutica. Por otro lado, el carácter superparamagnético de los núcleos de magnetita embebidos en el interior de la matriz lipídica podrá dotar al magnetoliposoma como agente de hipertermia, fenómeno que puede tener gran influencia en el proceso de liberación del fármaco.

Este campo de investigación es extenso y se encuentra en constante crecimiento, por lo que consideramos que nuestro trabajo de investigación podría contribuir en los siguientes aspectos:

- Diseño de un procedimiento reproducible, sencillo y económico de síntesis de nanopartículas magnéticas. La modificación introducida en la técnica de hidratación de la capa fina desarrollado por otros autores para la síntesis de liposomas, basada en la incorporación de los núcleos de óxido de hierro en la fase acuosa, simplifica notablemente la metodología de síntesis para magnetoliposomas.
- Aplicación de métodos de análisis físico, químico y fisicoquímico de superficies muy sensibles a las transformaciones experimentadas por los núcleos de magnetita al quedar recubiertos por la matriz lipídica. La información obtenida puede ser especialmente útil en la identificación de los mecanismos de formación de los magnetoliposomas.

- Observación de la respuesta de los magnetoliposomas frente a la aplicación de campos magnéticos externos: de forma cuantitativa mediante la determinación de su ciclo de histéresis, y de forma cualitativa mediante visualización *in vitro* de suspensiones acuosas de las nanoplataformas a nivel macro y microscópico.
- En estrecha relación con la contribución anterior, se pretende desarrollar nanopartículas magnéticas hipotérmicas con posibilidades en el transporte activo de fármacos hacia el tejido canceroso. Consideramos que esta contribución es especialmente importante, ya que este estudio potencia este tipo de nanosistemas como agentes teranósticos en clínica.
- Evaluación de la biocompatibilidad de las nanoplataformas a nivel *in vitro* por medio de la citotoxicidad y compatibilidad sanguínea (hemocompatibilidad) en líneas celulares tumorales.
- Análisis de la capacidad de este nanosistema mixto como sistema transportador de fármacos. En este sentido, la capacidad de vehiculización del coloide se investigó con el agente antitumoral 5-fluorouracilo.



# **Capítulo 3.**

**DISEÑO**

**Y**

**CARACTERIZACIÓN  
FISICOQUÍMICA**



### **3.1. SÍNTESIS Y ESTUDIO GEOMÉTRICO**

#### **3.1.1. ÓXIDO DE HIERRO SUPERPARAMAGNÉTICO. NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA**

Dentro de los diversos tipos de nanopartículas de óxido de hierro son de especial interés las de naturaleza superparamagnética por su potencial utilidad en la separación y etiquetados celular (detoxificación de fluidos biológicos), reparación de tejidos (ingeniería tisular), transporte de fármacos, resonancia magnética de imagen (como agente de contraste), hipertermia y magnetofección (transporte magnético de genes a las células diana) [Durán y cols., 2008]. Su pequeño tamaño y su gran área superficial específica determinan la gran susceptibilidad magnética y el comportamiento superparamagnético de estas nanopartículas [Gupta y Gupta, 2005]. Por este motivo, el procedimiento de síntesis persigue obtener estas propiedades.

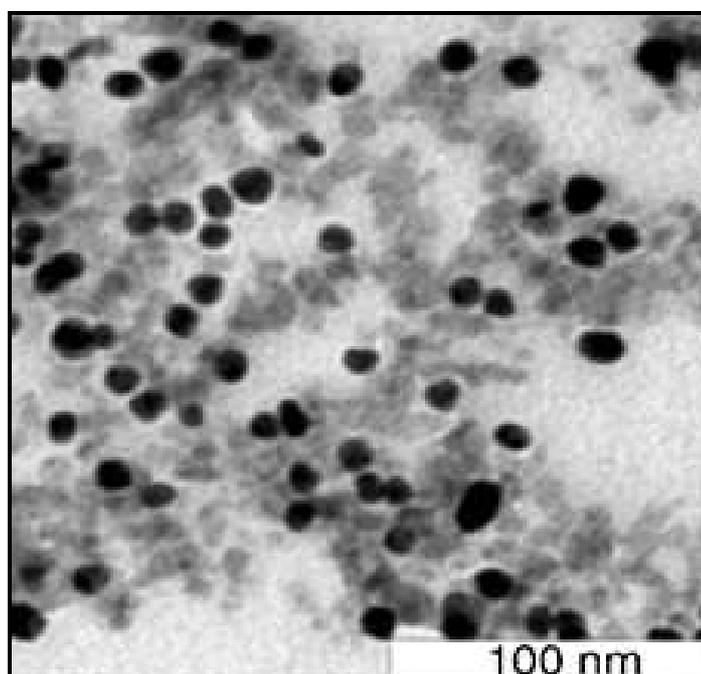
La magnetita, óxido ferroso-férrico,  $\text{Fe}^{2+}\text{O}^{2-}(\text{Fe}^{3+})_2(\text{O}^{2-})_3$  ó  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; es un mineral encontrado en entornos geológicos diversos y en algunos depósitos en cantidad suficiente como para constituir un mineral de hierro importante [Gaines y cols., 1997]. La magnetita es un ejemplo de óxido de hierro ferrimagnético, cuyo comportamiento está fundamentalmente asociado a su estructura cristalina. En ella, los iones  $\text{Fe}^{3+}$  se acoplan antiferromagnéticamente y no contribuyen a la imanación. Por el contrario, los iones  $\text{Fe}^{2+}$  de cada celda tienen orientación paralela y son responsables del momento magnético de dicha celda y, por tanto, del comportamiento magnético de la magnetita. En organismos vivos como las abejas, los delfines, las palomas o ciertos microorganismos tales como bacterias (p.ej., *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 o *Magnetovibrio* MV-1) se han encontrado pequeños agregados de este óxido de hierro magnético [Arakaki y cols., 2008; Okon y cols., 1994; Yan y cols., 2012a].

En cuanto a su toxicidad, se ha comprobado que es muy baja, tanto *in vitro* [Petri-Fink y Hofmann, 2007] como *in vivo* [Gu y cols., 2012]. La bibliografía refleja que la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) presenta un valor de 400 mg/Kg [Iannone y cols., 1991], por lo que es bien tolerada por el cuerpo humano [Li y cols., 2012b; Müller y cols., 1996]. En lo referente a su biodegradabilidad, numerosos estudios han demostrado que en el caso de nanopartículas superparamagnéticas con tamaño inferior a 20 nm, su degradación puede ocurrir en los lisosomas de células del SRE (p. ej., macrófagos). En este proceso de biodegradación se genera hierro libre, el cual puede utilizarse en la síntesis de transferrina y ferritina. Si, por el contrario, las partículas de magnetita presentan un tamaño mayor, su eliminación del organismo suele tener lugar mediante filtración renal [Gu y cols., 2012; Okon y cols., 1994]. Debido a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, se ha propiciado el desarrollo de nanopartículas de óxido de hierro comercializadas con el nombre de Resovist<sup>®</sup> (Bayer) en forma de solución inyectable, como medios de contraste para la detección de lesiones focales y tumores hepáticos por resonancia magnética nuclear [Vadémecum, 2013].

Desde mediados del siglo pasado se han desarrollado numerosos métodos para la preparación de partículas de magnetita con tamaño micrométrico [Omer-Mizrahi y Margel, 2009] o nanométrico [Katsnelson y cols., 2012; Laurent y cols., 2008; Sun y Zeng, 2002]. Es muy interesante comprobar cómo muchos de ellos permiten incluso modificar las características de la superficie de estas partículas en función de la aplicación deseada [Charles, 2003; Elaissari y cols., 2003; Tartaj y cols., 2003]. Si bien es muy difícil establecer una clasificación que abarque todos los métodos desarrollados de obtención de nanopartículas magnéticas constituidas de óxidos metálicos, mencionaremos algunos de los métodos más utilizados a nivel general [Durán y cols., 2008; Laurent y cols., 2008]:

- *Método de microemulsión:* este método se basa en la formulación de microemulsiones con fase externa oleosa que conduce al crecimiento de los núcleos magnéticos. Una modificación de esta técnica permite la preparación de

nanopartículas compuestas por aleaciones de hierro (Fe) [Feltin y Pileni, 1997; Pileni, 1997, 2001], cobalto (Co) [Schultz-Sikma y cols., 2011] o níquel (Ni) [Zhu y cols., 2004] con un tamaño inferior a 10 nm. También se ha usado este método para formular partículas de hierro recubiertas de capas de metales, p.ej., oro coloidal, con el objetivo de ralentizar la oxidación de estos núcleos y facilitar otras modificaciones superficiales con fines biomédicos (Figura 3.1.) [Carpenter, 2001; Iglesias-Silva y cols., 2010; López-Pérez y cols., 1997; Rivas y cols., 1994].

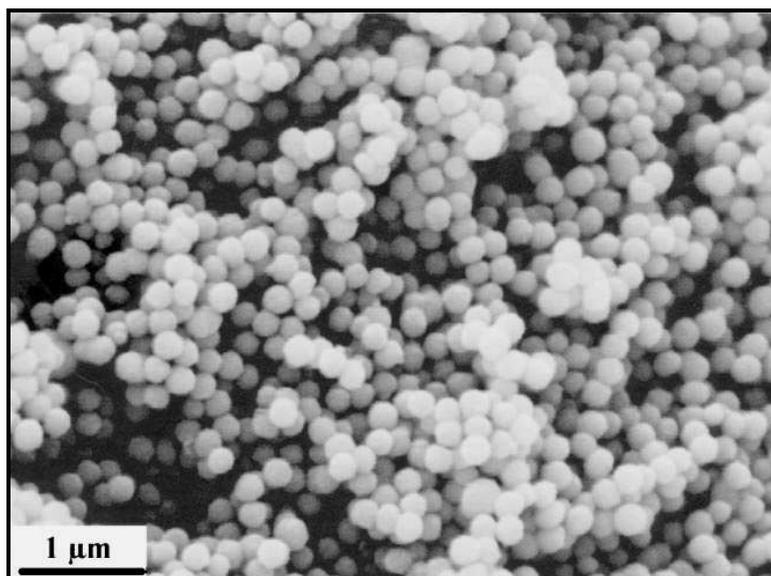


**Figura 3.1.** Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de maghemita ( $\gamma$ - $F_2O_3$ ) recubiertas por oro (Au), obtenidas por el método de microemulsión.

Reproducido de Iglesias-Silva, 2010. Copyright Elsevier (2010).

- *Método de los polioles:* técnica basada en una disminución de iones metálicos en presencia de polioles (p.ej., de etileno, propileno, etilenglicol, polietilenglicol, dietilenglicol, etc.). Este método permite obtener una gran gama de partículas con tamaños comprendidos de 10 nm hasta 1  $\mu$ m, con una composición química muy

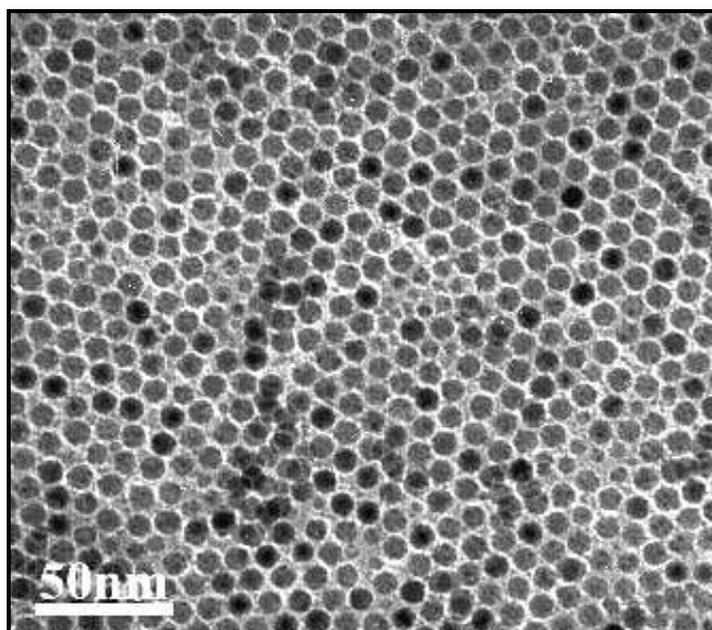
variable (hierro, aleaciones de cobalto y níquel e, incluso, aleaciones de hierro, cobalto y níquel) (Figura 3.2.). La formación de las partículas se produce por crecimiento y nucleación, bien espontánea o heterogénea [Fiévet, 2000; Laurent y cols., 2008; Toneguzzo y cols., 1998, 2000].



**Figura 3.2.** Microfotografía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas constituidas por una aleación de hierro, cobalto y níquel, y obtenidas mediante el método de los polioles. Reproducido de Toneguzzo y cols., 2000. Copyright SpringerLink (2000).

- *Método de descomposición de precursores organometálicos:* los óxidos metálicos con carácter magnético pueden ser preparados por la descomposición de compuestos organometálicos, bien por empleo de altas temperaturas (termólisis) o bien a través del uso de ultrasonidos (sonólisis). Con respecto a la primera técnica, esta se utiliza ampliamente para la síntesis de partículas superparamagnéticas de hierro, de cobalto y de aleaciones de hierro [Behrens y cols., 2006; Charles, 2003; Puentes y cols., 2001]. Básicamente, el procedimiento consiste en la descomposición térmica por hidrólisis, oxidación o neutralización de mezclas de compuestos organometálicos de las nanopartículas en una disolución de hidrocarburo. En este

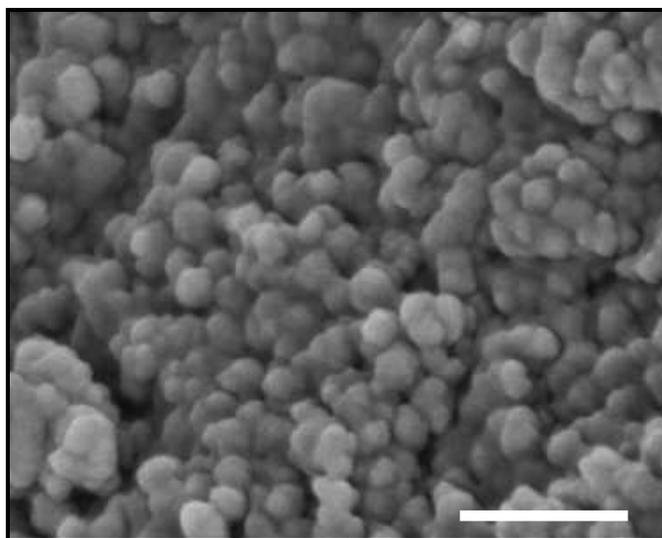
proceso las condiciones de la reacción, tales como la velocidad de calentamiento, la temperatura, el tiempo y la composición del medio de síntesis (disolvente) influyen en la geometría de las partículas sintetizadas. Este método permite obtener partículas con un tamaño controlado caracterizado por una distribución monodispersa (Figura 3.3.) [Hyeon y cols., 2001; Sun y Zeng, 2002; Yin y cols., 2004].



**Figura 3.3.** Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de nanocristales de maghemita ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) recubiertos con ácido eláidico obtenidos mediante descomposición térmica de hierro pentacarbonilo [ $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ] a través de una oxidación controlada con *N*-óxido trietilenamina [ $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ ]. Reproducido de Yin y cols., 2004. Copyright Materials Research Society (2004).

Con respecto a la segunda técnica, esta es usada para la obtención de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro por medio de reacciones inducidas por ultrasonidos denominadas reacciones sonoquímicas [Pinkas y cols., 2008] (Figura 3.4.). Los procesos sonoquímicos se basan en los efectos de cavitación

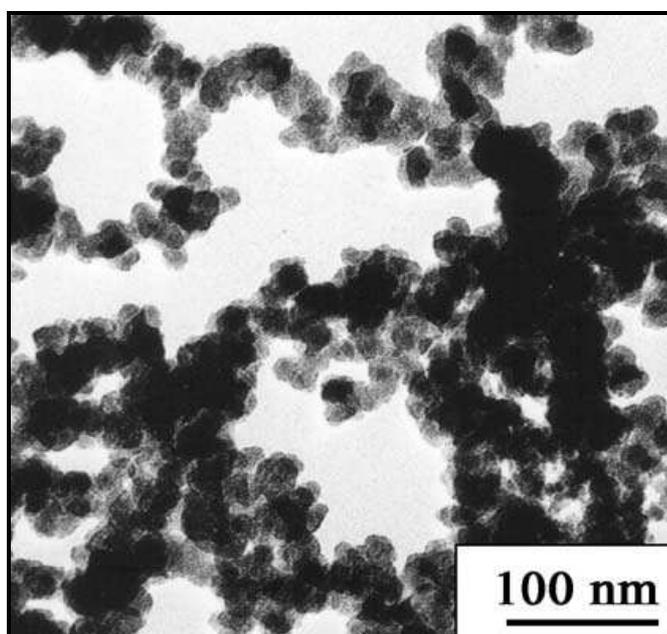
producidos por el colapso que experimentan las gotículas de precursores férricos, p.ej.,  $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  ó  $\text{Fe}(\text{OAc})_2$  [Schmidt, 2001; Vijayakumar, 2001], cuando son sometidas a ondas acústicas de 20 kHz (ultrasonidos) [Huang y cols., 2002]. Factores tales como la velocidad de enfriamiento, nivel de mezcla atómica, empleo de disolventes orgánicos y la naturaleza de las reacciones sonoquímicas influyen en la composición, morfología externa, cristalinidad y en definitiva en el control de la naturaleza química de los fluidos ferromagnéticos obtenidos por esta técnica [Abu Mukh-Qasem y Gedanken, 2005; Pinkas y cols., 2008].



**Figura 3.4.** Microfotografía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas amorfas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  obtenidos por sonólisis mediante el precursor férrico acetilacetona [ $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ]. Longitud de la barra: 100 nm. Reproducido de Pinkas y cols., 2008. Copyright Elsevier (2008).

- *Método de los aerosoles:* este método se basa en un proceso químico continuo, que permite la formación de nanopartículas de óxido de hierro de forma controlada por medio de nanogotículas que constituyen la fase interna del sistema disperso en fase de vapor (Figura 3.5.). La geometría original de las gotículas influye en la forma y tamaño de las partículas obtenidas por el proceso de nebulización. Este método se

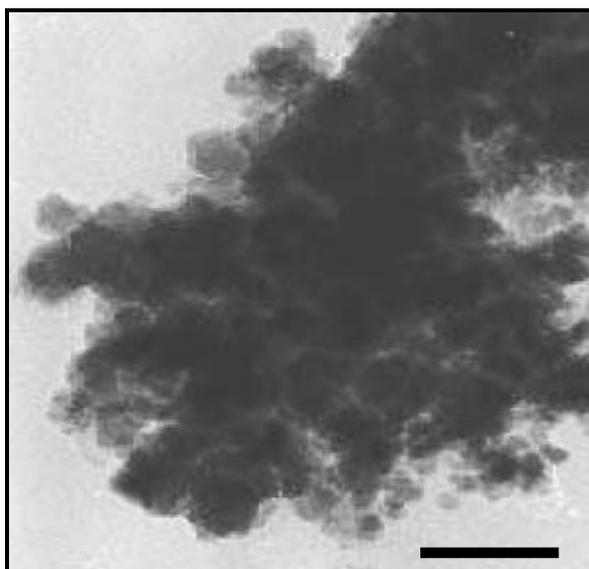
caracteriza por la obtención de un rango estrecho de tamaños de partícula con un gran rendimiento y una gran versatilidad en la modificación de la superficie del material obtenido con polímeros y compuestos inorgánicos [Matijević y Partch, 2000; Tartaj y cols., 2003]. Se han desarrollado dos variantes a esta técnica: aspersión y pirólisis mediante láser [Dumitrache y cols., 2005; González-Carreño y cols., 1993; Popovici y cols., 2007; Veintemillas-Verdaguer y cols., 2003; Tartaj y cols., 2007].



**Figura 3.5.** Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de hierro ultrafino sintetizadas según el proceso continuo de pirólisis inducida por láser a partir de hierro pentacarbonilo  $[\text{Fe}(\text{CO})_5]$  en forma de aerosol. Reproducida de Veintemillas-Verdaguer y cols., 2003. Copyright Elsevier (2002).

- *Método electroquímico:* este método se basa en un proceso electrolítico de sales constituidas por metales. El proceso se realiza a través de electrodos de hierro en presencia de disolventes orgánicos. Básicamente, el tamaño de partícula puede ser controlado por medio de la densidad de corriente aplicada [Pascal y cols., 1999].

Esta técnica permite obtener nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro o mezcla de óxidos metálicos tales como magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (Figura 3.6.), hexaferrita de estroncio ( $\text{SrFe}_{12}\text{O}_{19}$ ), hexaferrita de bario ( $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ ) e incluso cobalto coloidal (Co) [Amigó y cols., 2000; Khan y Petrikowski, 2002; Pascal y cols., 1999].



**Figura 3.6.** Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) obtenidas por proceso electroquímico aplicando una densidad de corriente de  $3 \text{ mA/cm}^2$  en *N,N*-dimetilformamida (DMF) como medio orgánico. Longitud de la barra: 50 nm Reproducida de Pascal y cols., 1999. Copyright American Chemical Society (1999).

- *Método de co-precipitación en solución:* es probablemente el método más simple y eficiente para la obtención en gran cantidad de partículas magnéticas. Esta técnica permite la síntesis de coloides inorgánicos con una geometría uniforme, obtenidos por una reacción estequiométrica de precursores químicos (sales ferrosas o férricas) que precipitan en disolución acuosa, mediante la adición de sustancias básicas [Arias y cols., 2001; Bee y Massart, 1995]. Se basa en la separación, nucleación y

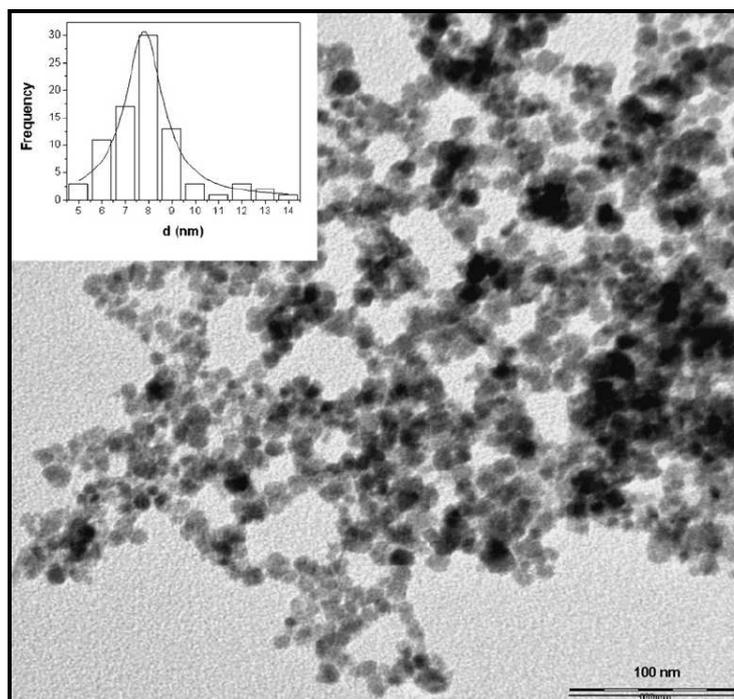
crecimiento de partículas de óxido de hierro. La nucleación ocurre cuando la concentración de las especies alcanzan la supersaturación crítica, tras ello, surge un crecimiento lento por difusión de los solutos hacia la superficie del cristal. Para producir nanopartículas de óxidos de hierro con tamaños monodispersos, la nucleación debería estar separada durante el periodo de crecimiento [Tartaj y cols., 2006]. El posterior proceso de envejecimiento u oxidación en la solución determina la formación de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), sus formas oxidadas como maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) [Pérez-Artacho y cols., 2012] u otras ferritas. La cinética de esta reacción ha sido ampliamente investigada [Matijević y Sapieszko, 2000; Ocaña y cols., 1995]. Para el caso de la magnetita, la reacción química de formación (1) es la siguiente:



De acuerdo con la termodinámica de la reacción, la completa precipitación de magnetita puede producirse a pH 8 y 14, con una relación estequiométrica 2:1 ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ) en ausencia de oxígeno. En el caso de la maghemita, está puede producirse por la oxidación de magnetita en presencia de oxígeno, aunque no es la única forma de transformar magnetita en maghemita, ya que los fenómenos redox dependen del pH de la suspensión. La reacción química de formación (2) de la maghemita a través de magnetita es [Laurent y cols., 2008]:



La variante más ampliamente utilizada por su versatilidad y sencillez es la propuesta por Massart (Figura 3.7.) [Frimpong y cols., 2010; Massart, 1981; Viota y cols., 2007].



**Figura 3.7.** Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) obtenidas mediante co-precipitación en solución. Figura insertada: Histograma de tamaños de las nanopartículas. Reproducido de Viota y cols., 2007. Copyright Elsevier (2007).

En este trabajo de investigación, el procedimiento para la síntesis de nanopartículas de magnetita superparamagnéticas es el de co-precipitación en solución [Massart, 1981]. La experiencia adquirida y reflejada en diversos estudios permite afirmar que esta metodología permite la obtención de nanopartículas de magnetita con morfología cúbica, tamaño muy pequeño (< 20 nm) y una baja polidispersión de tamaños [Arias y cols., 2011c; Arias y cols., 2012a; Clares y cols., 2013; Viota y cols., 2007]. Precisamente ha sido este método el seguido para la síntesis de nanopartículas de magnetita objeto de esta *Tesis Doctoral*. La metodología de síntesis comienza con la combinación de dos disoluciones acuosas de sales férricas y ferrosas en presencia de una base fuerte. Hay que indicar que todos los reactivos químicos utilizados tenían calidad analítica [Panreac, España]. La reacción consiste en la adición de 40 mL de una

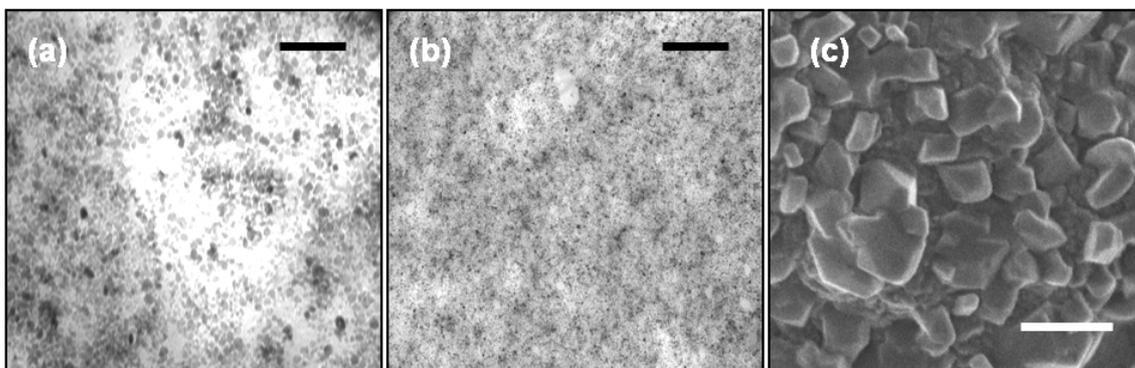
disolución de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ , 1 M) y 10 mL de una disolución de cloruro ferroso ( $\text{FeCl}_2$ , 2 M) acidulada ( $\text{HCl}$ , 2 M). Ambas disoluciones son añadidas poco a poco, a temperatura ambiente, sobre 500 mL de una solución acuosa de amoníaco ( $\text{NH}_3$ , 0.7 M) y bajo agitación mecánica (700 r.p.m.) durante 1 hora. Bajo estas condiciones, las nanopartículas de magnetita se forman espontáneamente y son recogidas en el fondo del recipiente de reacción, gracias a la aplicación de un imán de 400 mT, para posteriormente eliminar el sobrenadante del medio por sedimentación magnética.

Las nanopartículas de magnetita tienden a formar agregados, debido a su pequeño tamaño. Por tanto, es necesario conseguir que estas permanezcan aisladas en el medio de dispersión. El tratamiento químico a realizar depende del pH que presenten las suspensiones con la que se trabajará. Si el medio es básico, las partículas se van a dispersar en una disolución acuosa de hidróxido de tetrametilamonio ( $\text{C}_4\text{H}_{13}\text{NO}$ , 1 M); en cambio si el medio es ácido, como es nuestro caso, las partículas se mantienen dispersadas en una disolución de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ , 2 M) durante 12 horas. A continuación, las nanopartículas son retiradas de la disolución de ácido perclórico con ayuda de un imán de 400 mT y se redispersan en agua bidestilada. En el caso de que las nanopartículas no se empleen de forma inmediata, las suspensiones se desecan en un horno de convección a  $60 \pm 0.5$  °C [Digitronic, J.P. Selecta, S.A., España], conservándolas en estado seco hasta su utilización.

La caracterización de la geometría (forma y tamaño) de las nanopartículas de magnetita se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) [LIBRA 120 PLUS Zeiss SMT, Alemania], microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) [STEM PHILIPS CM20, Holanda] y microscopía electrónica de barrido de alta resolución por emisión de campo (FeSEM) [Zeiss DSM 950, Alemania]. Como puede apreciarse en la Figura 3.8. las partículas de magnetita presentan una morfología cúbica, superficie aparentemente lisa y un tamaño inferior a 20 nm.

La determinación del tamaño de partícula se obtuvo mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS) [Malvern 4700 analyzer, Malver Instruments, Inglaterra]. Esta técnica se basa en el análisis de la función de autocorrelación de la luz láser dispersada por la suspensión de partículas en movimiento térmico. La determinación es independiente de factores externos, salvo la viscosidad y la temperatura del medio y, como hace que las orientaciones de las partículas sean aleatorias, minimiza cualquier posible efecto de su forma. La muestra analizada fue una suspensión acuosa diluida de magnetita ( $\approx 0.1\%$ , p/v), la cual fue sonicada previamente durante 5 minutos. El ángulo de scattering se fijó en  $60^\circ$ . De esta manera se determinó que el tamaño medio de las partículas de magnetita era  $11 \pm 2$  nm, por lo que pueden considerarse superparamagnéticas [Liu y cols., 2006; López-López y cols., 2005; Taupitz y cols., 2003].

Este pequeño tamaño se confirmó mediante el análisis de microfotografías TEM y HRTEM. Para llevar a cabo dichas técnicas, fue sonicada una suspensión acuosa diluida de magnetita ( $\approx 0.1\%$ , p/v) durante 5 minutos y a continuación se depositaron una gotas de ésta sobre una rejilla de cobre con película formvar. Por último, estas rejillas se secaron a  $35.0 \pm 0.5$  °C en un horno de convección. Para la observación de las nanopartículas de magnetita por medio de microscopía FeSEM, la preparación de las muestras se realizó mediante sonicación durante 5 minutos de una suspensión acuosa diluida de partículas de magnetita, posteriormente se colocó 100  $\mu$ L de la solución de magnetita en un portamuestras de FeSEM (stubs o setas). A continuación, se secaron a  $37.0$  °C  $\pm$   $0.5$  °C durante 24 horas en un horno de convección. Tras ello, con el fin de hacer conductoras las muestras, éstas fueron recubiertas con carbón y se sometieron a una presión de  $10^{-5}$  torr para conseguir la sublimación de dicho material de recubrimiento.

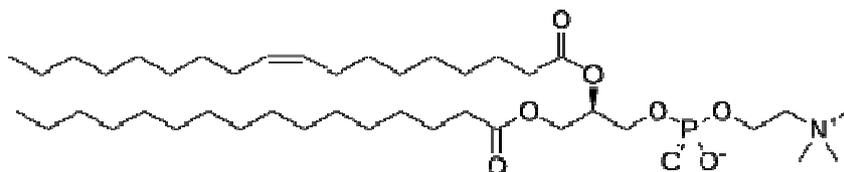


**Figura 3.8.** (a) Microfotografía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), (b) microfotografía electrónica de transmisión (TEM) y (c) microfotografía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo (FeSEM) de nanopartículas de magnetita.

Longitudes de barra: 100 nm (a), 200 nm (b) y 20 nm (c).

### 3.1.2. L- $\alpha$ -FOSFATIDILCOLINA. LIPOSOMAS

La L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (PC), también llamada 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfocolina es un tipo de fosfolípido o lípido anfipático perteneciente al grupo de ésteres de ácidos grasos cuyo componente alcohólico contiene un grupo fosfato. Presenta un peso molecular aproximado de 768 g/mol [Sigma Aldrich, Alemania]. De forma general, está constituido por dos cadenas de ácidos grasos esterificadas con los hidroxilos en posición 1 y 2 de una molécula de glicerina. El hidroxilo en posición 3 de la glicerina está esterificado a su vez con una molécula de ácido fosfórico, que a su vez se encuentra conjugado con una sustancia básica como es la colina (Figura 3.9.).



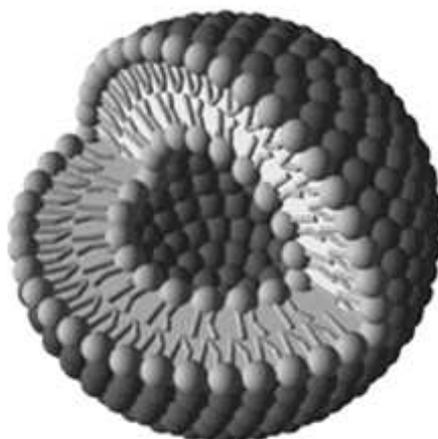
**Figura 3.9.** Fórmula estructural de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina.

La principal fuente de fosfolípidos es la lecitina, sustancia natural obtenida de las habas de soja o de la yema de huevo. A nivel general, los fosfolípidos poseen dos cadenas apolares (o hidrófobas) y un grupo polar (o cabeza hidrófila) unida a ambas cadenas. Esta última zona suele estar constituida por un ácido graso saturado (palmítico o esteárico) y un ácido insaturado (oléico, linoléico o araquidónico).

Los fosfolípidos no presentan olor y son prácticamente insolubles en aceites (animales y vegetales) a bajas temperaturas, disolventes polares y agua. Sin embargo, son solubles en hidrocarburos alifáticos y aromáticos, hidrocarburos halogenados (como el cloroformo), aceites minerales, ácidos grasos, éter y éter de petróleo. La L- $\alpha$ -fosfatidilcolina es soluble a temperatura ambiente en cloroformo, etanol y hexano con un 3 % de etanol. En agua adquieren una forma de agregación diferente en función del pH, la temperatura, la fuerza iónica y la presencia de sustancias cargadas. El carácter anfipático de estos compuestos provoca la formación de una capa bimolecular de manera rápida y espontánea en el agua.

Algunas de las materias primas, aparte de los fosfolípidos, que pueden ser utilizadas en la formación de liposomas, son el colesterol, el cual condiciona la permeabilidad de las bicapas lipídicas [Kunikazu y cols., 2000; Redondo-Morata y cols., 2012; Socaciu y cols., 2000]; otros lípidos de carácter iónico, los cuales confieren carga a los liposomas, negativa en el caso de lípidos aniónicos (p.ej., fosfatidilserina o fosfatidilglicerol) o positiva para lípidos catiónicos (p.ej., estearilamina o esfingomielina) [Barenholz y cols., 2011; Hong y cols., 1997; Webb y cols., 1995; Yasuhara y cols., 2012; Zhigaltsev y cols., 2002] y otros componentes que mejoran la estabilidad del liposoma, aumentan su capacidad de vehiculización de fármacos o retrasan los fenómenos de aclaramiento plasmático, como esteroides, glucolípidos o polímeros, p.ej., el dimiristoilfosfatidilglicerol, el diclorato de glicerol/colesterol/polioxietileno-10-esteárico éter y PEG [Laverman y cols., 2000; Momo y cols., 2000; van den Hoven y cols., 2013; Zalipsky y cols., 1995].

Los liposomas fueron descritos por primera vez por Bangham y cols., en 1965, tras estudiar el carácter lipídico de las membranas celulares [Bangham y cols., 1965; Baumgart y cols., 2003; Lasic y cols., 2001]. Estos trabajos permitieron definir los liposomas como vesículas microscópicas constituidas por bicapas fosfolipídicas concéntricas alternadas con compartimentos acuosos. En las bicapas, los fosfolípidos se disponen orientados con las cadenas hidrófobas situadas paralelamente entre sí (lo cual constituye una capa) y enfrentados a las cadenas hidrófobas de la otra capa. De esta forma, se aísla una amplia zona hidrófoba, ya que todas las cabezas polares se encuentran en ambos lados. El resultado de esta especial distribución son estructuras concéntricas de naturaleza lipídica que alternan con compartimentos acuosos (Figura 3.10.). Su formulación debe ser tal que se obtengan estructuras biodegradables, no tóxicas y no inmunogénas.



**Figura 3.10.** Esquema de la estructura de un liposomas. Reproducido de Kamaly y Miller, 2010. Copyright Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland (2010).

Pueden destacarse, resumidamente, las siguientes características de estas vesículas lipídicas [Huang, 2008; Zasadzinski y cols., 2011]: *i*) presentan una o más paredes integradas por moléculas fosfolípicas, las cuáles constituyen una o más bicapas concéntricas; *ii*) el compartimento central de la vesícula es acuoso y *iii*) las sustancias

hidrófilas ocupan el compartimento acuoso, las lipófilas se sitúan entre los fosfolípidos de la pared y las anfifílicas se unen a las bicapas por su resto lipófilo.

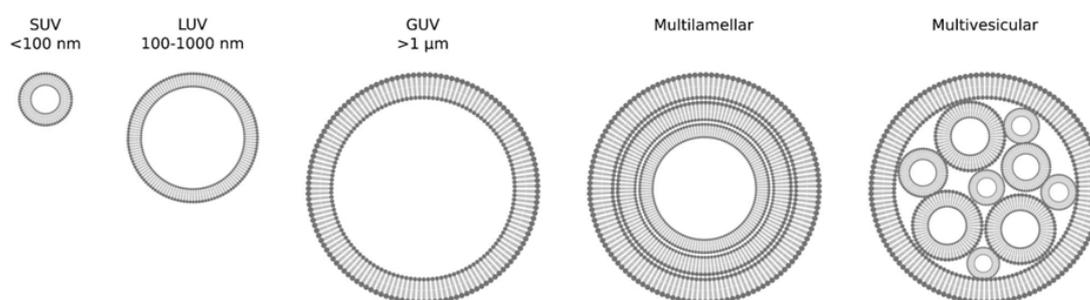
La formación del liposoma se produce de manera rápida y espontánea en el agua gracias a interacciones hidrófobas entre las zonas apolares del fosfolípido, interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas, e interacciones electrostáticas entre grupos polares y el agua. Las moléculas de agua son liberadas de las colas hidrocarbonadas a medida que quedan secuestradas en el interior apolar de la bicapa. Los fosfolípidos se agregan para formar los liposomas, debido a la tendencia del medio acuoso circundante a adquirir un sistema en el que las moléculas lipídicas se disponen de forma que reducen al mínimo el número de cadenas hidrocarbonadas expuestas al agua. De esta forma, las bicapas lipídicas tienden a cerrarse en sí mismas, de tal manera que no existan extremos con cadenas expuestas, lo que da como resultado la formación de un compartimento central acuoso. La cabeza polar del fosfolípido se orienta hacia la fase acuosa, en tanto que la región hidrófoba se sitúa hacia el interior, protegida del contacto con el agua [Huang, 2008; Thirawong y cols., 2008; Zasadzinski y cols., 2011].

La formación de un liposoma sólo tiene lugar a temperaturas superiores a aquella en la que las cadenas acílicas grasas de los fosfolípidos están en estado cristal-líquido. Esta temperatura de transición crítica es una propiedad característica de los lípidos y está asociada con la transformación de un estado ordenado de las cadenas hidrocarbonadas grasas (estado de gel) en otro más desordenado (estado de cristal-líquido) debido a la fusión de éstas. En general, la temperatura de transición es directamente proporcional a la longitud de las cadenas hidrocarbonadas. La hidratación de los fosfolípidos origina la aparición de numerosas fases de estructura variada [Peng y cols., 2012]. Por debajo de la temperatura de transición crítica, los fosfolípidos se encuentran en estado de gel, con cadenas ordenadas paralelamente típicas de estructuras anhidras.

*A priori* puede considerarse que la estructura vesicular de un liposoma es, al menos, termodinámicamente muy estable. Sin embargo, su estabilidad en el tiempo característica de los fosfolípidos en esta estructura depende de numerosos factores. Desde un punto de vista químico, los fosfolípidos de los liposomas pueden oxidarse, especialmente aquellos que contienen ácidos grasos con dobles enlaces en su estructura. Esta peroxidación lipídica puede verse favorecida por la presencia de metales, luz y un pH elevado, e inhibida por agentes quelantes, como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y antioxidantes, como el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). Otro factor a considerar es la hidrólisis de los ácidos grasos de los fosfolípidos, proceso que depende del tiempo, la temperatura y el pH. Dicha hidrólisis es mínima a pH 6.5 [Gabriëls y Plaizier-Vercammen, 2003]. Desde un punto de vista físico, el principal problema de estabilidad de un liposoma es su agregación, proceso que condiciona enormemente la permeabilidad de la pared lipídica y que puede desencadenar la liberación de la dosis de fármaco vehiculizado. La agregación de vesículas lipídicas puede controlarse incrementando la carga eléctrica superficial del liposoma [Brisaert y cols., 2001]. Esto puede lograrse mediante la introducción en su composición química de lípidos aniónicos, e incluso catiónicos, como la estearilamina. Otra posible solución a este problema sería la liofilización del liposoma. Investigaciones al respecto manifiestan la fácil rehidratación de las vesículas liofilizadas, constatándose una retención entorno al 70 % del producto inicialmente encapsulado. Incluso se ha descrito que la incorporación de la dosis de fármaco en el liposoma se puede realizar durante el proceso de rehidratación [Peer y Margalit, 2000]. También se ha propuesto la congelación como método de conservación de los liposomas, si se combina con el empleo de crioprotectores a bajas concentraciones [Medina y cols., 1986].

Si bien puede establecerse numerosos criterios de clasificación (tamaño, método de formulación, etc.) quizás el más comúnmente utilizado sea el que considera el número de compartimentos que constituyen la estructura vesicular [Arias y cols., 2011a], de manera que podemos considerar liposomas unilamelares (o unicompartmentales), con una única bicapa lipídica que engloba al compartimento central acuoso, de pequeñas

dimensiones (SUV) con tamaños entre 20 y 100 nm, de grandes dimensiones (LUV) con tamaños entre 0.1 y 1  $\mu\text{m}$  o gigantes (GUV) con tamaños de más de 1  $\mu\text{m}$ ; liposomas plurilamelares, pluricompartimentales o vesículas multilamelares (MLV), con varias bicapas lipídicas (entre cinco y veinte) y compartimentos acuosos con tamaños entre 0.1 y 10  $\mu\text{m}$ ; y vesículas multivesiculares (MVV), aquellas que engloban en su interior a otros liposomas, con tamaños de más de 1  $\mu\text{m}$  [Akbarzadeh y cols., 2013] (Figura 3.11.).



**Figura 3.11.** Clasificación de liposomas según el tamaño y lamelaridad. Reproducido de van Swaay y deMello, 2013. Copyright Royal Society of Chemistry (2013).

Los liposomas tienen aplicación en biomedicina debido a su gran capacidad para el transporte de fármacos de una muy diversa naturaleza química, ya que pueden incorporar en su estructura sustancias activas hidrófilas, lipófilas y anfifílicas [Arias y cols., 2011a; Knudsen y cols., 2011; Thomas y cols., 2011; Tseng y cols., 2009]. La vehiculización de la dosis de fármaco puede lograrse tanto en la fase acuosa como en la lipídica. La eficacia de vehiculización de fármacos depende de diversos factores, principalmente el tipo de vesícula, la composición de la pared lipídica, la concentración de fosfolípido, la carga eléctrica del liposoma, así como la naturaleza del fármaco a transportar [Fang y cols., 1997]. En lo referente a este último aspecto se ha descrito cómo la capacidad de encapsulación en liposomas multilaminares de distintos esteroides (hidrocortisona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, y hexacetónido de triamcinolona) se ve influenciada por la hidrofobia, el peso molecular y la concentración inicial utilizada de otras sustancias activas [Kulkarni y Vargha-Butler,

1995]. Es un hecho ampliamente contrastado que las moléculas altamente polares y relativamente pequeñas se vehiculizan en el compartimento acuoso, siempre que no interfieran en la formación de los liposomas, y su tamaño sea compatible con las dimensiones de estos compartimentos. Por el contrario, las moléculas no polares se intercalan entre las bicapas fosfolípicas, mientras que las sustancias anfifílicas se fijan a la vesícula por el resto lipófilo. La extensión y lugar de unión de un fármaco a un liposoma dependen fundamentalmente de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas principio activo-estructura vesicular [Karewicz y cols., 2011; Pereira-Leite y cols., 2013; Zhao y Feng, 2005].

En la actualidad, la utilización de liposomas en el campo terapéutico ha dado lugar al desarrollo de numerosas formulaciones con resultados muy significativos de mejora en la farmacoterapia (Tabla 3.1.) [Zhang y cols., 2008; Arias y cols. 2011a]:

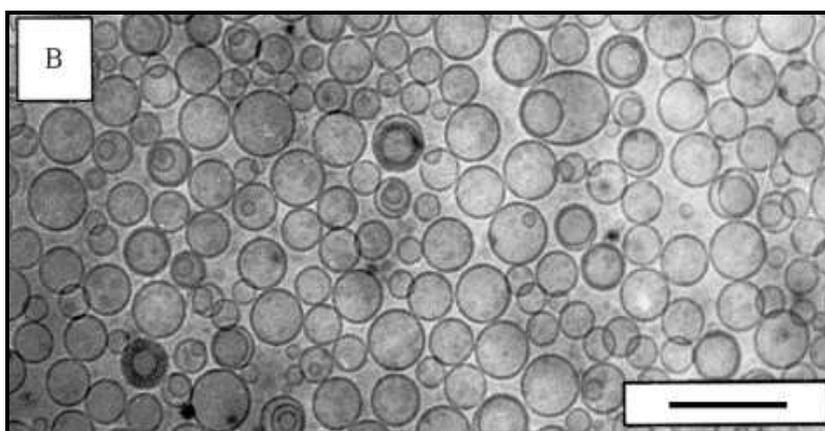
SUSTANCIA ACTIVA	NOMBRE COMERCIAL	COMPAÑÍA	INDICACIÓN
Anfotericina B	Abelcet <sup>®</sup>	Enzon	Infecciones por hongos
Anfotericina B	Ambisome <sup>®</sup>	Gilead Sciences	Infección por hongos y protozoos
Citarabina	Depocyt <sup>®</sup>	Pacira (anteriormente SkyePharma)	Meningitis linfomatosa maligna
Daunorrubicina	DaunoXome <sup>®</sup>	Gilead Sciences	Sarcoma de Kaposi relacionado con VIH
Doxorrubicina	Myocet <sup>®</sup>	Zeneus	Terapia de combinación con ciclofosfamida en cáncer de mama metastásico
Doxorrubicina	Doxil <sup>®</sup>	Janssen Biotech, Inc.	Cáncer de ovario metastásico y el sarcoma de Kaposi
Vacuna de virosoma de virus Influenza (IRIV <sup>®</sup> )	Epaxal <sup>®</sup> , Inflexal V <sup>®</sup>	Berna Biotech	Hepatitis A, Influenza
Morfina	DepoDur <sup>®</sup>	SkypePharma, Endo	Analgesia postquirúrgica
Verteporfina	Visudyne <sup>®</sup>	QLT, Novartis	Degeneración macular relacionada con la edad, miopía patológica, histoplasmosis ocular
Estradiol	Estrasorb <sup>®</sup>	Novavax	Terapia menopausal

**Tabla 3.1.** Ejemplos de medicamentos basados en liposomas.

Aunque es muy difícil establecer una clasificación que abarque todos los métodos desarrollados de obtención, mencionaremos algunos de los procedimientos comúnmente utilizados a nivel general para la síntesis de liposomas de diferente tamaño y lamellaridad [Akbarzadeh y cols., 2013; Jesorka y Orwar, 2008; Martins y cols., 2007; Meure y cols., 2008]:

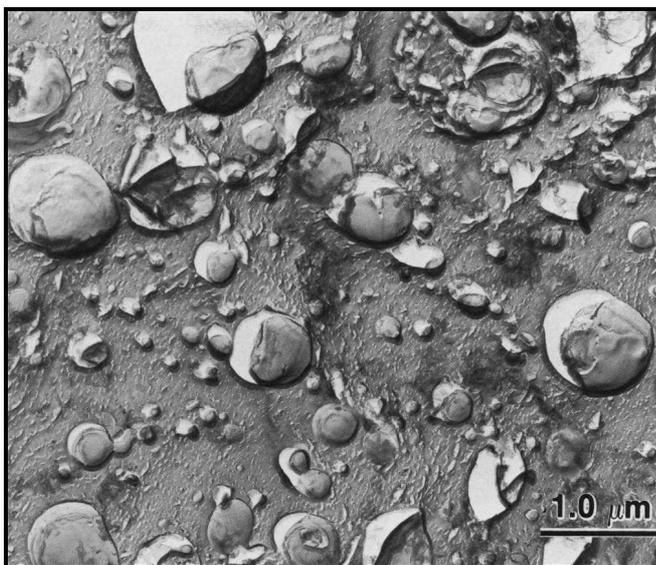
- *Método de extrusión:* esta técnica permite la obtención de liposomas unilamelares con tamaño definido [Berger y cols., 2001]. Esta técnica consiste en hacer pasar una suspensión heterogénea de liposomas MLV a través de filtros de membrana con un tamaño de poro determinado (50-200 nm) a una presión determinada. Dicho proceso es aplicable a grandes volúmenes de suspensiones concentradas de vesículas [Mui y cols., 2003]. En este proceso, inicialmente las vesículas son

sometidas a varios ciclos de un procedimiento de congelación-descongelación para posteriormente ser extruidas de cinco a diez veces hasta conseguir el tamaño deseado (Figura 3.12.).



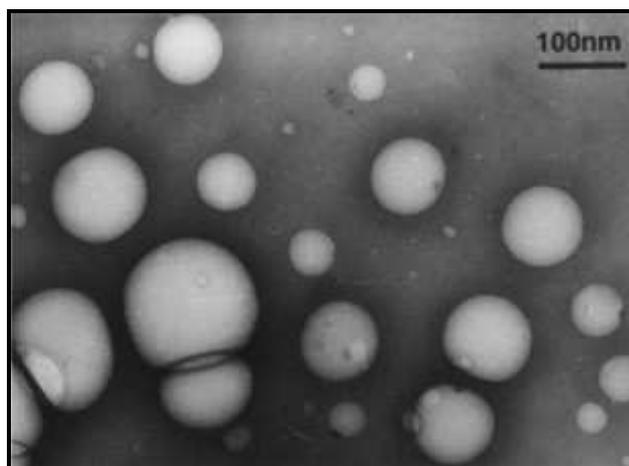
**Figura 3.12.** Microfotografía Crio-TEM de vesículas de fosfatidilcolina-colesterol (relación molar 55:45) obtenidas por extrusión en agua destilada. Longitud de barra: 200 nm. Reproducida de Mui y cols., 2003. Copyright Elsevier (2003).

- *Método de sonicación:* es un método simple para la formación de liposomas SUV (Figura 3.13.) homogéneos en cuanto a tamaño [Pereira-Lachataignerais y cols., 2006; Woodbury y cols., 2006; Yamaguchi y cols., 2009]. Se basa en someter, a ultrasonidos con frecuencias de  $\approx 20$  kHz, una suspensión de liposomas MLV durante varios segundos con una sonda con punta de titanio a temperatura controlada. Durante el proceso de formación puede producirse la degradación química del lípido o contaminación del medio de síntesis por parte de la sonda de ultrasonidos, lo que puede afectar a la estabilidad de los liposomas formados [Zasadzinski, 1986].



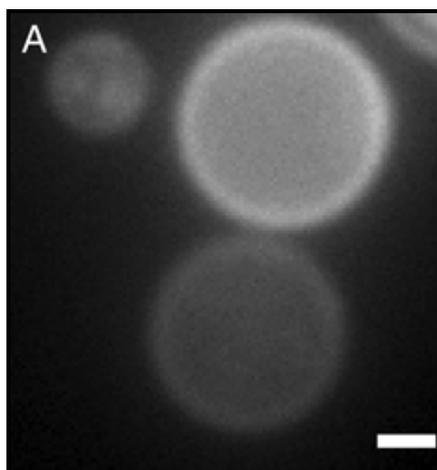
**Figura 3.13.** Microfotografía electrónica de transmisión por criofractura de liposomas SUV tras sonicación durante 10 segundos. Reproducida de Zasadzinski, 1986. Copyright The Biophysical Society (1986).

- *Método de liofilización de soluciones monofásicas:* este método consiste en la formación de una dispersión de una fase, homogénea e isotrópica, mezcla de fosfolípidos solubilizados con codisolventes en sistemas acuosos (p.ej., sistema sacarosa/*t*-butanol/H<sub>2</sub>O), para más tarde someter dicha dispersión a un proceso de liofilización para eliminar los disolventes. Este proceso permite la formación de un liofilizado denominado proliposoma [Wang y cols., 2009], que tras ser rehidratado forma espontáneamente liposomas LUV estériles, libres de pirógenos y con tamaños estrechos y submicrométricos [Li y Deng, 2004] (Figura 3.14.).



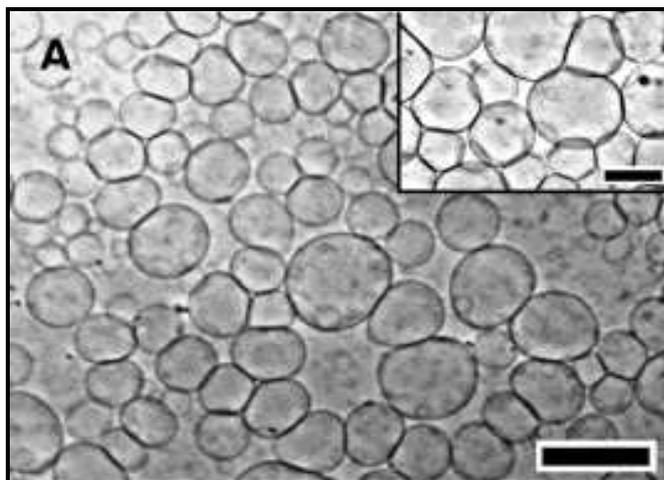
**Figura 3.14.** Microfotografía electrónica de transmisión de liposomas reconstituidos de proliposomas compuestos de lecitina/sorbitol/nicotina (relación molar 1:10:0.162, respectivamente). Reproducida de Hwang y cols., 1997. Copyright Elsevier (1997).

- *Método de hidratación, deshidratación e hinchamiento:* esta técnica está basada en el hinchamiento de capas de lípidos, deshidratados previamente, en medio acuoso. La separación de las moléculas de agua (deshidratación) de las bicapas lipídicas y las lamelas que forman el liposoma, se produce por la presencia de sustancias tampón y gradientes de presión osmótica. Este procedimiento es frecuente en la obtención de liposomas gigantes unilamelares (GUV) (Figura 3.15.) o multilamelares (MLV) [Karlsson y cols., 2000; Manley y Gordon, 2008]. El proceso de obtención de vesículas ocurre rápidamente y con rendimiento alto; no obstante hay factores que afectan al rendimiento en la formación de partículas como el grado de separación de las bicapas, la temperatura, la composición lipídica (lípidos con carga negativa inducen la separación de las lamelas), la fuerza iónica del medio y la agitación mecánica aplicada para la separación de los liposomas de las capas de lípidos desecados.



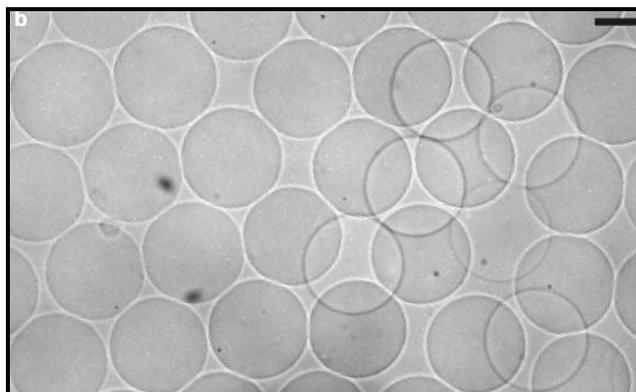
**Figura 3.15.** Microfotografía electrónica de fluorescencia de liposomas GUV obtenidos por el método de deshidratación/hidratación. Longitud de la barra: 10  $\mu\text{m}$ . Reproducida de Manley y Gordon, 2008. Copyright John Wiley & Sons, Inc (2008).

- *Método de electroformación:* este método permite obtener liposomas GUV con un alto rendimiento [Kuribayashi y cols., 2006]. Se basa en la formación de liposomas por crecimiento de una fina capa de lípidos inducido por un campo eléctrico aplicado; dicho campo causa fluctuaciones en las bicapas, induciendo así la separación de las lamelas y posterior formación de las vesículas (Figura 3.16.). Diversos factores influyen en este proceso tales como el espesor de la capa lipídica, la diferencia de potencial aplicado, el tiempo de aplicación, la frecuencia y la fuerza iónica del medio [Estes y Mayer, 2005]. Esta técnica suele aparecer combinada con el proceso de *spin-coating* (recubrimiento por rotación), el cual permite el control del espesor de las capas lipídicas que depende de la velocidad de rotación, la concentración lipídica y la viscosidad del disolvente [Krapf y cols., 2011].



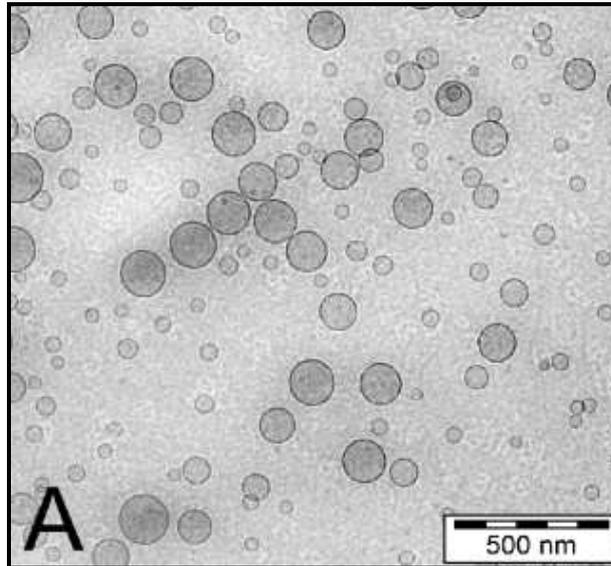
**Figura 3.16.** Microfotografía electrónica de transmisión de liposomas GUV obtenidos por el método de electroformación en una solución de glicerol durante dos horas. La solución tampón fosfato fue introducida lentamente (velocidad de flujo = 5 mL/h) para sustituir la solución de glicerol. Figura insertada: detalle de los liposomas formados por la misma técnica. Longitudes de barra: 100  $\mu\text{m}$ . Reproducida de Ester y Mayer, 2005. Copyright Elsevier (2005).

- *Método de inyección (ink-jet) en fase acuosa:* esta técnica permite obtener una suspensión de liposomas GUV. En este método son inyectadas gotículas de una solución de lípidos en un disolvente miscible en medio acuoso. La formación de las vesículas es producida por nucleación (micelización) y posterior crecimiento [Hauschild y cols., 2005]. La distribución controlada y monodispersa de las gotículas conduce a un nivel de supersaturación estable, el cual determina el número de partículas y tamaño de las vesículas [Stachowiak y cols., 2009] (Figura 3.17.).



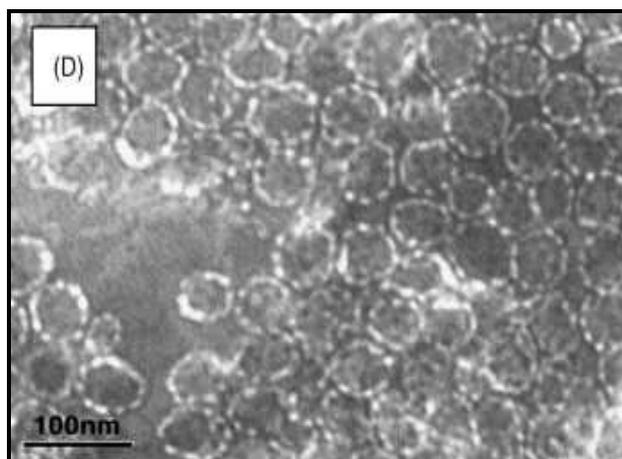
**Figura 3.17.** Vesículas lipídicas formadas por inyección en fase acuosa, observadas por microscopía de alta velocidad (500-30000 fotogramas por segundo, Photron 1024 PCI). Longitud de barra: 100  $\mu\text{m}$ . Reproducida de Stachowiak y cols., 2009. Copyright The Royal Society of Chemistry (2009).

- *Método de eliminación del detergente:* esta técnica se basa en la obtención de liposomas SUV por interposición de fosfolípidos en medio acuoso por formación de micelas mixtas con ayuda de agentes tensioactivos. La separación y posterior eliminación del detergente se realiza por centrifugación, diálisis o cromatografía líquida de exclusión [Holzer y cols., 2009; Schubert, 2003]. A través de esta técnica pueden obtenerse liposomas con tamaños homogéneos entre 20-100 nm (Figura 3.18.). No obstante, la persistencia del agente tensioactivo en los liposomas formados puede alterar sus propiedades físicas, químicas o fisicoquímicas.



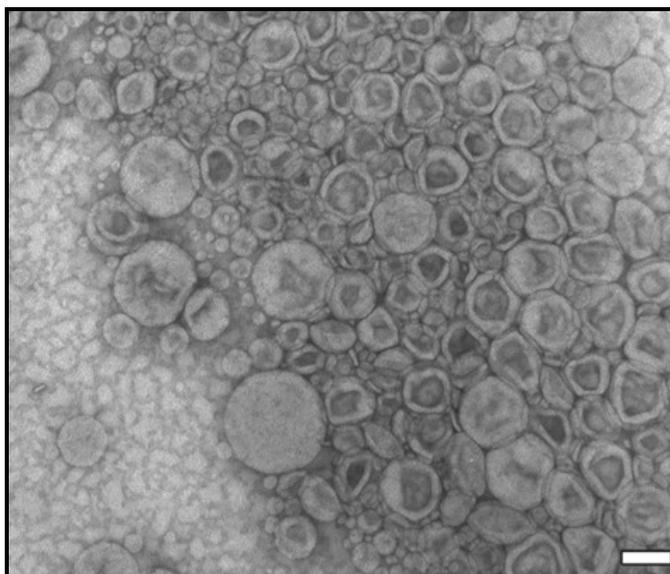
**Figura 3.18.** Microfotografía obtenida por microscopía Crio-TEM de liposomas obtenidos por eliminación del detergente. Reproducida de Holzer y cols., 2009. Copyright Elsevier (2009).

- *Método de infusión en etanol/éter:* esta técnica permite obtener liposomas LUV, se basa en la inyección de una solución de fosfolípidos (disueltos en etanol o éter) en otra solución acuosa a una temperatura de 55-65 °C [Justo y Moraes, 2005; Pham y cols., 2006; Stano y cols., 2004]. Posteriormente, es eliminado el disolvente por evaporación y es aplicada una filtración para obtener partículas con un tamaño homogéneo comprendido entre 50-250 nm (Figura 3.19.).



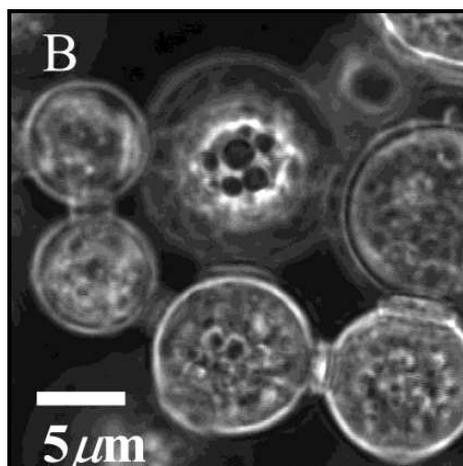
**Figura 3.19.** Microfotografía de TEM de liposomas obtenidos por inyección de una solución de fosfolípidos en éter y colesterol en una solución acuosa. Reproducida de Pham y cols., 2006. Copyright Elsevier (2006).

- *Método de evaporación en fase reversa (REV):* se basa en la formación de un sistema disperso formado por la rápida inyección de una solución acuosa en una fase orgánica que contiene lípidos [Chen y cols., 2013; Ko y Bickel, 2012]. Las vesículas obtenidas por esta técnica presentan un tamaño comprendido entre 0.1-1  $\mu\text{m}$  y una capacidad de vehiculización de hasta un 50 % (Figura 3.20.). Los pasos fundamentales de este método son: la sonicación del sistema disperso para obtener una emulsión, la cual se estabiliza con micelas inversas, evaporación parcial del disolvente orgánico que da lugar a un gel viscoso y por último tras un proceso de agitación se obtiene una suspensión concentrada de vesículas. El inconveniente de esta técnica es su limitación en productos lábiles como p.ej., proteínas [Lasch y cols., 2003].



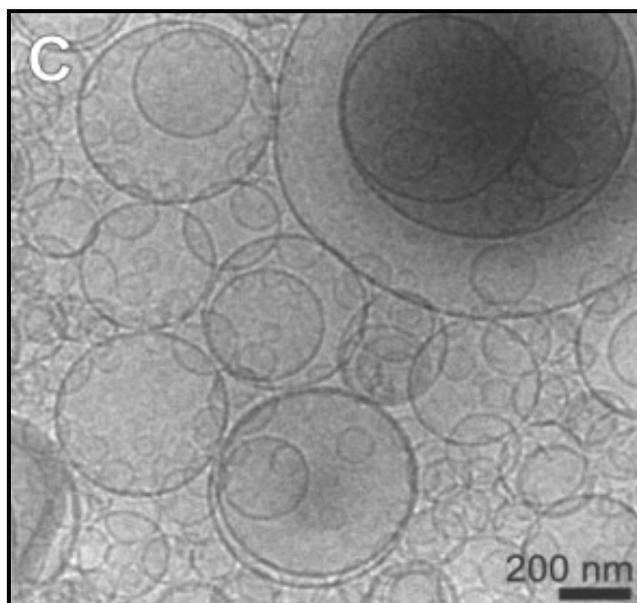
**Figura 3.20.** Microfotografía de TEM de liposomas obtenidos por el método de evaporación en fase reversa. Longitud de barra: 100 nm. Reproducida de Ko y Bickel, 2012. Copyright American Association of Pharmaceutical Scientists (2012).

- *Método de emulsión:* la producción de liposomas a través de este método se lleva a cabo por la formación de una emulsión A/O, dicha emulsión se forma por adición de una pequeña cantidad de medio acuoso en un volumen considerable de una solución orgánica inmiscible que contiene fosfolípidos. El proceso de formación de liposomas finaliza cuando dicha mezcla es llevada a agitación mecánica para interponer el medio acuoso con el medio orgánico donde están dispersos los lípidos. Existen diferentes variantes del método como el de doble emulsión [Shum y cols., 2008] o el de emulsión inversa [Nishimura y cols., 2012; Pautot y cols., 2003] (Figura 3.21.), que conducen a la obtención de liposomas de diferente tamaño dependiendo de la cantidad de lípido y velocidad de agitación aplicados [Meure y cols., 2008].



**Figura 3.21.** Microfotografía de contraste de fase de liposomas LUV obtenidos por el método de emulsión inversa estabilizada por el lípido POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina). Reproducida de Pautot y cols., 2003. Copyright American Chemical Society (2003).

- *Método de hidratación del film (thin layer evaporation method)*: es una técnica simple para la obtención de liposomas MLV. Este procedimiento se basa en la formación de liposomas por hidratación de una fina capa de lípidos desecados en las paredes de un matraz redondo. Previamente, los lípidos son disueltos en un disolvente orgánico volátil y es evaporado el disolvente a través de rotación y vacío en rotavapor. Este procedimiento se debe realizar por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos y conduce a la formación de vesículas heterogéneas en cuanto a tamaño y lamelaridad (Figura 3.22.).



**Figura 3.22.** Microfotografía TEM de liposomas MLV obtenidos por el método de hidratación del *film*. Reproducida de Hwang y cols., 2011. Copyright Elsevier (2011).

En este trabajo de investigación, el procedimiento seguido para la síntesis de los liposomas multilamelares (MLV) está basado en el método de hidratación del *film* (*thin layer evaporation technique*) [Clares y cols., 2009; Glavas-Dodov y cols., 2005]. Las condiciones de trabajo se mantuvieron de tal manera que la temperatura ( $37.0 \pm 0.5$  °C) mantenida mediante un baño termostatzado, superó a la temperatura de transición crítica de los lípidos presentes en la formulación ( $T_c = 25$  °C). Dichas condiciones deben favorecer: *i*) la evaporación del disolvente orgánico en la primera etapa de la síntesis; y, *ii*) la incorporación de la fase acuosa gracias a que las membranas de los liposomas son más fluidas en la segunda etapa de la síntesis.

Brevemente, en primer lugar se preparó la fase lipídica u orgánica, para ello se solubilizaron todos los componentes de la fase lipídica (238 mg de fosfatidilcolina) en 50 mL de cloroformo (triclorometano,  $\text{CHCl}_3$ ), dicha cantidad de lípido dará lugar a una reacción estequiométrica (mol a mol) con los componentes incluidos en el volumen de

la fase acuosa, dicho procedimiento ha sido empleado en trabajos anteriores [Clares y cols., 2009; Medina y cols., 1986]. El disolvente empleado es volátil, a fin de permitir su eliminación durante la siguiente etapa del método. En una segunda etapa, dicha solución orgánica se adicionó a un matraz redondo y se añadió más cantidad de cloroformo hasta un volumen final de 250 mL, la finalidad del empleo de un volumen elevado de cloroformo radica en la necesidad de asegurar una uniformidad en la superficie y grosor de la película, tras la evaporación. La evaporación del disolvente se efectuó a través de un rotavapor (rotavapor RII, Büchi, Suiza) a vacío y a 300 r.p.m. prolongándose el proceso el tiempo necesario hasta total desecación y formación de una película lipídica adherida a las paredes del matraz.

Finalmente, se preparó la fase acuosa constituida por agua bidestilada. La fase acuosa se adicionó al matraz que contiene la película lipídica adherida a sus paredes, obteniéndose así una suspensión de liposomas mediante agitación continua durante 45 minutos a 200 r.p.m., se produjo la hidratación de la película lipídica, la cual se desprendió de las paredes del recipiente y dio lugar a la formación de una suspensión de liposomas de aspecto lechoso. Finalmente, la suspensión se mantuvo en reposo durante 24 horas a  $4.0 \pm 0.5$  °C, para favorecer el crecimiento y la formación final de las vesículas [Medina y cols., 1986]. El pH de las suspensiones acuosas de liposomas osciló entre 5.6 y 6.0. Antes de llevar a cabo la caracterización de las nanopartículas, la suspensión de liposomas fue sometida a repetidos ciclos de centrifugación (6000 rpm, 1 hora) (Centrikon T-124 high-speed centrifuge, Kontron, Francia) y redispersión en agua bidestilada hasta que se comprobó que la conductividad del sobrenadante era inferior a  $10 \mu\text{S}/\text{cm}$  (Crison microcm 2202, España).

La caracterización de la geometría (forma y tamaño) de los liposomas fue estudiada mediante microscopía TEM, HRTEM y microscopía electrónica de barrido ambiental (eSEM) [FEI, Quanta 400, EE.UU]. Para llevar a cabo las técnicas de TEM y HRTEM fue agitada en vórtex una muestra de una suspensión acuosa diluida de liposomas ( $\approx 0.1$  %, p/v) durante 5 minutos para a continuación realizar una tinción negativa con acetato

de uranilo depositando una gotas de la suspensión sobre una rejilla de cobre con película formvar. Por último, estas rejillas se secaron a  $35.0 \pm 0.5$  °C en un horno de convección. Con respecto a la microscopía eSEM, utiliza un proceso físico denominado efecto Peltier, el cual permite controlar la temperatura, presión y humedad relativa del entorno de forma precisa [Jansson y cols., 2013; Mohammed y cols., 2004], para ello una muestra de una suspensión acuosa diluida de liposomas ( $\approx 0.1$  %, p/v) fue agitada durante 5 minutos en vórtex para más tarde depositar una gota de dicha suspensión en un soporte de Aluminio o acero inoxidable, a continuación es realizado un ciclo de purga (de 3.5 a 9.5 torr y 9.5 a 3.5 torr, realizado en 5 repeticiones) para alcanzar un estado de equilibrio en el sistema, dicha condición queda establecida con una presión de 4.4 torr, una temperatura de 2 °C y una humedad relativa de un 40 %. Asimismo, fueron realizadas medidas de PCS para determinar el tamaño medio de partícula de los liposomas, para ello fue analizada una suspensión acuosa diluida de liposomas ( $\approx 0.1$  %, p/v), la cual fue agitada en vórtex previamente durante 45 minutos para evitar posibles agregados, no se emplea la sonicación para individualizar las nanopartículas, ya que este tipo de técnica promueve que los liposomas MLV sintetizados puedan ser destruidos y a la vez transformados en liposomas SUV [Mura y cols., 2007]. El análisis de las microfotografías TEM, HRTEM y eSEM de las suspensiones acuosas de liposomas, permitió identificar su morfología esférica y una superficie lisa. Hay que indicar que se observa una sucesión de bandas claras y oscuras, debido a la alternancia entre capas lipídicas y acuosas, respectivamente (Figura 3.23.). Además, el análisis PCS de los liposomas nos permitió determinar un tamaño de partícula de  $635 \pm 310$  nm y una elevada heterogeneidad de tamaño.

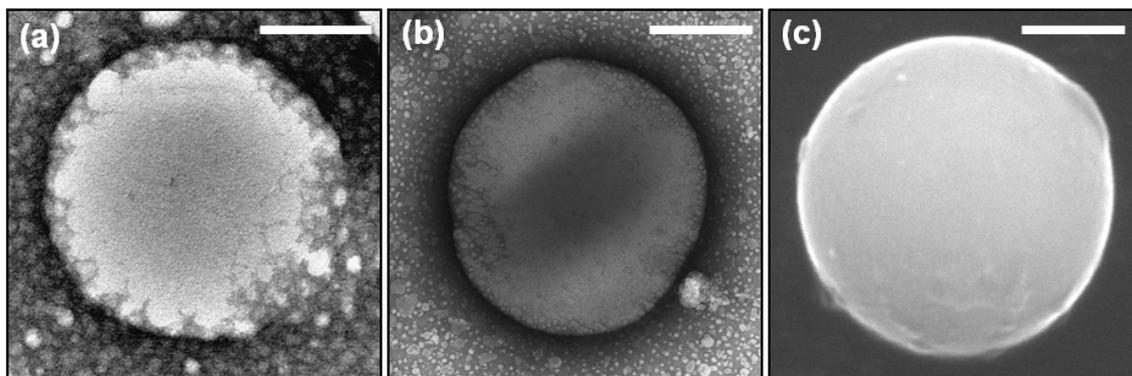


Figura 3.23. (a) Microfotografía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), (b) microfotografía electrónica de transmisión (TEM) y (c) microfotografía electrónica de barrido ambiental (eSEM) de liposomas MLV. Longitudes de barra: 500 nm (a), 400 nm (b) y 300 nm (c).

#### 3.1.3. NANOPARTÍCULAS MAGNETITA/LIPOSOMAS. MAGNETOLIPOSOMAS

El término magnetoliposoma debe ser diferenciado del término magnetosoma, ambos términos se refieren a nanopartículas magnéticas constituidas por un recubrimiento de carácter lipídico, aunque difieren en el modo de obtención, ya que los magnetosomas son formados por biomineralización en organismos vivos (síntesis biológica) de forma natural, mientras que los magnetoliposomas son formados por procesos fisicoquímicos (síntesis artificial) en el laboratorio [Arakaki y cols., 2008; Soenen y cols., 2011]. Básicamente, los magnetosomas son estructuras celulares (orgánulos) encontradas en ciertos microorganismos unicelulares, por ej., en especies de bacterias como *Magnetospirillum* (Figura 3.24.) o *Magnetovibrio* [Yan y cols., 2012b], que consisten en cristales de óxidos de hierro (como magnetita) envueltos por fosfolípidos que constituyen la membrana celular bacteriana. Este tipo de bacterias denominadas bacterias magnetostáticas, son capaces de sintetizar cristales magnéticos, como magnetita o greigita ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) [Lins y Farina, 2001; Schüler, 2008], que les permite

orientarse en la dirección del campo geomagnético (campo magnético de la tierra) [Lefèvre y cols., 2011; Lohsse y cols., 2011]. El tamaño, morfología y composición de los cristales magnéticos está sujeto a un proceso genético propio de cada bacteria [Lins y Farina, 2001].

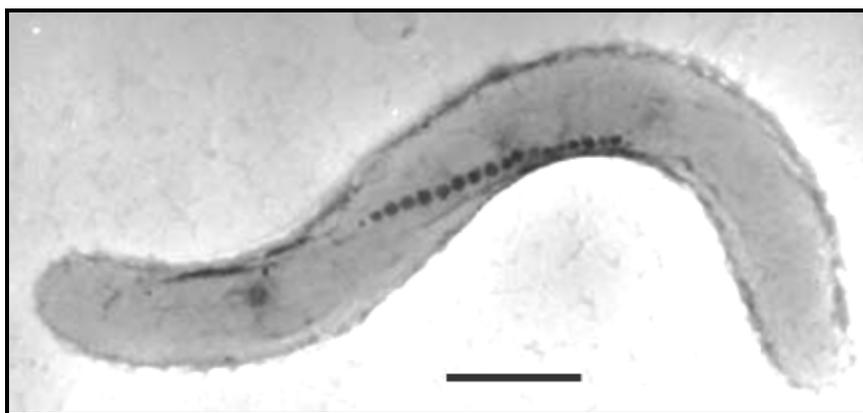


Figura 3.24. Microfotografía TEM de una bacteria magnetotáctica (*Magnetospirillum magneticum*) con magnetosomas intracelulares dispuestos linealmente en cadena. Longitud de barra: 500 nm. Reproducida de Arakaki y cols., 2008. The Royal Society (2008).

El mecanismo de formación de los magnetosomas es un proceso complejo relacionado con la fisiología, biología molecular y citoquímica ultraestructural de las bacterias magnetostáticas. Aunque la formación de los magnetosomas no es entendida todavía completamente en detalle, existen varios trabajos que proponen posibles modelos de formación [Arakaki y cols., 2008; Schüler y cols., 2008; Jogler y, Schüler, 2006]. A nivel general, el mecanismo de formación incluye varias etapas, las cuales están relacionadas con la formación de la vesícula lipídica a partir de la membrana de la pared bacteriana, la captación extracelular de hierro por parte de la célula, el transporte de hierro dentro de la vesícula lipídica y la mineralización biológicamente controlada de magnetita dentro de las vesículas lipídicas [Yan y cols., 2012b]. Los magnetosomas, según la especie bacteriana, presentan una morfología, composición, tamaño (generalmente distribución estrecha y uniforme)

y disposición determinada, todo ello depende en gran medida de la composición proteica de la membrana fosfolipídica bacteriana que envuelve los núcleos magnéticos [Soenen y cols., 2011]. Es por ello, que los magnetosomas han suscitado mucho interés como agentes de contraste en resonancia magnética por imagen (RMI), ya que ha sido demostrado que estos nanosistemas pueden ser una alternativa a ferrofluidos semisintéticos [Lang y Schüler, 2006].

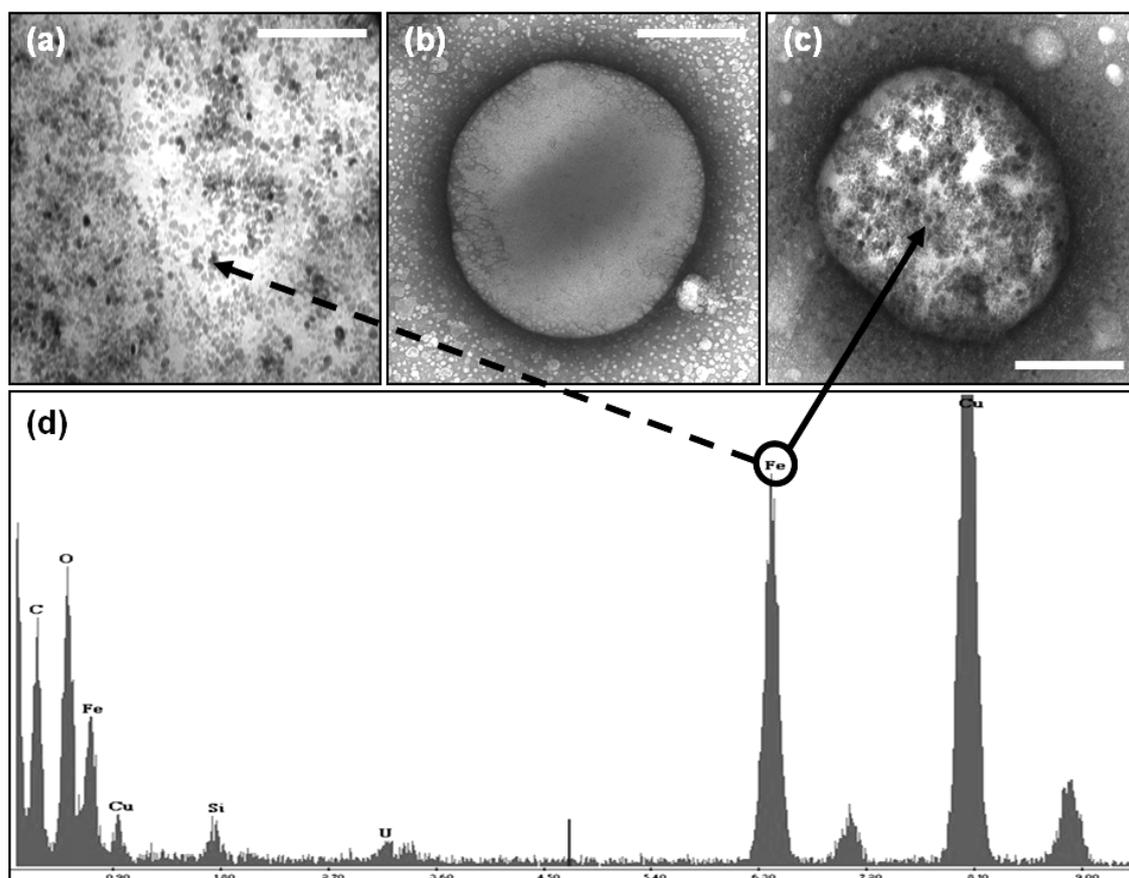
La obtención de nanopartículas magnéticas, a nivel de laboratorio (síntesis artificial), se produce por recubrimiento de los núcleos magnéticos en una matriz biodegradable, principalmente de carácter polimérico o lipídico. Algunos polímeros como a) poli(alquilcianoacrilatos), p.ej., poli(etil-2-cianoacrilato) [Arias y cols., 2001, 2005, 2012b] o poli(butilcianoacrilato) [Arias y cols., 2006], polihexilcianoacrilato o polioctilcianoacrilato [Arias y cols., 2008b]; b) derivados celulósicos, p. ej., etilcelulosa [Arias y cols., 2009a, 2010a]; c) quitosano [Elmizadeh y cols., 2013]; d) poli- $\epsilon$ -caprolactona [Arias y cols., 2010b; Gloria y cols., 2013; Nanaki y cols., 2011] y e) poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) [Lee y cols., 2012; Pérez-Artacho y cols., 2012], por citar algunos ejemplos.

Si la cubierta es lipídica, se habla de los magnetoliposomas, estos son nanopartículas magnéticas, obtenidas a nivel de laboratorio (síntesis artificial), constituidos por núcleos de óxido de hierro superparamagnético embebidos en una matriz biodegradable de carácter lipídico, algunos autores definen estas nanopartículas magnéticas como liposomas constituidos por bicapas fosfolipídicas que encapsulan óxidos de hierro en los compartimentos acuosos (liposomas magnéticos) [Fracione y cols., 2012; Laurent y cols., 2008; Martina y cols., 2005]. Diferentes métodos han sido descritos para sintetizar magnetoliposomas; algunos de ellos han sido ya descritos para la obtención de liposomas como el método de hidratación de la capa lipídica, método de sonicación [Giri y cols., 2005], extrusión [Lesieur y cols., 2003], evaporación en fase reversa [García-Jimeno y cols., 2011], por citar algunos ejemplos.

Para la síntesis de los magnetoliposomas objetivo de este trabajo (basados en magnetita y fosfatidilcolina) se sigue el mismo método de obtención que para los liposomas MLV, es decir el método de hidratación del *film*, con la única variante de la inclusión de los núcleos de magnetita en la fase acuosa utilizada para la rehidratación de la fina capa lipídica. Brevemente, sobre la fina capa lipídica, formada por evaporación de 238 mg de fosfolípidos disueltos en 300 mL de cloroformo en rotavapor, fue añadida una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita (4.5 mg/mL, pH = 6), en agitación continua durante 45 minutos a 200 r.p.m hasta total desprendimiento de la capa lipídica y formación de una suspensión de magnetoliposomas.

Finalmente, la limpieza de las nanopartículas de magnetoliposomas fue realizada mediante un procedimiento de sedimentación magnética, donde las nanopartículas fueron separadas del medio de dispersión, tras aplicar dos ciclos consecutivos de exposición a un imán de 400 mT durante 10 minutos, procediendo posteriormente a la eliminación del sobrenadante y a la redispersión de las nanopartículas sedimentadas en agua bidestilada, hasta que la conductividad del sobrenadante fue inferior a 10  $\mu$ S/cm.

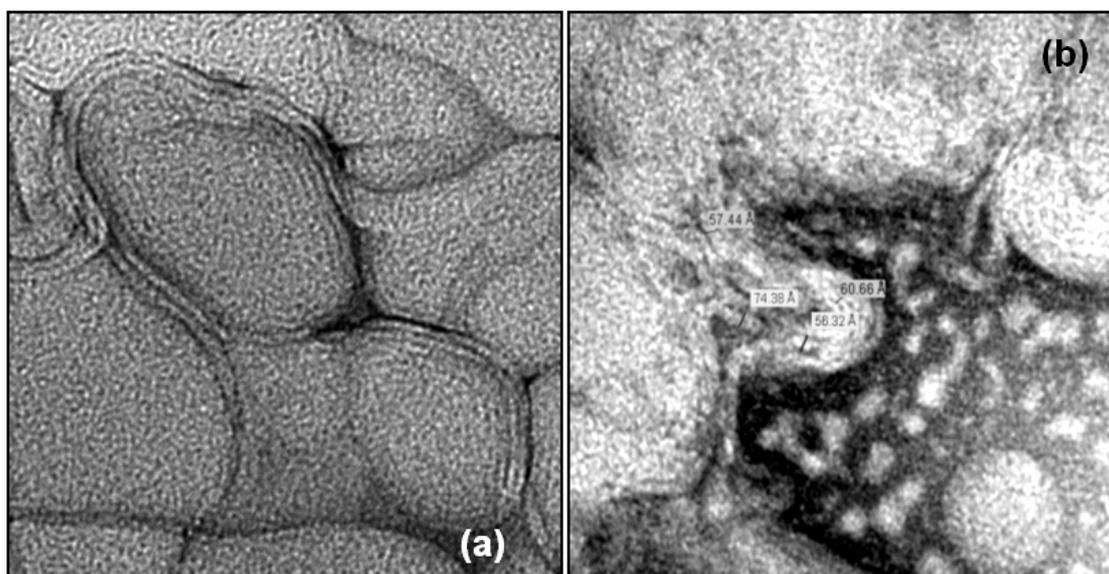
En estas condiciones de síntesis, y tal como se muestra en la Figura 3. 25., se obtuvieron magnetoliposomas (Figura 3. 25. c) con una morfología esférica y estructura vesicular característica de los liposomas (Figura 3.25. b), tras el recubrimiento de los núcleos de magnetita (Figura 3.25. a). El microanálisis de las muestras de magnetoliposomas fue realizado durante la microscopia TEM a través de un detector de energía dispersiva de rayos X (EDX) (INCA 350 Sistema EDX, Reino Unido). Dicho microanálisis reveló el contenido en hierro en las muestras de magnetoliposomas, el cuál es asumible a la presencia de magnetita (Figura 3.25. d). El resto de metales identificados corresponden a contaminaciones de la muestra durante su preparación para microscopía. Estas microfotografías definen la gran eficacia de la inclusión de los núcleos magnéticos por parte de la matriz lipídica biodegradable.



**Figura 3.25.** (a) Microfotografía HRTEM de partículas de magnetita, (b) TEM de liposomas y (c) TEM de magnetoliposomas. Longitudes de barra: 100 nm (a), 400 nm (b) y 50 nm (c). (d) Microanálisis de la composición química de la muestra de magnetoliposomas. La banda resaltada corresponde al contenido en hierro de los núcleos de magnetita (a) presentes en la muestra de magnetoliposomas (c).

El análisis en detalle de las microfotografías HRTEM de los magnetoliposomas refleja la estructura (MLV) de éstas. A este respecto la Figura 3.26. muestra una sucesión de bandas claras y oscuras, debido a la alternancia entre capas lipídicas y acuosas distancia media entra lamelas de 6 nm así como un grosor medio de 10 nm correspondiente a la cubierta fosfolípídica. Cómo puede apreciarse en la microfotografía TEM (Figura 3.26.a), las bicapas fosfolípídicas que aparecen en los liposomas ejemplifica la estructura vesicular lipídica de los magnetoliposomas. Finalmente, es

importante destacar que los núcleos magnéticos localizados en el espacio interlamelar parecen inducir una reducción considerable en el tamaño final del sistema vesicular, lo que puede ser debido a una contracción considerable del volumen acuoso liposomal [Chen y cols., 2010; Clares y cols., 2013]. Este hecho junto a otros, argumentados en el Capítulo 4 sobre propiedades electrocinéticas y Capítulo 5 sobre termodinámica superficial, ayudarán a explicar el mecanismo de formación de los magnetoliposomas.



**Figura 3.26.** Microfotografía TEM (a) de liposomas y HRTEM (b) de magnetoliposomas que revela una estructura vesicular multilaminar y algunos ejemplos de distancias entre capas laminares.

El análisis PCS de los magnetoliposomas permitió determinar el pequeño tamaño de éstos observado en las microfotografías obtenidas por microscopía electrónica. El tamaño medio y desviación estándar determinado es  $120 \pm 25$  nm, siendo este un tamaño adecuado para la vía de administración parenteral. Adicionalmente este tamaño probablemente posibilitará el transporte de fármacos hasta el lugar de acción (masa tumoral), ya que permite estimar una mayor acumulación de las nanopartículas al

minimizarse los fenómenos de reconocimiento y retirada por el SRE [Decuzzi y cols., 2009].

El procedimiento de síntesis que hemos desarrollado simplifica de manera considerable otros procedimientos propuestos previamente [García-Jimeno y cols., 2011; Giri y cols., 2005; Sabaté y cols., 2008]. En concreto, se evita un paso intermedio que consiste en la obtención de partículas de magnetita de carácter hidrófobo, material que complica las etapas siguientes del proceso (muy difícil manipulación de estas partículas hidrófobas por su tendencia arraigada a formar agregados) y que encarece la síntesis de las nanopartículas. Por tanto, podemos afirmar que el procedimiento propuesto para la obtención de magnetoliposomas es reproducible, sencillo y económico.

Para la obtención de los nanosistemas mixtos, se sintetizaron por triplicado diferentes proporciones PC:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, en concreto, desde 1:4 a 4:1 manteniendo el resto de la metodología como ya se ha indicado. La Tabla 3.2. recoge cada una de las formulaciones ensayadas, rendimientos y tamaños obtenidos, así como el aspecto macroscópico del sobrenadante no magnético. La fórmula seleccionada fue de 4 partes de fosfolípidos por 3 partes de magnetita (4:3). Estas condiciones posibilitan el mayor rendimiento en la obtención de magnetoliposomas y un tamaño idóneo.

Las diferencias más significativas se observaron entre las nanopartículas obtenidas utilizando una relación PC:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:4 y 4:1, en comparación con las otras posibilidades investigadas. Si la relación inicial entre las masas es 1:4, el recubrimiento lipídico de los núcleos magnéticos es bajo. En el caso contrario, cuando la relación es 4:1, las partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> quedaban totalmente englobadas por una matriz liposomal. El análisis de la influencia de esta relación de masas iniciales PC:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sobre el rendimiento de la síntesis, permitió comprobar que éste era máximo para una proporción 4:3 (≈ 68 %), seguido de la proporción 4:2 (≈ 67 %) (Tabla 3.2.). El análisis del tamaño por PCS de cada una de las proporciones

estudiadas permite concluir que la proporción 4:3 presenta el tamaño más bajo con respecto al resto de formulaciones. El rendimiento de la reacción de síntesis fue calculado mediante la ecuación 3:

$$\frac{\text{masa total obtenida de magnetoliposomas (mg)}}{\text{masa total utilizada de material (mg)}} \times 100 \quad (3)$$

PROPORCIÓN DE MASAS INICIALES PC:Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	TAMAÑO MEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR (nm)	RENDIMIENTO (%)	APARIENCIA DEL SOBRENADANTE NO MAGNÉTICO
1:4	171 ± 15	16	Marrón oscuro
2:4	170 ± 14	19	Marrón claro
3:4	220 ± 67	40	Marrón anaranjado
4:4	317 ± 33	45	Amarillento oscuro
<b>4:3</b>	<b>120 ± 25</b>	<b>68</b>	<b>Transparente</b>
4:2	337 ± 54	67	Anaranjado oscuro
4:1	303 ± 26	42	Anaranjado claro

**Tabla 3.2.** Tamaño medio en diámetro ± desviación estándar (nm), rendimiento (%) de la reacción de síntesis y apariencia del sobrenadante no magnético de magnetoliposomas para cada una de las proporciones de masas iniciales PC:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Desde 1:4 hasta 4:1.

En estudios anteriores, donde fueron utilizadas matrices poliméricas, ha sido puesto de manifiesto [Arias y cols., 2001, 2006, 2008d] que cuando hay un exceso en la cantidad de núcleos magnéticos utilizados con respecto a la masa del material de recubrimiento, como ocurre en el caso de la proporción 1:4 (PC:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), puede esperarse que un gran número de nanopartículas de magnetita quede sin recubrir por parte del material lipídico (sin formar parte de los magnetoliposomas) y, por su particular carácter superparamagnético, permanecerán en el sobrenadante de la suspensión en lugar de formar parte del sedimento magnético atraído por el imán. Lo anteriormente comentado, puede ser extrapolado para nanopartículas magnéticas recubiertas por lípidos. En estas condiciones, el sobrenadante no magnético presenta un característico color marrón oscuro (indicativo de la presencia de estos

núcleos superparamagnéticos). Por el contrario, si la relación es 4:1 (PC:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), el sobrenadante no magnético obtenido es anaranjado claro, consecuencia de la formación de liposomas puros en exceso [Chen y cols., 2010]. Además, de acuerdo con lo observado en estudios anteriores [Arias y cols., 2001, 2006, 2008c, d], a medida que se incrementa la cantidad de material de recubrimiento con respecto a la masa de magnetita, el grosor del recubrimiento de los núcleos magnéticos tiende a ser algo mayor. Esto podría tener como consecuencia una mayor vehiculización de fármaco, debido al aumento de compartimentos acuosos formados que se formarían al aumentar el número de bicapas lipídicas. El hecho de que el sobrenadante de las nanopartículas compuestas obtenidas con la relación 4:3 sea transparente, hace pensar que todo el material utilizado en la formulación de magnetoliposomas ha sido transformado en estas nanopartículas magnéticas. De hecho, el rendimiento es  $\approx 68\%$  (Tabla 3.2.). En el caso donde hay exceso de nanopartículas de magnetita sobre el fosfolípido (en concreto, en la relación 3:4) todo el material lipídico forma parte del recubrimiento de los núcleos de magnetita. No obstante, el exceso de magnetita hace que haya núcleos magnéticos no recubiertos quedando individualizados y suspendidos en el medio de dispersión. Este hecho da lugar a un rendimiento de síntesis más bajo y tamaño mayor con respecto al obtenido en la síntesis 4:3.

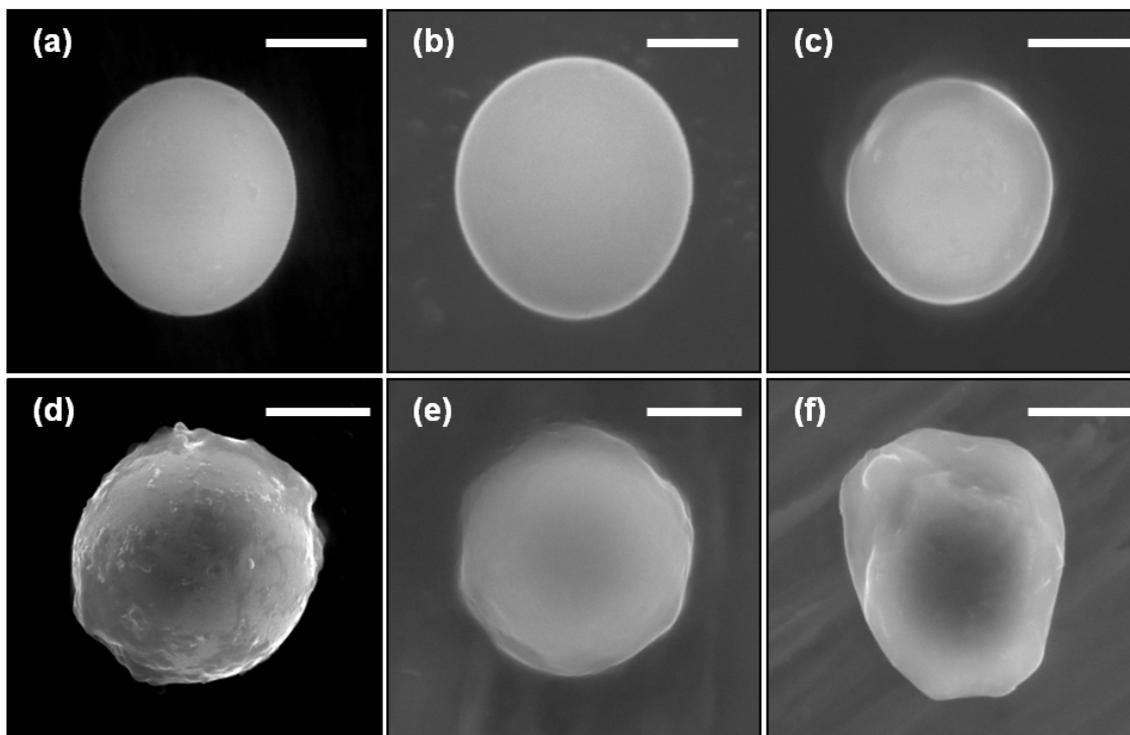
Por último, se analizó la estabilidad de las formulaciones elaboradas de liposomas y magnetoliposomas en base a su geometría. Los ensayos se realizaron a los 0, 7, 15, 30, 60 y 90 días. Se realizó un análisis PCS de las suspensiones y microfotografías TEM, en el caso de liposomas (Figura.3.28.) y magnetoliposomas (Figura. 3.29.), y microfotografías eSEM en el caso de liposomas (Figura. 3.27.) tras 90 días desde su preparación. Los resultados del análisis PCS se recogen en la Tabla 3.3.

MATERIAL	TAMAÑO ( $\pm$ DESVIACIÓN ESTÁNDAR) (nm)					
	Tiempo: 0 días	Tiempo: 7 días	Tiempo: 15 días	Tiempo: 30 días	Tiempo: 60 días	Tiempo: 90 días
Liposoma	635 $\pm$ 310	400 $\pm$ 85	348 $\pm$ 91	507 $\pm$ 150	401 $\pm$ 200	284 $\pm$ 19
Magnetoliposoma	105 $\pm$ 15	115 $\pm$ 70	143 $\pm$ 49	171 $\pm$ 45	192 $\pm$ 94	225 $\pm$ 53

**Tabla 3.3.** Evolución temporal del tamaño de partícula en liposomas y magnetoliposomas.

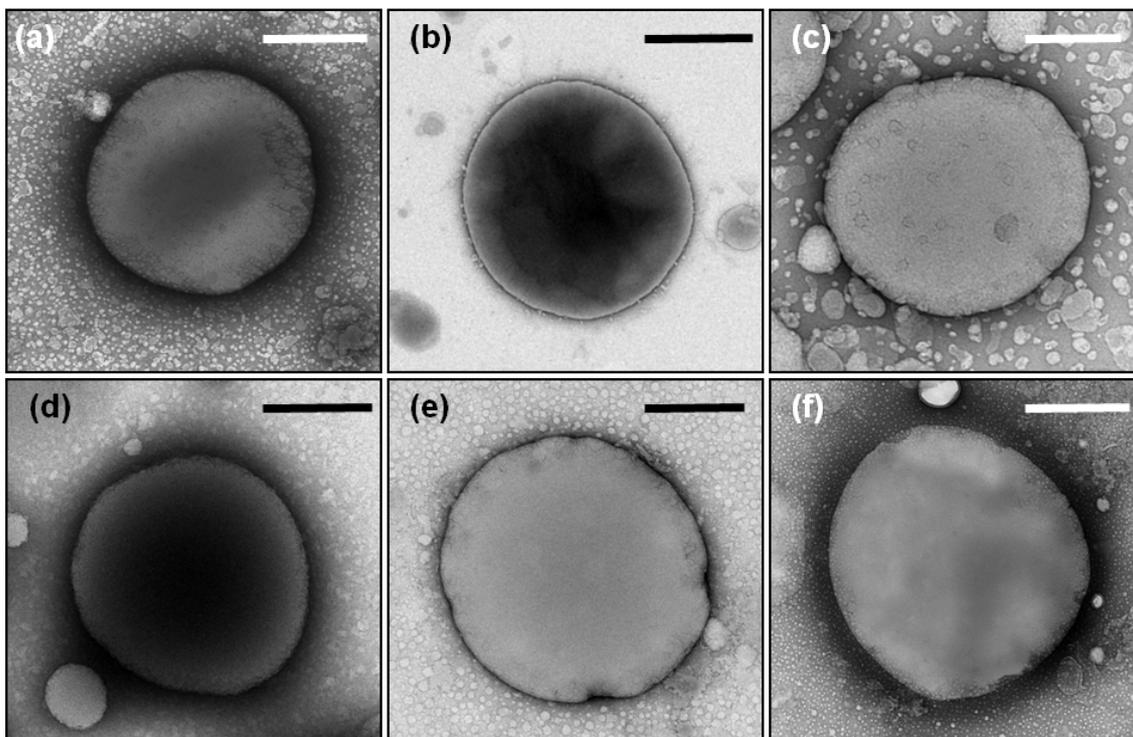
Si bien los núcleos de magnetita, mantienen su tamaño durante este período de tiempo, no ocurre lo mismo en el caso de los otros dos tipos de partículas. Mientras que en los liposomas va disminuyendo el tamaño de partícula a lo largo de los 90 días de estudio, en los magnetoliposomas ocurre todo lo contrario. Este cambio en el tamaño de los magnetoliposomas puede condicionar su eficacia *in vivo* [Decuzzi y cols., 2009].

En ambos nanosistemas la distribución de tamaños es heterogénea como consecuencia del fenómeno de agregación, pese a ello, el valor del índice de polidispersión fue inferior a 0.5.



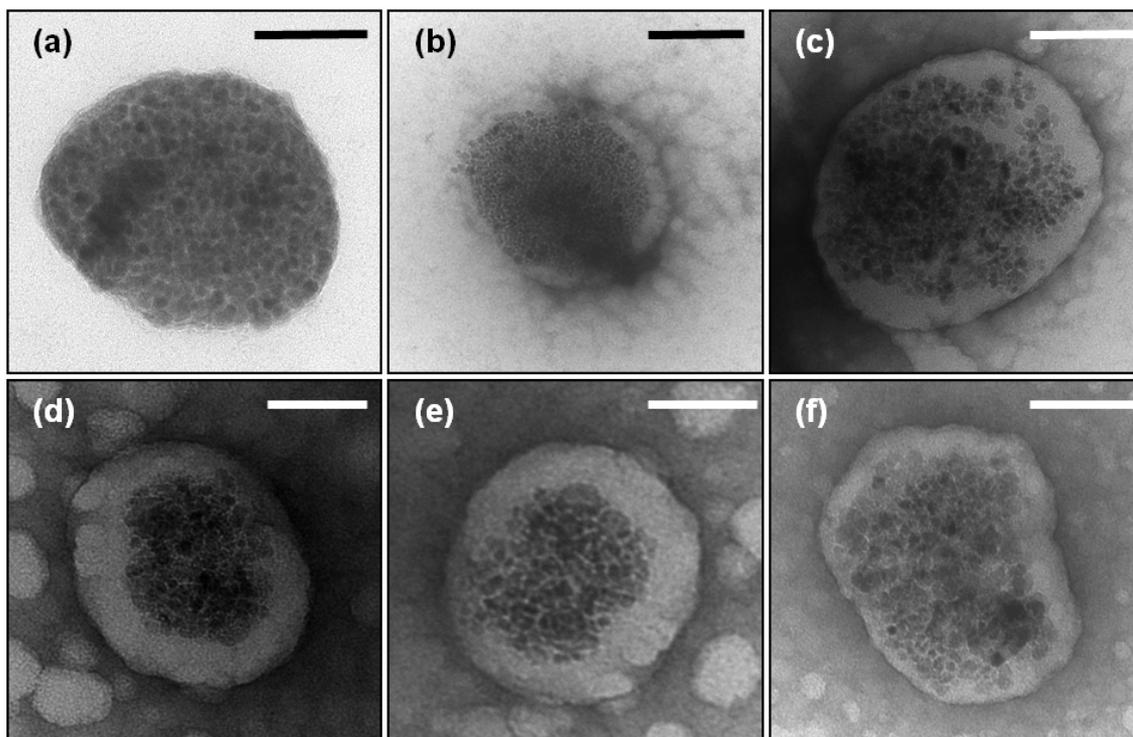
**Figura 3.27.** Microfotografías eSEM de la evolución temporal de la morfología de liposomas a diferentes tiempos tras la síntesis: (a) 0 días, (b) 7 días, (c) 15 días, (d) 30 días, (e) 60 días, (f) 90 días. Longitudes de barra: (a) y (b) 400 nm, (c) 300 nm, (d) 500 nm, (e) y (f) 300 nm.

Como puede apreciarse en las microfotografías eSEM de liposomas, estos sufren un acusado cambio en su morfología a lo largo del periodo de estudio. Tras 24 horas después de su elaboración, los liposomas muestran una morfología esférica (Figura 3.27. a) propia de una estructura vesicular compuesta por fosfolípidos [Clares y cols., 2013], la cual se mantiene hasta el día 15, a partir del cual comienza a apreciarse una superficie irregular, llegando incluso a perder la forma esférica transcurridos 90 días desde la síntesis (Figura 3.27. f).



**Figura 3.28.** Microfotografías TEM de de la evolución temporal de la morfología de liposomas a diferentes tiempos tras la síntesis: (a) 0 días, (b) 7 días, (c) 15 días, (d) 30 días, (e) 60 días, (f) 90 días. Longitudes de barra: (a) y (b) 500 nm, (c) 300 nm, (d) 200 nm, (e) y (f) 300 nm.

Al contrario que los liposomas, para los magnetoliposomas la morfología se mantiene durante mucho más tiempo (Figura 3.29.) llegando a presentar una forma y superficie similar a la inicial a los 60 días tras su elaboración (Figura 3.29. e). No obstante es significativo el engrosamiento sufrido por la pared lipídica a medida que transcurre el tiempo.



**Figura 3.29.** Microfotografías TEM de la evolución temporal de la morfología de magnetoliposomas a diferentes tiempos tras la síntesis: (a) 0 días, (b) 7 días, (c) 15 días, (d) 30 días, (e) 60 días, (f) 90 días. Longitudes de barra: (a), (b) y (c) 50 nm, (d) 75 nm, (e) 50 nm y (f) 75 nm.

## **3.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA**

### **3.2.1. DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X**

La difracción de rayos X permite definir la estructura interna de un cristal y evaluar el tipo de red cristalina que lo caracteriza. A nivel farmacéutico, esta técnica presenta una serie de aplicaciones [Billmeyer, 1975; Suryanarayanan, 1995], como *a)* el análisis cualitativo de materiales sólidos, basado esencialmente en la identificación de estructuras sólidas. Dicha aplicación es posible, debido a que cada forma cristalina de

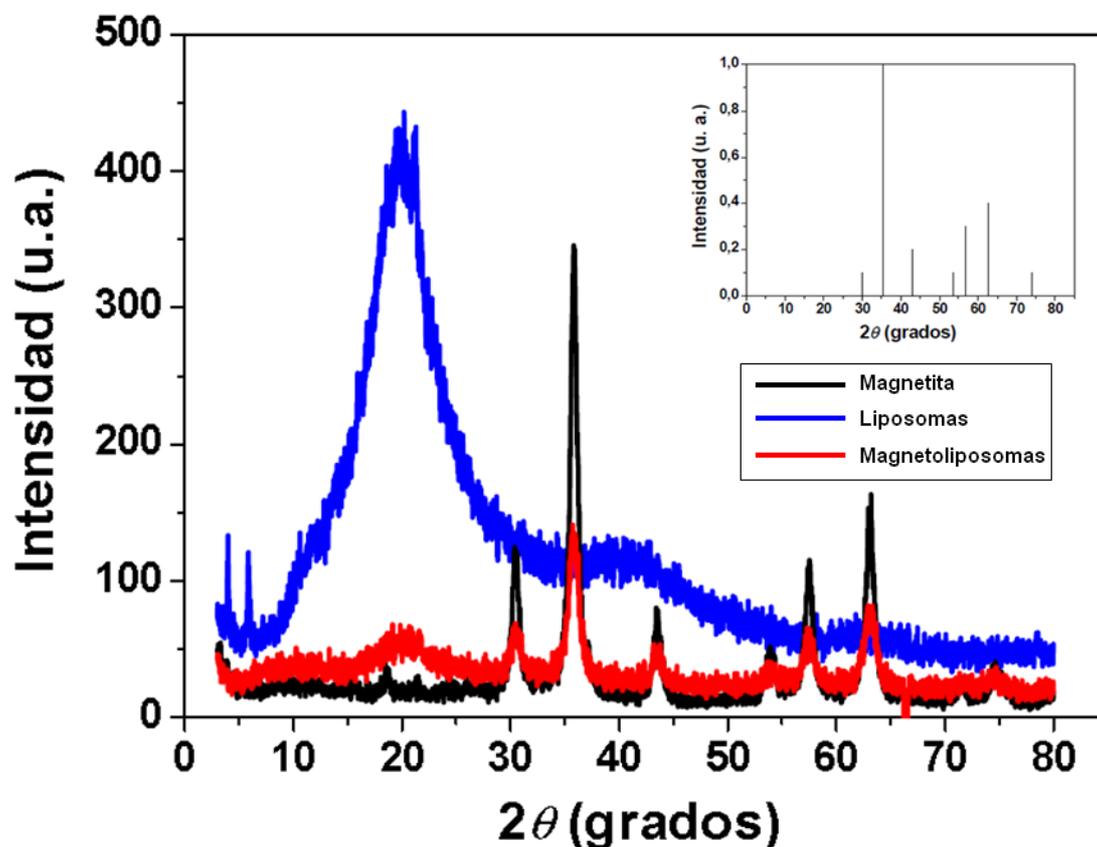
un compuesto es única, lo que hace que esta metodología sea especialmente útil, para la identificación de las diferentes formas polimórficas de un compuesto. El tratamiento de preformulación de sólidos algunas veces genera una estructura inactiva farmacológicamente. Es por ello que es importante confirmar las estructuras cristalinas en cada etapa de una formulación durante el proceso de desarrollo. Esta técnica también puede ser utilizada para identificar las formas solvatadas y no solvatadas (anhidras) de un compuesto, si redes cristalinas de las dos formas son diferentes. Sin embargo, esta técnica tiene una escasa utilidad en la identificación de materiales no cristalinos (amorfos). Además, esta técnica permite realizar un *b*) análisis cuantitativo de materiales sólidos, gracias a que en una mezcla de sólidos cristalinos de interés farmacéutico, cada uno de los componentes de la mezcla tiene un patrón de difracción característico, independiente del resto de sólidos. Tras realizar las correcciones apropiadas, la intensidad de los picos de cada uno de los componentes será proporcional a la fracción de peso de ese componente en la mezcla total. De esta manera, puede determinarse en qué cantidad se encuentra un determinado producto en una mezcla de sólidos farmacéuticos. Este análisis puede realizarse con un estándar interno o sin él. Otra aplicación importante que presenta esta técnica es la determinación del *c*) grado de cristalinidad de productos farmacéuticos, en especial de los polímeros. Muchos de ellos muestran características típicas de materiales cristalinos como la evolución con el tiempo del calor latente al enfriar el polímero fundido, pero también propias de los materiales no cristalinos como el patrón de rayos X difuso. Este comportamiento se puede explicar mediante el modelo de los dos estados. Este modelo indica que los materiales poliméricos están constituidos por pequeñas, aunque perfectas, regiones cristalinas (cristalitos) que están embebidas dentro de una matriz continua. La metodología de rayos X asume implícitamente este modelo. Por último, con este método de caracterización puede explicarse la *d*) cinética de reacciones en estado sólido, puede ser posible caracterizar de forma fiable la cinética con la que transcurren reacciones en el estado sólido si el patrón de rayos X del reactivo y el producto final de la reacción son diferentes.

En este trabajo de investigación, el empleo de la difracción de rayos X tiene como objetivo el análisis cualitativo de los tres tipos de materiales sintetizados. Para obtener datos reproducibles y fiables, es importante cuidar la preparación de la muestra. Los puntos críticos son el tamaño cristalino, la orientación preferida de la muestra en el soporte y, la coplanaridad de la muestra y el soporte superficial. Al depositar la muestra pulverizada sobre el soporte de rayos X, la distribución de las orientaciones del cristal puede que no se produzca al azar, ocurriendo lo que se conoce como la distribución preferida de la muestra. La manera en que la muestra es depositada sobre el soporte puede afectar a la orientación de los cristalitos con lo que puede ejercer un efecto negativo en el análisis del material. Para solventar en la medida de lo posible este fenómeno, los soportes más comúnmente utilizados son platos rectangulares de aluminio y de vidrio, que contienen una ventana rectangular en la que se empaqueta el polvo.

Los difractogramas de rayos X de los tres tipos de materiales (magnetita, liposomas y magnetoliposomas) fueron realizados mediante el método de Debye-Scherrer. El dispositivo utilizado fue un difractómetro Philips PW 1710 (Holanda) y la longitud de onda fue  $1.5405 \text{ \AA}$  (Cu-K $\alpha$ ). La masa empleada en el estudio fue la misma para todos los materiales ( $\approx 0.5 \text{ g}$ ). Estas muestras se obtuvieron mediante desecación de las correspondientes suspensiones acuosas a  $35.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  en una estufa de desecación con circulación forzada de aire [Digitronic, J.P. Selecta S.A., España].

En la Figura 3.30. se recogen los difractogramas obtenidos para la magnetita, liposomas y magnetoliposomas. Al comparar los difractogramas de la magnetita y los magnetoliposomas con el patrón de la *American Society for Testing and Materials* (patrón ASTM) de la magnetita (ver imagen insertada en la Figura 3.30.), se comprueba la perfecta coincidencia de las líneas de estos difractogramas con las del patrón, lo que permite identificar las nanopartículas de magnetita sintetizadas y apreciar la elevada cristalinidad de ésta (tamaño de grano  $\approx 300 \text{ \AA}$ ), incluso tras ser embebida en la estructura vesicular. Las características no cristalinas (amorfas) típicas de los liposomas

quedan reflejadas ligeramente en el difractograma de los magnetoliposomas, si bien no aparece una señal pronunciada. Pensamos que esto es debido al menor contenido lipídico presente en los magnetoliposomas para la misma masa de muestra que los liposomas. Por lo tanto, la difracción de rayos X nos permite constatar la presencia de ambos materiales (magnetita y liposomas) en la muestra de magnetoliposomas. De esta manera, esta técnica constituye una prueba cualitativa de la eficacia de la metodología de síntesis de magnetoliposomas. Otro aspecto muy importante como se ha indicado, es que la técnica permite comprobar que los magnetoliposomas presentan la estructura cristalina típica de la magnetita, la cuál debe asegurar una excelente capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados.



**Figura 3.30.** Difractograma de rayos X de las nanopartículas de magnetita (línea negra), liposomas (línea azul) y magnetoliposomas (línea roja). Figura insertada: Patrón ASTM de difracción de rayos X de la magnetita. La intensidad está expresada en unidades arbitrarias (u.a.).

### 3.2.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER

La radiación infrarroja se encuentra localizada en el espectro electromagnético entre la zona de la radiación visible y la zona de la radiación de microondas. Como es bien sabido, un gran número de moléculas orgánicas de interés farmacéutico absorben la radiación infrarroja en el intervalo de números de onda entre  $4000$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  en energía de vibración molecular. Esta absorción es cuantificable y el espectro aparece en forma

de bandas, ya que un cambio simple de energía vibracional es acompañado por diversos cambios de energía rotacional. Las posiciones de las bandas en el espectro de infrarrojos se suelen presentar en función del número de onda ( $\kappa$ ). Las intensidades de las bandas pueden expresarse como transmitancia ( $T$ ) o absorbancia ( $A$ ).

Hay dos tipos de vibraciones moleculares [Silverstein y Webster, 1998]: la vibración de elongación y la vibración de flexión. Sólo aquellas vibraciones que provocan un cambio rítmico en el momento bipolar de la molécula se observan en el infrarrojo. Esto es debido a que la alternancia del campo eléctrico, producido por el cambio en distribución de cargas que acompaña a una vibración, acopla la vibración de la molécula con el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética. En general, los grupos funcionales que tienen un dipolo intenso dan lugar a absorciones fuertes en el infrarrojo. El conjunto de vibraciones fundamentales (frecuencias de absorción) raramente se observará debido a la existencia de factores que aumentan el número de bandas (la presencia de armónicos y los tonos de combinación) y de factores que reducen el número de bandas (frecuencias fundamentales fuera de la región de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , bandas fundamentales demasiado débiles para ser observadas, ausencia de un cambio en el momento dipolar, etc.).

Por tanto, el objetivo de este ensayo es analizar los tres tipos de sistemas coloidales (magnetita, liposomas y magnetoliposomas) para dotar a nuestra investigación de una nueva prueba de la eficacia de la metodología de síntesis de magnetoliposomas. Más concretamente, los magnetoliposomas deben tener un espectro de infrarrojos en el que aparezcan las bandas características de los liposomas, junto con la banda propia de la magnetita. De ser esto así, quedará demostrado que los magnetoliposomas están constituidos por magnetita y liposomas. Para la preparación de las muestras a analizar tras la síntesis de las suspensiones acuosas de las nanopartículas, estas fueron sometidas a desecación a  $35.0 \pm 0.5$  °C en un horno de desecación por convección [Digitronic, J.P. Selecta S.A., España]. A continuación, se tomó una pequeña cantidad de material sólido (0.5 mg - 1.0 mg) y se mezcló con 100 mg de bromuro potásico (KCl) pulverizado y

seco. La mezcla se realizó en un mortero de ágata y fue prensada a 10000 - 15000 kPa para obtener un disco transparente. Como consecuencia de este tratamiento, es de esperar la aparición de bandas en el espectro de infrarrojos en torno a  $3450\text{ cm}^{-1}$  y  $1640\text{ cm}^{-1}$  debido a la humedad [Silverstein y Webster, 1998]. Para la obtención del interferograma se utilizó un espectrómetro de infrarrojos [Nicolet 20 SXB, EE.UU.], con una resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$ . La técnica implica la división de una radiación que contiene todas las longitudes de onda (en nuestro caso:  $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ ) en dos rayos [Silverstein y Webster, 1998]. Uno tiene un camino óptico fijo y el otro variable (mediante un espejo móvil). La superposición de los rayos dará lugar a un patrón de interferencias que por transformada de Fourier se convierte en un punto en el dominio de la frecuencia. La transformada de Fourier a sucesivos puntos a lo largo de esta variación da lugar a un espectro de infrarrojos completo cuando la radiación pasa a través de la muestra, lo que hace que el material a analizar quede expuesto a una banda amplia de energías.

Como se ha comentado previamente, el objetivo de este estudio es confirmar cualitativamente la formación de los magnetoliposomas. No se pretende una caracterización exhaustiva de los materiales estudiados, ya que para ello sería necesario utilizar esta técnica analítica junto con la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear. Es bien sabido, que sólo con el análisis de todos estos resultados es posible determinar la estructura molecular de un material. En referencia a la interpretación de un espectro de infrarrojos no hay reglas establecidas para ello. Sin embargo, sí existen ciertos requisitos previos [Silverstein y Webster, 1998]:

- El espectro debe tener una resolución y una intensidad adecuadas, y debe ser el de un compuesto razonablemente puro.
- El espectrofotómetro debe estar calibrado.

- El método de manipulación de la muestra debe estar perfectamente definido.

La frecuencia o la longitud de onda de absorción dependen de las masas relativas de los átomos de la molécula, de las constantes de fuerza de los enlaces entre éstos, de la geometría de los átomos y del entorno molecular. Una molécula por simple que sea puede generar un espectro extremadamente complejo, que es característico de la molécula entera (excepto en el caso de los compuestos enantiómeros). Existe una gran dificultad a la hora de realizar un tratamiento preciso de las vibraciones de una molécula compleja, por este motivo, el espectro de infrarrojos debe interpretarse a partir de la comparación empírica y la extrapolación a estudios de moléculas sencillas, ya que determinados grupos de átomos dan lugar a bandas de igual o similar frecuencia independientemente de la estructura del resto de la molécula. La persistencia de estas bandas características permite la obtención de información estructural, mediante simple inspección y comparación con tablas de referencias que recogen la absorción característica de grupos funcionales. No obstante, toda conclusión alcanzada tras examinar una banda debe confirmarse cuando sea posible mediante el examen de otras zonas del espectro.

De forma general, en un espectro de infrarrojo se distinguen tres zonas características [Silverstein y Webster, 1998]:

- La región de los grupos funcionales (de 4000 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ ) de la molécula. Generalmente, si no hay absorción en esta zona podría considerarse que la molécula problema carece de grupos funcionales.
- La zona de la *huella dactilar* (de 1300 a 900  $\text{cm}^{-1}$ ). La absorción en esta región es única y característica para cada especie molecular.

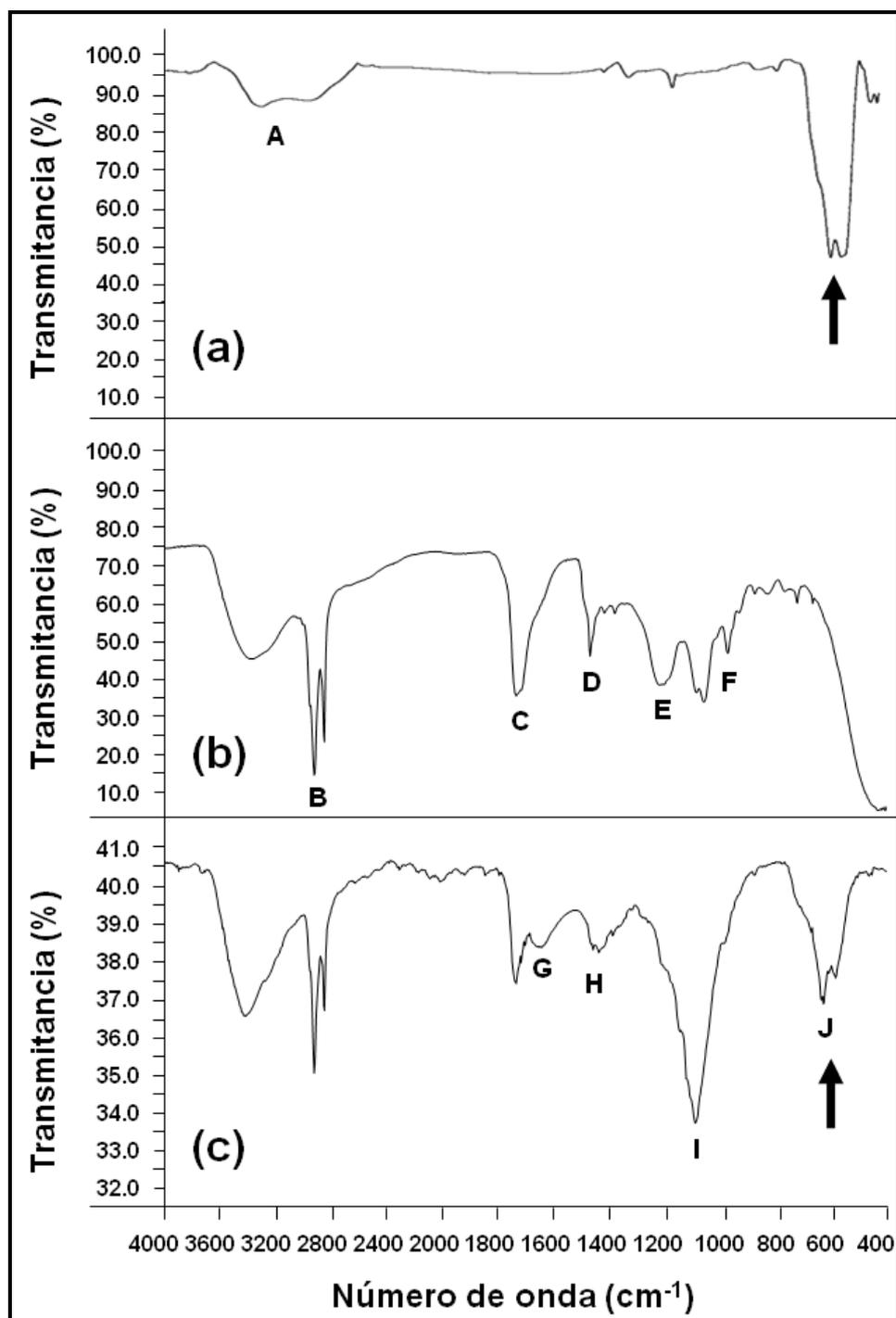
- La región entre 900 y 650  $\text{cm}^{-1}$ . La ausencia de absorción en esta zona generalmente indica una estructura no aromática.

La Figura 3.31. recoge el espectro de infrarrojos de los tres tipos de nanopartículas (magnetita, liposomas y magnetoliposomas). Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento ya que permite la identificación de los grupos funcionales de los liposomas en los magnetoliposomas. Es decir, las bandas típicas del liposoma y la característica de las nanopartículas de magnetita están presentes en el espectro de los magnetoliposomas. Sin embargo, las bandas son menos intensas como consecuencia de la menor cantidad relativa de lípidos presentes en las vesículas mixtas.

En concreto, las bandas observadas son:

- **A:** banda debida a la humedad que adquieren las muestras como consecuencia de su proceso de manipulación. Se localiza a 3420  $\text{cm}^{-1}$ .
- **B:** grupo de dos bandas que corresponden a la vibración de estiramiento de enlaces C-H. A 2922  $\text{cm}^{-1}$  se localiza la banda característica de la vibración de elongación asimétrica del grupo  $\text{CH}_2$  ( $\nu_{\text{AS}} \text{CH}_2$ ) y a 2852  $\text{cm}^{-1}$  observamos la perteneciente a la vibración de elongación simétrica del  $\text{CH}_2$  ( $\nu_{\text{S}} \text{CH}_2$ ).
- **C:** banda que corresponde a la vibración molecular de enlaces C=O en liposomas (aparece a 1732  $\text{cm}^{-1}$ ). En el espectro de magnetoliposomas aparece a 1734  $\text{cm}^{-1}$ .
- **D:** banda que corresponde a la vibración de estiramiento de grupos alquenos (C=C) en liposomas ( $\approx 1500 \text{ cm}^{-1}$ ).
- **E:** banda correspondiente a la vibración de flexión de enlaces C-H (aparece a 1219  $\text{cm}^{-1}$ ).

- **F:** banda correspondiente a la vibración de estiramiento de enlaces C-N (aparece a  $972\text{ cm}^{-1}$ ).
- **G:** banda debida a la humedad que adquiere la muestra como consecuencia de su proceso de manipulación. Se localiza a  $1622\text{ cm}^{-1}$  [Giri y cols., 2005].
- **H:** banda que corresponde a la vibración de flexión asimétrica del  $\text{CH}_2$  ( $\nu_{\text{AS}} \text{CH}_2$ ) en los liposomas (aparece a  $1465\text{ cm}^{-1}$ ). En magnetoliposomas aparece a  $1435\text{ cm}^{-1}$ .
- **I:** banda intensa localizada a  $1088\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de tensión de enlaces P=O en grupos óxidos de fosfina por la presencia de grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en magnetoliposomas. En liposomas aparecen a  $1085\text{ cm}^{-1}$  [Giri y cols., 2005].
- **J:** banda ausente en el espectro de los liposomas. Aparece a  $626\text{ cm}^{-1}$  y es una banda ancha e intensa característica de la absorción en la magnetita [Lyon, 1967]. Se trata de la frecuencia “Restrahl” (o rayo residual), de máxima absorbancia de cristales iónicos (o parcialmente iónico) en el infrarrojo [Gartstein y cols., 1986].



**Figura 3.31.** Espectro de infrarrojos de las nanopartículas de magnetita (a), liposomas (b) y magnetoliposomas (c). Las flechas resaltan la única banda ausente en el espectro de los liposomas, y que es característica de los óxidos de hierro.

## **Capítulo 4.**

# **PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES**



Si consideremos una partícula sólida esférica de 1 cm de diámetro, su superficie  $S$  y su volumen  $V$  son  $3.14 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$  y  $5.24 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3$ , respectivamente, y la relación superficie/volumen es  $S/V \approx 600 \text{ m}^{-1}$ . La división de la partícula en  $N$  partículas esféricas de radio 100 nm tal que su volumen total sea igual al de la esfera original, sin embargo, provocará que la superficie sea de  $15.7 \text{ m}^2$  y la relación  $S/V \approx 3 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$ . Este sencillo ejemplo explica que la principal contribución a las propiedades de un sistema, formado mediante la dispersión de esas  $N$  partículas en 1 L de agua, vendrá dada por las superficies e interfaces de las partículas. En particular, el estado eléctrico de la superficie de las partículas puede ser determinante: si cada una de ellas tiene un potencial superficial de 100 mV (en torno al orden de magnitud típico de las partículas coloidales en medio acuoso), la fuerza electrostática repulsiva ( $F^{\text{EL}}$ ) entre dos de estas partículas dispersas en agua y localizadas a una distancia entre superficies de 10 nm es  $2.12 \cdot 10^{-12} \text{ N}$ . Esta fuerza tiene que compararse con la fuerza de otras interacciones que deben o pueden existir entre ellas. Así, su atracción gravitatoria ( $F^{\text{G}}$ ) a la misma distancia será  $6.3 \cdot 10^{-15} \text{ N}$ , si su densidad es  $10^3 \text{ Kg/m}^3$ ; y la fuerza de van der Waals ( $F^{\text{LW}}$ )  $8 \cdot 10^{-13} \text{ N}$ , utilizando los valores típicos de la constante de Hamaker [Hunter, 1987, van Oss, 2006]. Estos ejemplos muestran que, en la mayoría de los casos, las interacciones electrostáticas son las principales responsables de las propiedades macroscópicas de las suspensiones.

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

la calidad y eficiencia del recubrimiento para las diferentes proporciones de masa ensayadas PC:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (1:4 a 4:1). Esto es posible dado que las propiedades eléctricas superficiales de la magnetita y del liposoma son claramente diferentes, como veremos. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que los núcleos de óxido de hierro adecuadamente embebidos en la estructura lipídica puedan ser diferenciados de los no recubiertos, analizando su comportamiento electroforético. Idealmente, el magnetoliposoma sintetizado debería incluso mostrar un potencial zeta idéntico al de un liposoma.

Dada la sensibilidad de la electroforesis a las características de la interfase, esta técnica puede ser útil para analizar el proceso de degradación de la estructura lipídica que recubre a la magnetita en los magnetoliposomas sintetizados. Algunos estudios han sido llevado a cabo para estudiar el fenómeno de degradación en una estructura polimérica como material de recubrimiento de núcleos de óxidos de hierro [Arias y cols., 2001; Delgado, 2002]. Por tanto también se analizará la evolución temporal de la movilidad electroforética de magnetoliposomas, como método de seguimiento de la degradación del recubrimiento fosfolipídico.

### **4.1. DESCRIPCIÓN CLÁSICA DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA**

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

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

Puede darse la posibilidad de que participe más de un mecanismo, en cualquiera de los casos, la carga neta superficial debe estar compensada por iones en torno a la partícula de modo que se mantenga la electroneutralidad del sistema. La carga superficial y su contracarga compensadora en disolución forman la doble capa eléctrica (DCE). A pesar de utilizarse la palabra doble, la estructura de esta capa puede ser muy compleja, no totalmente resuelta en la mayoría de los casos, y puede contener tres o más capas, que se extienden a lo largo de distancias variables desde la superficie del sólido. Cerca de la superficie del sólido o sobre ella, se pueden encontrar cargas responsables de la carga superficial ( $\sigma_0$ ). En su proximidad inmediata, podrían localizarse los iones capaces de sufrir adsorción específica: la distancia al sólido será del orden de un radio iónico, dado que se puede suponer que han perdido su capa de hidratación, al menos en la dirección de la superficie del sólido. Llamemos  $\sigma_i$  a la carga superficial en un determinado plano de átomos, localizados a una distancia  $\beta_i$  desde el sólido (Figura 4.1.). Si aceptamos que la interfase tiene una geometría plana, y que  $x$  es la distancia

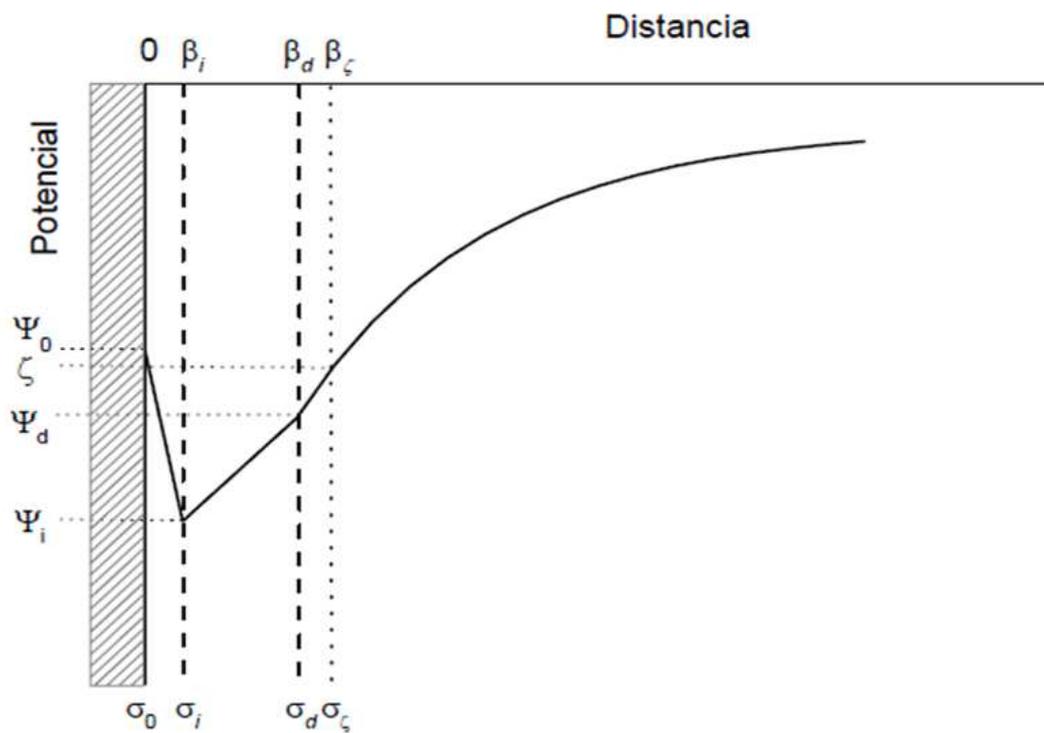
## Capítulo 4. Propiedades Eléctricas Superficiales

---

externa normal a esta, podemos decir que la región entre  $x = 0$  y  $x = \beta_i$  está libre de carga, y podemos identificar un condensador cuyas placas son la superficie y el plano  $\beta_i$ . Si  $C_i$  es su capacidad específica (por unidad de área):

$$\Psi_0 - \Psi_i = \frac{\sigma_0}{C_i} \quad (4)$$

donde  $\psi_0$  es el potencial en la superficie del sólido. Los iones responsables de  $\psi_i$  no sólo desarrollarán interacciones electrostáticas con la superficie, sino que, a menudo superan la repulsión eléctrica y son capaces, por ejemplo, de aumentar la carga positiva de una superficie de carácter ya positivo. Es habitual decir que las interacciones desconocidas son de naturaleza química, a pesar de que este no es siempre el caso. Hay una amplia variedad de situaciones, desde la formación de uniones químicas (covalentes) a interacciones más débiles como la atracción de van der Waals, los enlaces por puentes de hidrógeno, las fuerzas hidrófobas-hidrófilas, etc. [Lyklema, 1987]. Debido a la ausencia habitual de información sobre la parte más interna de la atmósfera iónica, el tratamiento a menudo no está exento de hipótesis y suposiciones más o menos realistas.



**Figura 4.1.** Distribución del potencial en una interfase sólido-líquido cargada negativamente.

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

$$\sigma_d = \int_{\beta_d}^{\infty} \rho(x) dx \quad (5)$$

para una interfase plana, o:

$$\sigma_d = \frac{1}{(a + \beta_d)^2} \int_{\beta_d}^{\infty} r^2 \rho(r) dr \quad (6)$$

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

Debido a la electroneutralidad:

$$\sigma_0 = -\sigma_i - \sigma_d \quad (7)$$

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

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

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

$$-e z_i \nabla \psi - k_B T \nabla \ln n_i = 0, \quad i = 1, \dots, N \quad (8)$$

donde el primer término corresponde a la fuerza electrostática sobre los iones  $i$  (carga  $ez_i$ , concentración  $n_i$ ) y el segundo es la fuerza termodinámica. La integración de la ecuación 8 bajo la condición  $n_i = n_i^0(\infty)$  para  $\psi = 0$ , da lugar a la distribución de Boltzmann:

$$n_i(\vec{r}) = n_i^0(\infty) \exp[-ez_i\psi(\vec{r})/k_B T], \quad i = 1, \dots, N \quad (9)$$

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

$$\nabla^2 \psi(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0} \rho(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0} \sum_{i=1}^N ez_i n_i^0(\infty) \exp\left[-\frac{ez_i\psi(\vec{r})}{k_B T}\right] \quad (10)$$

siendo  $\epsilon_{rs}\epsilon_0$  la permisividad eléctrica del medio de dispersión. La ecuación 10 (ecuación de Poisson-Boltzmann) es el punto de partida de la descripción de Gouy-Chapman de la capa difusa.

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

❖ Una interfase plana con potencial bajo. Donde:

$$\psi = \psi_d e^{-\kappa x} \quad (11)$$

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

$$\kappa^{-1} = \left\{ \frac{\epsilon_{rs} \epsilon_0 k_B T}{\sum_{i=1}^N e^2 z_i^2 n_i^0(\infty)} \right\}^{1/2} \quad (12)$$

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

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

$$y(x) = 2 \ln \left[ \frac{1 + e^{-\kappa x} \tanh(y_d / 4)}{1 - e^{-\kappa x} \tanh(y_d / 4)} \right] \quad (13)$$

donde  $y$  es el potencial adimensional:

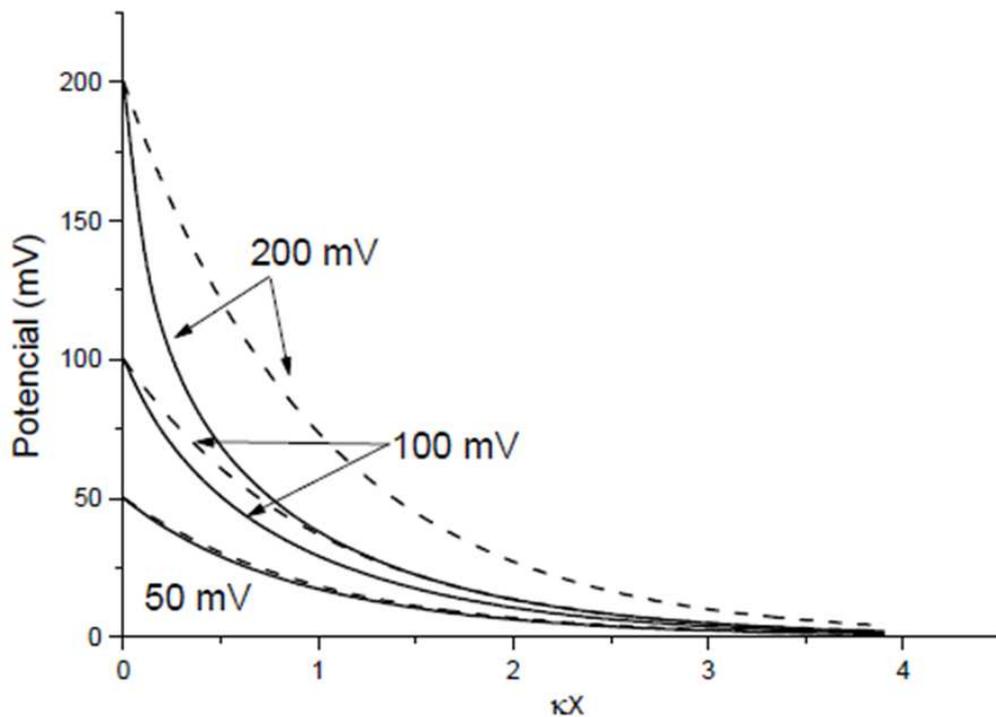
$$y = \frac{ze\Psi}{k_B T} \quad (14)$$

y puede darse una expresión similar para  $y_d$ .

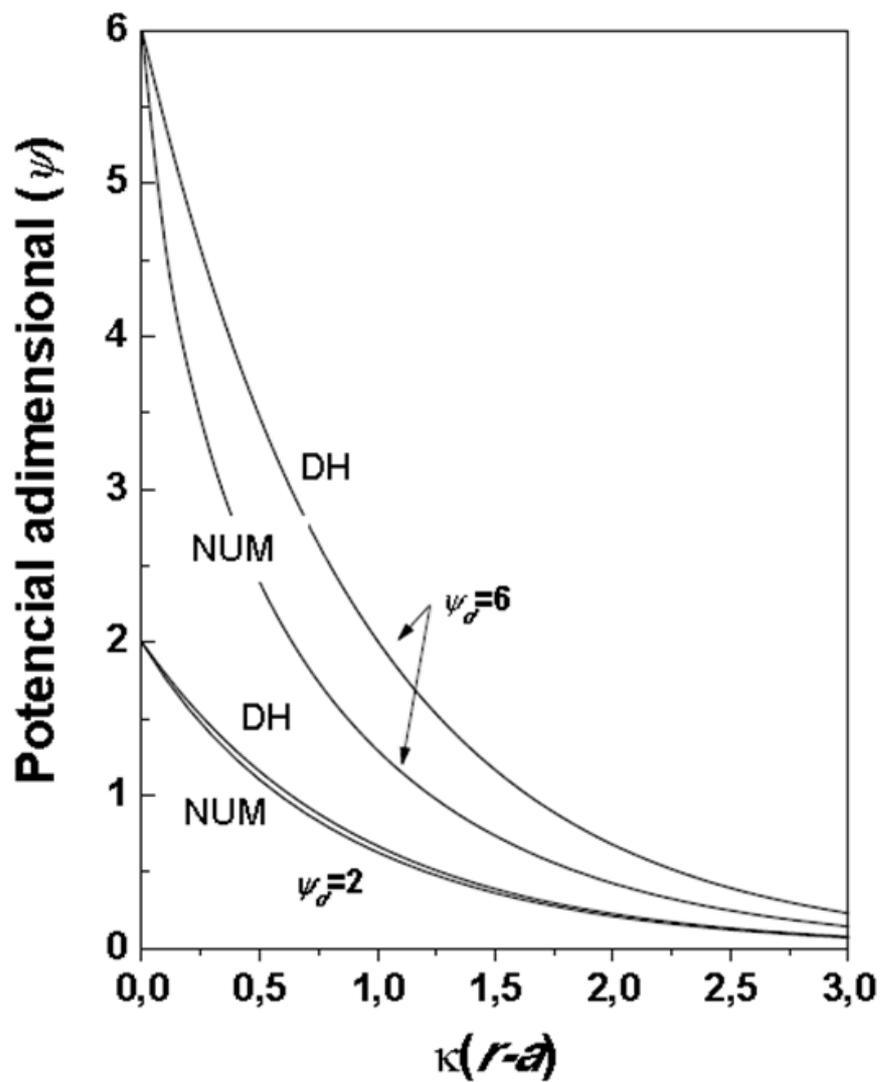
- ❖ Una interfase esférica de radio  $a$ , a potenciales bajos (aproximación de Debye):

$$\psi(r) = \psi_d \left( \frac{a}{r} \right) e^{-\kappa(r-a)} \quad (15)$$

mientras que deben aplicarse soluciones numéricas o expresiones analíticas aproximadas en otros casos. Esto es ilustrado en la Figura 4.2., donde se comparan las ecuaciones 11 y 13 para la interfase plana; y en la Figura 4.3., donde la solución aproximada (ecuación 13), se representa junto a resultados numéricos [López-García y cols., 1996].



**Figura 4.2.** Distribución del potencial en una interfase plana para electrolitos monovalentes calculado mediante la fórmula aproximada de Debye-Hückel (ecuación 11, ---) y el cálculo completo (ecuación 13, -) para los valores de  $\psi_d$  indicados.



**Figura 4.3.** Potencial adimensional ( $\psi$ ) en torno a una partícula esférica en función de la distancia reducida a la superficie para electrolitos monovalentes. *DH*: aproximación de Debye-Hückel; *NUM*: cálculo totalmente numérico  
[Russel y cols., 1989].

## 4.2. FENÓMENOS ELECTROKINÉTICOS.

### POTENCIAL ZETA

Supongamos que se aplica un campo eléctrico paralelamente a la interfase sólido/disolución de la Figura 4.1., y que la superficie sólida está fija en nuestro sistema de coordenadas. De lo expuesto anteriormente, se deduce que el líquido adyacente al sólido tiene una carga eléctrica neta, opuesta a la de la superficie de éste. De forma general, parte de los iones de este líquido están unidos fuertemente a la superficie mediante fuerzas atractivas de corto alcance y pueden considerarse inmóviles. Sin embargo, esto es una aproximación, ya que tales iones pueden ser móviles y, en ese caso, no es raro que su movilidad tenga un valor próximo a la del núcleo de la disolución. En las condiciones generales comentadas, los iones y el líquido externo pueden ser desplazados por el campo externo. De hecho, la fuerza eléctrica actuará sobre los iones (principalmente, contraiones) y arrastrará líquido en su movimiento. De esta manera, se producirá un movimiento relativo entre el sólido y el líquido; lo que constituye el fundamento del fenómeno electrocinético.

El potencial existente en el límite entre las fases móvil e inmóvil es conocido como potencial electrocinético o potencial zeta ( $\zeta$ ). La localización exacta (distancia  $\beta_\zeta$  en la Figura 4.1.) del también llamado plano de cizalladura o plano de deslizamiento es un aspecto ampliamente investigado. De hecho, incluso la existencia de este plano y del mismo potencial zeta son estrictamente una abstracción [Lyklema, 1977], ya que se basan en la aceptación de que la viscosidad del medio líquido varía discontinuamente desde infinito en la capa de Stern a un valor finito en la atmósfera difusa. Una posible forma de salvar, al menos formalmente, esta incertidumbre es suponer una variación gradual de la viscosidad  $\eta$  desde la superficie hasta el inicio de la parte difusa [Dukhin, 1974; López-García y cols., 1996; Lyklema, 1977], pero la verificación experimental cuantitativa de tal

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

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

### 4.2.1. ELECTROFORESIS: TEORÍA ELEMENTAL

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

Sea una partícula esférica de radio  $a$  en presencia de un campo eléctrico que, lejos de la partícula, es  $\vec{E}_\infty$ . Se considera que la partícula no es conductora y tiene una permisividad eléctrica mucho menor que la del medio de dispersión. Por el momento, también aceptaremos que la concentración de electrolito es muy baja y que  $a$  es también muy pequeño, por lo que se da la siguiente desigualdad entre el grosor de la doble capa (ecuación 12) y el radio:

$$\kappa^{-1} \gg a \quad \text{o} \quad \kappa a \ll 1 \quad (16)$$

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

$$\vec{F}_S = -6\pi\eta a\vec{v}_e$$

$$\vec{F}_E = Q\vec{E}_\infty$$

$$\vec{F}_S + \vec{F}_E = 0 \quad (17)$$

En estas ecuaciones,  $\eta$  es la viscosidad del medio de dispersión, y  $Q$  es la carga total superficial de la partícula. De la ecuación 17:

$$\vec{v}_e = \frac{Q}{6\pi\eta a} \vec{E}_\infty \quad (18)$$

Si recordamos que el potencial en la superficie [Panofski y Phillips, 1975], bajo la condición de la ecuación 16, es:

$$V(a) = \frac{1}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \frac{Q}{a} \quad (19)$$

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

$$\bar{v}_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_{rs} \epsilon_0}{\eta} \zeta \vec{E}_\infty \quad (20)$$

o la movilidad electroforética ( $u_e$ ):

$$u_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_{rs} \epsilon_0}{\eta} \zeta \quad (21)$$

lo que se conoce como fórmula de Hückel.

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

$$\kappa^{-1} \ll a \quad \text{o} \quad \kappa a \gg 1 \quad (22)$$

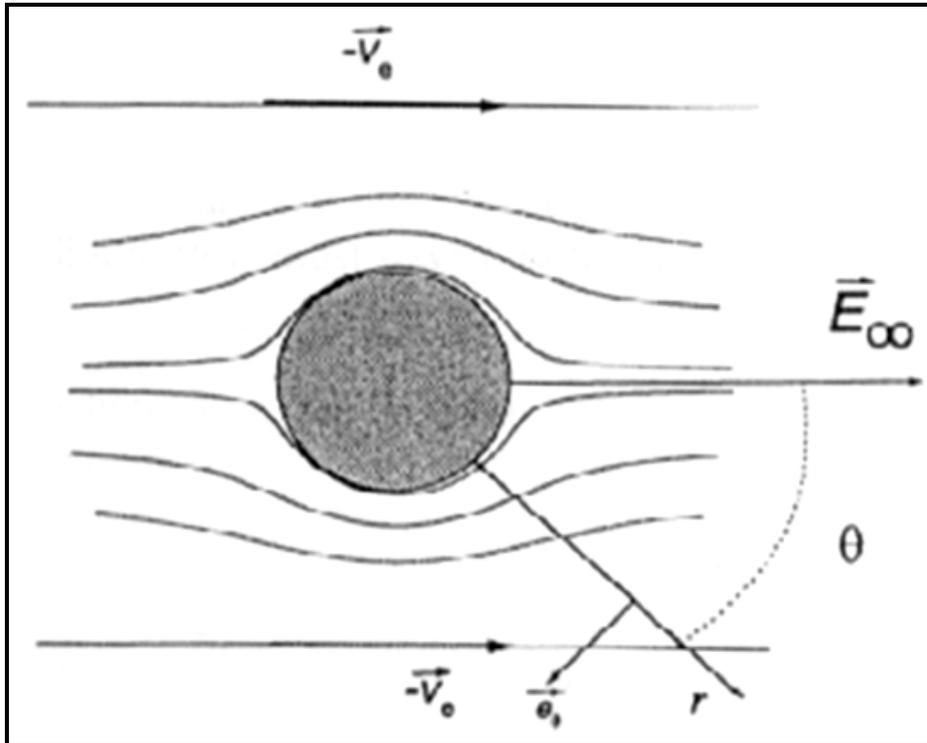
En este caso, los iones de la doble capa apantallan la carga superficial en una distancia corta, lo que significa que, como hemos descrito antes, se pierde la electroneutralidad en esta región. El campo provocará, por lo tanto, movimientos del líquido cargado que afectarán al propio movimiento de la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

Para ello se ha de suponer que el potencial  $\zeta$  no es muy elevado, lo que permite admitir que la doble capa no se deforma por acción del campo aplicado. Por ello, la distribución de potencial eléctrico es la simple superposición del potencial debido al campo más el inducido en la interfase (Figura 4.4.). Específicamente [Ohshima, 1998; Panofski y Phillips, 1975]:

$$\psi(F)\Big|_{r=a} = -E_{\infty} a \cos\theta - \frac{1}{2} E_{\infty} a \cos\theta = -\frac{3}{2} E_{\infty} a \cos\theta \quad (23)$$

Que se puede interpretar como si la polarización diese lugar a un campo aumentado en un factor 3/2, lo que modifica la ecuación (21) para dar la de Smoluchowski:

$$\mu_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (24)$$



**Figura 4.4.** Flujo de líquido en torno a una partícula esférica cargada negativamente.

Lejos de la interfase, el líquido se mueve con una velocidad constante  $-\vec{v}_e$ .

De todo lo expuesto, debe entenderse que la ecuación 24 es válida para cualquier geometría siempre que [Delgado y cols., 1986; Morrison, 1970]: i) la

partícula dispersa adquiera carga superficial, que se compensa mediante un exceso de carga de signo opuesto en el medio; *ii*) la partícula sea rígida y de forma arbitraria, con potencial eléctrico superficial uniforme ( $\zeta$ ) con respecto al líquido lejos de la interfase; *iii*) las dimensiones de la partícula sean tales que el radio de curvatura de la interfase en cualquier posición sea mucho mayor que el grosor de la doble capa; *iv*) la partícula no sea conductora; *v*) los efectos de la conductancia superficial sean despreciables; *vi*) la constante dieléctrica y la viscosidad del medio sean independientes de la posición [ver, sin embargo, Hunter, 1966; James, 1979; Lyklema y Overbeek, 1961a,b; Overbeek, 1952]; y, *vii*) el campo aplicado, a pesar de estar deformado por la presencia de la partícula, se suma vectorialmente al campo local en equilibrio de la doble capa.

### **4.2.2. ELECTROFORESIS: TRATAMIENTOS MÁS ELABORADOS**

Henry fue el primer autor que eliminó la restricción (*iii*) anterior, y resolvió el problema para esferas (también para cilindros infinitos) de cualquier radio  $a$ , es decir, cualquier valor  $\kappa a$ , aunque para pequeños potenciales zeta, ya que se acepta que la ecuación 15 determina la distribución de potencial en la doble capa en equilibrio [Henry, 1931]. Restringiéndonos al caso de la esfera, la ecuación de Henry para partículas no conductoras es:

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta f(\kappa a) \quad (25)$$

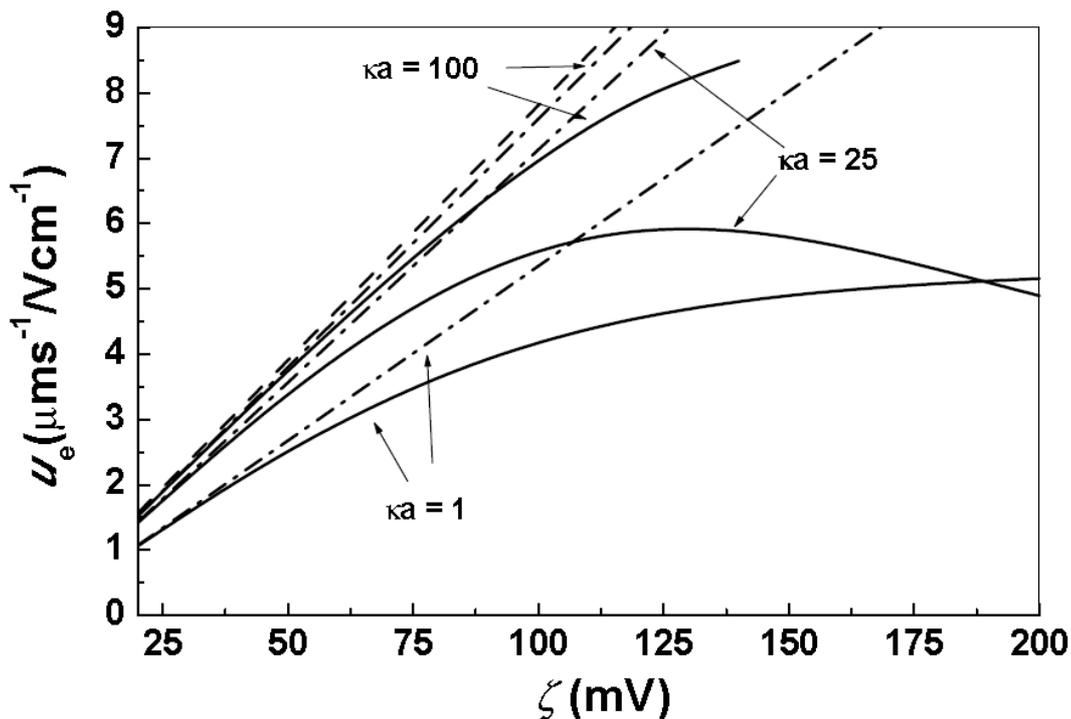
donde:

$$f(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - 5 \frac{(\kappa a)^3}{48} + \dots \quad (26)$$

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

Gracias a Overbeek, podemos entender y evaluar la movilidad electroforética y, en general, la física del fenómeno electrocinético [Overbeek, 1943, 1952]. Booth también elaboró una teoría que siguió líneas similares, para esferas en ambos casos [Booth, 1948a; Booth, 1948b; Booth, 1950]. Estos autores, fueron los primeros en considerar que durante la migración electroforética la doble capa pierde su simetría original y se polariza: la distribución del potencial fuera del equilibrio no es la simple adición del creado por el campo externo en torno a la esfera no conductora y el de la doble capa eléctrica en equilibrio [Derjaguin y Dukhin, 1974]. El problema matemático es mucho más complejo y hasta la aparición de los ordenadores sólo estaban disponibles teorías aproximadas (bajo  $\zeta$ , gran  $\kappa a$ ) [Booth, 1948a; Booth, 1948b; Booth, 1950; Overbeek, 1943; Overbeek, 1952]. Los primeros tratamientos numéricos del problema, válidos para valores arbitrarios del radio, el potencial zeta o las concentraciones iónicas, aparecieron a partir de la década de los sesenta [O'Brien y White, 1978; Wiersema y cols., 1966].

Como no es relevante describir estos tratamientos, simplemente mostraremos algunos resultados en la Figura 4.5. La validez de la fórmula de Smoluchowski para valores elevados  $\kappa a$  y valores bajos a moderados de  $\zeta$  es claramente apreciable. También es evidente que el tratamiento de Henry es válido para  $\zeta$  bajo, independientemente del grosor de la doble capa.



**Figura 4.5.** Movilidad electroforética frente a potencial zeta ( $\zeta$ ) para partículas esféricas de radio  $a = 100$  nm y para  $\kappa a = 1.25$  y  $100$  en disoluciones de KCl. Línea discontinua (---): ecuación de Smoluchowski; líneas discontinuas – punteadas (-.-): fórmula de Henry; líneas continuas (-): teoría de O'Brien y White.

### 4.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La determinación de las movilidades electroforéticas ( $u_e$ ) de las distintas suspensiones acuosas de nanopartículas se llevó a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 [Malvern Instruments, Inglaterra]. La medida está basada en el análisis de la autocorrelación de la luz láser dispersada por las nanopartículas en movimiento. El aparato utilizado permite determinar  $u_e$  con errores del 5 % o menores. La temperatura de medida (25 °C) se mantuvo constante (hasta  $\pm 0.2$  °C) utilizando un módulo Peltier.

Las suspensiones estudiadas tenían una concentración de nanopartículas de aproximadamente el 0.1 % (p/v). Antes de preparar la suspensión se fija la concentración del electrolito ( $\text{KNO}_3$ ) deseada y se ajusta, en su caso, el pH con  $\text{HNO}_3$  o  $\text{KOH}$ . Debido a la dificultad que presenta el ajuste de ciertos pHs, la preparación de las suspensiones se realizó cuando estos eran estables. De esta manera, evitamos que las nanopartículas estén demasiado tiempo en disolución antes de medir sus propiedades eléctricas superficiales, lo que podría comprometer la estabilidad de dichas propiedades, al favorecerse fenómenos de oxidación y de degradación [Arias y cols., 2001; Plaza y cols., 2002]. Las medidas se realizaron tras 24 horas de contacto de las nanopartículas con el medio de dispersión a  $25.0\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$  y bajo agitación mecánica (50 rpm). Los datos presentados son el promedio de 12 determinaciones, cambiando la muestra cada tres. La teoría de O'Brien y White se utilizó para convertir los valores de  $u_e$  en  $\zeta$  [O'Brien y White, 1978].

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

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

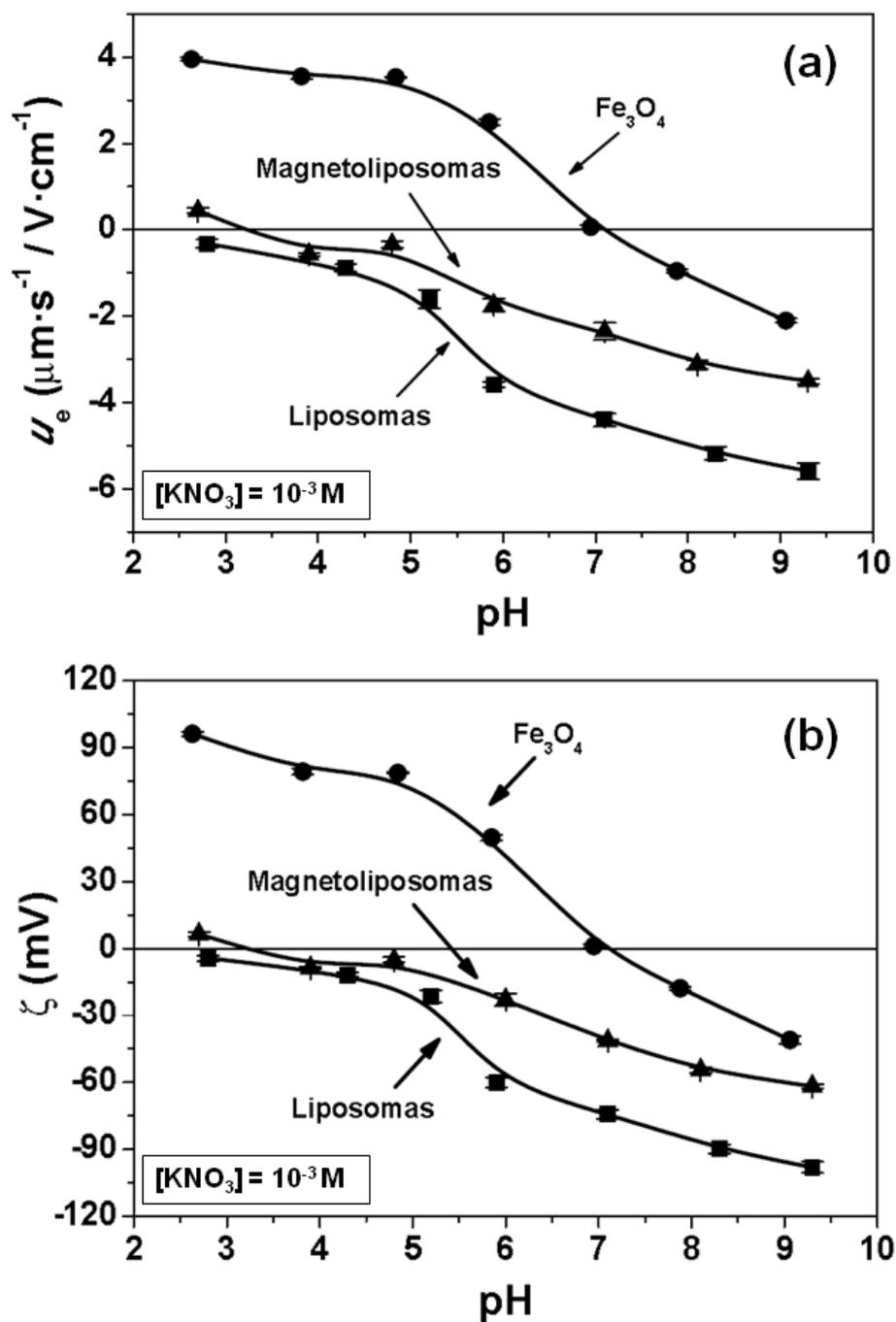
Las propiedades eléctricas superficiales de los óxidos de hierro son extremadamente sensibles a las variaciones del pH [Plaza y cols., 2002], lo cual no es predecible en el caso de los sistemas vesiculares de tipo liposomal, debido a la naturaleza de los grupos responsables de su carga, como restos de grupos fosfato [Woodle y cols., 1992]. Por ello, centraremos en primer lugar nuestro estudio en el

efecto del pH sobre la movilidad electroforética ( $u_e$ ) y el potencial zeta ( $\zeta$ ) de las nanopartículas.

La Figura 4.6. muestra ambos parámetros en función del pH bajo una fuerza iónica moderada constante ( $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M). Como puede observarse, las nanopartículas de magnetita presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero bien definido en torno a 7.0, de forma que a pHs ácidos los valores de  $\zeta$  son positivos y a partir del punto isoeléctrico pasan a ser negativos. Estos resultados concuerdan con investigaciones previamente realizadas [Arias y cols., 2001; Matijević, 2002; Plaza y cols., 2002; Regazzoni y cols., 1983]. Resulta interesante resaltar cómo el comportamiento electrocinético de los magnetoliposomas es muy similar al de los liposomas, debido a la naturaleza de los grupos responsables de su carga eléctrica superficial. En concreto, los grupos fosfato de la cabeza polar de la fosfatidilcolina (localizada en la parte externa de los sistemas vesiculares) se encuentran neutralizados a pH ácido (por los hidrogeniones del medio de dispersión). Por el contrario, conforme el valor del pH crece, es decir aumenta la concentración de grupos hidroxilos en el medio, cada vez un mayor número de grupos fosfato superficiales estarán disociados. Esto determina el aumento de la carga eléctrica superficial del coloide [Chen y cols., 2010].

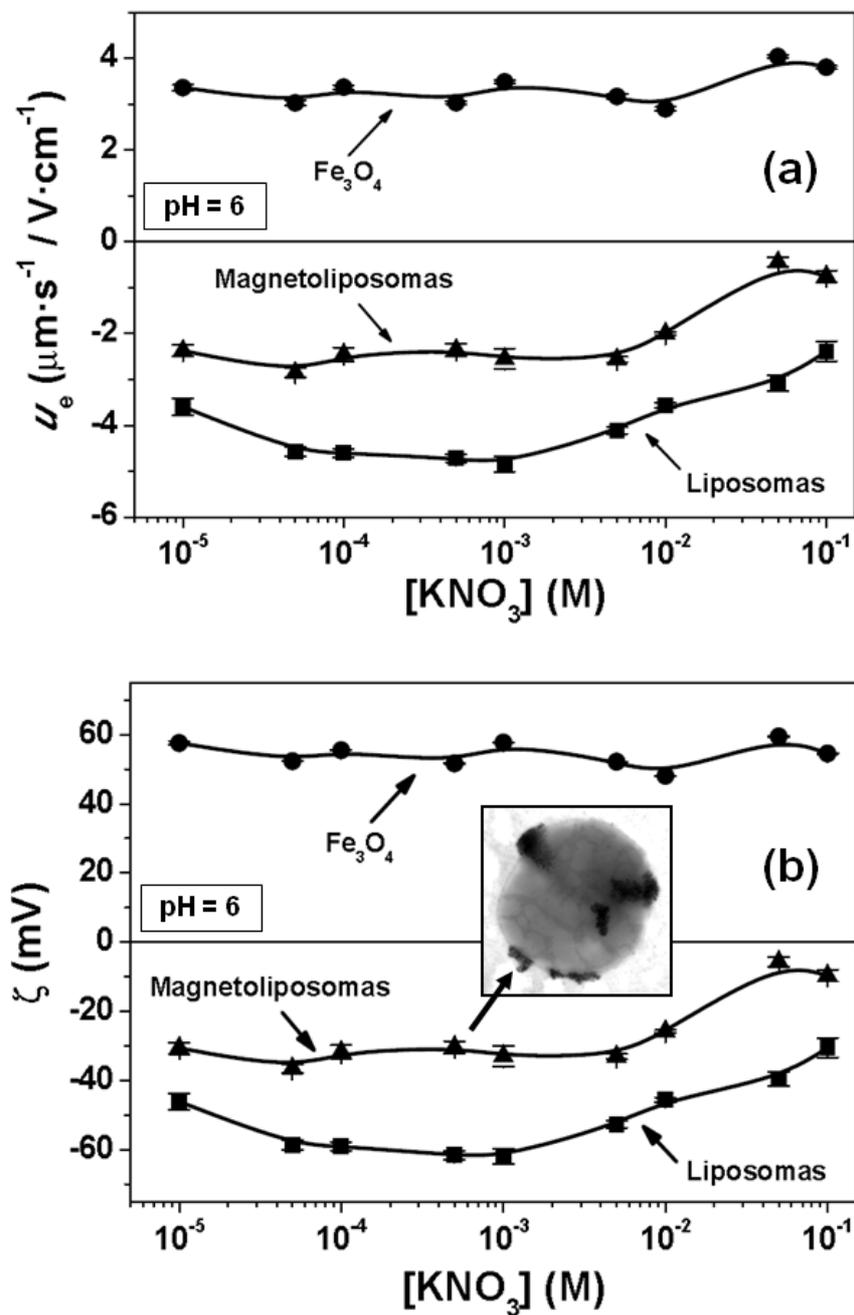
Esta diferencia entre el comportamiento electrocinético de los núcleos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y los coloides vesiculares hacen que la electroforesis sea una herramienta muy útil para evaluar cualitativamente la eficacia del recubrimiento corroborando de esta manera la obtención de magnetoliposomas. De hecho, la Figura 4.6. muestra claramente cómo los magnetoliposomas (relación de masas iniciales  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ :PC, 4:3) presentan un comportamiento electrocinético similar al de liposomas. Por lo tanto, podemos concluir que el recubrimiento vesicular oculta muy eficazmente al núcleo magnético, haciendo que la superficie de los magnetoliposomas sea muy parecida a la de los liposomas, hecho que se ha

observado en otros trabajos de nuestro grupo de investigación donde fue empleado como material de recubrimiento una matriz polimérica [Arias y cols., 2001, 2006, 2008c; Clares y cols., 2013].



**Figura 4.6.** Movilidad electroforética ( $u_e$ ) (a) y potencial zeta ( $\zeta$ ) (b) de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (●), Liposomas (■), y Magnetoliposomas (▲) en función del pH, en presencia de  $10^{-3}$  M  $\text{KNO}_3$ .

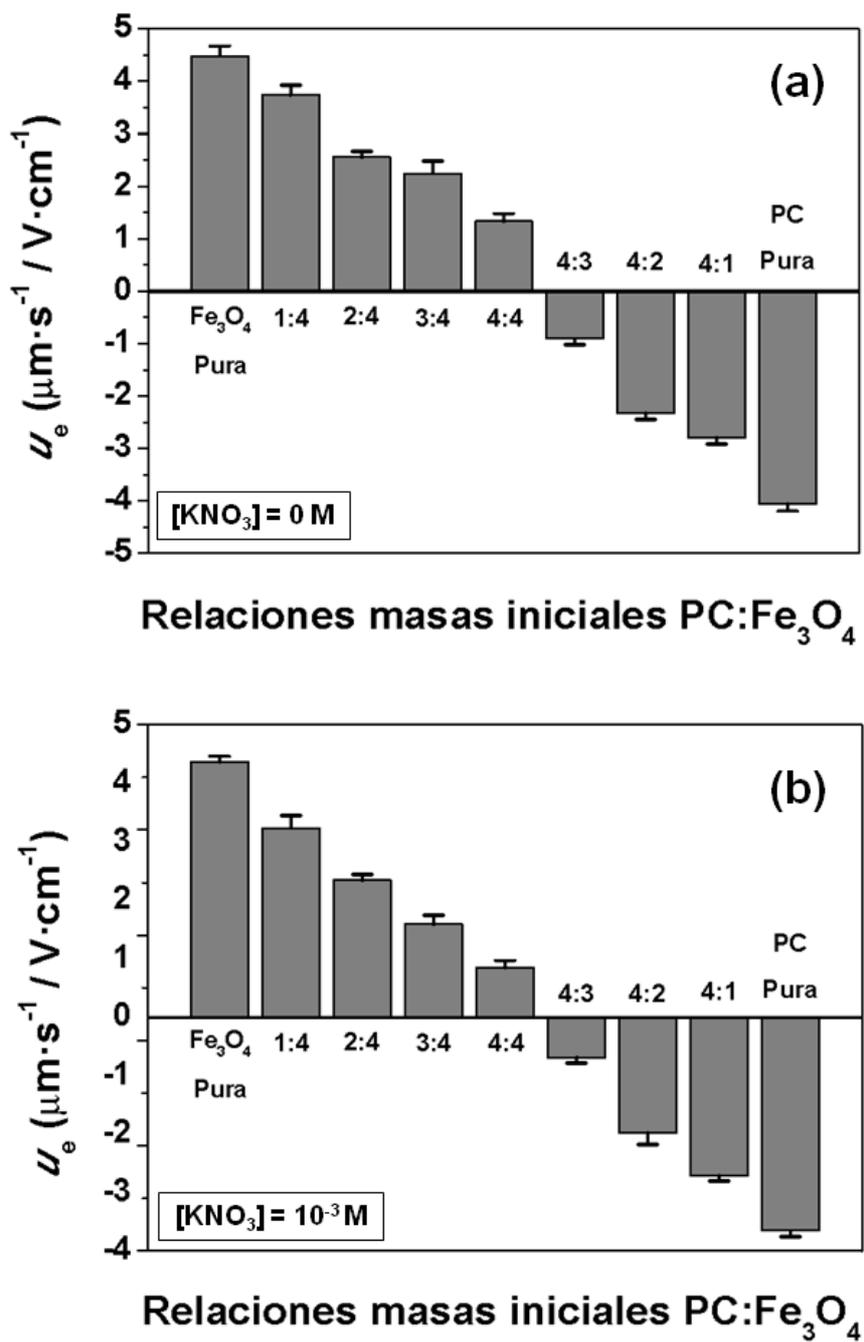
Para confirmar estos resultados, evaluamos las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de coloides en función de la concentración de  $\text{KNO}_3$  (fuerza iónica) a  $\text{pH} = 6.0$ , siguiendo la misma metodología. Los resultados de este análisis representan una evidente electrosimilitud entre el componente vesicular lipídico y los magnetoliposomas, y las diferencias con respecto a los núcleos de óxido de hierro. Como puede apreciarse en la Figura 4.7., los valores de  $u_e$  y de  $\zeta$  de los magnetoliposomas son muy similares al de los liposomas, presentando ambos nanosistemas carga negativa en todo el intervalo de concentración de  $\text{KNO}_3$ . Por su parte, la magnetita mantiene valores positivos en todo el intervalo fijado de concentraciones de  $\text{KNO}_3$ . Es interesante destacar que la carga eléctrica superficial de los magnetoliposomas no es tan negativa como la de los liposomas, creemos que esto es debido a la presencia de nanopartículas de magnetita (con carga positiva) en la superficie de los magnetoliposomas (detalle de la Figura 4.7. b.), lo que reduce la carga eléctrica superficial negativa global del coloide mixto. Así, este análisis constituye una nueva prueba de la eficacia de la metodología desarrollada para la síntesis de magnetoliposomas.



**Figura 4.7.** Movilidad electroforética ( $u_e$ ) (a) y potencial zeta ( $\zeta$ ) (b) de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (●), Liposomas (■), y Magnetoliposomas (▲) en función de la concentración de  $\text{KNO}_3$  a pH = 6. Figura insertada: microfotografía TEM de un magnetoliposoma en la que pueden apreciarse núcleos magnéticos en la superficie de la nanopartícula.

Los resultados del análisis electrocinético de los magnetoliposomas en función de la fuerza iónica del medio podrían ser utilizados para predecir la estabilidad de éstos en suspensión. Como puede apreciarse en la Figura 4.7. b, los valores absolutos de  $\zeta$  de estas nanopartículas están muy cercanos, siendo iguales o ligeramente superiores a 30 mV, excepto para las concentraciones de  $\text{KNO}_3 \geq 0.1 \text{ M}$ . Esta elevada carga eléctrica superficial debe impedir la agregación de las partículas en suspensión, asegurándose así la estabilidad de la formulación en las condiciones experimentales estudiadas [Pradhan y cols., 2007].

Finalmente, la técnica de electroforesis fue utilizada adicionalmente, siguiendo la misma metodología y rutina, para analizar las características y la eficacia del recubrimiento cuando varía la relación de masas iniciales PC:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  utilizada en la formulación de los magnetoliposomas. La Figura 4.8. muestra los valores de  $u_e$  del coloide mixto en un medio de dispersión acuoso, en ausencia (Figura 4.8. a) o en presencia (Figura 4.8. b) de una fuerza iónica moderada constante ( $\text{KNO}_3 10^{-3} \text{ M}$ ). De forma muy patente, puede apreciarse cómo los valores de  $u_e$  característicos de los núcleos magnéticos tienden a acercarse hacia los valores de los liposomas puros al aumentar la cantidad de fosfatidilcolina (PC) utilizada en la relación de masas iniciales PC: $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , principalmente por encima de 4:3. Por lo tanto, desde un punto de vista electroforético podemos justificar la utilización de una relación de masas iniciales 4:3 para la formulación de los magnetoliposomas. De esta manera, los valores de  $u_e$  de los coloides mixtos son indistinguibles de los del coloide lipídico puro y, por lo tanto, el recubrimiento vesicular de los núcleos magnéticos será óptimo y eficaz.



**Figura 4.8.** Histograma de las movilidades electroforéticas ( $u_e$ ) de los magnetoliposomas (a) en agua y (b) en presencia de  $KNO_3$   $10^{-3}$  M para diferentes relaciones de masas iniciales fosfatidilcolina:magnetita (PC:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). También se incluyen los valores de  $u_e$  de las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y de PC (Liposomas puros).

Con toda la información obtenida tras la caracterización de las propiedades electrocinéticas de los nanomateriales estudiados, podemos argumentar el mecanismo de formación por el que una matriz lipídica actúa como material de recubrimiento de los núcleos de magnetita, quedando estos embebidos en su interior. Dicho mecanismo de formación, además, es apoyado por la caracterización de la termodinámica superficial de los nanosistemas (ver Capítulo 5). Con respecto a la caracterización electroforética, recuérdese que las condiciones ligeramente ácidas ( $\text{pH} = 6.0$ ) determinan las cargas eléctricas de la superficie (Figura 4.6.), y bajo estas condiciones, es posible una interacción electrostática atractiva entre las cargas positivas de los núcleos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y las cargas negativas de las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que permite la formación de diferentes bicapas lipídicas entorno a los óxidos de hierro. Este es un mecanismo ampliamente descrito en la literatura y que justifica la formación de este tipo de coloides magnéticos compuestos [Arias y cols., 2001, 2007a, 2008b; Chen y cols., 2010; Clares y cols., 2013]. Además, esta hipótesis podría explicar el pequeño tamaño de partícula de los magnetoliposomas ( $\approx 200$  nm) en comparación con los liposomas ( $\approx 600$  nm). Esto podría ser debido a una contracción considerable del volumen acuoso liposomal. Las partículas de magnetita presentan carga eléctrica superficial positiva y las bicapas fosfolipídicas negativas, por lo que es de esperar que se produzca una interacción electrostática entre ambos materiales. Como consecuencia de este proceso, debe producirse la atracción de las lamelas hacia los núcleos magnéticos, lo que contraerá el volumen ocupado por las vesículas. Así, el tamaño final del nanosistema debe reducirse considerablemente, haciéndolo aún más idóneo para la vía de administración parenteral [Chen y cols., 2010].

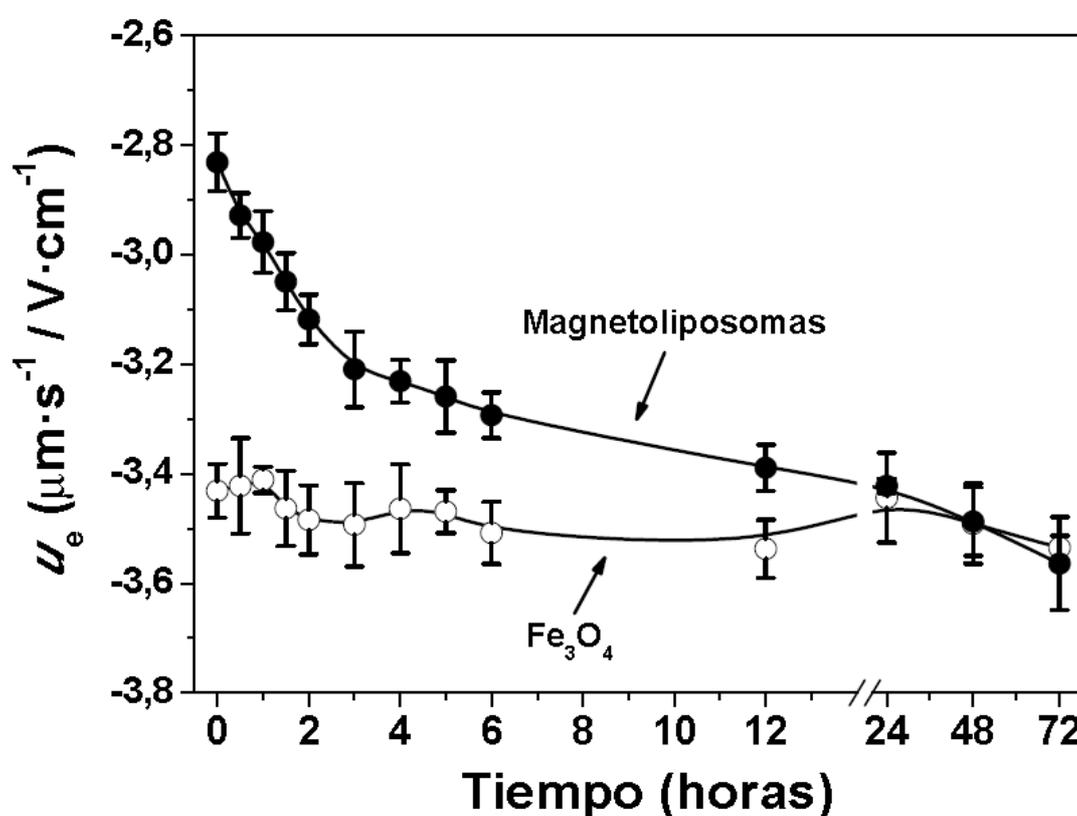
## **4.5. ANÁLISIS ELECTROKINÉTICO DE LA ESTABILIDAD DEL RECUBRIMIENTO LIPÍDICO**

La experiencia adquirida en nuestro grupo de investigación en la caracterización electrocinética de nanopartículas magnéticas recubiertas por una matriz polimérica [Arias y cols., 2001, 2005, 2006, 2007a, 2008a, 2009a, 2010a, 2010b; Pérez-Artacho y cols., 2010], nos hace pensar que la técnica de electroforesis puede ser muy útil para caracterizar la velocidad a la que la matriz lipídica se degrada y deja zonas cada vez mayores de magnetita expuestas a la disolución [Arias y cols., 2001]. Las medidas electroforéticas de las suspensiones acuosas de magnetita y de las nanoplateformas magnéticas (concentración  $\approx 0.1$  %, m/v) se realizaron reproduciendo las condiciones fisiológicas (pH  $7.4 \pm 0.1$ , y  $37.0 \pm 0.5$  °C) [Malvern Zetasizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido]. El experimento se consideró finalizado cuando los valores de movilidad electroforética ( $u_e$ ) de los magnetoliposomas coincidían con los de las nanopartículas puras de  $Fe_3O_4$ , señal inequívoca de la pérdida del recubrimiento lipídico.

En la Figura 4.9. se aprecia cómo los valores de  $u_e$  de la magnetita permanecen constantes durante todo el período del estudio ( $u_e \approx -3.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Este valor negativo de  $u_e$  tan elevado podría atribuirse a la formación en la superficie de la magnetita de una fina capa de oxidación (maghemita, un estado más oxidado de ésta), como se ha descrito en medios acuosos [Plaza y cols., 2002]. De hecho, los valores de  $u_e$  de nanopartículas de maghemita (de igual tamaño a la  $Fe_3O_4$  y bajo las mismas condiciones experimentales) eran muy similares a los de nuestros núcleos de óxido de hierro ( $u_e \approx -3.6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

Es muy interesante comprobar en esta representación gráfica cómo los valores de  $u_e$  de los magnetoliposomas se aproximan progresivamente a los característicos de los

núcleos magnéticos. En concreto, se hacen iguales tras prácticamente 24 horas. A partir de entonces, no se observan diferencias significativas entre la  $u_e$  de ambos materiales. Por tanto, podría decirse que la superficie de los núcleos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  del coloide mixto queda cada vez más expuesta al medio de dispersión (de ahí los valores cada vez más negativos de  $u_e$ ), por la degradación progresiva del recubrimiento. Así, cuando la cubierta de lípido se degrada los valores de  $u_e$  se hacen indistinguibles.



**Figura 4.9.** Evolución de los valores de movilidad electroforética ( $u_e$ ) de las partículas coloidales de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\circ$ ) y magnetolisosomas ( $\bullet$ ) en función del tiempo (horas), a  $\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$ , y  $37.0 \pm 0.5$  °C.

Esta evolución progresiva de  $u_e$  hacia los valores típicos de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , pone de manifiesto cualitativamente que la velocidad de degradación de la cubierta lipídica

## Capítulo 4. Propiedades Eléctricas Superficiales

---

ocurre rápidamente, lo que ha sido asociado a la estabilidad del lípido. En el caso de que el mecanismo de liberación de un fármaco vehiculizado en este sistema transportador sea consecuencia del proceso de degradación de ésta, la electroforesis se convierte en una herramienta cualitativa indirecta para caracterizar ese proceso de liberación [Katas y cols., 2013; Viota y cols., 2011].

## **Capítulo 5.**

# **TERMODINÁMICA SUPERFICIAL**



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

De esta manera, estimaremos la relevancia de las contribuciones no electrostáticas al balance total de la energía de interacción entre las nanopartículas de los sistemas analizados. Para llevar a cabo esta determinación, serán utilizados los datos experimentales de los ángulos de contacto formados por líquidos seleccionados con nuestros tres tipos de sistemas: nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), liposomas y magnetoliposomas. Además, se prestará especial atención al análisis comparativo de la energía libre superficial de los diferentes tipos de materiales puros: núcleo magnético ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), fosfatidilcolina (recubrimiento lipídico) y magnetoliposomas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /liposomas).

### **5.1. INTERACCIONES SUPERFICIALES**

La principal interacción interfacial a tener en cuenta entre partículas coloidales cargadas, inmersas en un medio acuoso, es la electrostática (*EL*). Este tipo de interacción nos da idea del alcance e intensidad de la repulsión eléctrica. Sin embargo,

también existen otro tipo de interacciones entre las moléculas que constituyen las distintas fases en disolución y que pueden adquirir valores significativos. De entre ellas, vamos a destacar dos como más significativas:

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

### 5.1.1. INTERACCIONES DISPERSIVAS

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

- Interacciones entre dipolos permanentes o fuerzas de orientación de Keesom.

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

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

Debe tenerse en cuenta que las interacciones dispersivas son débiles en comparación con las electrostáticas responsables del enlace iónico o del covalente, no obstante las interacciones dispersivas afectan de forma considerable a un variado conjunto de fenómenos relacionados con los sistemas coloidales, tales como la adhesión, la adsorción, la agregación de partículas en suspensión o la estructura de macromoléculas condensadas, como polímeros o proteínas

[Israelachvili, 1991]. Resumiendo, las características esenciales de estas interacciones son:

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

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

### 5.1.2. INTERACCIONES NO-DLVO

Hay una serie de fenómenos relacionados con la estabilidad coloidal, que no se pueden explicar sólo mediante la interacción electrostática entre dobles capas eléctricas y las fuerzas de van der Waals. Algunos ejemplos de dichos fenómenos inexplicables son, el hinchamiento espontáneo de arcillas secas cuando están en contacto con agua [van Olphen, 1977]; tampoco puede explicarse por qué las dispersiones de sílice no coagulan en el punto isoelectrico (o pH de potencial zeta cero) en el seno de disoluciones salinas concentradas [Allen y Matijević, 1969]; recientemente, se han encontrado comportamientos similares en suspensiones de sulfuro de zinc [Durán y cols., 1995] o de látex de etilcelulosa [Vera y cols., 1996],

entre otros ejemplos [Laskowski y Pugh, 1992; Pashley, 1992]. Por ello ha sido necesario introducir las denominadas fuerzas no-DLVO (cuyo alcance es del orden de pocos nanómetros), entre las que se incluyen la repulsión hidrófila, la atracción hidrófoba, los enlaces de hidrógeno, los enlaces  $\pi$ , o la presión osmótica en suspensiones muy concentradas de polímeros. Las fuerzas más conocidas son las que tienen su origen en la solvatación de las superficies (por lo que se denominan estructurales), pudiendo ser atractivas (efecto hidrófobo), repulsivas (efecto hidrófilo) e incluso oscilatorias. Son interacciones de tipo polar y pueden llegar incluso a alcanzar un valor dos órdenes de magnitud superior a las interacciones *EL* y *LW*. Analizaremos a continuación los aspectos físicos fundamentales de estas fuerzas no-DLVO.

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

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

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

### **5.1.3. CONTRIBUCIONES A LA ENERGÍA LIBRE SUPERFICIAL. TEORÍA DE VAN OSS, GOOD Y COLS.**

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

$$\Delta G_{C,1} = -W_{C,1} = -2\gamma_I \quad (27)$$

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

Si se considera un proceso también reversible, igual al anterior, pero con dos sistemas físicos de materiales diferentes,  $1$  y  $2$ , se habla de adhesión, siendo  $\Delta G_{A,12}$  la energía libre de adhesión y  $W_{A,12}$  el trabajo de adhesión. En este caso, se destruyen las interfases  $1$ -vacío y  $2$ -vacío, pero se crea la interfase  $1$ - $2$ . Se define entonces la tensión interfacial ( $\gamma_{12}$ ) mediante la ecuación de Dupré [Adamson, 1982].

$$\Delta G_{A,12} = -W_{A,12} = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad (28)$$

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

$$\Delta G_{123} = \gamma_{13} - \gamma_{12} - \gamma_{23} \quad (29)$$

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

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} \quad (30)$$

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

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

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + \gamma_1^{AB} \quad (31)$$

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

La ecuación 31 se puede hacer extensiva a la energía libre de la interfase 1-2:

$$\gamma_{12} = \gamma_{12}^{LW} + \gamma_{12}^{AB} \quad (32)$$

A continuación, se expresa matemáticamente cada uno de los dos sumandos de la tensión superficial de la ecuación 32. Utilizando la regla de Good-Girifalco [Good y Girifalco, 1960; Overbeek, 1952], el primer término  $\gamma_{12}^{LW}$  queda de la forma:

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

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

$$\gamma_{12}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}\right) = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_2^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_2^-}\right) \quad (34)$$

donde  $\gamma_i^+$  y  $\gamma_i^-$  representan, respectivamente, la contribución electrón-aceptor (ácido de Lewis) y electrón-donante (base de Lewis) a la tensión superficial de la fase  $i$ . La ecuación 34 para una fase queda de la forma:

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

Sustituyendo la ecuación 35 en la ecuación 31:

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

Sustituyendo las ecuaciones 33 y 34 en la ecuación 32, y teniendo en consideración la ecuación 36, se obtiene:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2\sqrt{(\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW})} - 2\sqrt{(\gamma_1^+ \gamma_2^-)} - 2\sqrt{(\gamma_1^- \gamma_2^+)} \quad (37)$$

que expresa la tensión interfacial entre las fases 1 y 2.

Es usual hacer una clasificación de los materiales en función de los valores que adquieren las componentes ácido y base de Lewis: bipolares, si las moléculas se comportan como ácidos y bases de Lewis simultáneamente; monopolares, cuando una de esas dos componentes (ácido o base) es despreciable o nula frente a la otra; y apolares, si se anulan ambas componentes. Si un material es monopolar, no existe el término  $\gamma_i^{AB}$ , y la tensión superficial total ( $\gamma$ ) es igual al término  $LW$ . No obstante, tales materiales pueden interaccionar fuertemente con materiales bipolares y materiales monopolares de polaridad opuesta, a pesar de la aparente naturaleza apolar de su tensión superficial. Ambas interacciones  $LW$  y

$AB$  entre dos cuerpos idénticos o entre dos diferentes en el vacío, son siempre atractivas. Sin embargo, cuando estos cuerpos están inmersos en un líquido, puede surgir una interacción repulsiva. Con respecto a la interacción  $LW$ , solamente aquella que tiene lugar entre dos materiales diferentes  $1$  y  $3$ , inmersos en un líquido  $2$ , puede ser repulsiva [Derjaguin, 1954; Fowkes y Mostafa, 1978; Hamaker, 1937; Visser, 1972] siempre que la componente apolar del líquido ( $\gamma_2^{LW}$ ), cumpla:  $\gamma_1^{LW} < \gamma_2^{LW} < \gamma_3^{LW}$  [Neumann y cols., 1979; van Oss, 2006].

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

El punto importante que queremos resaltar por su significación en la determinación de la energía total de interacción entre dos partículas coloidales es que el conocimiento de los componentes  $\gamma_i^{LW}$  y  $\gamma_i^\pm$  para las fases implicadas permite calcular dicha energía. En efecto, la energía libre de interacción (por unidad de superficie) entre dos partículas de material  $1$  inmersas en un líquido  $2$  será:

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} = -2\left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}}\right)^2 - 4\left(\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}\right) \quad (38)$$

Nótese que un valor positivo de  $\Delta G_{121}$  implicaría una repulsión neta entre las superficies (presión de hidratación o interacción hidrófila). Teniendo en cuenta que  $\Delta G_{121}^{LW}$  es siempre negativo, el carácter atractivo o repulsivo de la interacción, representado por el valor de  $\Delta G_{121}$ , dependerá de la contribución ácido-base  $\Delta G_{121}^{AB}$ . En medio acuoso, la componente  $AB$  de la energía de cohesión del agua,

debido a sus enlaces por puentes de hidrógeno es  $102 \text{ mJ/m}^2$ . Este valor es lo suficientemente elevado como para imponer un efecto atractivo neto entre superficies de partículas apolares o débilmente polares (efecto hidrófobo).

En otras ocasiones, como sucede en especial con las superficies monopolares ( $\gamma = \gamma^{LW}$ ;  $\gamma^{AB} = 0$ , usualmente  $\gamma^+ = 0$  y  $\gamma^- \neq 0$ ) [van Oss y cols., 1988], el elevado valor del carácter básico de estas superficies las hace muy hidrófilas, existiendo fuertes interacciones repulsivas (presión de hidratación) por la presencia del factor  $(\gamma_1^- \gamma_2^+)^{1/2}$  y, por lo tanto se verificara que  $|\Delta G_{121}^{AB}| > |\Delta G_{121}^{LW}|$ .

Desde este punto de vista, el modelo de van Oss propone una interpretación de las interacciones de solvatación, según la cual tienen su origen en intercambios *AB* (ácido-base de Lewis) entre la superficie de las partículas dispersas y el medio de dispersión (agua generalmente). La componente *AB* del incremento de la energía libre de Gibbs asociado a dicha interacción sería la fuerza termodinámica responsable de las mismas.

## **5.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

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

una breve descripción de la técnica de medida de ángulos de contacto, la cual se ha utilizado en este trabajo.

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

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

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_L \cos \theta \quad (39)$$

donde  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{SL}$  y  $\gamma_L$  son, respectivamente, las tensiones interfaciales sólido-vapor y sólido-líquido, y la tensión superficial del líquido. La ecuación 39 se puede escribir de la forma:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta + \pi_e \quad (40)$$

donde  $\gamma_S$  es la tensión superficial del sólido y  $\pi_e$  es la presión superficial (*film pressure*), definida por:

$$\pi_e \equiv \gamma_S - \gamma_{SV} \quad (41)$$

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

$$\gamma_s = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta \quad (42)$$

Un factor importante a considerar en las medidas de ángulo de contacto es el fenómeno de histéresis. Cuando una gota de líquido se deposita sobre la superficie de un sólido, se puede producir dependiendo del método utilizado un avance (la gota se deposita sobre una superficie seca) o una regresión (la gota depositada se retrae, desplazándose sobre zonas ya mojadas) de esta. De esta forma, los respectivos ángulos de contacto son:  $\theta_a$  (avance) y  $\theta_r$  (retroceso). Se verifica que  $\theta_r$  es siempre inferior a  $\theta_a$ . Este fenómeno puede dificultar la estimación del verdadero ángulo de contacto, pues existe una gran dependencia entre la amplitud de la histéresis y el volumen de la gota utilizado. Este efecto se puede minimizar disminuyendo el volumen de la gota de líquido. Nuestras medidas experimentales se han realizado sobre el ángulo de avance. Un trabajo reciente explica los valores de los ángulos de retroceso como consecuencia de la disminución de la energía superficial del sólido causada por la presión superficial asociada a la adsorción del vapor del líquido utilizado [Chibowski y González-Caballero, 1993].

## Capítulo 5. Termodinámica Superficial

---

Una vez medidos los ángulos de contacto, es posible determinar los componentes de la energía superficial del sólido. Sustituyendo en la ecuación 42 el valor de  $\gamma_{SL}$  dado por la ecuación 37, se obtiene:

$$2\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+} = \gamma_L(1 + \cos\theta) \quad (43)$$

Midiendo los ángulos de contacto formados por tres líquidos diferentes, de los que se conocen las componentes de su tensión superficial, se puede establecer un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas como la ecuación 43, a partir de la cual se calcularán los valores de las componentes del sólido. Por lo general, se suelen utilizar dos líquidos polares y uno apolar.

El análisis termodinámico superficial se efectuó en los tres tipos de nanopartículas sintetizadas: núcleo magnético (magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), recubrimiento lipídico (liposomas) y nanopartículas compuestas obtenidas utilizando la relación de masas iniciales 4:3 [fosfatidilcolina:magnetita, PC: $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ]. Los líquidos empleados fueron: agua filtrada y desionizada con un sistema Milli-Q Academic [Millipore, Francia], formamida [Carlo Erba, Italia] y  $\alpha$ -bromonaftaleno [Merck, Alemania]. En la aplicación del modelo de van Oss se utilizaron los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba utilizados (Tabla 5.1.) [van Oss, 2006].

LÍQUIDO	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$
Agua	21.8	25.5	25.5
Formamida	39.0	2.28	39.6
$\alpha$ -Bromonaftaleno	43.6	0.0	0.0

**Tabla 5.1.** Componentes de la tensión superficial ( $\text{mJ/m}^2$ ) a 20 °C de los líquidos utilizados en el experimento de medida del ángulo de contacto.

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

Los ángulos de contacto de los líquidos seleccionados se determinaron sobre capas delgadas de los tres tipos de materiales, depositadas sobre portaobjetos de microscopio. Estas superficies lisas se obtuvieron tras la adición de manera uniforme de una suspensión acuosa ( $\approx 10\%$ , p/v) de cada tipo de coloide sobre la superficie limpia y seca de una placa de vidrio. En la preparación de la muestra pudimos comprobar que con la adición de 15 mL de suspensión acuosa de nanopartículas se obtenía una capa de material suficientemente gruesa y uniforme. La desecación de los portaobjetos con cada una de las muestras se realizó a  $35.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , utilizando un horno de desecación durante 24 horas. De esta manera, se obtuvo una capa de material muy uniforme a nivel macroscópico, que permitió que la medida de los ángulos de contacto se realizara en gotas muy estables.

En la Figura 5.1. se recogen los valores promedio de los ángulos de contacto obtenidos tras realizar 16 determinaciones midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de importantes diferencias entre los núcleos de óxido de hierro y los magnetoliposomas.

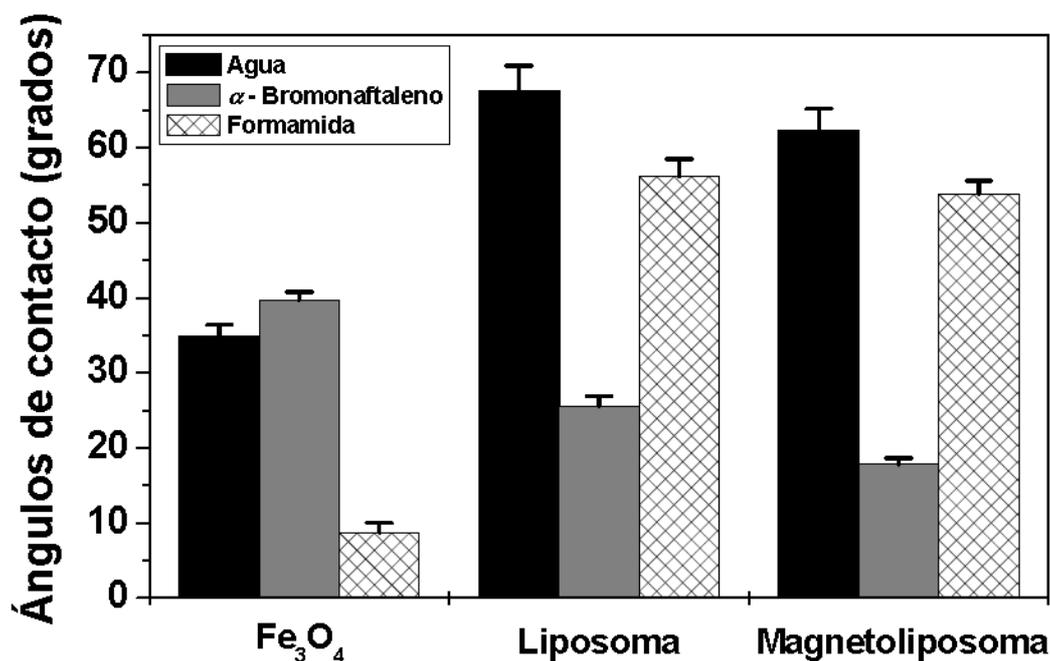
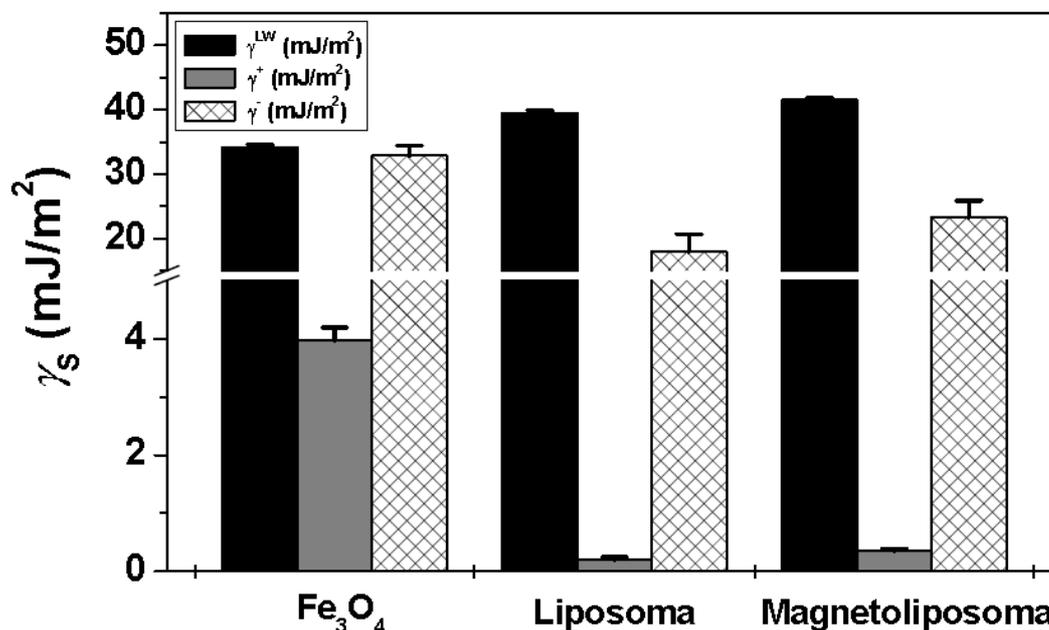


Figura 5.1. Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones con nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, liposomas y magnetoliposomas.

### **5.3. COMPONENTES DE LA ENERGÍA LIBRE SUPERFICIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS**

Para proporcionar una información física veraz sobre la termodinámica de los tres tipos de superficies es fundamental la evaluación de las componentes de  $\gamma_s$ . Los datos representados en la Figura 5.2. confirman en gran medida nuestras estimaciones sobre la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos basadas en las propiedades electrocinéticas (ver Capítulo 4) y análisis microscópico (ver Capítulo 6). En particular, para cualquier componente de la energía libre superficial, sus valores para las nanopartículas magnéticas, magnetoliposomas, coinciden casi totalmente con los correspondientes al liposoma puro.

Además, a pesar de que la componente Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_s^{LW}$ ) es la menos afectada por el tratamiento superficial, como suele ser habitual [Arias y cols., 2001, 2006, 2008d], su valor para los magnetoliposomas ( $\approx 41.5 \text{ mJ/m}^2$ ) es casi el mismo que para liposomas ( $\approx 39.5 \text{ mJ/m}^2$ ). En cuanto a la componente electrón-aceptor ( $\gamma_s^+$ ), aún presentando valores muy bajos para los tres tipos de materiales, esta es virtualmente cero para el liposoma y los magnetoliposomas y adquiere valores finitos superiores para la magnetita. La contribución electrón-donante ( $\gamma_s^-$ ) muestra una diferencia mucho más notable entre los núcleos de óxido de hierro y los magnetoliposomas. El elevado valor de esta última componente en el caso de la magnetita confirma su carácter monopolar electrón-donante [Arias y cols., 2001; van Oss, 2006]. Según van Oss, esto quiere decir que la magnetita puede tener interacciones ácido-base con fases de cualquier polaridad ( $\gamma^+$ ,  $\gamma^-$ , o ambas, diferentes de cero) pero las fuerzas  $AB$  no contribuyen a su energía libre de cohesión. Resultados similares se han obtenido anteriormente con diferentes compuestos inorgánicos [Chibowski, 1992; Chibowski y Holysz, 1992; Durán y cols., 1994, 1995]. Es bastante general el comportamiento monopolar en los materiales inorgánicos, si bien se ha descrito un carácter bipolar en materiales como la calconita y la galena [Janczuk y cols., 1984, 1987, 1994].



**Figura 5.2.** Componentes de la energía libre superficial (mJ/m<sup>2</sup>) de las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, liposomas y magnetoliposomas.  $\gamma_s^{LW}$  es la componente de Lifshitz-van der Waals;  $\gamma_s^+$  ( $\gamma_s^-$ ) es la componente electrón-aceptor (electrón-donante).

Con los resultados obtenidos y junto con el análisis electrocinético de los tres tipos de coloides, podemos afirmar que el recubrimiento de los núcleos magnéticos es completo cuando se utiliza la relación de masas iniciales 4:3 (fosfatidilcolina:magnetita, PC:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

## **5.4. ANÁLISIS DE LA NATURALEZA HIDRÓFILA/HIDRÓFOBA**

Como ya hemos comentado anteriormente, una caracterización termodinámica tan exhaustiva como la descrita sólo tiene interés desde el punto de vista fundamental. Las interacciones implicadas en la determinación de la

energía libre superficial de los materiales se manifiestan a través de fenómenos como la agregación de nanopartículas en suspensión o su adhesión a diferentes sustratos. La idea que prevalece en nuestro estudio es que las metodologías empleadas, junto con su base teórica, permiten: *i*) especificar completamente la componente  $LW$  de la energía de interacción entre las nanopartículas dispersas (contemplada, junto con la repulsión electrostática entre dobles capas eléctricas, en la teoría clásica DLVO); y *ii*) cuantificar igualmente las contribuciones no-DLVO a la energía total del sistema, las cuales se relacionan con la componente  $AB$  de la teoría superficial tanto del sólido en suspensión como del líquido.

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

$$\Delta G_{121} = \Delta G_{121}^{LW} + \Delta G_{121}^{AB} \quad (44)$$

Haciendo uso de la ecuación 38, pueden obtenerse los valores de  $\Delta G_{121}^{LW}$  y  $\Delta G_{121}^{AB}$ , que se muestran en la Tabla 5.2. En la misma se puede apreciar que para la magnetita, el intercambio energético debido a la componente  $LW$  es bastante menor que el asociado a la componente  $AB$ , siendo además negativo. Por tanto, la variación de la energía libre de interacción total es debida, principalmente, a la componente  $AB$  [Arias y cols., 2001, 2008a].

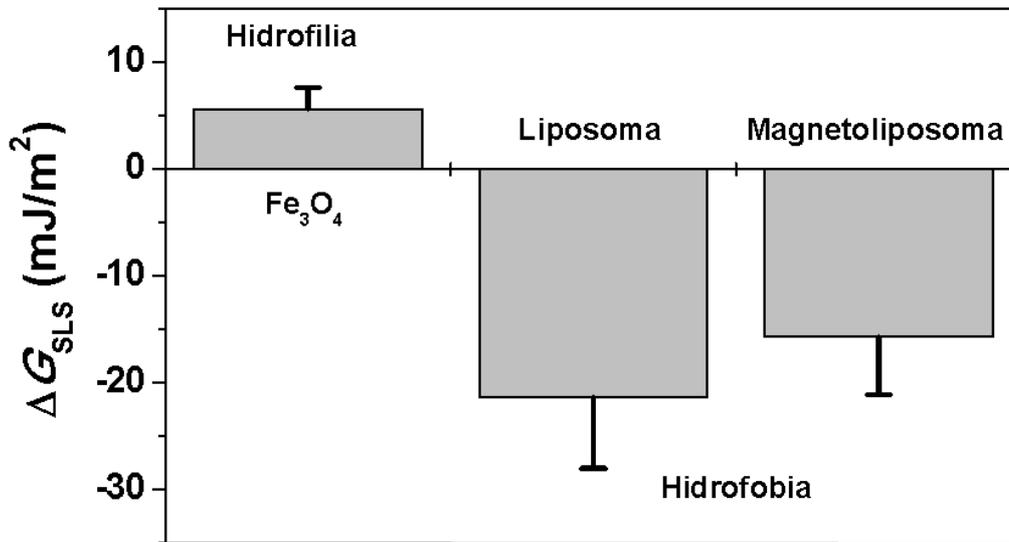
SÓLIDO	$\Delta G_{121}^{LW}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G_{121}^{AB}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G_{121}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-2.8 ± 0.6	8.4 ± 2.2	5.6 ± 1.9
Liposomas	-5.2 ± 1.2	-16.2 ± 0.8	-21.4 ± 6.6
Magnetoliposomas	-6.3 ± 1.9	-9.4 ± 0.5	-15.7 ± 5.4

**Tabla 5.2.** Energía libre de interacción (mJ/m<sup>2</sup>) entre las nanopartículas y sus componentes *AB* y *LW* en medio acuoso.

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

Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los diferentes materiales estudiados. Puede utilizarse el siguiente criterio para determinar cuando un material puede considerarse hidrófilo o hidrófobo [van Oss, 2006]: si  $\Delta G_{121}$  resulta ser negativo, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las nanopartículas, y se consideran hidrófobas. Por el contrario, la hidrofilia se corresponde con valores positivos de  $\Delta G_{121}$ .

La Figura 5.3. muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de nanomateriales. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde al ser recubierta por el fosfolípido hidrófobo. Esto puede considerarse un indicio muy claro de que dicho recubrimiento ha sido efectivo.



**Figura 5.3.** Valores de  $\Delta G_{121}$  (mJ/m<sup>2</sup>) y carácter hidrófilo/hidrófobo de los tres tipos de nanomateriales: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, liposomas y magnetoliposomas.

La información ya descrita sobre las características superficiales de los materiales estudiados, permite argumentar el mecanismo por el que los núcleos de magnetita son recubiertos por las vesículas lipídicas. Dicho mecanismo de formación, es apoyado a través de la caracterización de las propiedades eléctricas superficiales de dichos nanosistemas (ver Capítulo 4). Además, podemos dar un razonamiento termodinámico a partir de los datos de  $\gamma_s$  (Figura 5.2.), la energía libre de interacción entre la magnetita (M) y la estructura multilamenar lipídica (S) en el medio acuoso (A),  $\Delta G_{MAS}$ , puede calcularse utilizando la ecuación de Dupré [van Oss, 2006; Arias y cols., 2011d; Chen y cols., 2010]:

$$\Delta G_{MAS} = \gamma_{MS} - \gamma_{MA} - \gamma_{SA} \quad (45)$$

donde las energías libres interfaciales pueden ser calculadas fácilmente a través del modelo desarrollado [van Oss, 2006; Arias y cols., 2011d] para cada par de

interfases involucradas. El resultado de este cálculo es  $-16.8 \pm 1.3 \text{ mJ/m}^2$ . Esto significa que las interacciones de van der Waals y ácido-base entre los núcleos de magnetita y las vesículas lipídicas multilamelares son netamente atractivas. En otras palabras, termodinámicamente es más favorable para la estructura lipídica multilamelar permanecer en contacto con la magnetita antes que estar aislada en el agua [Arias y cols., 2001; Clares y cols., 2013].

## **Capítulo 6.**

# **PROPIEDADES MAGNÉTICAS**



## 6.1. PROPIEDADES MAGNÉTICAS

Las propiedades magnéticas macroscópicas de los materiales son consecuencia de los momentos magnéticos asociados con sus átomos individuales. En un átomo, cada electrón tiene momentos magnéticos que se originan de dos fuentes distintas. Una de estas fuentes está relacionada con el movimiento angular orbital del electrón alrededor del núcleo y la otra tiene su origen en su espín. El electrón, siendo una carga en movimiento, puede ser considerado como una pequeña espira de corriente que genera un gradiente magnético muy pequeño con un momento magnético asociado a lo largo de su eje de rotación. Por lo tanto, el momento magnético neto de un átomo es justamente la suma de los momentos magnéticos de cada uno de los electrones constituyentes, incluyendo tanto las contribuciones orbitales como de espín y tomando en consideración la cancelación de los momentos. Entre los distintos tipos de magnetismo se incluyen el diamagnetismo, el paramagnetismo y el ferromagnetismo. Junto a éstos, el antiferromagnetismo y el ferrimagnetismo son considerados subclases del ferromagnetismo [Callister, 1996a].

- Diamagnetismo. Es una forma muy débil de magnetismo que no es permanente y persiste sólo mientras el campo externo está presente. Está asociado a átomos cuyo momento magnético neto es nulo y se debe a un cambio en el movimiento orbital de los electrones debido al campo magnético aplicado. La permeabilidad magnética relativa ( $\mu_r$ ) es ligeramente menor que uno y la susceptibilidad magnética ( $\chi$ ) es negativa. Recuérdese que  $\chi$  es una magnitud característica de cada material (en general, depende de la temperatura, de la orientación de la muestra respecto al gradiente aplicado y del valor de éste) y relaciona la imanación  $M$  (momento magnético por unidad de volumen) y el gradiente magnético  $H$ :

$$M = \chi \times H \tag{45}$$

La relación entre la inducción magnética  $B$  y el gradiente  $H$  en un medio imanado es:

$$B = \mu_0 (H + M) \quad (46)$$

Siendo  $\mu_0$  la permeabilidad magnética del vacío. Aplicando la ecuación 45:

$$B = \mu_0 (1 + M)H = \mu_0 \mu_r H = \mu H \quad (47)$$

que constituye la definición de permeabilidad magnética relativa ( $\mu_r$ ) y absoluta ( $\mu$ ).

- **Paramagnetismo.** Es característico de aquellos átomos o moléculas que tienen momentos magnéticos permanentes que no interactúan entre sí y que en ausencia de campo externo están orientados al azar, de modo que una porción cualquiera de material no posee imanación neta permanente. Estos dipolos atómicos son libres para girar y se producirá paramagnetismo cuando, mediante rotación, se alineen de forma preferente con un campo magnético externo. En estos materiales  $\chi$  es positiva y depende de la temperatura, mientras que  $\mu_r$  es ligeramente mayor que uno. Una característica muy interesante por sus implicaciones biomédicas es el superparamagnetismo. Esta propiedad es consecuencia de un cambio cualitativo en la estructura de los materiales magnéticos nanométricos, la cual pasa de estar constituida por numerosos dominios magnéticos, a estar formada por un único dominio magnético o monodominio. Esta estructura determina una reducción muy importante de la barrera de anisotropía magnética, lo que provoca la desaparición de la histéresis (no hay campo coercitivo ni remanencia) [Álvarez Paneque y cols., 2008].
- **Ferromagnetismo.** En estos materiales las interacciones de acoplamiento hacen que los momentos magnéticos netos de espín de átomos adyacentes se alineen unos con

otros aun en ausencia de un campo magnético aplicado. Esta alineación mutua de los espines se presenta en volúmenes relativamente grandes del cristal denominados dominios. La máxima imanación posible (magnetización de saturación) corresponde a la situación en que todos los dipolos magnéticos en una muestra sólida están mutuamente alineados con el campo externo. Estos materiales presentan una  $\chi$  positiva, muy grande y dependiente del campo mientras que  $\mu_r$  tiene un valor en torno a  $10^5$ . La magnetización de saturación y la permeabilidad magnética dependen significativamente de  $H$  y de la temperatura.

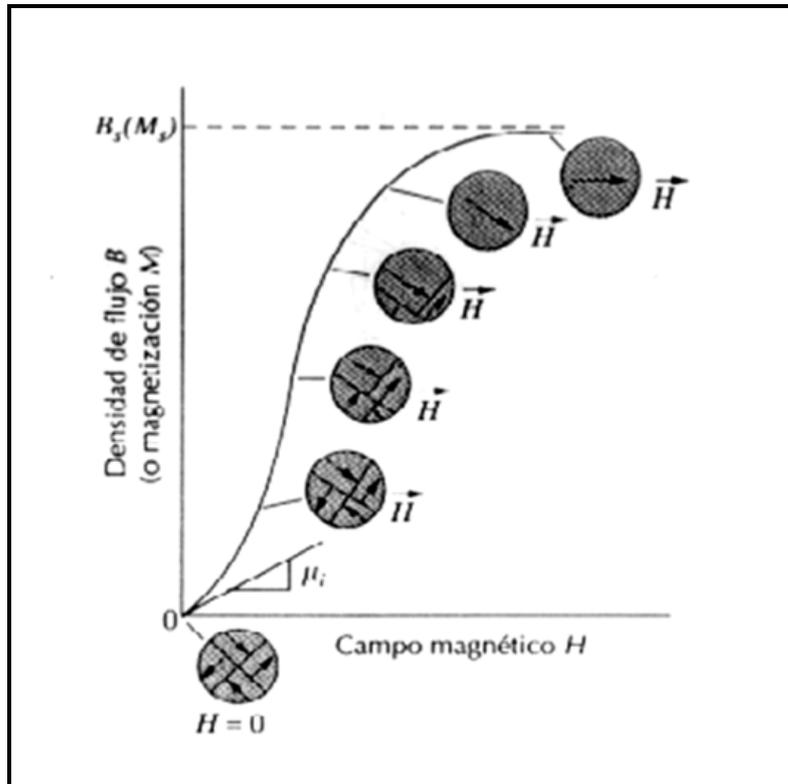
- Antiferromagnetismo. Fenómeno de acoplamiento entre los momentos magnéticos que determina su alineamiento antiparalelo, de modo que el material mostrará imanación espontánea nula. Estos materiales tienen una  $\mu_r > 1$  y  $\chi_m$  positiva.
- Ferrimagnetismo. La interacción de intercambio entre momentos magnéticos en estos materiales favorece también la alineación antiparalela, pero los momentos no son idénticos en módulo, por lo que no se cancelan completamente. Por este motivo su comportamiento será parecido al de los ferromagnéticos.

### **6.2. CICLO DE HISTÉRESIS**

La magnetita es un material iónico ferrimagnético con estructura cristalina cúbica holoédrica del tipo de las espinelas inversas y que pertenece al grupo de las ferritas blandas [Callister, 1996b]. Su fórmula puede escribirse como  $\text{Fe}^{2+}\text{O}^{2-}(\text{Fe}^{3+})_2(\text{O}^{2-})_3$ , donde los iones Fe existen en los estados de valencia +2 y +3 en una proporción 1:2. Para cada uno de los iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  existe un momento magnético que corresponde a 4 y 5 magnetones de Bohr, respectivamente. Además, los iones  $\text{O}^{2-}$  son magnéticamente neutros. Entre los iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  se producen interacciones de acoplamiento de los espines en las direcciones antiparalelas, similares a las que se producen en el caso del

antiferromagnetismo. Sin embargo, se produce un momento ferrimagnético neto debido a que los momentos de espín no se cancelan completamente.

Cualquier material ferromagnético o ferrimagnético a temperaturas inferiores a la temperatura de Curie está formado por pequeñas regiones tridimensionales en las que todos los momentos magnéticos se encuentran alineados en la misma dirección [Callister, 1996b; Mercouff, 1969]. Estas regiones se denominan dominios y cada uno está magnetizado hasta la saturación. Los dominios adyacentes están separados por paredes de dominio, a través de las cuales la dirección de imanación cambia gradualmente. La densidad de flujo ( $B$ ) y la intensidad del campo magnético ( $H$ ) no son proporcionales en el caso de los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos. Si el material está inicialmente no imanado, entonces  $B$  varía en función de  $H$  según se muestra en la Figura 6.1. La curva empieza en el origen, y a medida que aumenta  $H$ , la inducción  $B$  empieza a aumentar lentamente y después más rápidamente hasta que al final alcanza un nivel determinado y se hace independiente de  $H$ . Este valor máximo de  $B$  es la densidad de flujo de saturación ( $B_s$ ) y la imanación correspondiente es la imanación de saturación ( $M_s$ ). Según la ecuación  $B = \mu \cdot H$ , la permeabilidad ( $\mu$ ) es la pendiente de la curva  $B$  frente a  $H$ , y se puede apreciar en la Figura 6.1. que cambia con  $H$ . En algunas ocasiones, la pendiente de  $B$  frente a  $H$  (a  $H = 0$ ) se especifica como una propiedad del material, denominada permeabilidad inicial ( $\mu_i$ ), tal como se indica en la Figura 6.1.

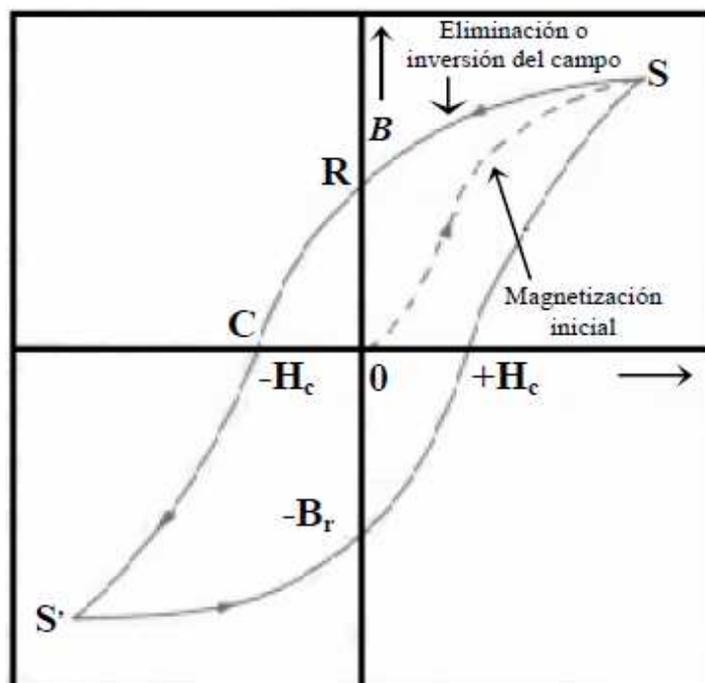


**Figura 6.1.** Comportamiento de  $B$  frente a  $H$  de un material ferromagnético o ferrimagnético que estaba inicialmente desmagnetizado. Se representan las configuraciones de los dominios durante varios estadios de la imanación.

A medida que se aplica el campo  $H$ , los dominios cambian de forma y tamaño debido al movimiento de los límites de dominio. Las estructuras típicas de los dominios están representadas de forma esquemática en varios puntos de la curva de la Figura 6.1. Inicialmente, los momentos de los dominios constituyentes están orientados al azar de tal manera que no existe un campo de momento neto  $B$  (o  $M$ ). A medida que se aplica el campo externo, los dominios que están orientados en direcciones favorables al campo aplicado (o casi alineado con él) crecen a expensas de aquellos que no están favorablemente orientados. Este proceso continúa al aumentar la intensidad del campo hasta que la muestra macroscópica se convierte en un solo dominio, el cual está casi

completamente alineado con el campo. La saturación se alcanza cuando este dominio gira y se orienta con el campo  $H$ .

A partir de la saturación, punto  $S$  de la Figura 6.2., a medida que el campo  $H$  se reduce, la curva no invierte su camino original, sino que se produce un efecto de histéresis. Debido a este efecto, el campo  $B$  va retrasado con respecto al campo aplicado  $H$ , es decir, disminuye más lentamente. Cuando el campo  $H$  es cero (punto  $R$  de la curva), existe un campo residual  $B$  que se denomina remanencia, o densidad de flujo remanente,  $B_r$ . Por este motivo, el material permanece imanado en ausencia de un campo externo  $H$ .



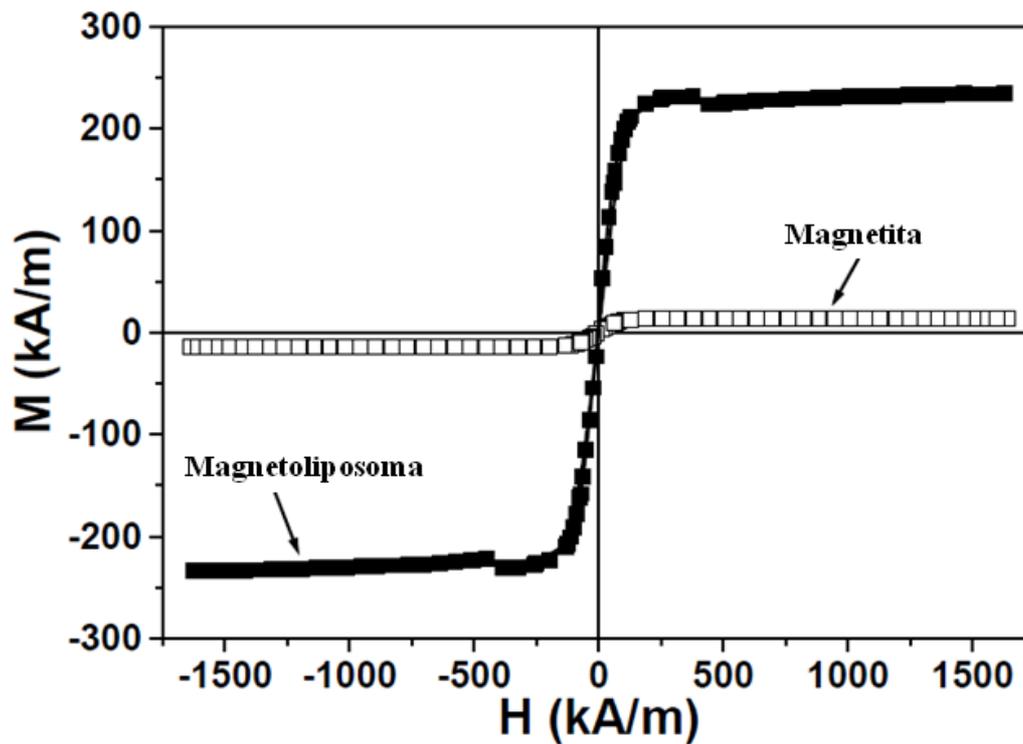
**Figura 6.2.** Densidad de flujo magnético frente a la intensidad del campo magnético de un material ferromagnético para la saturación en ambas direcciones (puntos  $S$  y  $S'$ ). La curva de histéresis viene representada por una curva sólida, mientras que la curva discontinua indica la primera imanación del material. La remanencia  $B_r$  y la fuerza coercitiva  $H_c$  también están representadas.

Para reducir a cero  $B$  dentro de la muestra (punto  $C$  de la Figura 6.2.), se debe aplicar un gradiente  $H$  de magnitud a  $-H_c$  en la dirección opuesta del gradiente original.  $H_c$  se denomina coercitividad, o bien, fuerza coercitiva. Al continuar aplicando el gradiente en la dirección contraria a la del original, finalmente se alcanza la saturación en la dirección opuesta, correspondiente al punto  $S'$ . Una segunda inversión del gradiente magnético hasta el punto de la saturación inicial (punto  $S$ ) completa el ciclo de histéresis simétrico y también produce una remanencia negativa ( $-B_r$ ) y una coercitividad positiva ( $+H_c$ ). La curva  $B$  frente a  $H$  de la Figura 4.6., representa un ciclo de histéresis hasta saturación. Desde luego, no es necesario aumentar  $H$  hasta la saturación antes de invertir su dirección. Además, es posible invertir la dirección del gradiente magnético en cualquier punto a lo largo de la curva y generar otros ciclos de histéresis.

La determinación del modo de variación de la imanación de la muestra con el gradiente magnético aplicado es una herramienta muy adecuada para caracterizar (a nivel macroscópico) el comportamiento magnético de un sistema transportador de fármacos basados en nanopartículas de óxido de hierro [Arias y cols., 2007a]. Por tanto, el objetivo a alcanzar en este apartado es la caracterización de las propiedades magnéticas de los núcleos de  $Fe_3O_4$  y el efecto que el recubrimiento lipídico puede tener sobre éstos. Las propiedades magnéticas de la magnetita y de los magnetoliposomas quedan perfectamente definidas mediante el ciclo de histéresis. Esta caracterización macroscópica del comportamiento magnético de las partículas coloidales se realizó con la ayuda de un magnetómetro-susceptibilímetro Manics DSM-8 (Francia). Todas las medidas se realizaron a  $25.0 \pm 0.5$  °C, ya que a esta temperatura se realizó la preparación y el almacenamiento de las suspensiones.

La Figura 6.3. recoge el ciclo de histéresis de las nanopartículas de magnetita y de las nanopartículas compuestas con la relación de masas correspondiente a la proporción 4:3 (fosfolípido:magnetita, PC: $Fe_3O_4$ ) estudiada anteriormente. En ambos

casos, el comportamiento observado se explica considerando el carácter superparamagnético de la magnetita, consecuencia del pequeño tamaño de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (< 20 nm) [López-López y cols., 2005]. Dado que no se pudo determinar con precisión la densidad de las partículas compuestas, los datos de imanación se dan en masa y no en volumen. De la región lineal del ciclo de histéresis (zona de campo magnético bajo) puede estimarse la susceptibilidad magnética inicial ( $\chi_{mi}$ ) de los materiales: ( $0.14 \pm 0.04$ ) en el caso de la magnetita, y ( $2.51 \pm 0.23$ ) en el caso de los magnetoliposomas. También se pudo apreciar un valor notablemente menor de la imanación de saturación en este segundo caso, debido a la menor cantidad de material magnetizable. Es muy interesante resaltar el aumento considerable en el valor de la magnetización de saturación de los núcleos magnéticos cuando quedan atrapados por la estructura vesicular fosfolipídica:  $14 \pm 2$  kA/m en el caso de la magnetita, y  $206 \pm 12$  kA/m en los magnetoliposomas.

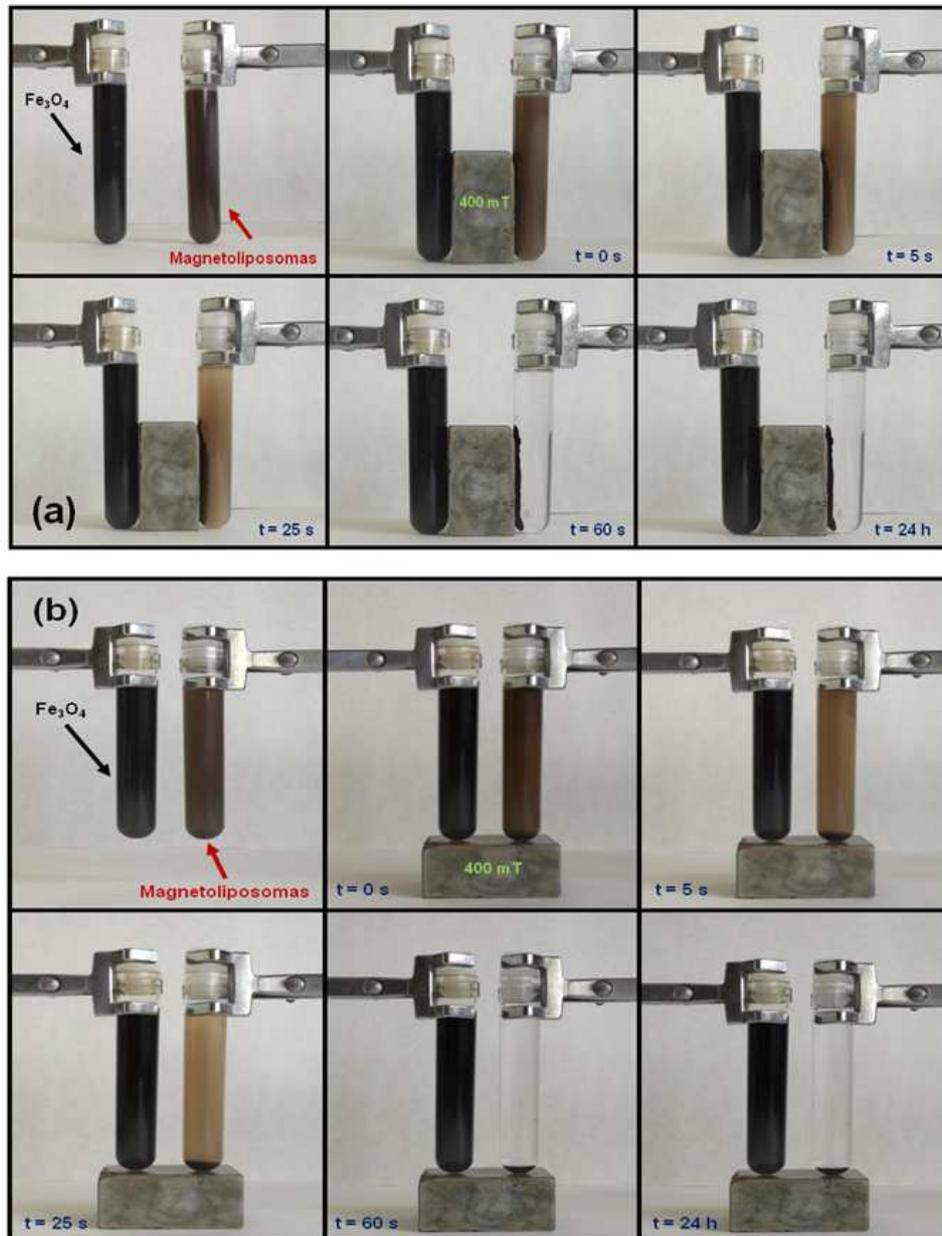


**Figura 6.3.** Ciclo de histéresis de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\square$ ) y de magnetoliposomas ( $\blacksquare$ ).

Estas propiedades magnéticas de los magnetoliposomas nos permiten postular que el nanosistema diseñado tiene las características adecuadas para su utilización en el transporte de fármacos a un órgano, tejido o célula diana, con una enorme capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados. Por este motivo, la direccionabilidad de las partículas coloidales hasta el lugar de acción en el organismo deberá quedar garantizada.

### **6.3. PRUEBA *IN VITRO* A NIVEL MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO**

El análisis cualitativo de la capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados de las partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y de magnetoliposomas fue analizada mediante visualización macroscópica del efecto que ejerce un imán permanente de 400 mT sobre una suspensión acuosa de estas nanopartículas. Más concretamente, fueron preparadas sendas suspensiones acuosas coloidales con una concentración  $< 0.5 \%$  (p/v). A continuación, se puso en contacto la suspensión de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y la de magnetoliposomas con un gradiente magnético de 400 mT a una temperatura de  $25.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , y se observó el comportamiento de las partículas magnéticas en estas condiciones. Como puede apreciarse en la Figura 6.4., los magnetoliposomas, con la relación de masas correspondiente a la proporción 4:3 (fosfolípido:magnetita, PC:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), son atraídos muy rápidamente por el imán, lo que confirma las excelentes propiedades magnéticas del nanosistema diseñado. De hecho, el sobrenadante de la suspensión queda completamente transparente en sólo 1 minuto desde que se sometieran las nanopartículas a la acción del imán. Por el contrario, la suspensión de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mantiene su aspecto homogéneo incluso tras 24 horas de exposición al gradiente magnético externo. El carácter superparamagnético de los núcleos de óxido de hierro justifica la ausencia de respuesta magnética.

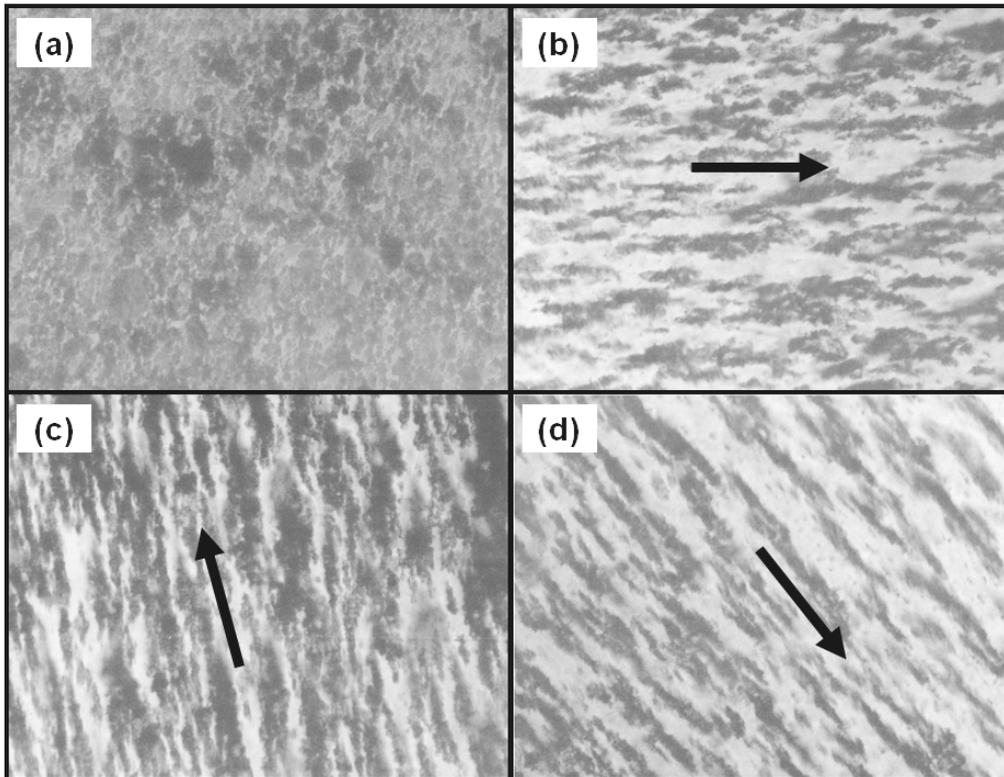


**Figura 6.4.** Observación visual macroscópica de la decantación magnética de las partículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y de los magnetoliposomas bajo la influencia de un imán permanente de 400 mT localizado en el lateral (a) o debajo (b) de las muestras.

Finalmente, con el fin de analizar el comportamiento a nivel microscópico de las suspensiones acuosas de magnetoliposomas, para ello, seguimos su evolución mediante

microscopía óptica. Indicar nuevamente que las suspensiones de magnetoliposomas presentaban la relación de masas correspondiente a la proporción 4:3 (fosfolípido:magnetita, PC:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). La suspensión acuosa de magnetoliposomas tenía una concentración de nanopartículas del 0.1 % (p/v) y la exposición a un campo magnético de 400 mT se realizó a  $25.0 \pm 0.5$  °C. En concreto, una gota de suspensión acuosa de las nanopartículas se colocó en un portaobjetos y fue sometida a un imán localizado en diferentes posiciones con respecto a la suspensión magnética. La visualización del efecto que el gradiente magnético ejerce sobre la suspensión de nanopartículas se realizó utilizando un microscopio óptico (magnificación: 40X).

Como puede observarse en la Figura 6.5., la suspensión acuosa de magnetoliposomas es muy homogénea en ausencia de campo magnético aplicado. Sin embargo, cuando la gota de suspensión queda bajo la influencia del imán de 400 mT, las nanopartículas tienden a formar agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección del gradiente magnético aplicado (Figura 6.5. en adelante). Este comportamiento puede explicarse si tenemos en cuenta que las interacciones magnéticas entre los magnetoliposomas son de mayor intensidad en comparación con las interacciones coloidales de tipo DLVO (interacciones electrostáticas tipo van der Waals y de hidratación o ácido-base), a pesar de la existencia del recubrimiento liposomal en torno a los núcleos de óxido de hierro.



**Figura 6.5.** Observación por microfotografía óptica (magnificación: 40X) de una suspensión acuosa de magnetoliposomas en ausencia (a) o bajo la influencia de un campo magnético externo ( $B = 400 \text{ mT}$ ), en la dirección de la flecha (b, c, d).



## **Capítulo 7.**

# **ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE LAS NANOPARTÍCULAS**



En el tratamiento del cáncer, es importante conocer la posible toxicidad de los coloides transportadores de fármacos sobre las células, ya que puede influir significativamente, en la llegada al lugar de acción y acceso a la zona diana. La ausencia de citotoxicidad de las nanoplataformas favorece la entrada de dichos nanosistemas en las células y tejidos tumorales, para así poder ejercer su función transportadora, y adicionalmente se evitara un perjuicio en las células sanas si se produce interacción con ellas, debido a la biocompatibilidad y biodegradabilidad de las partículas empleadas.

En este ensayo se evaluó la ausencia de citotoxicidad de los nanosistemas mixtos en fibroblastos de colon humano CCD-18 y en líneas celulares del carcinoma de colon humano T-84; asimismo se investigó la excelente compatibilidad sanguínea *in vitro* de núcleos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , liposomas y magnetoliposomas, por medio de la caracterización del efecto sobre la activación plaquetaria, la activación del complemento, la hemólisis y el tiempo de coagulación en muestras de plasma sanguíneo.

### **7.1. HEMOCOMPATIBILIDAD**

Es importante que los sistemas transportadores de fármacos presenten una adecuada compatibilidad sanguínea para así conseguir un perfil terapéutico óptimo [Bender y cols., 2012; Dash y cols., 2010]. Se investigó la interacción de nanopartículas de magnetita, liposomas y magnetoliposomas con componentes de la sangre para ver el uso potencial de los compuestos magnéticos en el transporte sistémico de fármacos en combinación con el fenómeno de hipertermia. Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de cinco mujeres adultas sanas (de entre 25 a 45 años), y fueron añadidas en recipientes que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, utilizado en experimentos de hemólisis y activación plaquetaria), o citrato sódico (utilizado en experimentos de activación del sistema del complemento y tiempo de coagulación del plasma sanguíneo). Siguiendo un método claramente definido [Dash y cols., 2010], las nanopartículas fueron puestas en contacto con alícuotas de muestras de sangre para

evaluar su efecto en los eritrocitos, la coagulación sanguínea y el sistema del complemento. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Una solución de tampón fosfato (PBS) fue usada como control negativo. Las técnicas espectrofotométricas UV fueron validadas con éxito y se verificó su exactitud, precisión y linealidad.

En la Tabla 7.1. se muestran los datos obtenidos a partir de los estudios de compatibilidad sanguínea. Los resultados sugieren claramente un amplio margen de seguridad *in vivo* para los tres tipos de partículas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , liposomas y magnetoliposomas), y por lo tanto, dichos nanosistemas pueden ser considerados adecuados para la administración por vía parenteral. De hecho, si comparamos los datos con los obtenidos a partir del control, se espera que las partículas presenten un efecto insignificante sobre la hemólisis; además de no afectar a la liberación de la sP-selectina (cuantificación de activación de las plaquetas), a la activación del sistema del complemento y al tiempo de coagulación del plasma sanguíneo. Resultados similares se han obtenido en otras partículas compuestas magnéticas con un margen de seguridad muy significativo a nivel *in vivo* [Dash y cols., 2010, Pérez-Artacho y cols., 2012].

<b>MUESTRA</b>	<b>HEMÓLISIS (%)</b>	<b>LIBERACIÓN DE sP-SELECTINA (ng/mL)</b>	<b>C3a desArg (ng/mL)</b>	<b>T<sub>1/2</sub> máx (min)</b>
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	1.6 ± 0.4	98 ± 7	290 ± 4	11.3 ± 0.6
<b>Liposomas</b>	1.7 ± 0.3	108 ± 5	294 ± 5	10.8 ± 0.6
<b>Magnetoliposomas</b>	1.4 ± 0.5	101 ± 6	288 ± 6	10.9 ± 0.5
<b>Control (solución PBS)</b>	0	103 ± 7	292 ± 8	11.1 ± 0.6

**Tabla 7.1.** Compatibilidad sanguínea de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , liposomas y magnetoliposomas en términos de hemólisis (%), activación plaquetaria (liberación de SP-selectina, ng/mL), la activación del complemento (C3a liberación: C3a desArg, ng/mL), y el tiempo de coagulación del plasma (T<sub>1/2</sub> máx, min).

## **7.2. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN *IN VITRO***

Las partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, liposomas y magnetoliposomas fueron probadas en fibroblastos de colon humano CCD-18, y en líneas celulares de carcinoma de colon humano T-84 (obtenidos del Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada, España; y de la *American Type Culture Collection*, EE.UU., respectivamente). Ambas líneas celulares se cultivaron en Medio de *Eagle* modificado de *Dulbecco* (DMEM) [Sigma-Aldrich, EE.UU], suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB), 15 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), 14 mM de bicarbonato sódico, 2 mM de L-glutamina, 40 µg/mL de gentamicina y 500 µg/mL de ampicilina [Antibióticos S.A., España]. Las células fueron sembradas en cultivos monocapa en 96 pocillos (6 · 10<sup>3</sup> células por pocillo), y mantenidas durante 24 horas a 37.0 ± 0.5 °C en una atmósfera controlada con un 5 % de CO<sub>2</sub> en aire.

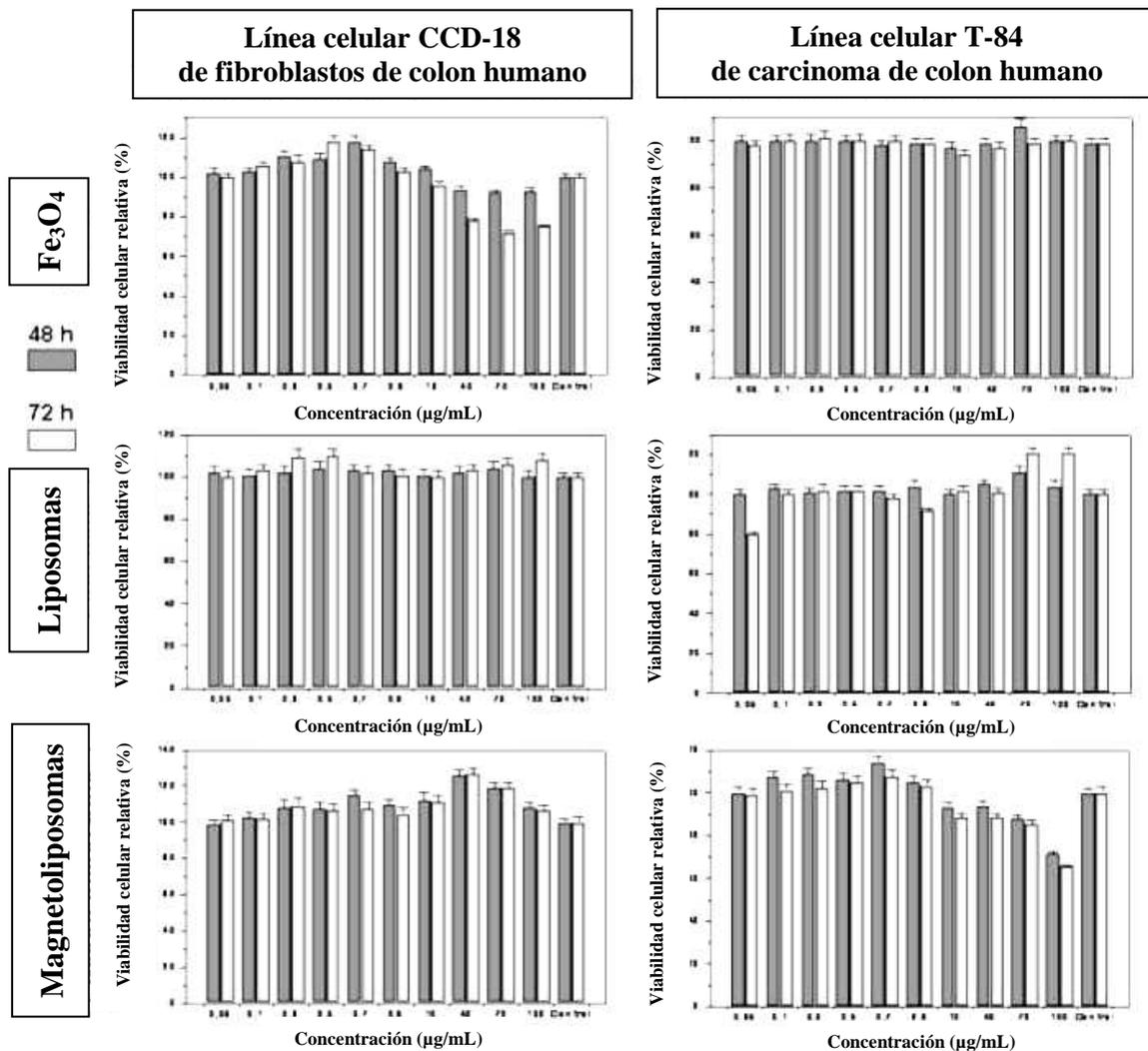
El análisis de citotoxicidad de las partículas en las líneas celulares se evaluó por triplicado mediante el ensayo MTT. El MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este proceso es realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas, la cual transforma al MTT de un compuesto hidrofílico de color amarillo a un compuesto azul, hidrofóbico (formazán). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Por lo cual, este método permite medir supervivencia y proliferación celular, así como también, determinar la citotoxicidad de potenciales agentes terapéuticos.

El porcentaje de proliferación se calculó utilizando ambas líneas celulares para partículas vacías. Brevemente, un amplio rango de concentración de partículas (0.05-100 µg/mL) se añadió a las células en el medio de cultivo. Después de 48 y 72 horas de incubación a 37.0 ± 0.5 °C, 20 µL de solución de MTT en medio de cultivo celular (5 mg/mL) se añadieron a cada pocillo. Después de 4 horas de incubación a la temperatura

establecida, el medio de cultivo se retiró y los cristales resultantes formados fueron disueltos en 200  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO). La densidad óptica (OD) del colorante empleado, es proporcional al número de células viables, y fue medida entre 570 nm y 690 nm, utilizando un colorímetro Titertek Multiscan [Flow Laboratories, Irvine, EE.UU]. El porcentaje de células vivas fue calculado a través de la relación entre las densidades ópticas de las células tratadas y las células no tratadas (control) multiplicado por 100.

Los datos de citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , liposomas y magnetoliposomas en las líneas celulares (fibroblastos de colon humano CCD-18 y células de carcinoma de colon humano T-84) utilizadas, pueden ser observados en la Figura 7.1. En general, se podría asumir que todos estos coloides (sin carga de fármaco), exhibieron una insignificante citotoxicidad en ambas líneas celulares. Independientemente del tipo y concentración de partícula, y tiempo de incubación célula-partícula; los resultados del ensayo de MTT indicaron que no hubo diferencias significativas entre las absorbancias correspondientes a los controles de las líneas celulares y las absorbancias correspondientes a los pocillos tratados con las nanopartículas. Sin embargo, las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a concentraciones superiores o iguales a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y después de 72 horas de tiempo de contacto (incubación) con las líneas celulares CCD-18, inducían una toxicidad importante ( $p < 0.05$ ), con  $\approx 22\text{-}28\%$  de la reducción en la proliferación celular. En el caso de los magnetoliposomas, estos indujeron una ligera toxicidad en las líneas de células T-84. Concretamente, a una concentración de 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , durante 48 horas de incubación, se produjo una reducción en la proliferación celular de  $\approx 12\%$  ( $p < 0.05$ ); para la misma línea celular, con un rango de concentración de 10 a 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , durante 72 horas de incubación, los magnetoliposomas produjeron una reducción en la proliferación celular de  $\approx 13\%$  ( $p < 0.05$ ). Además, puede ser inducida una toxicidad importante por parte de los magnetoliposomas en líneas de células T-84, con una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tras 48 y 72 horas de incubación, en estas condiciones se produce una reducción de la

proliferación celular de  $\approx 30\%$  y  $35\%$ , respectivamente ( $p < 0.05$ ). Por lo tanto, las concentraciones de partícula de magnetoliposomas que causan citotoxicidad no se deben utilizar en la terapia contra el cáncer.



**Figura 7.1.** Gráficas de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares de fibroblastos humanos de colon (CCD-18) y de carcinoma de colon humano (T-84), tras ser expuestas a nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, liposomas y magnetoliposomas, después de 48 (barra gris) y 72 (barra blanca) horas de incubación. Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar (*DE*) de tres determinaciones.



## **Capítulo 8.**

# **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE VEHICULIZACIÓN DE 5-FLUOROURACILO**



En la respuesta producida a un fármaco son fundamentales dos aspectos: tiempo que permanece el fármaco en su lugar de acción y cantidad de fármaco que llega a su diana terapéutica. Dicha administración aparece limitada por resistencias al fármaco, captura del medicamento por otras células del organismo, incapacidad del fármaco para penetrar en las células o tejidos en tratamiento o por carecer de un tropismo específico, distribuyéndose por el organismo y dirigiéndose no solo a la biofase, sino también al resto de células y tejidos. En consecuencia, para obtener una concentración suficiente a nivel de las células blanco, es necesario administrar dosis relativamente elevadas, que conducen a efectos toxicológicos e inmunológicos indeseables. En base a estas premisas irán encaminadas las nuevas formas de dosificación de medicamentos conocidas como formas de liberación controlada.

En el caso de los fármacos antitumorales, el objetivo será asegurar la máxima acumulación de estos principios en el lugar diana para tratar de aumentar su eficacia terapéutica y minimizar los fenómenos de toxicidad asociados al tratamiento farmacológico [Floréz, 2008]. En este sentido, uno de los campos que está recibiendo especial atención es la utilización de coloides como sistemas transportadores de fármacos al tejido u órgano diana. De hecho, numerosos estudios han puesto de manifiesto que los sistemas transportadores basados en nanopartículas biodegradables de origen liposomal o polimérico, incrementan la captación del principio activo vehiculizado por las células diana. De esta manera, la eficacia del fármaco se verá significativamente acrecentada, junto con la minimización de la incidencia y severidad de las reacciones adversas asociadas a su utilización [Arias, 2008a; Arias y cols., 2009a, 2011a].

Así pues el objetivo de esta fase de la investigación es lograr una óptima vehiculización del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo en el coloide magnético que hemos diseñado. Según lo expuesto en el Capítulo 1, puede esperarse que la utilización de nanopartículas biodegradables constituidas por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento lipídico (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina) permita

el transporte controlado de dosis de fármaco vehiculizado hasta el tejido u órgano diana. De esta manera, además de los beneficios ya comentados sobre el uso de este tipo de nanoplataformas [Durán y cols., 2008; Pouliquen y Chouly, 1999], en el caso del 5-fluorouracilo, serían mejorados sus problemas de estabilidad-toxicidad (cardiotoxicidad de los productos de degradación generados *in vitro* y/o *in vivo*) [Katzung, 2007; Lemaire y cols., 1994] y su perfil farmacocinético (rápida metabolización: semivida plasmática de 10 minutos) [Flórez, 2008], pudiéndose incluso llegar a vencer los fenómenos de resistencia que las células cancerosas lograran desarrollar [Durán y cols., 2008].

El estudio de la adsorción superficial de fármaco en los tres tipos de nanomateriales se abordará desde un punto de vista cualitativo (electroforesis) y cuantitativo (espectrofotometría UV-Vis). La evaluación de la estabilidad sobre la permanencia del fármaco absorbido en las nanopartículas dependiendo de factores como el tiempo transcurrido tras la síntesis y el almacenamiento de dichas suspensiones bajo diferentes condiciones de temperatura desde un punto de vista cuantitativo (espectrofotometría UV-Vis). Finalmente, se llevará a cabo la caracterización *in vitro* del proceso de liberación del 5-FU desde las nanopartículas en ausencia del fenómeno de hipertermia y bajo la influencia de dicho fenómeno, y la estimación de las cinéticas correspondientes.

El objetivo último de la terapia antineoplásica es la eliminación completa de toda célula cancerosa. La quimioterapia constituye un método terapéutico muy útil que pretende, junto con otras estrategias terapéuticas como la cirugía y la radioterapia, mejorar el tratamiento de la enfermedad. La acción de los antineoplásicos se dirige en su totalidad a frenar la proliferación y el crecimiento celular. Para ello, los agentes quimioterápicos actúan sobre la maquinaria reproductora celular y sólo excepcionalmente el objetivo primordial es inhibir la síntesis de proteínas [Flórez, 2008]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los fármacos

antineoplásicos en tres niveles de prioridad, según criterios avalados científicamente acerca de la utilidad en el tratamiento de tumores y según la incidencia global de los tumores que responden a la terapia [Sikora y cols., 1999]. Dentro de los antineoplásicos que pertenecen al grupo de prioridad 1 se encuentra el 5-fluorouracilo (Tabla 8.1.), eficaz en el tratamiento de los diez tipos de tumores con mayor incidencia (pulmón, estómago, mama, colorrectal, cérvix, cabeza y cuello, linfoma, hepatobiliar, esofágico y próstata) y de aquellos clasificados en las categorías 1 y 2. La primera categoría incluye tumores para los que existe evidencia de que un fármaco o una combinación de quimioterápicos, utilizada en solitario o con otras modalidades terapéuticas, da lugar a una curación total en algunos pacientes o a una prolongación de la supervivencia en la mayoría. Dichos tumores son: cáncer de células germinales, trofoblástico, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, linfoma de enfermedad de Hodgkin y no Hodgkin. En la categoría 2 se engloban tumores en los que la supervivencia media se prolonga cuando la quimioterapia es utilizada como coadyuvante de la cirugía local o la radioterapia en los estados iniciales de la enfermedad. Estos son: cáncer colorrectal, de mama, de ovario, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, retinoblastoma y tumor de Wilms.

<b>FÁRMACOS ANTITUMORALES</b>	<b>ACTIVIDAD SOBRE LOS DIEZ TIPOS DE CÁNCER CON MAYOR INCIDENCIA</b>	<b>ACTIVIDAD SOBRE LOS TIPOS DE CÁNCER AGRUPADOS EN LAS CATEGORÍAS 1 Y 2</b>
Bleomicina	+	+
Clorambucilo	+	+
Cisplatino	+	+
Ciclofosfamida	+	+
Doxorrubicina	+	+
Etopósido	+	+
<b>5-fluorouracilo</b>	+	+
Metotrexato	+	+
Prednisolona	+	+
Procarbacina	-	+
Tamoxifeno	+	+
Vincristina	+	+
Citarabina	-	+
Dactinomicina	-	+
6-mercaptopurina	-	+
Vinblastina	+	+
Daunorubicina	-	+

**Tabla 8.1.** Fármacos antitumorales de prioridad 1. El signo + indica actividad sobre ese grupo de tumores y el signo - indica ausencia de actividad.

## **8.1. CARACTERIACIÓN DEL 5-FLUOROURACILO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS**

### **8.1.1. ABSORBANCIA ÓPTICA DE LAS DISOLUCIONES DE 5-FLUOROURACILO**

Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible (UV-Vis) encuentran una enorme aplicación en la identificación y determinación cuantitativa de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas. La espectroscopía de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia  $T$  o de la Absorbancia  $A$  de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes

que tienen un camino óptico de  $b$  cm. Normalmente, la concentración de un analito absorbente está relacionada con la Absorbancia como se muestra en la siguiente ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (48)$$

donde  $A$  es la Absorbancia,  $T$  es la transmitancia,  $P$  y  $P_0$  son las intensidades transmitida e incidente, respectivamente,  $\epsilon$  es la absortividad molar,  $b$  es el camino óptico de la radiación y  $c$  es la concentración de analito absorbente. Esta ecuación es una representación matemática de la ley de Beer.

La ley de Beer también se puede aplicar a un medio que contenga más de una clase de sustancias absorbentes. La absorbancia total de una disolución es igual a la suma de las absorbancias que presentan los componentes individuales. Esta relación hace posible la determinación cuantitativa de los constituyentes individuales de una mezcla, incluso si sus correspondientes espectros se solapan [Skoog y cols., 2001]. Siempre que se cumpla la ley de Beer y las distintas especies se comporten de forma independiente unas respecto de otras, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por:

$$A_{total} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1 bc_1 + \epsilon_2 bc_2 + \dots + \epsilon_n bc_n \quad (49)$$

donde los subíndices se refieren a los componentes absorbentes 1,2,...,  $n$ . La mayor exactitud de un análisis de este tipo se alcanza cuando se seleccionan longitudes de onda en las que las diferencias entre las absortividades molares sean grandes.

Se han encontrado pocas excepciones a la generalización de que la absorbancia está relacionada linealmente con el camino óptico. Por otra parte, con frecuencia se han encontrado desviaciones de la proporcionalidad entre la medida de absorbancia y la concentración cuando  $b$  es constante [Skoog y cols., 2001]. En algunas ocasiones estas desviaciones están relacionadas con el fundamento de la ley y representan limitaciones propias de la misma. Otras veces surgen como consecuencia de la forma en que se realizan las medidas de absorbancia (desviaciones instrumentales) o como resultados de cambios químicos asociados con cambios de concentración (desviaciones químicas).

Hay que recordar que la ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentración de analito relativamente bajas. A concentraciones altas, generalmente superiores a  $10^{-2}$  M, la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas. Esta interacción, a su vez, puede 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. Aunque, normalmente, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a  $10^{-2}$  M, entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes aparecen algunas excepciones.

La absorción UV-Vis resulta, generalmente, de la excitación de los electrones de enlace, como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio. La espectroscopía de absorción molecular es, por tanto, válida para identificar grupos funcionales en una molécula. Sin embargo, más importantes son las aplicaciones en la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes.

El espectrofotómetro ultravioleta-visible utilizado en este trabajo (Pekin Elmer Lambda 35, Spectrometer UV-Vis, EE.UU.) está equipado con una lámpara de deuterio, que produce un espectro continuo útil para la región comprendida entre 180 y 375 nm, y otra de wolframio, útil para la región de longitudes de onda comprendida entre 350 y 1100 nm. Así, este aparato permite obtener un espectro desde los 180 nm hasta 1100 nm. La cubeta utilizada es de cuarzo, transparente en la región espectral de interés, y con un camino óptico de 1 cm. Su mantenimiento es crítico para la calidad de las medidas, por lo que la limpieza completa antes y después de su uso es fundamental y se realizó siempre con agua destilada y acetona.

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

Dentro de este apartado, el 5-fluorouracilo utilizado (Sigma-Aldrich, Alemania) es un polvo cristalino blanco o casi blanco, inodoro y estable en aire. Su fórmula química es  $C_4H_3FN_2O_2$  y su peso molecular es 130.08 g/mol. Su punto de fusión se encuentra entre 280 y 284 °C, y es soluble en dimetilsulfóxido (DMSO), bastante soluble en agua (1:80), poco soluble en alcohol (1:170) e insoluble en cloroformo, benceno y éter [Florey, 1973]. Si bien no es termosensible y si muy fotosensible.

En base a algunas de las características del fármaco, si bien la metodología seguida en la formulación de los coloides determina las condiciones de trabajo, un

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

---

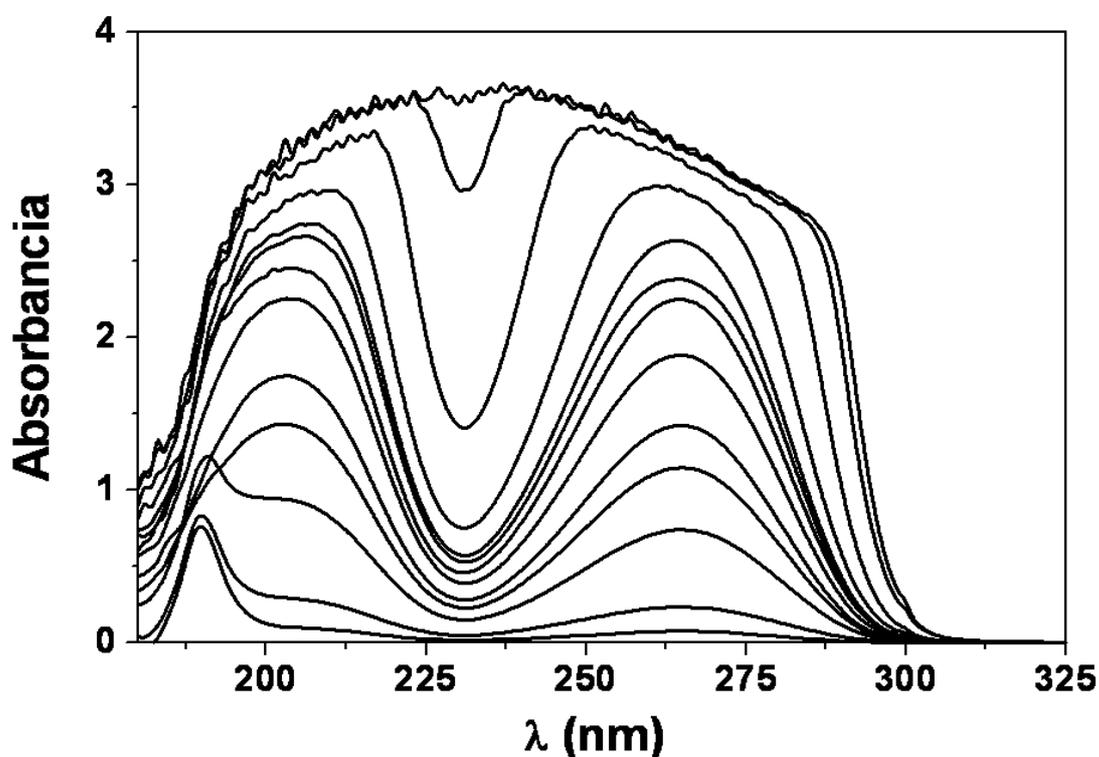
aspecto crucial previo es la clarificación de las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de fármaco. En nuestro caso, se investigaron las condiciones óptimas de conservación durante 24 horas según la concentración molar de fármaco y el pH de las disoluciones. No se observó ningún tipo de alteración macroscópica de las disoluciones del 5-fluorouracilo tras el período de conservación de 24 horas. Finalmente, y en referencia a la temperatura de conservación, las disoluciones preparadas se mantuvieron siempre a 4 °C hasta ser utilizadas para así ralentizar los posibles procesos de degradación. Debemos destacar que la metodología de trabajo general está condicionada debido al carácter fotosensible del 5-fluorouracilo [Florey, 1973] y por la formación de cristales en las disoluciones acuosas de éste con una concentración por encima de  $10^{-2}$  M [Arias y cols., 2005].

Por lo tanto, antes de abordar la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración del fármaco, hay que indicar que la preparación y manipulación de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo se realizó a temperatura ambiente, protegiéndolas de la luz ambiental (cubiertas por papel de aluminio) debido al carácter fotosensible del 5-fluorouracilo, a pH natural (4.9) y pH fisiológico (7.4) y en un rango de concentración comprendido de  $10^{-5}$  hasta  $10^{-2}$  M. Para la disolución de los cristales de 5-fluorouracilo se precisó la utilización de ultrasonidos. Su intensidad y la duración de la aplicación fue menor para las disoluciones preparadas a pH 7.4. No se observó ningún tipo de alteración macroscópica en las disoluciones de este agente quimioterápico tras el período de conservación de 24 horas. Sin embargo, se ha descrito que en disoluciones con una concentración superior a  $10^{-2}$  M ocurre espontáneamente la recristalización de este fármaco en solución [Arias y cols., 2005; Barberi-Heyob y cols., 1995].

La curva de calibrado de las disoluciones del 5-fluorouracilo se realizó utilizando las concentraciones molares  $10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $8.5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $7 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M. Transcurridas 24 horas desde su preparación, se

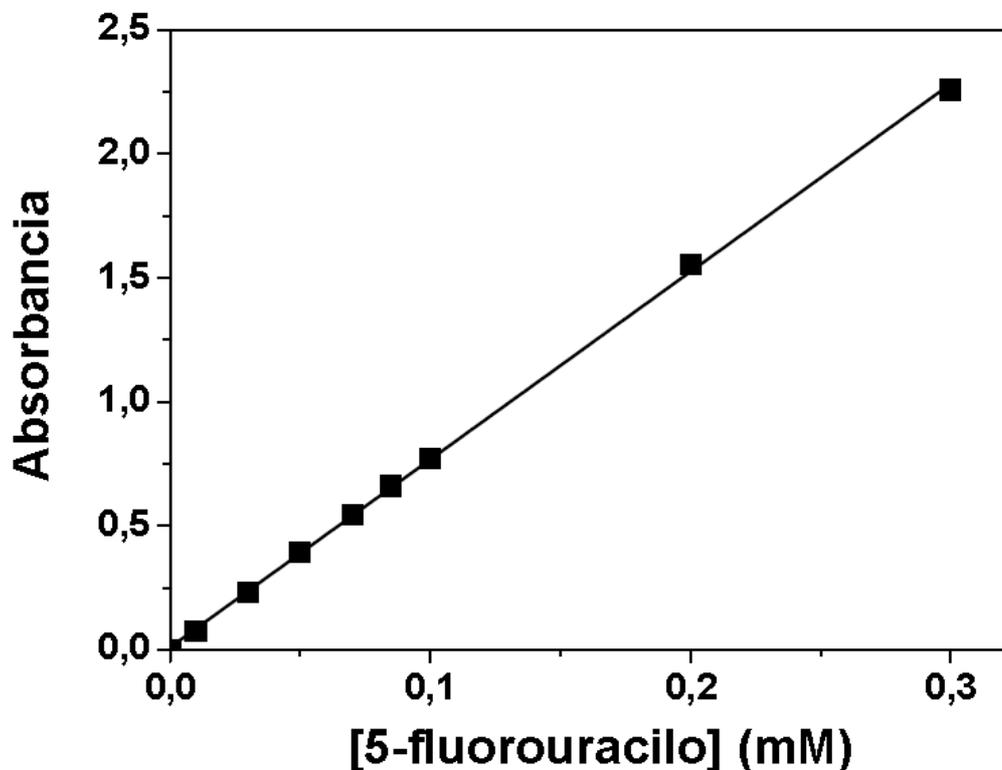
determinó el espectro de absorción UV-Vis de cada una de las disoluciones según la metodología ya descrita para el 5-fluorouracilo.

Los resultados de este estudio se recogen en la Figura 8.1., donde sólo se observa señal por debajo de 325 nm y se aprecia cómo la absorción se incrementa al aumentar la concentración de fármaco en el medio. El único máximo de los observados que presenta una longitud de onda de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones es el correspondiente a 266 nm [Florey, 1973], longitud de onda seleccionada para las medidas que realizamos. A partir de concentraciones superiores a  $2 \cdot 10^{-4}$  M se aprecia una irregularidad del espectro con tendencia de los dos picos a fusionarse, hecho que se produce por encima de  $10^{-3}$  M. La longitud de onda de máxima absorbancia decrece significativamente conforme la concentración de 5-fluorouracilo aumenta por encima de  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Esta desviación de la ley de Beer impide realizar determinaciones fiables a estas concentraciones.



**Figura 8.1.** Espectro de absorbancia UV-Vis de las disoluciones de 5-fluorouracilo. Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son:  $10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $8.5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $7 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M.

La determinación del coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) se realizó según la metodología ya indicada, siendo el resultado obtenido  $\epsilon = 7720 \pm 160 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $r = 0.999$ ). En la Figura 8.2. se muestran los datos y la recta de ajuste. Los valores de absorbancia a diferentes concentraciones obtenidos a 266 nm cumplen la ley de Beer.



**Figura 8.2.** Determinación del coeficiente de absortividad molar de las disoluciones de 5-fluorouracilo a la longitud de onda de máxima absorbancia (266 nm).

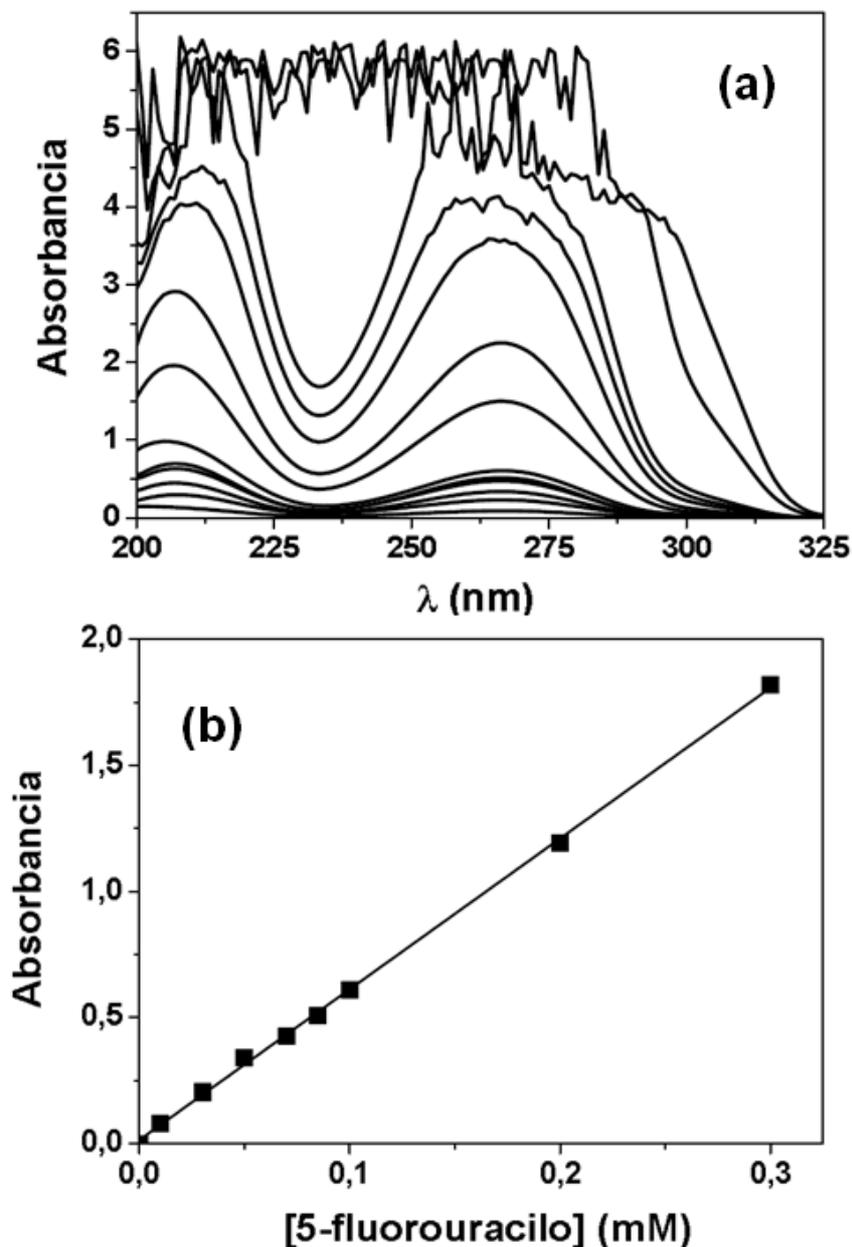
En el caso del efecto del pH sobre la absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo existe una clara reducción en los valores de absorbancia a 266 nm cuando el fármaco se expone a un pH ligeramente básico [Arias y cols., 2005]. Esto es lógico si recordamos que bajo estas condiciones se encuentra favorecida la transformación (degradación) del agente antitumoral en las sustancias cardiotoxicas fluoroacetaldehído y ácido fluoromalonaldehídico [Bertolini y cols., 1999; Lemaire y cols., 1994]. Por ello, preparamos una curva de calibrado con una batería de disoluciones acuosas a pH 7.4.

La Figura 8.3. muestra la aparición de dos máximos por debajo de 350 nm, cuya absorbancia crece al aumentar la concentración de principio activo en el medio. El

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

---

primero de ellos ( $\lambda = 266$  nm, como ocurre a pH 4.9) será el que utilizemos en la cuantificación de la liberación de fármaco desde los diferentes tipos de nanopartículas. Por encima de  $2 \cdot 10^{-4}$  M, los máximos tienden a fusionarse en uno (lo que ocurre cuando la concentración es superior a  $10^{-3}$  M), por lo que no pueden realizarse medidas por encima de esta concentración. En la Figura 8.3.b quedan recogidos los datos experimentales utilizados y la resta de ajuste obtenida en la determinación del coeficiente de absorptividad molar ( $\varepsilon = 5977 \pm 150$  L $\cdot$ mol $^{-1}$  $\cdot$ cm $^{-1}$ ,  $r = 0.995$ ).



**Figura 8.3.** (a) Espectro de absorbancia UV-Vis de disoluciones de 5-fluorouracilo preparadas utilizando un tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4). Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son:  $10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $8.5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $7 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M. (b) Determinación del coeficiente de adsorividad molar de las disoluciones de 5-fluorouracilo a un pH  $7.4 \pm 0.1$  y para la longitud de onda de máxima absorbancia (266 nm).

### 8.1.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTICO

El método espectrofotométrico UV-Vis que se utilizará para el análisis de la cantidad de fármaco vehiculizado o liberado por los colides debe ser validado previamente para verificar su exactitud, precisión o linealidad. Antes de describir la validación del método, debemos definir qué se entiende por linealidad, precisión y exactitud de una metodología experimental.

La linealidad de un método analítico se define como la proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta en el intervalo de concentraciones de producto utilizadas para las cuáles el método es satisfactorio. A la hora de realizar los ajustes lineales, hemos recurrido al método de los mínimos cuadrados, de acuerdo con el cuál obtenemos rectas de la forma  $y = a + bx$ . En referencia a la exactitud del método, se define como el error sistemático que indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor real. Se calcula a partir del error relativo y del coeficiente de variación para cada una de las concentraciones de las rectas. Se acepta un error de un orden de magnitud menor y un coeficiente de variación entre un 5 y un 10 %. Finalmente, la precisión es la medida del grado de reproducibilidad de un método analítico o, dicho de otro modo, el grado de dispersión de los datos de los distintos replicados. Por consiguiente, se puede considerar como el error aleatorio y se determina a partir del coeficiente de variación de cada una de las concentraciones de las rectas de calibrado, valores no superiores a un 5-10 %.

Con este objetivo, se prepararon seis réplicas de disoluciones acuosas con concentraciones molares de 5-fluorouracilo entre  $10^{-5}$  M y  $10^{-2}$  M, a pH natural (4.9) y a pH 7.4 (utilizado en los ensayos de liberación *in vitro*). Como ya se ha comentado, hasta el momento de realizar la medida las disoluciones de fármaco se conservaron a 4 °C durante 24 horas y protegidas de la luz con papel de aluminio.

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

---

En la Tabla 8.2. se recogen los valores de absorbancia de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo en función de su concentración a pH natural. Se muestran los valores medios de absorbancia y las desviaciones estándar (D.E.) para cada una de las concentraciones, así como el coeficiente de variación (C.V.). Los bajos valores de los coeficientes de variación (< 5 % en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. El ajuste lineal de la relación absorbancia (A) – concentración molar (C) [ $A = (0.03 \pm 0.08) + (7720 \pm 160) \cdot C$ ] es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

CONCENTRACIÓN (M)	ABSORBANCIA	C.V. (%)
$10^{-5}$	$0.0764 \pm 0.002$	1.96
$3 \cdot 10^{-5}$	$0.2334 \pm 0.005$	2.15
$5 \cdot 10^{-5}$	$0.3915 \pm 0.011$	2.81
$7 \cdot 10^{-5}$	$0.5433 \pm 0.017$	3.13
$8.5 \cdot 10^{-5}$	$0.6618 \pm 0.012$	1.82
$10^{-4}$	$0.7721 \pm 0.018$	2.33
$2 \cdot 10^{-4}$	$1.5534 \pm 0.039$	2.51
$3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.7903 \pm 0.025$	1.11
$5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.7836 \pm 0.016$	2.04
$7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.7975 \pm 0.014$	1.76
$10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.7699 \pm 0.012$	1.56
$5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.7713 \pm 0.015$	1.94
$10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.8116 \pm 0.029$	3.58

**Tabla 8.2.** Absorbancia (media  $\pm$  D.E.) de las soluciones acuosas de 5-fluorouracilo para cada una de las concentraciones indicadas a pH 4.9 (natural). Las concentraciones por encima de  $2 \cdot 10^{-4}$  M fueron diluidas hasta  $10^{-4}$  M antes de realizar la medida. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

Con el propósito de comprobar la exactitud del método analítico, utilizamos los datos de absorbancia de las concentraciones estudiadas o (“concentraciones verdaderas”) para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas como “estimadas” en la Tabla 8.3. Como antes, los bajos valores de los C.V. y sus

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico.

VERDADERA (M)	ESTIMADA (M)	ERROR RELATIVO (%)	C.V. (%)
$10^{-5}$	$(9.891 \pm 0.22) \cdot 10^{-6}$	1.11	2.22
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.022 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	0.66	0.33
$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.062 \pm 0.14) \cdot 10^{-5}$	1.18	2.77
$7 \cdot 10^{-5}$	$(7.035 \pm 0.09) \cdot 10^{-5}$	0.43	1.28
$8.5 \cdot 10^{-5}$	$(8.562 \pm 0.13) \cdot 10^{-5}$	0.71	1.52
$10^{-4}$	$(1.013 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	0.99	1.98
$2 \cdot 10^{-4}$	$(2.027 \pm 0.08) \cdot 10^{-4}$	0.99	3.96
$3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.024 \pm 0.11) \cdot 10^{-4}$	2.39	3.75
$5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.018 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	0.99	2.97
$7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.031 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	2.91	3.88
$10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.969 \pm 0.19) \cdot 10^{-5}$	0.41	1.91
$5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.995 \pm 0.23) \cdot 10^{-5}$	0.11	2.31
$10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.058 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	4.76	1.91

**Tabla 8.3.** Comparación de las concentraciones “verdaderas” de 5-fluorouracilo en solución acuosa con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de  $2 \cdot 10^{-4}$  M fueron diluidas hasta  $10^{-4}$  M antes de realizar la medida. Los valores “estimados” son la media ( $\pm$  D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado - verdadera)/estimado], también se muestran los C.V.

De igual forma se procedió para la validación del 5-fluorouracilo a pH 7.4 (tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Tabla 8.4.). Los bajos valores de los coeficientes de variación (< 5 %, en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A) - concentración molar (C) [ $A = (0.002 \pm 0.005) + (5977 \pm 105) \times C$ ] se confirma estadísticamente, con un error inferior al 0.01 %. Finalmente, se procedió de igual forma a la anteriormente descrita para demostrar la exactitud del método analítico (Tabla 8.5.).

CONCENTRACIÓN (M)	ABSORBANCIA	C.V. (%)
$10^{-5}$	$0.0595 \pm 0.002$	3.36
$3 \cdot 10^{-5}$	$0.1822 \pm 0.003$	1.65
$5 \cdot 10^{-5}$	$0.3108 \pm 0.007$	2.21
$7 \cdot 10^{-5}$	$0.4256 \pm 0.018$	4.23
$8.5 \cdot 10^{-5}$	$0.5076 \pm 0.023$	4.53
$10^{-4}$	$0.6103 \pm 0.030$	4.91
$2 \cdot 10^{-4}$	$1.1915 \pm 0.016$	1.34
$3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.6113 \pm 0.025$	1.37
$5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.6005 \pm 0.030$	4.91
$7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.6143 \pm 0.029$	4.72
$10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.6003 \pm 0.026$	4.33
$5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.6213 \pm 0.031$	4.99
$10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.6103 \pm 0.030$	4.91

**Tabla 8.4.** Absorbancia (media  $\pm$  D.E.) de las soluciones acuosas de 5-fluorouracilo para cada una de las concentraciones indicadas a pH 7.4. Las concentraciones por encima de  $2 \cdot 10^{-4}$  M fueron diluidas hasta  $10^{-4}$  M antes de realizar la medida. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

VERDADERA (M)	ESTIMADA (M)	ERROR RELATIVO (%)	C.V. (%)
$10^{-5}$	$(9.955 \pm 0.19) \cdot 10^{-6}$	0.45	1.91
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.048 \pm 0.12) \cdot 10^{-5}$	3.94	1.59
$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.199 \pm 0.14) \cdot 10^{-5}$	3.85	2.69
$7 \cdot 10^{-5}$	$(7.121 \pm 0.07) \cdot 10^{-5}$	1.70	0.98
$8.5 \cdot 10^{-5}$	$(8.493 \pm 0.10) \cdot 10^{-5}$	0.08	1.18
$10^{-4}$	$(1.021 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	2.06	4.89
$2 \cdot 10^{-4}$	$(1.994 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}$	0.33	3.01
$3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.023 \pm 0.14) \cdot 10^{-4}$	1.52	4.59
$5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.005 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	2.22	1.96
$7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.028 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	2.70	2.92
$10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.004 \pm 0.05) \cdot 10^{-4}$	0.43	4.98
$5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.039 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	3.80	3.85
$10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.021 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	2.06	0.98

**Tabla 8.5.** Comparación de las concentraciones “verdaderas” de 5-fluorouracilo en solución acuosa con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de  $2 \cdot 10^{-4}$  M fueron diluidas hasta  $10^{-4}$  M antes de realizar la medida. Los valores “estimados” son la media ( $\pm$  D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado - verdadera)/estimado], también se muestran los C.V.

Como conclusión, puede afirmarse que el método espectrofotométrico propuesto es lineal, exacto y preciso, pudiéndose usar los coeficientes de absortividad calculados para evaluar la concentración de cualquiera de los fármacos en disoluciones cuya concentración se desconoce.

### **8.1.3. METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE 5-FLUOROURACILO EN LAS NANOPARTÍCULAS**

La determinación cuantitativa de la incorporación del 5-fluorouracilo en las nanoplataformas diseñadas se basa en la metodología establecida por otros autores para la cuantificación del fármaco vehiculizado y liberado por diferentes tipos de

sistemas coloidales [Fawaz y cols., 1997; Müller y cols., 1991; Sullivan y Birkinshaw, 2004]. Esta metodología ha sido puesta a punto por nuestro grupo de investigación [Arias y cols., 2008a, c, 2009a, 2010a]. En concreto, la técnica se basa en la aplicación de la ley de Beer a un medio que contenga más de un tipo de sustancias absorbentes. Como es sabido, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por la suma de las absorbancias de cada una de las especies, siempre que no exista interacción entre éstas (ver ecuación 49). De esta manera, se acepta la contribución de cada una de las sustancias presentes en el medio de dispersión/preparación de las nanopartículas (o de las sustancias que se han generado en el proceso de liberación de los principios activos) a la absorbancia total del sistema.

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

### **8.2. INCORPORACIÓN SUPERFICIAL DEL 5-FLUOROURACILO**

Existen dos métodos generales para llevar a cabo la vehiculización de un fármaco determinado en sistemas coloidales [Arias y cols., 2010c, d, e]: su adición en el momento en el que se generan las nanopartículas, de forma que quede atrapado

principalmente en la matriz del coloide (método de absorción), o la adsorción superficial tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de principio activo. Es previsible que la mayor captación de fármaco se consiga mediante el método de absorción [Arias y cols., 2009a; Soppimath y cols., 2001].

El estudio de vehiculización superficial del 5-fluorouracilo en los coloides diseñados se centró en la evaluación del grado de unión a la superficie como mecanismo coadyuvante en la captación del fármaco en los liposomas y los magnetoliposomas. También determinaremos la adsorción en la superficie de los núcleos magnéticos con vistas a una posible aplicación en la incorporación de fármaco en los magnetoliposomas mediante absorción. Para ello, se realizarán determinaciones espectrofotométricas UV-Vis y, como se recoge más adelante, un estudio electroforético de los tres tipos de nanomateriales.

### **8.2.1 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA**

La determinación de la adsorción superficial de fármaco sobre las nanopartículas se realizó partiendo de una serie de disoluciones acuosas (10 mL) con diferente concentración molar de principio activo ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M). En todos estos medios de dispersión se fijó una concentración de nanopartículas del 1 % (p/v). Justo antes de añadirles se tomó una muestra del medio de dispersión para su posterior comparación. Tras 24 horas de contacto de las nanopartículas con el fármaco a  $25\text{ °C} \pm 0.1\text{ °C}$  y bajo agitación mecánica (50 rpm), se separaron los sobrenadantes mediante doble centrifugación a 6000 rpm durante 30 minutos, para así determinar sus correspondientes espectros de absorción UV-Vis. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones de fármaco. El cálculo de la adsorción superficial de fármaco en los tres tipos de nanopartículas se realizó mediante la comparación de la absorbancia de las muestras del medio (tomadas antes de añadir los coloides) con los sobrenadantes obtenidos tras una doble centrifugación de las

suspensiones con fármaco, y una vez eliminada la contribución a la absorbancia total del sistema de los residuos o subproductos del experimento de adsorción [Arias y cols., 2010c]. La cantidad de fármaco incorporado en la superficie de las partículas se expresa en términos de eficacia de atrapamiento (*entrapment efficiency*, *EE* %) y de carga de fármaco (*drug loading*, *DL* %) [Arias y cols., 2009a; Brigger y cols., 2004].

$$EE(\%) = \frac{\text{fármaco vehiculado (mg)}}{\text{cantidad total de fármaco utilizada (mg)}} \times 100 \quad (50)$$

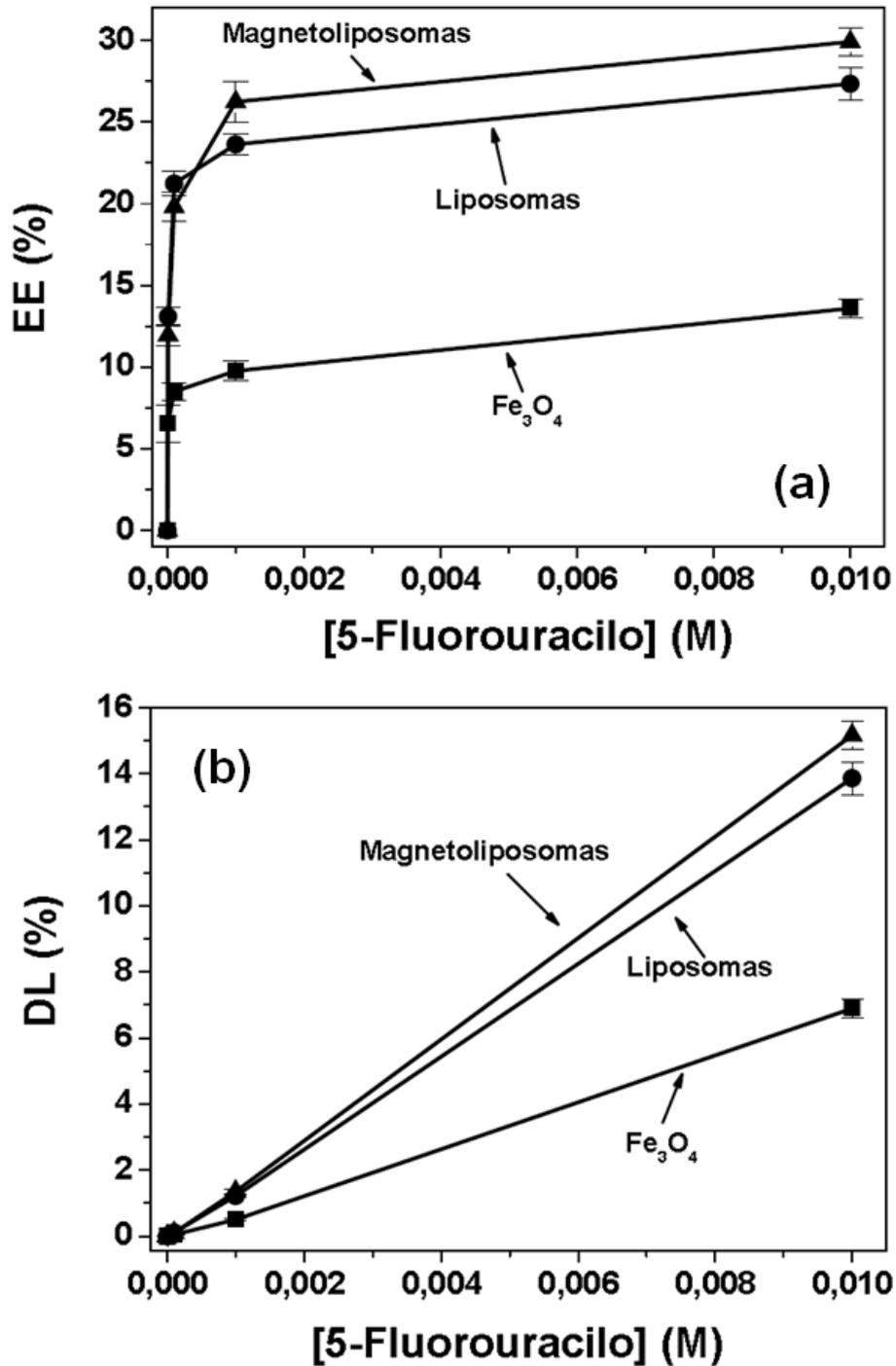
$$DL(\%) = \frac{\text{fármaco vehiculado (mg)}}{\text{masa total del sistema transportador (mg)}} \times 100 \quad (51)$$

Los resultados de adsorción obtenidos en los tres tipos de nanopartículas muestran una considerable adsorción del 5-fluorouracilo sobre la superficie lipídica (liposomas y magnetoliposomas). Pensamos que esto puede ser debido a la existencia de una interacción atractiva de tipo electrostático entre el fármaco cargado positivamente y la superficie negativa del lípido. Por el contrario, debe existir una interacción electrostática de tipo repulsivo con la superficie también positiva de las nanopartículas de magnetita. En cualquier caso y, tal como es de esperar, la vehiculización de fármaco a nivel superficial resulta ser bastante baja (Figura 8.4.). En concreto, para la máxima concentración de fármaco utilizada ( $10^{-2}$  M), el valor máximo de *EE* % es  $\approx 13.59$  %,  $\approx 27.34$  % y  $\approx 29.90$  %, en el caso de la  $Fe_3O_4$ , liposomas y magnetoliposomas, respectivamente. A pesar de esta baja vehiculización los valores de *DL* % conseguidos fueron considerables:  $\approx 6.89$  %,  $\approx 13.86$  % y  $\approx 15.16$  % en  $Fe_3O_4$ , liposomas y magnetoliposomas, respectivamente debido a la interacción electrostática superficial favorable del fármaco con la superficie de los liposomas y magnetoliposomas. Por otro lado, la existencia de cierta adsorción de este fármaco hidrófilo en la superficie de los núcleos magnéticos (a pesar de la repulsión

## **Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo**

---

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



**Figura 8.4.** Valores de *EE* (%) (a) y (b) *DL* (%) del 5-fluorouracilo en la superficie de las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (■), liposomas (●) y magnetoliposomas (▲) en función de la concentración molar de fármaco.

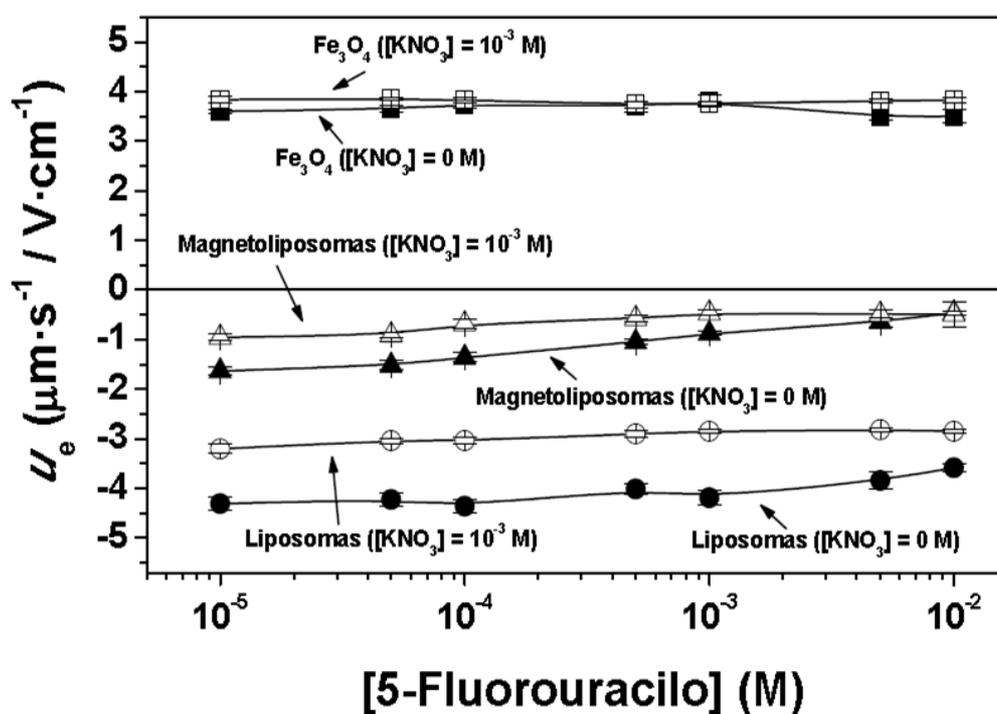
### 8.2.2. ANÁLISIS ELECTROCINÉTICO

Como prueba adicional de tipo cualitativo de la adsorción superficial del fármaco, se estudia las modificaciones de la movilidad electroforética ( $u_e$ ) de cada una de las nanopartículas desarrolladas al ponerlas en contacto con el fármaco. La extrema sensibilidad de la técnica de electroforesis debe permitir la identificación de cambios en las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas que sean consecuencia de la adsorción de moléculas de fármaco [Clares y cols., 2013].

La metodología experimental seguida es igual a la descrita en las anteriores determinaciones electroforéticas. Las suspensiones preparadas (25 mL) tenían una concentración de nanopartículas  $\approx 0.1$  % (p/v). Se prepararon, dos series de suspensiones para cada uno de los tipos de nanopartículas con el objetivo de descartar la influencia de los iones presentes en la disolución sobre la  $u_e$  de los coloides. En concreto, fueron preparadas una tanda de suspensiones con una fuerza iónica de  $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M, mientras que la otra tanda solo presentaba agua bidestilada como medio de dispersión. Cada suspensión contenía una determinada concentración molar de fármaco ( $10^{-5}$  a  $10^{-2}$  M). Las medidas se realizaron tras 24 horas de conservación de las suspensiones a  $25.0 \pm 0.5$  °C, protegidas de la luz ambiental (con papel de aluminio) y bajo agitación constante (50 rpm), comprobando previamente el pH. Los datos presentados son el promedio de doce determinaciones, cambiando la muestra cada tres.

La Figura 8.5. muestra la evolución de los valores de  $u_e$  con la concentración molar de 5-fluorouracilo para los tres tipos de coloides, en presencia y en ausencia de electrolito ( $10^{-3}$  M  $\text{KNO}_3$  en su caso). En el caso de los magnetoliposomas, se observa una tendencia general de la  $u_e$  a aumentar muy levemente (sin evidencia de inversión de carga en este caso) al aumentar la concentración de fármaco en el medio, ya que la adsorción electrostática puede verse favorecida por la interacción entre las cargas

negativas de la superficie de los magnetoliposomas, debidas a los grupos fosfato de las cabezas polares de los lípidos, y las cargas positivas del fármaco generadas, fruto de la protonación de los grupos  $-NH-$  del 5-fluorouracilo. Hay, además un claro efecto de la presencia de  $KNO_3$ . La presencia del electrolito ( $KNO_3$ ) produce la compresión de la doble capa, con la consiguiente reducción de  $u_e$ . En cualquier caso, la adsorción debe ser pequeña, como demuestra el hecho, incluso para las mayores concentraciones de 5-fluorouracilo utilizadas, ya que no se observa apenas cambio de signo en los valores de  $u_e$  de los liposomas o magnetoliposomas.



**Figura 8.5.** Movilidad electroforética ( $u_e$ ) de las nanopartículas de  $Fe_3O_4$  (■, □), liposomas (●, ○) y magnetoliposomas (▲, Δ) en función de la concentración molar de 5-fluorouracilo, en presencia (símbolo abierto) o en ausencia (símbolos cerrados) de  $10^{-3}$  M  $KNO_3$ .

### **8.3. INCORPORACIÓN MATRICIAL DEL 5-FLUOROURACILO**

Una vez confirmada la escasa o moderada adsorción del 5-fluorouracilo en la superficie de nuestros tres tipos de nanomateriales, nos centraremos en el estudio de la contribución del, *a priori*, principal método de vehiculización de fármacos en sistemas transportadores: la incorporación del principio activo en el momento en que se produce la formación de la nanoplataforma. De esta manera, pretendemos definir las condiciones de vehiculización óptimas para lograr la máxima incorporación del fármaco en el sistema transportador magnético coloidal que proponemos. El análisis de la influencia de la concentración del 5-fluorouracilo sobre su incorporación en la matriz fosfolipídica se realizó siguiendo la rutina de síntesis y el procedimiento de determinación espectrofotométrica ya descrito y justificado. Para ello, la única variable que se introdujo en la metodología de síntesis de las nanopartículas de liposomas y de magnetoliposomas fue la concentración de fármaco. Las concentraciones molares utilizadas del 5-fluorouracilo fueron  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M. Para favorecer la incorporación del fármaco en al interfase  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -lípidos y así lograr una mayor vehiculización, se dejaron en contacto durante 24 horas ( $25.0 \pm 0.5$  °C y 50 rpm) los núcleos de óxido de hierro con las moléculas de fármaco antes de llevar a cabo la síntesis de los magnetoliposomas. Los experimentos se repitieron por triplicado para cada una de las concentraciones molares de fármaco. La determinación de la absorción de fármaco en la matriz de las nanopartículas se realizó mediante la comparación de la absorbancia de las muestras del medio (tomadas antes de llevar a cabo la síntesis) con los sobrenadantes obtenidos tras una doble centrifugación de las suspensiones de nanopartículas formuladas, y una vez eliminada la contribución a la absorbancia total del sistema de los residuos o subproductos del experimento de adsorción [Arias y cols., 2010b, c]. De nuevo, la cantidad de fármaco incorporado en

la matriz de las nanopartículas se ha expresado en términos de *EE* (%) y *DL* (%) [Arias y cols., 2009a, b; Brigger y cols., 2004].

Las cantidades de 5-fluorouracilo absorbidas por los liposomas y los magnetoliposomas para cada concentración molar de fármaco se recogen en la Figuras 8.6. Como puede apreciarse, la absorción aumenta con la concentración de fármaco presente en el medio de síntesis, sugiriéndose un efecto positivo del aumento de dicha concentración sobre la eficacia de la vehiculización en todos los casos. Este efecto aparece ampliamente descrito en la bibliografía sobre el desarrollo de sistemas coloidales para el transporte de fármacos [Arias y cols., 2008b, d, f, 2011c, d, e; Clares y cols., 2013; Ulbrich y Šubr, 2004].

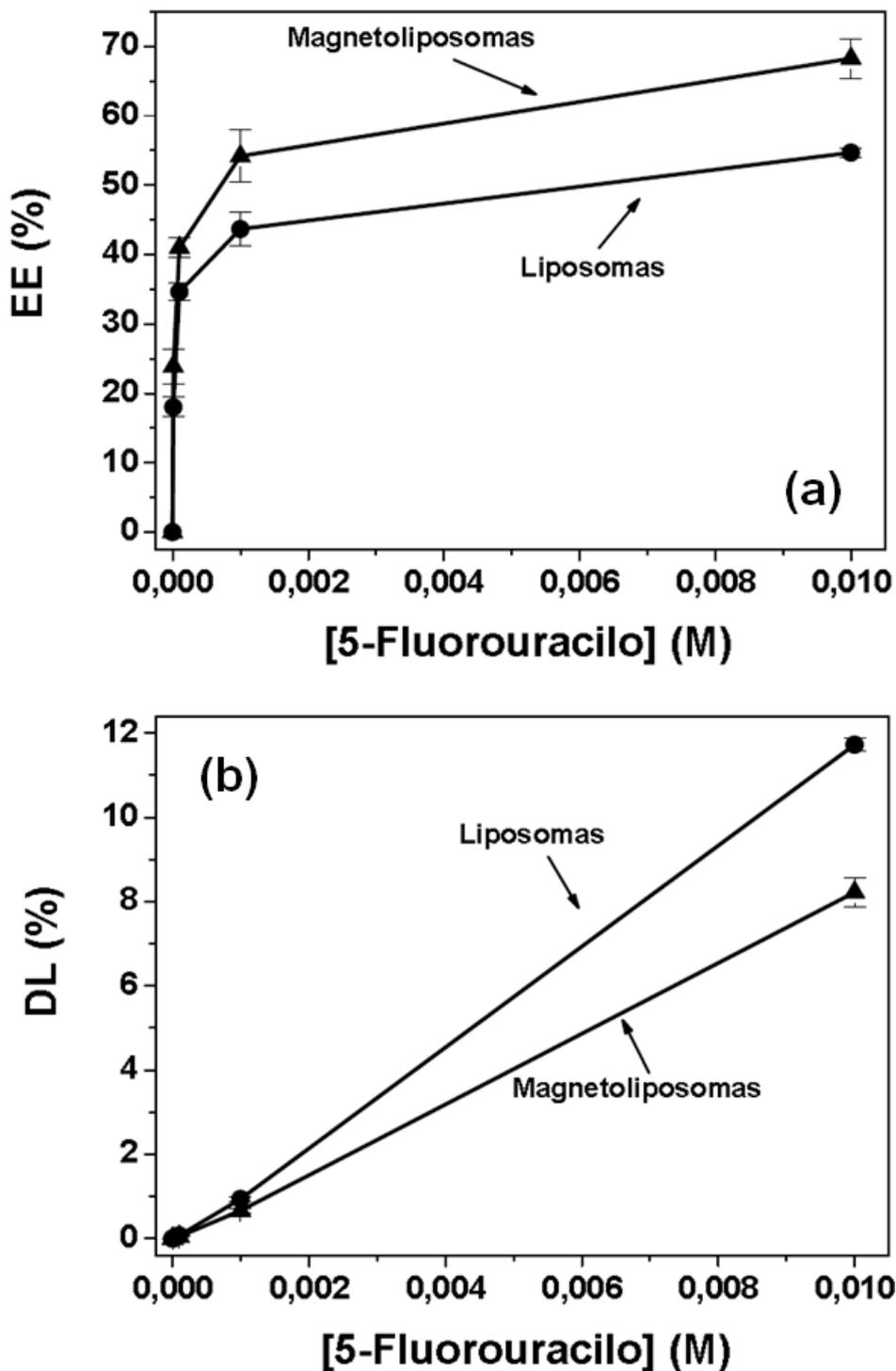


Figura 8.6. Valores de *EE* (%) (a) y (b) *DL* (%) del 5-fluorouracilo en la matriz lipídica de los liposomas (●) y magnetoliposomas (▲) en función de la concentración molar de fármaco.

Los valores obtenidos para la incorporación mediante absorción del fármaco estudiado son claramente superiores a los alcanzados mediante el procedimiento de adsorción en superficie, lo que justifica la selección de este método de vehiculización para la síntesis de los coloides mixtos. Para la máxima concentración de fármaco utilizada ( $10^{-2}$  M), el valor máximo de *EE* % alcanzado en los liposomas pasa de  $\approx 27$  % en el método de adsorción (Figura 8.4.a) a  $\approx 55$  % mediante el método de absorción (Figura 8.6.a); mientras que el valor máximo de *EE* % alcanzado en magnetoliposomas pasa de  $\approx 30$  % por el método de adsorción en superficie (Figura 8.4.a) a  $\approx 68$  % mediante el método de absorción en matriz (Figura 8.6.a). En el caso del método de absorción, la vehiculización del fármaco (*DL* %) en los liposomas es superior a la obtenida en los magnetoliposomas. Sin embargo, la capacidad de respuesta a campos magnéticos externos aplicados que exhiben los magnetoliposomas debe asegurar la llegada controlada de la dosis transportada hasta el lugar de acción, proceso menos controlable en el caso de los liposomas.

### 8.3.1. ESTABILIDAD DEL FÁRMACO VEHICULIZADO

Como prueba adicional, una vez conocida la vehiculización de fármaco en los sistemas coloidales a través de la información obtenida de la *EE* % y *DL* %, se realizó un estudio preliminar de la estabilidad de las formulaciones de liposomas y magnetoliposomas en función del tiempo y de la temperatura de conservación. En concreto, se investigó la capacidad de retención del 5-fluorouracilo por parte de las partículas durante un período de conservación tras 90 días, y a las temperaturas de almacenamiento/conservación  $4.0 \pm 0.5$  °C y  $25.0 \pm 0.5$  °C. El 5-fluorouracilo fue incorporado mediante el método de absorción (en matriz) a la máxima concentración de fármaco utilizada ( $10^{-2}$  M).

La Tabla 8.6. recoge los valores obtenidos de vehiculización de 5-fluorouracilo por los liposomas y los magnetoliposomas. Resulta interesante destacar que en ambos

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

casos la cantidad de vehiculizada es superior a los resultados alcanzados en estructuras lipídicas de similar naturaleza. En concreto los valores de *EE* (%) para los liposomas y los magnetoliposomas son  $\approx 55\%$  y  $\approx 68\%$ , respectivamente. Sin embargo, formulaciones similares previamente desarrolladas por otros autores no logren superar el 25 % de *EE* (%) [Fresta y cols., 1993; Sindhu y cols., 1993; Glavas-Dodov y cols., 2005].

FÓRMULA		LIPOSOMAS		MAGNETOLIPOSOMAS	
Días	Temperatura (°C)	<i>EE</i> (%)	<i>DL</i> (%)	<i>EE</i> (%)	<i>DL</i> (%)
0	4	54.71 ± 0.04	11.72 ± 0.02	68.26 ± 0.01	8.13 ± 0.04
7	4	53.78 ± 0.01	11.52 ± 0.01	67.47 ± 0.02	8.09 ± 0.01
	25	53.67 ± 0.02	11.50 ± 0.01	67.01 ± 0.05	8.06 ± 0.02
15	4	52.86 ± 0.03	11.32 ± 0.02	65.56 ± 0.04	7.90 ± 0.02
	25	50.92 ± 0.01	10.91 ± 0.01	64.51 ± 0.01	7.77 ± 0.02
30	4	50.87 ± 0.02	10.90 ± 0.01	64.13 ± 0.02	7.73 ± 0.03
	25	48.88 ± 0.01	10.47 ± 0.01	63.81 ± 0.06	7.69 ± 0.04
60	4	48.65 ± 0.07	10.42 ± 0.02	62.05 ± 0.01	7.47 ± 0.02
	25	46.32 ± 0.02	9.92 ± 0.01	60.09 ± 0.02	7.41 ± 0.02
90	4	45.41 ± 0.04	9.73 ± 0.01	59.83 ± 0.04	7.21 ± 0.03
	25	44.42 ± 0.03	9.52 ± 0.01	59.45 ± 0.03	7.16 ± 0.04

**Tabla 8.6.** Valores de vehiculización (*EE* % y *DL* %) de 5-fluorouracilo en los liposomas y los magnetoliposomas en función del tiempo y de la temperatura de conservación.

La elevada capacidad de incorporación de 5-fluorouracilo por parte las vesículas lipídicas probablemente es consecuencia de la presencia de gran variedad de ácidos grasos insaturados en la composición de la fosfatidilcolina de huevo, así como de su baja temperatura de transición crítica. De esta manera, los lípidos se encontrarán en estado fluido (cristal-líquido) bajo las condiciones de formación. En cuanto a la capacidad de encapsulación de los magnetoliposomas, ésta resulta superior a la de los liposomas. Probablemente, debido a las interacciones electrostáticas entre la magnetita y las bicapas fosfolipídicas, las cuáles pudieran retraer las lamelas dejando un espacio central acuoso superior al de los liposomas donde albergar al 5-fluorouracilo. Como puede apreciarse, los valores de vehiculización se mantienen estables a lo largo del

tiempo de almacenamiento estudiado e independientemente de la temperatura de conservación fijada. Por tanto, el análisis de los resultados obtenidos pone de manifiesto la interesante estabilidad de los magnetoliposomas.

### **8.4. LIBERACION DE FÁRMACO**

En los apartados anteriores se han descrito las condiciones óptimas de vehiculización del fármaco en los magnetoliposomas. El siguiente paso en este trabajo de investigación será estudiar la liberación *in vitro* del fármaco desde los magnetoliposomas. Además, será analizada la influencia del fenómeno de hipertermia en la liberación del fármaco por parte de las nanopartículas.

En primer lugar se sintetizaron magnetoliposomas a partir de una concentración  $10^{-2}$  M de 5-FU por ser ésta la que aportó mayor *EE* %. El ensayo de liberación *in vitro* de fármaco se realizó por triplicado a  $37.0 \pm 0.5$  °C. Para ello, se utilizó el método de diálisis y un tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH =  $7.4 \pm 0.1$ ) como medio de liberación. Las bolsas de diálisis se dejaron sumergidas en agua bidestilada 12 horas antes de comenzar el ensayo. La bolsa de diálisis (Spectrum<sup>®</sup> Spectra/Por<sup>®</sup> 6, EE.UU.) tienen un tamaño de poro de 2000 Da y es capaz de retener las nanopartículas en su interior, dejando sólo pasar a su través el fármaco liberado hasta el medio de liberación. Brevemente, las suspensiones de las partículas con fármaco vehiculado fueron centrifugadas en dos ciclos a 6000 rpm durante 30 minutos, para así eliminar el principio activo no incorporado. Se introdujo 1 mL de suspensión de nanopartículas (concentración de fármaco: 5.2 mg/mL) en las bolsas de diálisis, cerrando los extremos de la misma con pinzas. A continuación, se sumergieron las bolsas en un vaso con 400 mL de tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. La temperatura y la agitación mecánica (150 rpm) de las bolsas se mantuvieron constantes durante todo el ensayo. Las muestras (1 mL) se recogieron a intervalos de tiempo prefijado (nanopartículas con fármaco incorporado mediante adsorción: 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12,

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

---

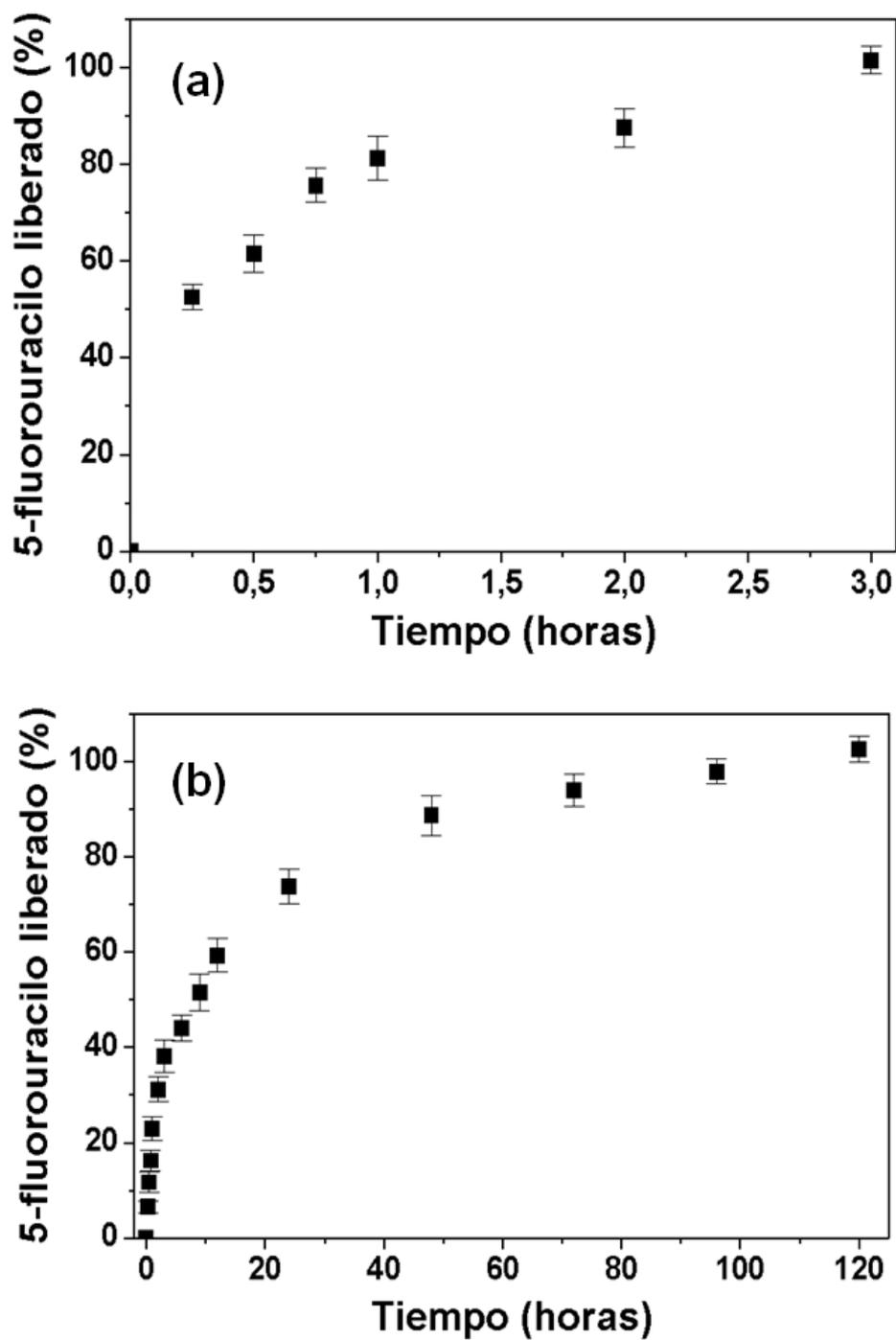
24, 48 y 72 horas; nanopartículas con fármaco incorporados mediante absorción: 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 24 horas, y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 días) y se analizaron mediante la metodología UV-Vis ya descrita y en la longitud de onda de máxima absorbancia correspondiente (266 nm). Un volumen igual de solución tampón, (mantenido a la misma temperatura), fue añadido al medio de liberación tras cada toma de muestra con el objetivo de mantener las condiciones *sink*. El mismo procedimiento analítico utilizado en la determinación de la vehiculización de fármaco, fue seguido en los ensayos de liberación *in vitro* del fármaco.

La Figura 8.7. muestra la liberación de 5-fluorouracilo en función del tiempo desde los magnetoliposomas en los que la incorporación de agente quimioterápico se ha realizado a nivel superficial y en matriz. Al comparar la liberación desde las nanopartículas con diferente incorporación de fármaco se aprecia claramente una importante diferencia en cuanto a la velocidad con la que se produce la salida del fármaco antitumoral desde los nanocompuestos.

En el caso del 5-fluorouracilo incorporado en la superficie de los magnetoliposomas, el proceso de liberación se completa en 3 horas (Figura 8.7.a). Esta rápida liberación de agente quimioterápico sugiere que la cantidad vehiculizada de éste se encuentra adsorbida exclusivamente en la superficie externa de los magnetoliposomas. El mecanismo responsable de este comportamiento podría ser la degradación de la cubierta lipídica (véase el apartado 4.5.). Por tanto, en este caso podemos considerar que el proceso es muy rápido y no adecuado para los fines terapéuticos de esta investigación, ya que la dosis vehiculizada quedaría libre del sistema transportador antes de llegar al lugar de acción, dando lugar a una extensa biodistribución.

Sin embargo, el proceso de liberación del 5-fluorouracilo cuando se incorpora en la matriz de las nanopartículas es bifásico y mucho más sostenido en el tiempo (Figura

8.7.b). En primer lugar, aparece una fase de liberación rápida que probablemente corresponda a la pérdida del fármaco asociado a la superficie de las nanopartículas o débilmente atrapado en éstas. En concreto, el  $\approx 38\%$  del 5-fluorouracilo es liberado en esta primera fase en 3 horas. Sin embargo, durante la segunda fase del proceso, la liberación del 5-fluorouracilo se hace más lenta liberándose el  $\approx 62\%$  restante a lo largo de 5 días. En esta última etapa de liberación, el mecanismo responsable podría ser debido a la difusión de este fármaco a través de la matriz lipídica. Este fenómeno de liberación de 5-fluorouracilo tan sostenido en el tiempo, puede explicarse en base a que parte del principio activo debe encontrarse adsorbido en la superficie de los núcleos de óxido de hierro cuando éstos son recubiertos por la capa lipídica en la formación de las nanopartículas mixtas (véase el apartado 8.3.). Así, la cantidad de moléculas de fármaco localizada en la interfase  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -fosfatidilcolina debe difundir a través de toda la matriz lipídica para poder salir al exterior, lo que ralentiza la velocidad de liberación.



**Figura 8.7.** Liberación de 5-fluorouracilo (%) (a) adsorbido y (b) absorbido desde los magnetoliposomas en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7.4 ± 0.1) a 37.0 ± 0.5 °C.

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

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

$$Q_t = K_0 t \quad (52)$$

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

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

$$\begin{aligned} \frac{dQ_t}{dt} &= K_1(Q_\infty - Q_t) \\ Q_t &= Q_\infty(1 - e^{-K_1 t}) \end{aligned} \quad (53)$$

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

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

$$Q_t = A + B \cdot \sqrt{t} \quad (54)$$

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

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = A + B \cdot t \quad (55)$$

En la Tablas 8.7. se recogen los valores de  $F$  y  $r^2$  correspondientes a los ajustes cinéticos de la liberación de 5-fluorouracilo (incorporado en superficie) desde los magnetoliposomas.

	VALORES DE $F$ Y $r^2$				
		Cinética de orden cero	Cinética de orden uno	Cinética de raíz cuadrada	Cinética de raíz cúbica
<b>Magnetoliposomas (Adsorción)</b>	F	26.17	<b>314.05</b>	<b>736.28</b>	109.76
	$r^2$	0.834	0.814	<b>0.920</b>	0.474

**Tabla 8.7.** Valores del estadístico  $F$  y del coeficiente de determinación  $r^2$  obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de 5-fluorouracilo liberado en función del tiempo desde los magnetoliposomas (método de vehiculización mediante adsorción superficial).

En el caso de la liberación del fármaco adsorbido sobre las nanopartículas obtenidas, es completa en 3 horas desde que se inició el ensayo, la liberación presenta valores de  $F$  y  $r^2$  que indican un ajuste significativo a una cinética de raíz cuadrada, con los coeficientes de ajuste indicados en la Tabla 8.8. (la Figura 8.8. muestra el buen acuerdo entre los datos experimentales y la curva de ajuste). Esta cinética puede explicarse por la mayor concentración de fármaco presente en la superficie de la

nanopartícula y la baja concentración de fármaco en el medio, lo que producirá difusión (dependencia con  $\sqrt{t}$ , ecuación 54) desde la zona superficial, en la que el fármaco se encuentra más concentrado hacia el seno de la disolución, donde la concentración es menor. No hay alteración de la matriz.

SISTEMA	A	B
5-Fluorouracilo, Magnetoliposomas (Adsorción)	$(37.97 \pm 5.45)$	$(37.38 \pm 4.87)$

Tabla 8.8. Coeficientes de ajuste de la ecuación (54) a la cinética de liberación del 5-fluorouracilo desde la superficie de los magnetoliposomas.

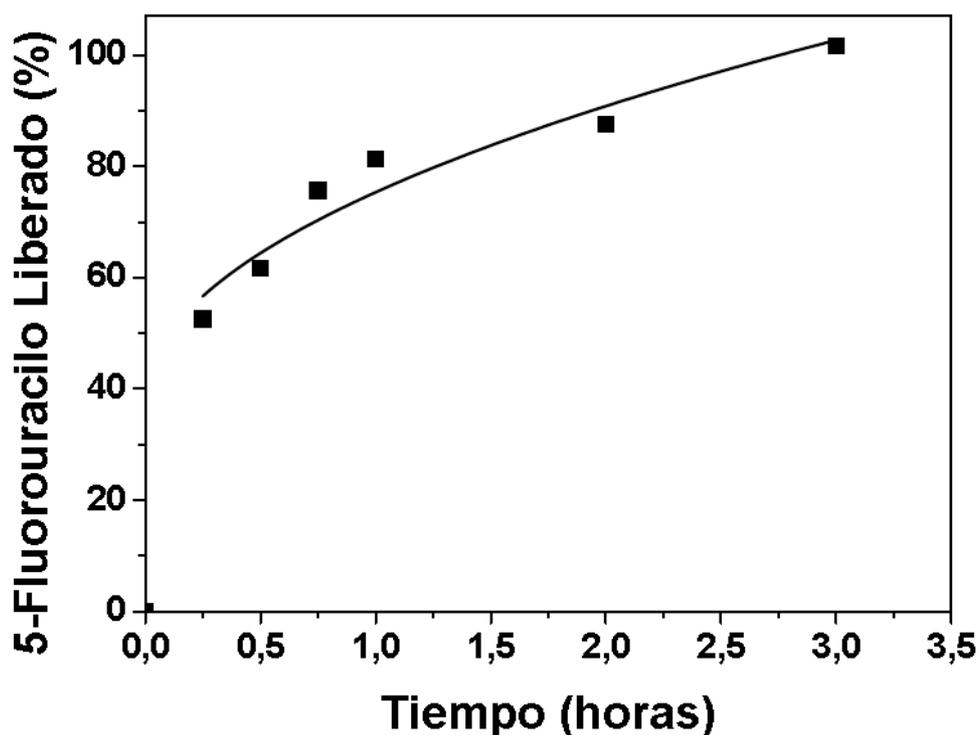


Figura 8.8. Ejemplo de ajuste (línea continua) de la ecuación (54) a los datos experimentales (símbolos) en el caso de 5-fluorouracilo adsorbido en los magnetoliposomas.

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

En cuanto a la liberación del fármaco desde el interior de las nanopartículas sintetizadas, debemos diferenciar en la realización del ajuste cinético las dos fases características del proceso: una fase rápida de unas 3 horas de duración y, a continuación, una segunda fase de liberación mucho más prolongada y lenta (Figura 8.7. b). Como puede apreciarse en las Tablas 8.9., la cinética que mejor describe la primera fase del proceso de liberación es la de orden 1 (véase Tabla 8.10. para los coeficientes de ajuste y gráficas de la Figura 8.9.). Esto es indicativo de una liberación de fármaco que va a depender de la concentración a la que se encuentre el mismo en la parte más superficial de las nanopartículas hacia el medio. Sin embargo, en la segunda fase la cinética a la que mejor se ajusta el proceso de liberación se corresponde con la de raíz cuadrada (coeficientes de ajuste en Tabla 8.11.), lo que implica una liberación por difusión inicial del fármaco a lo largo del tiempo desde la matriz lipídica de las nanopartículas hacia el medio. Una posible explicación a este tipo de liberación podría basarse en el hecho de que el fármaco que se encuentra originalmente en el interior de la matriz lipídica multilamelar difunde a través de ella hacia la superficie con nuevas moléculas que pasan al medio. Se requiere para ello una elevada cantidad de fármaco absorbida en la matriz y no fuertemente ligado a esta.

	VALORES DE $F$ Y $r^2$				
		Cinética de orden cero	Cinética de orden uno	Cinética de raíz cuadrada	Cinética de raíz cúbica
<b>Magnetoliposomas (1ª fase Liberación)</b>	F	63.05	<b>1309.25</b>	<b>685.13</b>	22.62
	$r^2$	0.925	<b>0.990</b>	0.983	0.522
<b>Magnetoliposomas (2ª fase Liberación)</b>	F	36.66	49.99	<b>797.86</b>	<b>93.50</b>
	$r^2$	0.820	-0.140	<b>0.924</b>	0.370

**Tabla 8.9.** Valores del estadístico  $F$  y del coeficiente de determinación  $r^2$  obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de 5-fluorouracilo liberado en función del tiempo desde la matriz de las nanopartículas de magnetoliposomas (método de formulación mediante absorción).

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

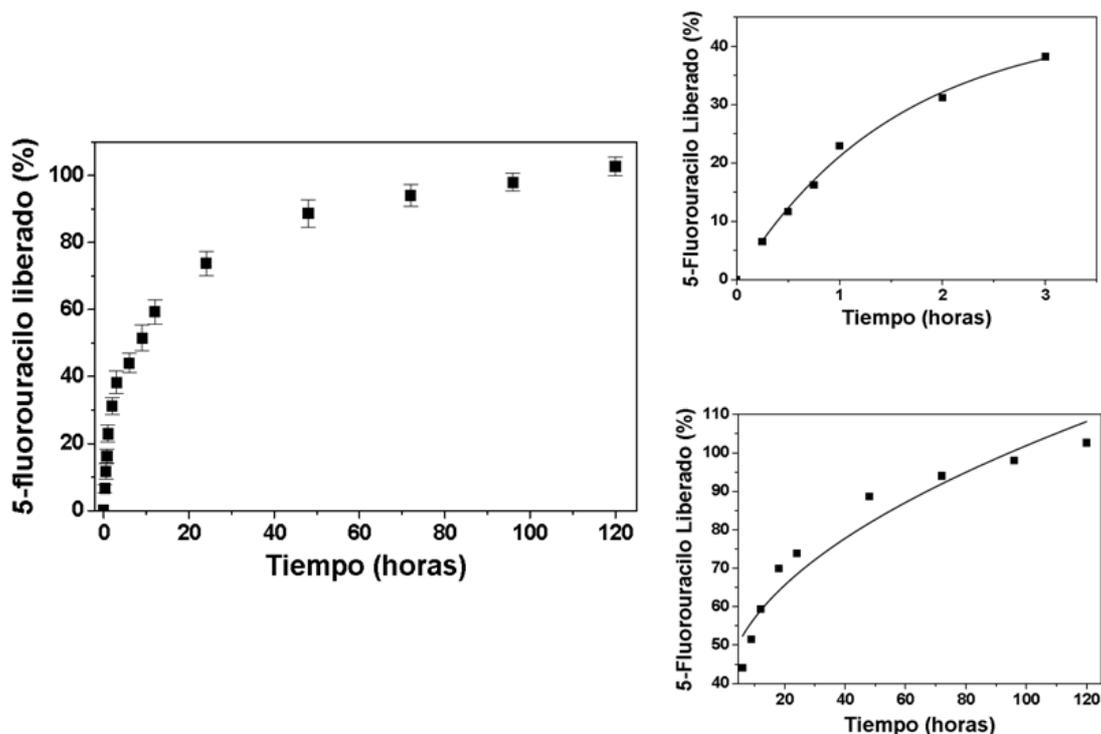
---

SISTEMA	A	B
5-Fluorouracilo, Magnetoliposomas (1ª fase Absorción)	$(44.26 \pm 2.50)$	$(0.65 \pm 0.07)$

**Tabla 8.10.** Coeficientes de ajuste de la ecuación (53) a la cinética de liberación de orden 1 que describen la primera etapa de liberación del 5-fluorouracilo desde la matriz de los magnetoliposomas.

SISTEMA	A	B
5-Fluorouracilo, Magnetoliposomas (2ª fase Absorción)	$(36.22 \pm 4.45)$	$(6.56 \pm 0.66)$

**Tabla 8.11.** Componentes de la ecuación (54) de la cinética de liberación de raíz cuadrada que describen la segunda etapa de liberación del 5-fluorouracilo desde la matriz de los magnetoliposomas.



**Figura 8.9.** Izquierda: datos experimentales de la cinética de liberación de 5-fluorouracilo desde los magnetoliposomas. Derecha: líneas de mejor ajuste de los datos de estas últimas a los modelos descritos en el texto, para la fase inicial de liberación (arriba) y para tiempos largos (abajo).

La Figura 8.9. ilustra los resultados y su mejor ajuste para el fármaco absorbido en matriz. Es importante insistir en que la liberación sostenida del fármaco en el tiempo es idónea para lograr un efecto farmacológico óptimo *in vivo*. Es decir, casi toda la dosis de principio activo vehiculizada en los nanocompuestos se liberará exclusivamente en el lugar de acción, una vez que los magnetoliposomas se acumulen de forma selectiva a este nivel con la ayuda del campo magnético aplicado.

### **8.4.1. Influencia del fenómeno de hipertermia en la liberación**

Adicionalmente, se evaluaron las características de calentamiento (efecto de hipertermia) derivadas de las propiedades magnéticas de los magnetoliposomas al aplicar un campo electromagnético oscilante de alta frecuencia. Paralelamente, se investigó y comparó el efecto de la hipertermia en la cinética de liberación del 5-fluorouracilo a partir de dichos nanosistemas. Hay que indicar que las condiciones seguidas de incorporación del fármaco, liberación y ajuste cinético para el análisis del estudio fueron las ya descritas anteriormente.

Como ya ha sido comentado (ver Capítulo 1), las nanopartículas magnéticas pueden ser una herramienta muy prometedora para el diagnóstico por resonancia magnética por la imagen (RMI) y tratamiento del cáncer por aumento de temperatura en la masa tumoral (hipertermia). Estos nanosistemas están bajo un extenso análisis y estudio en el posible tratamiento de tumores debido a que gracias al fenómeno de hipertermia pueden ser alcanzadas temperaturas comprendidas en el rango de 42-45 °C, el cual es suficiente para dañar irreversiblemente las células cancerosas [Glöckl y cols.; 2006; Reddy cols., 2012; Tanaka y cols., 2005]. Si las nanopartículas magnéticas hipertérmicas son capaces de transportar fármacos antitumorales, podría obtenerse un efecto sinérgico entre la quimioterapia y el calor generado que actuarían sobre las células cancerosas de una manera más selectiva, eficaz y segura. De hecho, la hipertermia se ha descrito para mejorar la eficacia de los agentes antitumorales de dos maneras posibles: *i*) aumentar la liberación del fármaco desde las nanoplataformas termo-sensibles, y *ii*) mejorar la acumulación del fármaco en la masa tumoral mediante el aumento de la permeabilidad de células endoteliales y flujo sanguíneo local [Al-Ahmady y cols., 2012, Koning y cols., 2010]. Es más, en recientes investigaciones *in vitro* se ha puesto de relieve los beneficios procedentes de la hipertermia y la quimioterapia combinada [Babincov y cols., 2008; Yoshida y cols., 2012]. En unos de los primeros trabajos donde se estudiaron las aplicaciones del tratamiento por

hipertermia, se comprobó la alta eficacia de una suspensión de cristales superparamagnéticos para absorber la energía de un campo magnético oscilante y convertirla en calor [Jordan y cols., 1993]. Esta propiedad puede ser usada *in vivo* para incrementar la temperatura del tejido tumoral y destruir las células malignas por hipertermia. Una de las aproximaciones clásicas consiste en someter al paciente a un campo electromagnético de 100 MHz de frecuencia, la destrucción de las células tumorales puede alcanzarse por una onda electromagnética emitida por un electrodo implantado en la masa cancerosa. Otros métodos menos invasivos consisten en combinar hipertermia y radioterapia, irradiando la masa tumoral con microondas mediante un emisor externo o radiación gamma [Laurent y cols., 2008].

El principal parámetro para determinar el calentamiento del tejido tratado, es la tasa de absorción específica (SAR), definido como la velocidad a la que la energía de una onda electromagnética de radiofrecuencia dada es absorbida por unidad de masa de material biológico. Las unidades son expresadas en calorías por kilogramo y es proporcional al incremento de temperatura ( $\Delta T/\Delta t$ ) (ecuación 56) [van den Berg y cols., 2004]:

$$SAR = 4.1868 \frac{P}{m_e} = C_e \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (56)$$

donde  $P$  representa el poder de la onda electromagnética absorbida por la muestra,  $m_e$  corresponde a la masa de la muestra, y  $C_e$  es el calor específico de la muestra. Una dificultad añadida en la hipertermia electromagnética en un lugar específico es la aparición de altas temperaturas a nivel local (denominadas zonas calientes), debido a falta de homogeneidad de la permeabilidad eléctrica y conductividad del tejido, que hace variar el valor de SAR. Un mejor control de la energía es obtenida irradiando el tejido con nanopartículas magnéticas con un campo electromagnético de baja frecuencia (100-400 kHz). Para un material superparamagnético dado, el SAR se

determina de manera muy precisa por la relación de volumen de estos cristales en el tejido. Rosensweig demostró teóricamente una fuerte relación entre el SAR de este material y su relajación magnética (ecuación 57) [Rosensweig, 2002]:

$$SAR = 4.1868\pi\mu_o^2 \frac{\varphi M_s^2 V}{1000kT} H_o^2 \nu \frac{2\pi\nu\tau}{1+(2\pi\nu\tau)^2} \quad (57)$$

donde  $\varphi$  es la fracción de volumen del material superparamagnético,  $\nu$  es la frecuencia del campo magnético oscilante,  $H_o$  es la intensidad del campo magnético, y  $\tau$  es el tiempo de relajación. La ecuación 57 muestra que si la irradiación del campo magnético es uniforme, el SAR solo dependerá de la naturaleza y la fracción de volumen de las partículas superparamagnéticas. Por tanto, una alta selectividad en la zona de actuación puede lograrse si las partículas sólo se localizan en la zona de actuación (masa tumoral). La frecuencia de irradiación debe ser lo suficientemente baja para evitar una interacción del campo electromagnético con los iones intracelulares. En el caso de nanopartículas, el SAR es proporcional al tiempo de relajación y es debido a la disipación causada por la viscosidad magnética. Está es máxima si se verifica la ecuación 58 [Rosensweig, 2002]:

$$\tau = \frac{1}{2\pi\nu} \quad (58)$$

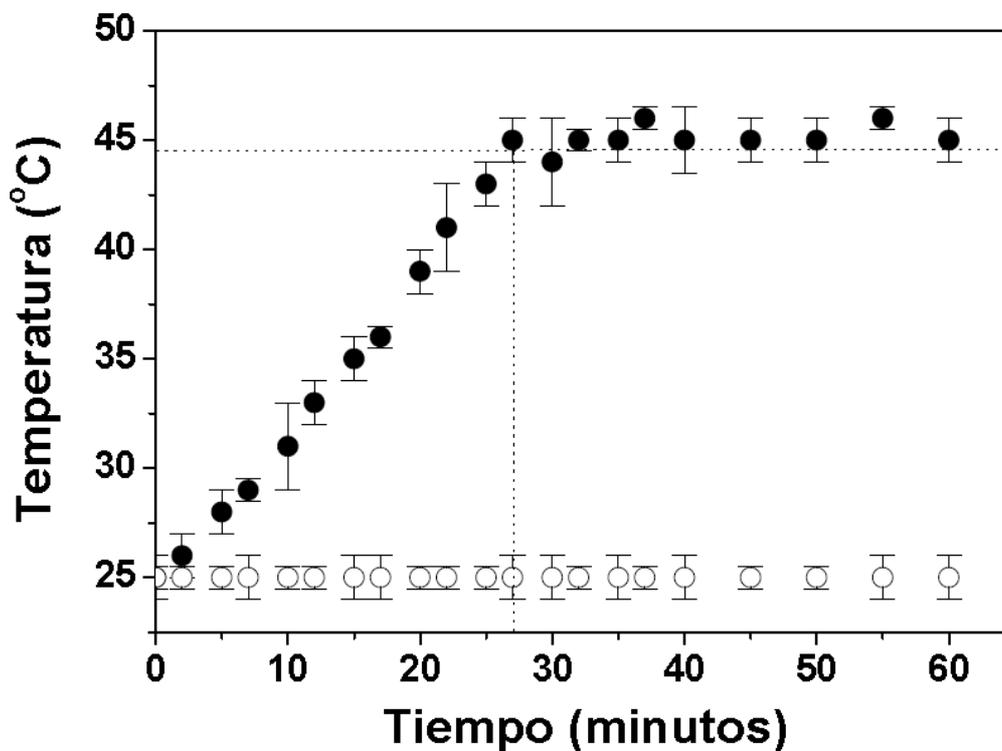
Para  $\tau$  más largos que el valor óptimo, el SAR disminuye rápidamente debido a que la relajación magnética está demasiado baja para permitir que el cristal superparamagnético pueda seguir al campo magnético oscilante. Por tanto, los coloides superparamagnéticos pueden actuar como un agentes de hipertermia, con mejoras en la reproducibilidad y control del tamaño de partícula durante la síntesis de dichos nanosistemas [Rau y cols., 2000; Laurent y cols., 2008].

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

---

La metodología seguida para estudiar el comportamiento de calentamiento de los magnetoliposomas a nivel *in vitro*, se basó en la comparación de una suspensión acuosa de partículas de magnetoliposomas (10 mg/mL, 5 mL) con una formulación control (medio acuoso sin partículas), se investigó por triplicado a  $25.0 \pm 0.5$  °C. Para ello, se utilizó un campo electromagnético alterno de alta frecuencia inducido por una fuente de alimentación equipada con un solenoide con unas condiciones determinadas (diámetro: 20 mm; longitud: 100 mm; número de espiras: 70). La frecuencia del campo magnético y la intensidad fue de 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente. Estos valores están dentro de aquellos comúnmente fijados para realizar tal experimento [Lao y Ramanujan, 2004; Purushotham y Ramanujan, 2010; Tang y cols., 2008]. Los datos de temperatura se registraron continuamente por medio de una sonda termométrica de fibra óptica conectada a un ordenador.

La Figura 8.10. muestra el comportamiento del calentamiento que experimenta los magnetoliposomas expuestos a una alta frecuencia de un campo magnético alterno. Bajo la exposición al gradiente del campo aplicado, la oscilación del momento magnético de los magnetoliposomas hizo que fueran transformados en emisores de calor, alcanzando la temperatura mínima de hipertermia (41 °C) en 22 minutos. En las condiciones experimentales descritas, la temperatura máxima (45 °C) se alcanzó después de 27 minutos, y luego se estabilizó hasta el final del experimento. Esto demuestra un buen control de la temperatura y flujo de calor, un requisito básico para la aplicación de las nanopartículas magnéticas hipertérmicas. En particular, aceptamos que el calentamiento local de una masa tumoral para un tiempo de  $\approx 30$  minutos a esta temperatura es suficiente para destruirla [Huber, 2005], y que las temperaturas superiores a 56 °C dañan los tejidos sanos que rodean el sitio del tumor (termoablación: coagulación, necrosis y carbonización de el tejido) [Hilger y cols., 2001; Jordan y cols., 2001].



**Figura 8.10.** Curva de calentamiento de una suspensión acuosa de magnetoliposomas (●) y medio control (○), bajo la influencia de un gradiente de campo electromagnético oscilante de 250 kHz y 4 kA/m.

Finalmente, el campo electromagnético alterno de alta frecuencia descrito previamente (frecuencia e intensidad: 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente), fue acoplado al medio de liberación con el fin de definir el efecto de las propiedades de calentamiento de los magnetoliposomas (efecto de hipertermia) en la cinética de liberación del 5-fluorouracilo a partir de dichas nanopartículas. Los datos de temperatura se registraron constantemente como se ha descrito anteriormente.

La Figura 8.11. muestra la liberación de 5-fluorouracilo en función del tiempo desde los magnetoliposomas en los que la incorporación del 5-fluorouracilo se realizó previamente en superficie y matriz, siempre bajo la influencia del fenómeno de hipertermia. Al comparar la liberación desde las nanopartículas con diferentes formas

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

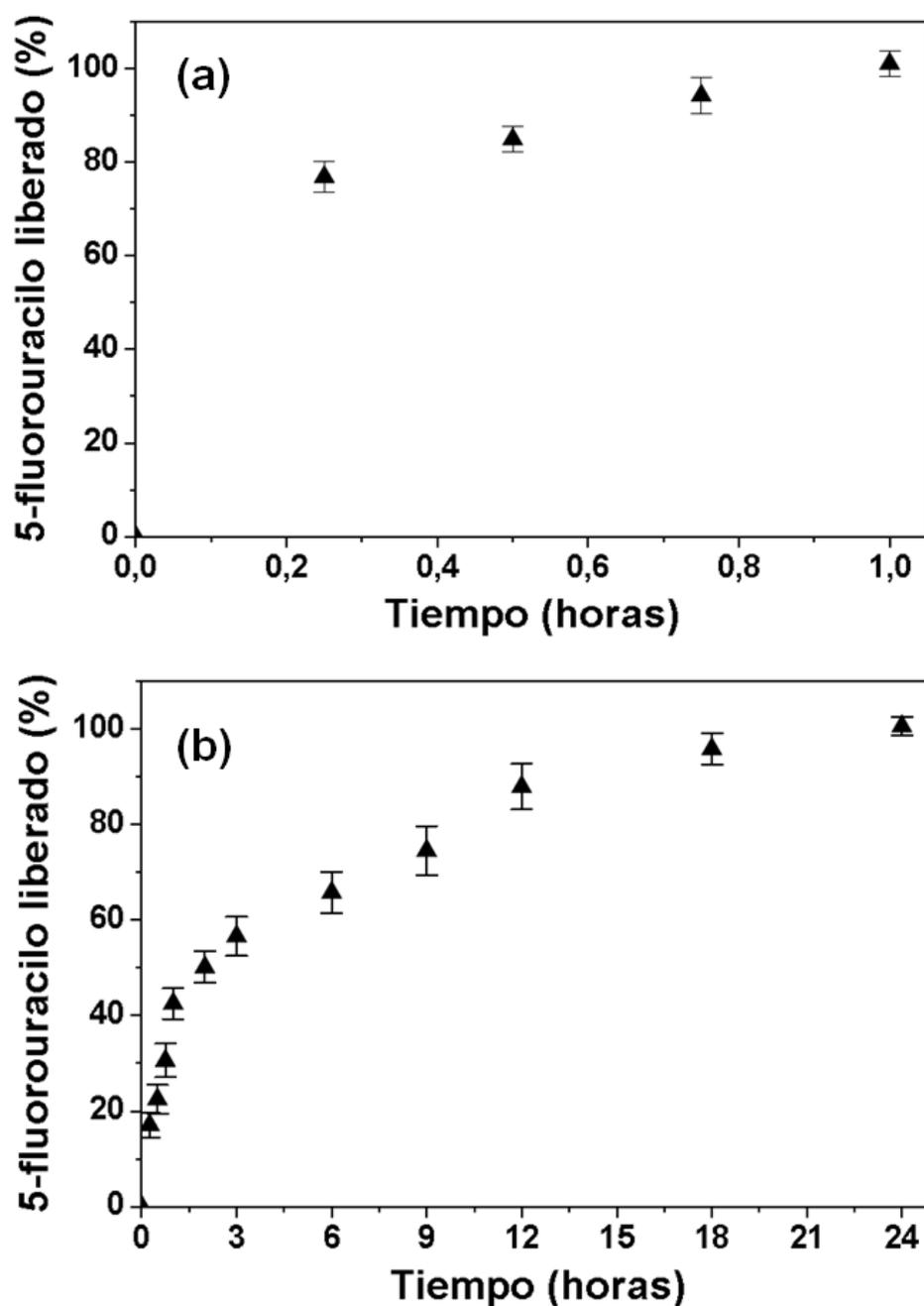
---

de incorporación de fármaco se aprecia claramente una importante diferencia en cuanto a la velocidad con la que se produce la salida del fármaco antitumoral desde los nanocompuestos, siendo en cualquier caso una liberación acelerada con respecto al anterior caso de liberación descrito desde los magnetoliposomas sin aplicación de un campo electromagnético oscilante de alta frecuencia.

Para la liberación de 5-fluorouracilo incorporado en la superficie de los magnetoliposomas, el proceso se completa en tan solo 1 hora de estudio (Figura 8.11.a). Esta liberación acelerada del agente antitumoral indica que la cantidad vehiculizada de éste se encuentra adsorbida exclusivamente en la superficie externa de los magnetoliposomas, el mecanismo responsable de este comportamiento podría ser debido a la potenciación de la degradación de la cubierta lipídica (véase el apartado 4.5.) activado por el aumento de temperatura, debido a la disipación de energía (en forma de calor) surgida de la vibración de los núcleos de magnetita. Por tanto, en este caso podemos considerar que el proceso es demasiado rápido y no adecuado para fines terapéuticos como los de este trabajo; ya que la dosis vehiculizada quedaría libre del sistema transportador antes de llegar a la masa del tumor.

Sin embargo, el proceso de liberación del 5-fluorouracilo cuando se incorpora en matriz es bifásico y más sostenido en el tiempo con respecto a la liberación cuando se vehiculiza por adsorción en la superficie de la nanopartícula (Figura 8.11.b). En primer lugar, aparece una fase de liberación rápida que probablemente significa la pérdida del fármaco asociado a la superficie de las nanopartículas o débilmente atrapado en éstas. En concreto, el  $\approx 45\%$  del 5-fluorouracilo es liberado en 1 hora. Sin embargo, durante la segunda fase del proceso, la liberación del 5-fluorouracilo se hace progresivamente liberándose el  $\approx 55\%$  de fármaco restante en las próximas 24 horas. Este perfil de liberación del 5-fluorouracilo tan rápido es producido por el efecto de hipertermia (consecuencia de la pérdida de la histéresis magnética) generado por la aplicación del campo electromagnético oscilante de alta frecuencia. Dicho perfil se atribuye a un

aumento de la permeabilidad del agua y los solutos en las membranas lipídicas que constituyen la vesículas lipídicas multilamelares. Incluso, se ha planteado la hipótesis de que al alcanzar la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos ( $T_m$ ), los límites de los dominios sólido/líquido dentro de la estructura liposomal están en un estado desordenado bajo el fenómeno de hipertermia (calentamiento), aumentando así la fluidez de los fosfolípidos [Al-Ahmady y cols., 2012; Al-Jamal y cols., 2012; Babincová y cols., 2002; Ding y cols., 2012a].



**Figura 8.11.** Liberación de 5-fluorouracilo (%) (a) adsorbido y (b) absorbido desde los magnetoliposomas sometidos a un campo electromagnético oscilante de alta frecuencia y en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7.4 ± 0.1) a 37.0 ± 0.5 °C..

En la Tablas 8.12. se recogen los valores de  $F$  y  $r^2$  correspondientes a los ajustes cinéticos de la liberación de 5-fluorouracilo (incorporado en superficie) desde los magnetoliposomas por efecto de hipertermia.

	VALORES DE $F$ Y $r^2$				
		<b>Cinética de orden cero</b>	<b>Cinética de orden uno</b>	<b>Cinética de raíz cuadrada</b>	<b>Cinética de raíz cúbica</b>
<b>Magnetoliposomas (Adsorción) Hipertermia</b>	F	<b>601.25</b>	440.14	12130.12	439.81
	$r^2$	<b>0.995</b>	0.674	0.988	0.674

**Tabla 8.12.** Valores del estadístico  $F$  y del coeficiente de determinación  $r^2$  obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de 5-fluorouracilo liberado en función del tiempo desde los magnetoliposomas (método de formulación mediante adsorción superficial) bajo la influencia del fenómeno de hipertermia.

La liberación del fármaco adsorbido sobre las nanopartículas obtenidas bajo la acción del campo electromagnético oscilante de alta frecuencia, se aceleró significativamente, siendo completa después de 1 hora, los valores de  $F$  y  $r^2$  indican que la liberación se ajusta a una cinética de orden 0, con los coeficientes de ajuste indicados en la Tabla 8.13., en la Figura 8.12. se muestra el buen acuerdo entre los datos experimentales y la curva de ajuste. Esto es indicativo de una liberación de fármaco que va a depender de la concentración a la que se encuentre el mismo en la parte más superficial de las nanopartículas hacia el medio.

SISTEMA	A	B
5-Fluorouracilo, Magnetoliposomas (Adsorción) Hipertermia	$(96.52 \pm 4.45)$	$(5.82 \pm 1.32)$

Tabla 8. 13. Coeficientes de ajuste de la ecuación (52) a la cinética de liberación del 5-fluorouracilo desde la superficie de los magnetoliposomas bajo la influencia del fenómeno de hipertermia.

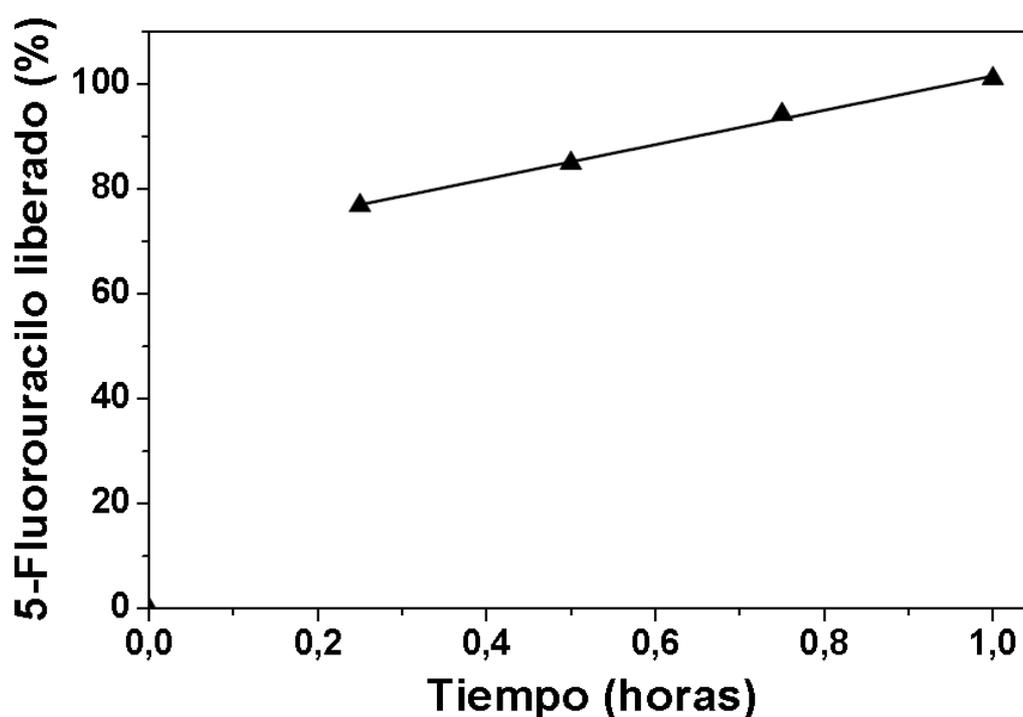


Figura 8.12. Ejemplo de ajuste (línea continua) de la ecuación (52) a los datos experimentales (símbolos) en el caso de 5-fluorouracilo adsorbido sobre los magnetoliposomas bajo la influencia del fenómeno de hipertermia.

En cuanto a la liberación del fármaco desde el interior de las nanopartículas sintetizadas (incorporación en matriz) por efecto de hipertermia, debemos diferenciar en la realización del ajuste cinético un proceso bifásico acelerado con: una fase rápida

de 1 hora de duración (más lenta que en el caso de la adsorción en superficie) y, a continuación, una segunda fase de liberación mucho más prolongada y lenta (Figura 8.11. b). Como puede apreciarse en las Tablas 8.14., la cinética que mejor describe la primera fase del proceso de liberación es la de orden 0 (véase Tabla 8.15. para los coeficientes de ajuste y gráficas de la Figura 8.13.). Esto es indicativo de una velocidad de liberación de fármaco constante en la primera fase del proceso. Sin embargo, en la segunda fase la cinética a la que mejor se ajusta el proceso de liberación se corresponde con la de raíz cuadrada (coeficientes de ajuste en Tabla 8.16.), lo que implica una liberación por difusión inicial del fármaco a lo largo del tiempo desde la matriz lipídica de las nanopartículas hacia el medio. Una posible explicación a este tipo de liberación podría basarse en el hecho de que el fármaco que se encuentra originalmente en el interior de la matriz lipídica multilamelar difunde a través de ella hacia la superficie con nuevas moléculas que pasan al medio gracias al efecto que genera el aumento de temperatura en las membranas fosfolípicas. Se requiere para ello una elevada cantidad de fármaco absorbida en la matriz y no fuertemente ligado a esta.

	VALORES DE $F$ Y $r^2$				
		Cinética de orden cero	Cinética de orden uno	Cinética de raíz cuadrada	Cinética de raíz cúbica
<b>Magnetoliposomas (1ª fase Liberación) Hipertermia</b>	F	<b>66.43</b>	<b>126.19</b>	<b>134.73</b>	<b>136.60</b>
	$r^2$	<b>0.956</b>	0.889	0.893	0.895
<b>Magnetoliposomas (2ª fase Liberación) Hipertermia</b>	F	63.41	43.95	<b>2148.42</b>	<b>94.15</b>
	$r^2$	0.912	-0.200	<b>0.974</b>	0.423

**Tabla 8.14.** Valores del estadístico  $F$  y del coeficiente de determinación  $r^2$  obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de 5-fluorouracilo liberado en función del tiempo desde la matriz de las nanopartículas de magnetoliposomas (método de formulación mediante absorción) bajo la influencia del fenómeno de hipertermia.

## Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo

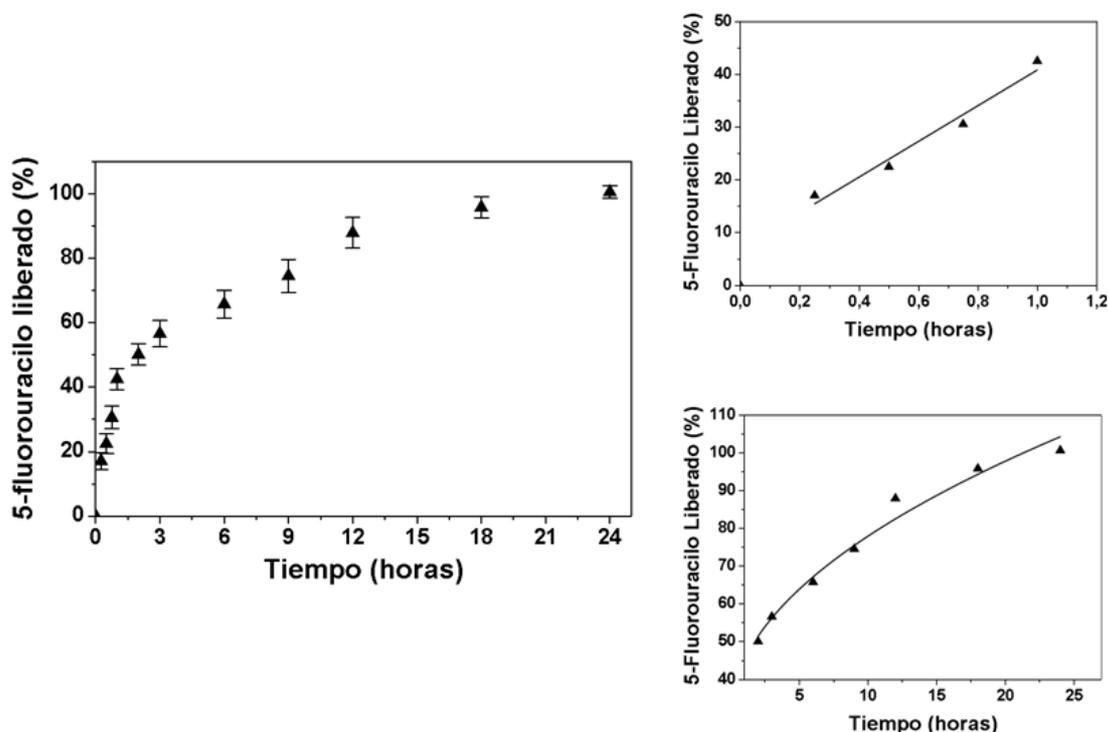
---

SISTEMA	A	B
<b>5-Fluorouracilo, Magnetoliposomas (1ª fase Absorción) Hipertermia</b>	(7.02 ± 2.84)	(33.80 ± 4.15)

**Tabla 8.15.** Coeficientes de ajuste de la ecuación (52) a la cinética de liberación de orden 0 que describen la primera etapa de liberación del 5-fluorouracilo desde la matriz de los magnetoliposomas bajo la influencia del fenómeno de hipertermia.

SISTEMA	A	B
<b>5-Fluorouracilo, Magnetoliposomas (2ª fase Absorción) Hipertermia</b>	(30.03 ± 3.27)	(15.15 ± 1.00)

**Tabla 8.16.** Componentes de la ecuación (54) de la cinética de liberación de raíz cuadrada que describen la segunda etapa de liberación del 5-fluorouracilo desde la matriz de los magnetoliposomas bajo la influencia del fenómeno de hipertermia.



**Figura 8.13.** Izquierda: datos experimentales de la cinética de liberación de 5-fluorouracilo desde los magnetoliposomas bajo la influencia del fenómeno de hipertermia. Derecha: líneas de mejor ajuste de los datos de estas últimas a los modelos descritos en el texto, para la fase inicial de liberación (arriba) y para tiempos largos (abajo).

Debido a los resultados de liberación anteriormente discutidos, el 5-fluorouracilo podría acceder más rápidamente al lugar de acción en comparación con el fármaco liberado en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, se espera que los magnetoliposomas proporcionen a nivel *in vivo* un aumento de temperatura (hipertermia) necesaria para activar la liberación de las moléculas de 5-fluorouracilo vehiculizadas en las nanopartículas, lo cual podría ser de gran beneficio para obtener concentraciones mayores de fármaco intracelularmente y/o en el intersticio tumoral para lograr así un efecto farmacológico óptimo [Al-Ahmady y cols., 2012; Babincov y cols., 2008; Reddy y cols., 2012; Yoshida y cols., 2012]. Es decir, es de esperar que prácticamente toda la dosis de principio activo transportada se acumule de forma selectiva en la zona

## **Capítulo 8. Evaluación de la Capacidad de Vehiculización de 5-Fluorouracilo**

---

deseada con la ayuda del campo magnético aplicado, y una vez allí, se activará la liberación del fármaco cuando el campo electromagnético alterno de alta frecuencia actué, debido al efecto de hipertermia.

## **Capítulo 9.**

# **CONCLUSIONES**



El presente trabajo de investigación, tiene tres objetivos principales. El primero es el diseño y elaboración, bajo condiciones óptimas, de un sistema transportador de fármacos basado en un nanosistema mixto, llamado magnetoliposoma, constituido por un núcleo magnético y un recubrimiento vesicular lipídico. El segundo es la vehiculización del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo en el sistema transportador. Y el tercero es determinar la capacidad de generar calor debido a sus propiedades magnéticas y, en base a ello, ver la influencia del fenómeno de hipertermia sobre el proceso de liberación del fármaco a través del coloide mixto. Las principales aportaciones pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

### **1. Sobre la síntesis y morfología de los magnetoliposomas.**

Se ha puesto a punto un procedimiento reproducible de síntesis de nanosistemas de composición mixta, formados por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento vesicular lipídico (liposomas), ambos biodegradables. La metodología de síntesis de los núcleos de óxido de hierro es muy sencilla y permite la obtención de magnetita superparamagnética. El procedimiento de formulación de las estructuras vesiculares magnéticas se fundamenta en una variación del método de hidratación del film (*thin layer evaporation method*) utilizado en la síntesis de liposomas.

Para optimizar las condiciones de la síntesis, se analizó el efecto de la proporción inicial de masas lípido/magnetita sobre los magnetoliposomas obtenidos, y se concluyó que la relación 4:3 es la más óptima. El análisis de las propiedades eléctricas superficiales respalda esta conclusión.

Con la metodología de síntesis desarrollada, se ha logrado el diseño de magnetoliposomas con una geometría muy apropiada para la vía de administración parenteral; constituidos por un núcleo magnético, responsable del pequeño tamaño

y de las propiedades magnéticas de las nanopartículas obtenidas, y por un recubrimiento lipídico biodegradable y biocompatible.

### **2. Sobre la estructura y composición química.**

Mediante la comparación de los difractogramas de rayos X obtenidos para las nanopartículas de magnetita, liposomas y magnetoliposomas, comprobamos la perfecta coincidencia de los difractogramas de las nanopartículas magnéticas con el patrón *ASTM* de la magnetita. Esto permite identificar las muestras de magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta, a pesar de quedar incluida en el interior de la matriz vesicular. Con ello, es de esperar que las propiedades magnéticas persistan tras el recubrimiento de los núcleos magnéticos por la estructura vesicular biodegradable.

El análisis del espectro de infrarrojos constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos, ya que permitió identificar los grupos funcionales característicos de los liposomas, así como una banda propia de la magnetita en los magnetoliposomas.

### **3. Sobre las propiedades eléctricas superficiales.**

El análisis comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de partículas mediante electroforesis constituye también una prueba de la eficacia de recubrimiento de las nanopartículas de óxido de hierro por parte de la matriz vesicular. Ésta oculta muy eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de los magnetoliposomas sea indistinguible de la de los liposomas.

El análisis preliminar de la estabilidad del recubrimiento mediante el estudio de la evolución de las propiedades electrocinéticas de los magnetoliposomas en

función del tiempo muestra cómo el comportamiento de éstas se aproxima al de la magnetita en agua.

Empleando la información obtenida del estudio electrocinético de nuestros materiales, hemos justificado el mecanismo de formación de la capa de recubrimiento lipídico sobre los núcleos magnéticos (junto con el mecanismo termodinámico). Dicha capa se genera como consecuencia de la atracción electrostática entre las nanopartículas de magnetita cargadas positivamente y las bicapas lipídicas multilamelares con carga negativa, lo que induce la presencia de la estructura lipídica en la superficie de la magnetita. Además, los resultados del estudio electrocinético de la formulación desarrollada de magnetoliposomas permiten explicar la reducción del tamaño de partícula observada en comparación con los liposomas.

#### **4. Sobre la termodinámica superficial.**

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

La diferente naturaleza de las superficies de magnetita, liposomas y magnetoliposomas se manifiesta en cambios sufridos por las interacciones interfaciales entre el sólido y los líquidos de ensayo, y en general, en diferentes contribuciones a la energía superficial total de cada tipo de sólido.

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

Utilizando la información obtenida del estudio termodinámico de los materiales empleados, podemos justificar el mecanismo de formación de las nanopartículas mixtas (junto con el mecanismo electroforético), ya que termodinámicamente es más favorable para la estructura lipídica multilamelar permanecer en contacto con la magnetita antes que estar aislada en el agua.

### **5. Sobre las propiedades magnéticas.**

La determinación del ciclo de histéresis de los magnetoliposomas ha resultado muy útil en la caracterización de sus propiedades magnéticas. Al quedar englobados los núcleos de óxido de hierro en el interior de la matriz lipídica, la imantación de la nanopartícula resulta ser muy elevada por su carácter superparamagnético. Esta característica ha sido comprobada cualitativamente de forma visual y mediante microscopía óptica en suspensiones acuosas de los nanocompuestos.

### **6. Sobre la citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas.**

La ausencia de citotoxicidad y la excelente hemocompatibilidad comprobada, por parte de las nanopartículas sin presentar carga de fármaco, en fibroblastos de colon humano CCD-18 y en líneas celulares del carcinoma de colon humano T-84, muestra en los coloides mixtos su biodegradabilidad y biocompatibilidad óptima para ser utilizados como agentes transportadores *in vitro*.

### **7. Sobre la capacidad de vehiculización y liberación controlada del fármaco antitumoral 5- fluorouracilo sin y con presencia de hipertermia.**

Se ha validado y utilizado un procedimiento espectrofotométrico sencillo para la determinación de la incorporación del agente antitumoral 5-fluorouracilo en los

magnetoliposomas, y para la cuantificación de la cantidad de fármaco cedida al medio en los ensayos de liberación.

Hemos estudiado y definido las condiciones óptimas de vehiculización del 5-fluorouracilo en los magnetoliposomas, mediante dos métodos: *i*) la adsorción tras la formación e incubación de los nanocompuestos en una disolución de principio activo; y, *ii*) la adición del principio activo en el medio acuoso que quedará englobado por parte de la matriz lipídica, y que contiene los núcleos magnéticos en suspensión, antes de que se desencadene la formación de las nanopartículas compuestas.

El análisis espectrofotométrico de la incorporación de fármaco por los magnetoliposomas pone de manifiesto la contribución de la adsorción superficial al proceso de vehiculización de los fármacos. Se ha observado un efecto positivo de la concentración de principio activo en el medio de contacto sobre la cantidad adsorbida por las nanopartículas compuestas.

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

Además, el estudio preliminar de las formulaciones ha puesto de manifiesto la estabilidad en el tiempo en cuanto a retención de fármaco (incorporado en matriz)

que tienen los magnetoliposomas para diferentes condiciones típicas de conservación o almacenamiento de estas nanoformulaciones.

En el estudio de los magnetoliposomas como nanopartículas magnéticas hipertérmicas, las temperaturas alcanzadas son necesarias y suficientes para conseguir la destrucción de las células tumorales. El fenómeno de hipertermia influye tanto en la liberación *in vitro* del 5-fluorouracilo incorporado en superficie (adsorción) como en matriz (absorción) de los magnetoliposomas, dicho análisis revela un perfil de cesión muy rápido (acelerado) de principio activo, completo en una hora y que se ajusta, según el análisis de varianza de la regresión al modelo (criterio ANOVA) y del coeficiente de determinación,  $r^2$ , a una cinética de liberación de orden 0. Sin embargo, la liberación del fármaco incorporado en los nanocompuestos mediante absorción en matriz resulta ser mucho más interesante para obtener un óptimo efecto farmacológico para una administración cercana al tumor (intraarterial o intratumoral).

## **Capítulo 10.**

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abrikossova II, Derjaguin BV. Measurement of molecular attraction between solid bodies of different nature at large distances. *Prog. Surf. Sci.* 1992; 40: 133-140.
- Abu Mukh-Qasem R, Gedanken A. Sonochemical synthesis of stable hydrosol of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2005; 284: 489-494.
- Adamson AW. *Physical chemistry of surfaces.* Nueva York: John Wiley & Sons 1982.
- Ai J, Xu Y, Li D, Liu Z, Wang E. Folic acid as delivery vehicles: targeting folate conjugated fluorescent nanoparticles to tumors imaging. *Talanta.* 2012; 101: 32-7.
- Ak G, Yilmaz H, Sanlier SH. Preparation of magnetically responsive albumin nanospheres and in vitro drug release studies. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2013.
- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013; 8: 102.
- Al-Ahmady ZS, Al-Jamal WT, Bossche JV, Bui TT, Drake AF, Mason AJ, Kostarelos K. Lipid-peptide vesicle nanoscale hybrids for triggered drug release by mild hyperthermia in vitro and in vivo. *ACS Nano.* 2012; 6: 9335-9346.
- Al-Jamal WT, Al-Ahmady ZS, Kostarelos K. Pharmacokinetics & tissue distribution of temperature-sensitive liposomal doxorubicin in tumor-bearing mice triggered with mild hyperthermia. *Biomaterials.* 2012; 33: 4608-4617.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Alexiou C, Arnold W, Hulin P, Klein RJ, Renz H, Parak FG, Bergemann C, Lübbe AS. Magnetic mitoxantrone nanoparticle detection by histology, X-ray and MRI after magnetic tumor targeting. *J. Magn. Magn. Mater.* 2001; 225: 187-193.
- Allen LM, Matijević EJ. Stability of colloidal silica: I. Effect of simple electrolytes. *J. Colloid Interface Sci.* 1969; 31: 287-296.
- Allen TM. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994; 15: 215-220.
- Allen TM, Cullis PT. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science* 2004; 303: 1818-1822.
- Álvarez Paneque A, Reguera Ruiz E, Estévez Hernández O, Martínez García R, Canino Ramos C, Díaz Castañón S. Síntesis y caracterización de un sistema de nanopartículas superparamagnéticas basado en la ferrita de manganeso ( $MnFe_2O_4$ ) tipo espinela. *Revista Cubana de Química.* 2008; 20: 70-76.
- Amigó R, Asenjo J, Krotenko E, Torres F, Tejada J. Electrochemical Synthesis of New Magnetic Mixed Oxides of Sr and Fe: Composition, Magnetic Properties, and Microstructure. *Chem. Mater.* 2000; 12: 573-579.
- Andresen TL, Davidsen J, Begtrup M, Mouritsen OG, Jørgensen K. Enzymatic release of anti-tumor ether lipids by specific phospholipase A<sub>2</sub> activation of novel liposome-forming prodrugs. *J. Med. Chem.* 2004; 47: 1694-1703.
- Andresen TL, Jensen SS, Kaasgaard T, Jørgensen K. Triggered activation and release of liposomal prodrugs and drugs in cancer tissue by secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Curr. Drug Deliv.* 2005; 2: 353-362.

- Ang KL, Venkatraman S, Ramanujan RV. Magnetic PNIPA hydrogels for hyperthermia applications in cancer therapy. *Mater. Sci. Eng. C*. 2007; 27: 347-351.
- Arakaki A, Nakazawa H, Nemoto M, Mori T, Matsunaga T. Formation of magnetite by bacteria and its application. *J. R. Soc. Interface*. 2008; 5: 977-999.
- Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Release*. 2001; 77: 309-321.
- Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Delgado AV. Loading of 5-fluorouracil to poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Biomed. Nanotechnol*. 2005; 1: 632-634.
- Arias JL, Gallardo V, Linares-Molinero F, Delgado AV. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci*. 2006; 299: 599-607.
- Arias JL, López-Viota M, Ruiz MA, López-Viota J, Delgado AV. Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/Shell nanoparticles for biomedical applications. *Int. J. Pharm*. 2007a; 339: 237-245.
- Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(buthylcyanoacrylate) nanospheres. *Int. J. Pharm*. 2007b; 337: 282-290.
- Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules*. 2008a; 13: 2340-2369.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-Fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008b; 69: 54-63.

Arias JL, Ruiz MA, López-Viota M, Delgado AV. Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008c; 62: 64-70.

Arias JL, Harivardhan Reddy L, Couvreur P. Magnetoresponse squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. *Langmuir.* 2008d; 24: 7512-7519.

Arias JL, Linares-Molinero F, Gallardo V, Delgado AV. Study of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) (core/shell) particles as anticancer drug delivery systems: Loading and release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008e; 33: 252-261.

Arias JL, Ruiz MA, Gallardo V, Delgado AV. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J. Control. Release* 2008f; 125: 50-58.

Arias JL, López-Viota M, López-Viota J, Delgado AV. Development of iron/ethylcellulose (core/shell) nanoparticles loaded with diclofenac sodium for arthritis treatment. *Int. J. Pharm.* 2009a; 382: 270-276.

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J. Drug Target.* 2009b; 27: 586-598.

- Arias JL, López-Viota M, Delgado AV, Ruiz MA. Iron/ethylcellulose (core/shell) nanopatform loaded with 5-fluorouracil for cancer targeting. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010a; 77: 111-6.
- Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA. Formulation and physicochemical characterization of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010b; 75: 204-8.
- Arias JL, López-Viota M, Gallardo V, Adolfina Ruiz M. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the chemotherapy agent tegafur. *Drug Dev Ind Pharm*. 2010c; 36: 744-50.
- Arias JL, Martínez-Soler GI, López-Viota M, Ruiz MA. Formulation of chitosan nanoparticles loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett Drug Des Discov*. 2010d; 7: 70-78.
- Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA. Formulation and physicochemical characterization of poly(ε-caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2010e; 75: 204-208.
- Arias JL, Clares B, Morales ME, Gallardo, V, Ruiz MA. Lipid-based drug delivery systems for cancer treatment. *Curr. Drug Targets*. 2011a; 12: 1151-1165.
- Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: An overview. *Mini Rev. Med. Chem*. 2011b; 11: 1-17.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Delgado AV. Engineering of an antitumor (core/shell) magnetic nanoformulation based on the chemotherapy agent ftorafur. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2011c; 384: 157-163.

Arias JL, Reddy LH, Othman M, Gillet B, Desmaële D, Zouhiri F, Dosio F, Gref R, Couvreur P. Squalene based nanocomposites: a new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano*. 2011d; 5: 1513-1521.

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* 2011e; 12: 97-104.

Arias JL, Sáez-Fernández E, López-Viota M, Biedma-Ortiz RA, Ruiz MA. Synthesis of a biodegradable magnetic nanomedicine based on the antitumor molecule tegafur. *Med Chem*. 2012a; 8: 516-23.

Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA. Multifunctional anticancer nanomedicine based on a magnetically responsive cyanoacrylate polymer. *Methods Enzymol*. 2012b; 508: 61-88.

Arora HC, Jensen MP, Yuan Y, Wu A, Vogt S, Paunesku T, Woloschak GE. Nanocarriers enhance Doxorubicin uptake in drug-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2012; 72: 769-78.

Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* 2007; 2: 22-32.

- Babincov M, Altanerov V, Altaner C, Bergemann C, Babinec P. In vitro analysis of cisplatin functionalized magnetic nanoparticles in combined cancer chemotherapy and electromagnetic hyperthermia. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2008; 7: 15-9.
- Babincová M, Ciemanec P, Altanerová V, Altaner C, Babinec P. AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy. *Bioelectrochemistry*. 2002; 55: 17-9.
- Bajpai AK, Shukla SK, Bhanu S, Kankane S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Prog Polym Sci*. 2008; 33: 1088–1118.
- Banerjee S, Sen K, Pal TK, Guha SK. Poly(styrene-co-maleic acid)-based pH-sensitive liposomes mediate cytosolic delivery of drugs for enhanced cancer chemotherapy. *Int J Pharm*. 2012; 436: 786-97.
- Bangham AD, Standish MM, Miller N. Cation permeability of phospholipid model membranes: effect of narcotics. *Nature*. 1965; 208: 1295-7.
- Barberi-Heyob M, Watelet M, Merlin JL, Bleyer C, Schroeder B. Stability of newly-formulated 5-fluorouracil solutions. *Bull. Cancer*. 1995; 82: 1025-1031.
- Barenholz Y, Bombelli C, Bonicelli MG, di Profio P, Giansanti L, Mancini G, Pascale F. Influence of lipid composition on the thermotropic behavior and size distribution of mixed cationic liposomes. *J Colloid Interface Sci*. 2011; 356: 46-53.
- Baumgart T, Hess ST, Webb WW. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*. 2003; 425:821-24.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Bavetsias V, Marriott JH, Melin C, Kimbell R, Matusiak ZS, Boyle FT, Jackman AL. Design and synthesis of Cyclopenta[g]quinazoline-based antifolates as inhibitors of thymidylate synthase and potential antitumor agents. *J Med Chem.* 2000; 43: 1910-26.
- Bawa P, Pillay V, Choonara YE, Toif LC. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. *Biomed. Mater.* 2009; 4: 022001-022015.
- Bédard MF, De Geest BG, Skirtach AG, Möhwald H, Sukhorukov GB. Polymeric microcapsules with light responsive properties for encapsulation and release. *Adv Colloid Interface Sci.* 2010; 158: 2-14.
- Bee A, Massart R. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Mater.* 1995; 149: 6-9.
- Behrens S, Bönnemann H, Matoussevitch N, Gorschinski A, Dinjus E, Habicht W, Bolle J, Zinoveva S, Palina, Hormes J, Modrow H, Bahr S, Kempter V. Surface engineering of Co and FeCo nanoparticles for biomedical application. *J. Phys. Condens. Matter.* 2006; 18: S2543-S2561.
- Bender EA, Adorne MD, Colomé LM, Abdalla DS, Guterres SS, Pohlmann AR. Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *Int. J. Pharm.* 2012; 426: 271-279.
- Berger N, Sachse A, Bender J, Schubert R, Brandl M. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *Int. J. Pharm.* 2001; 223: 55-68.

- Bertolini A, Fiumanò M, Muffatti A, Pedroncelli S, Doria A, Codazi G, Giustiani S, Scarinci A, Redaelli G. Acute cardiotoxicity due to 5-fluorouracil: An underestimated toxicity. *Minerva Cardioangiol.* 1999; 47: 269-273.
- Billmeyer FW. Morfología y orden en los polímeros cristalinos. En: *Ciencia de los Polímeros.* (Ed.: Billmeyer FW). Barcelona: Reverté 1975; pp. 148-167.
- Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1816: 232-46.
- Booth F. Surface conductance and cataphoresis. *Trans. Faraday Soc.* 1948a; 44: 955-959.
- Booth F. Theory of electrokinetic effects. *Nature.* 1948b; 161: 83-86.
- Booth F. The cataphoresis of spherical, solid non-conducting particles in a symmetrical electrolyte. *Proc. Roy. Soc.* 1950; 203: 514-533.
- Borlido L, Moura L, Azevedo AM, Roque AC, Aires-Barros MR, Farinha JP. Stimuli-Responsive Magnetic Nanoparticles for Monoclonal Antibody Purification. *Biotechnol J.* 2013. doi: 10.1002/biot.201200329.
- Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci.* 2008; 121 Suppl 1:1-84.
- Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56: 1649-59.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 631-651.
- Brigger I, Morizet J, Laudani L, Aubert G, Appel M, Velasco V, Terrier-Lacombe MJ, Desmaële D, d'Angelo J, Couvreur P, Vassal G. Negative preclinical results with steath<sup>®</sup> nanospheres-encapsulated Doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *J. Control. Release.* 2004; 100: 29-40.
- Brisaert M, Gabriëls M, Matthijs V, Plaizier-Vercammen J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 26: 909-17.
- Callister WDJr. Estructura de los polímeros. En: *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales.* (Ed. Callister WDJr). Vol. 2. Barcelona: Reverté 1996a; pp. 482-486.
- Callister WDJr. Propiedades magnéticas. En: *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales.* (Ed. Callister WDJr). Vol. 2. Barcelona: Reverté 1996b; pp. 685-717.
- Carpenter EE. Iron nanoparticles as potential magnetic carriers. *J. Magn. Magn. Mater.* 2001; 225: 17-20.
- Cervadoro A, Giverso C, Pande R, Sarangi S, Preziosi L, Wosik J, Brazdeikis A, Decuzzi P. Design maps for the hyperthermic treatment of tumors with superparamagnetic nanoparticles. *PLoS One.* 2013; 8: e57332.
- Charles SW. The preparation of magnetic fluids. En: *Ferrofluids.* (Ed.: Odenbach S). Berlin: Springer 2003; pp. 3-18.

- Chaudhury MK, Good RJ. Retarded van der Waals force theory and stability of thick films in systems of three condensed phases. *J. Colloid Interface Sci.* 1983; 94: 292-294.
- Chaudhury MK. Hamaker Constant and the Dispersion Component of the Surface Tension of Liquid Mercury. *J. Colloid Interface Sci.* 1987; 119: 174-180.
- Chen Y, Bose A, Bothun GD. Controlled release from bilayer-decorated magnetoliposomes via electromagnetic heating. *ACS Nano.* 2010; 4: 3215-21.
- Chen G, Li D, Jin Y, Zhang W, Teng L, Bunt C, Wen J. Deformable liposomes by reverse-phase evaporation method for an enhanced skin delivery of (+)-catechin. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013.
- Chen KJ, Chiu YL, Chen YM, Ho YC, Sung HW. Intracellularly monitoring/imaging the release of doxorubicin from pH-responsive nanoparticles using Förster resonance energy transfer. *Biomaterials.* 2011; 32: 2586-92.
- Cheng R, Meng F, Deng C, Klok HA, Zhong Z. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials.* 2013; pii: S0142-9612(13)00139-7.
- Chibowski E. Solid surface free energy components determination by the thin-layer wicking technique. *J. Adhesion Sci. Technol.* 1992; 6: 1069-1090.
- Chibowski E, Holysz L. Use of the Washburn equation for surface free energy determination. *Langmuir* 1992; 8: 710-716.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Chibowski E, González-Caballero F. Theory and practice of thin-layer wicking. *Langmuir* 1993; 9: 330-340.
- Chibowski E, Kerkeb ML, González-Caballero F. Effect of inorganic ions on changes in the energetic heterogeneity of the cholesterol surface. *Langmuir*. 1993; 9: 2491-2495.
- Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1310-1316.
- Chorny M, Alferiev IS, Fishbein I, Tengood JE, Folchman-Wagner Z, Forbes SP, Levy RJ. Formulation and in vitro characterization of composite biodegradable magnetic nanoparticles for magnetically guided cell delivery. *Pharm Res.* 2012; 29: 1232-41.
- Chorny M, Fishbein I, Tengood JE, Adamo RF, Alferiev IS, Levy RJ. Site-specific gene delivery to stented arteries using magnetically guided zinc oleate-based nanoparticles loaded with adenoviral vectors. *FASEB J.* 2013; 27:2198-206.
- Christenson HK, Horn RG. Solvation forces measured in non-aqueous liquids. *Chemica Scripta.* 1985; 25: 37-41.
- Christenson HK. Non-DLVO forces between surfaces-solvation, hydration and capillary effects. *J. Disp. Sci. Technol.* 1988; 9: 171-206.
- Ciofani G, Riggio C, Raffa V, Menciassi A, Cuschieri A. A bi-modal approach against cancer: Magnetic alginate nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia. *Med. Hypotheses.* 2009; 73: 80-82.

- Cirstoiu-Hapca A, Bossy-Nobs L, Buchegger F, Gurny R, Delie F. Differential tumor cell targeting of anti-HER2 (Herceptin) and anti-CD20 (Mabthera) coupled nanoparticles. *Int J Pharm.* 2007; 331: 190-6.
- Clares B, Gallardo V, Medina MM, Ruiz MA. Multilamellar liposomes of triamcinolone acetonide: preparation, stability, and characterization. *J Liposome Res.* 2009; 19: 197-206.
- Clares B, Biedma-Ortiz RA, Sáez-Fernández E, Prados JC, Melguizo C, Cabeza L, Ortiz R, Arias JL. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013; 85, 329-338.
- Coenegrachts K, van Werven J, ter Beek L, Mzallassi Z, Bögels M, van Gulik T, Van Den Berghe I, Nederveen A, Stoker J, Rigauts H, Soenen S, De Cuyper M. Evaluation of peri-tumoral vessels surrounding colorectal liver metastases after intravenous injection of extruded magnetoliposomes in rats: correlation with 3T MRI and histopathology. *JBR-BTR.* 2010; 93: 87-91.
- Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 2006; 23: 1417-1450.
- Danhier F, Vroman B, Lecouturier N, Crockart N, Pourcelle V, Freichels H, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, Feron O, Préat V. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel. *J Control Release.* 2009; 140: 166-73.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Danhier F, Pourcelle V, Marchand-Brynaert J, Jérôme C, Feron O, Prétat V. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles. *Methods Enzymol.* 2012; 508: 157-75.
- Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1820: 291-317.
- Das M, Sahoo SK. Folate decorated dual drug loaded nanoparticle: role of curcumin in enhancing therapeutic potential of nutlin-3a by reversing multidrug resistance. *PLoS One.* 2012; 7: e32920.
- Dash BC, Réthoré G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials.* 2010; 31: 8818-8197.
- Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008; 7: 771-782.
- Debye PJW. Molekularkräfte und ihre Elektrische Deutung. *Physik Zeit.* 1921; 22: 302-308.
- Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, Ferrari M. Intravascular delivery of particulate systems: Does geometry really matter? *Pharm. Res.* 2009; 26: 235-243.

- Dehvari K, Lin KS. Synthesis, characterization and potential applications of multifunctional PEO-PPOPEO-magnetic drug delivery system. *Curr Med Chem.* 2012; 19: 5199-204.
- Dehousse V, Garbacki N, Colige A, Evrard B. Development of pH-responsive nanocarriers using trimethylchitosans and methacrylic acid copolymer for siRNA delivery. *Biomaterials.* 2010; 31: 1839-49.
- Delcea M, Möhwald H, Skirtach AG. Stimuli-responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63: 730-47.
- Delgado A, González-caballero F, Bruque JM. On the zeta potential and surface charge density of montmorillonite in aqueous electrolyte solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 1986; 113: 203-211.
- Delgado A. *Interfacial electrokinetics and electrophoresis.* New York: Marcel Dekker 2002.
- Derjaguin, B.V. A theory of the hetero-coagulation, interaction and adhesion dissimilar particles in solutions of electrolytes. *Dis. Faraday Soc.* 1954; 18: 85-98.
- Derjaguin BV, Dukhin SS. Nonequilibrium double layer and electrokinetic phenomena. En: *Surface and Colloid Science.* (Ed.: Matijević E). Vol. 7. New York: Wiley 1974; pp. 273-335.
- Derycke AS, Kamuhabwa A, Gijssens A, Roskams T, De Vos D, Kasran A, Huwyler J, Missiaen L, de Witte PA. Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer AlPcS4 to rat bladder carcinoma cells. *J. Natl. Cancer.* 2004; 96: 1620-30.

- Ding HM, Ma YQ. Role of physicochemical properties of coating ligands in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *Biomaterials*. 2012; 33: 5798-802.
- Ding X, Cai K, Luo Z, Li J, Hu Y, Shen X, Biocompatible magnetic liposomes for temperature triggered drug delivery. *Nanoscale*. 2012a; 4: 6289-6292.
- Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Develop. Res.* 2006; 67: 55-60.
- Doménech J, Martínez J, Plá JM. En: *Biofarmacia y farmacocinética*. Madrid: Síntesis 1998.
- Dong L, Xia S, Wu K, Huang Z, Chen H, Chen J, Zhang J. A pH/enzyme-responsive tumor-specific delivery system for doxorubicin. *Biomaterials*. 2010; 31: 6309-16.
- Dukhin SS. Development of notions as to the mechanism of electrokinetic phenomena and the structure of the colloid micelle. En: *Surface and colloid science*. (Ed.: Matijević E). Nueva York: Wiley; 1974; pp. 1-47.
- Dukhin SS, Derjaguin BV. Equilibrium double layer and electrokinetic phenomena. En: *Surface and colloid science*. (Ed.: Matijević E). Vol. 7. Nueva York: Wiley 1974; pp. 49-272.
- Dumitrache F, Morjan I, Alexandrescu R, Ciupina V, Prodan G, Voicu I, Fleaca C, Albu L, Savoiu M, Sandu I, Popovici E, Soare I. Iron-iron oxide core-shell nanoparticles synthesized by laser pyrolysis followed by superficial oxidation. *Appl. Surf. Sci.* 2005; 247: 25-31.

- Durán JDG, Delgado AV, González-Caballero F, Chibowski E. Surface free energy components of monodisperse zinc sulfide. *Mater. Chem. Phys.* 1994; 38: 42-49.
- Durán JDG, Guindo MC, Delgado AV. Electrophoretic properties of colloidal dispersions of monodisperse zinc sulphide: Effects of potential determining ions and surface oxidation. *J. Colloid Interface Sci.* 1995; 173: 436-442.
- Durán JDG, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloids as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97: 2948-2983.
- Eeckman F, Amighi K, Moës AJ. Effect of some physiological and non-physiological compounds on the phase transition temperature of thermoresponsive polymers intended for oral controlled-drug delivery. *Int J Pharm.* 2001; 222: 259-70.
- Eeckman F, Moës AJ, Amighi K. Poly(N-isopropylacrylamide) copolymers for constant temperature controlled drug delivery. *Int J Pharm.* 2004; 273: 109-19.
- Elaissari A, Sauzedde F, Montagne F, Pichot C. Preparation of magnetic lattices. En: *Colloidal polymers. Synthesis and characterization.* (Ed.: Elaissari A) New York: CRC Press. 2003; pp. 285-318.
- Elmizadeh H, Khanmohammadi M, Ghasemi K, Hassanzadeh G, Nassiri-Asl M, Garmarudi AB. Preparation and optimization of chitosan nanoparticles and magnetic chitosan nanoparticles as delivery systems using Box-Behnken statistical design. *J Pharm Biomed Anal.* 2013; 80:141-146.
- Estes DJ, Mayer M. Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1712: 152-60.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Elizondo E, Moreno E, Cabrera I, Córdoba A, Sala S, Veciana J, Ventosa N. Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2011; 104:1-52.
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet.* 1964 28; 1: 702-3.
- Etzerodt A, Maniecki MB, Graversen JH, Møller HJ, Torchilin VP, Moestrup SK. Efficient intracellular drug-targeting of macrophages using stealth liposomes directed to the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Control Release.* 2012; 160: 72-80.
- Evjen TJ, Nilssen EA, Barnert S, Schubert R, Brandl M, Fossheim SL. Ultrasound-mediated destabilization and drug release from liposomes comprising dioleoylphosphatidylethanolamine. *Eur J Pharm Sci.* 2011; 42: 380-6.
- Fang JY, Lin HH., Hsu LR, Tsai YH. Characterization and stability of various liposome-encapsulated enoxacin formulations. *Chem. Pharm. Bull.* 1997; 45: 1504-1509.
- Fawaz F, Guyot M, Lagueny AM, Devissaguet JPh. Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: Preparation and characterization, *Int. J. Pharm.* 1997; 154: 191-203.
- Feltin N, Pileni MP. New technique for synthesizing iron ferrite magnetic nanosized particles. *Langmuir.* 1997; 13: 3927-3933.
- Fernández-Pacheco R, Marquina C, Valdivia JG, Gutiérrez M, Romero MS, Cornudella R, Laborda A, Vilorio A, Higuera T, García A, García de Jalón JA, Ibarra MR.

- Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants. *J. Magn. Mater.* 2007; 311: 318-322.
- Fiévet F. Polyol process. Poliol process. En: *Fine particles: Synthesis, characterization and mechanism of growth*. (Ed.: Sugimoto T). New York: Marcel Dekker 2000; pp. 460-496.
- Fleige E, Quadir MA, Haag R. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64: 866-84.
- Florez K. Fluorouracil. En: *Analytical profiles of drug substances*. (Eds.: Rudy BC, Senkowski BZ). Vol. 2. New York and London: Academic Press 1973; pp. 221-244.
- Flórez J. 2008; *Farmacología Humana*, 5º Ed., Barcelona: Elsevier-Maason S.A.
- Fowkes FMJ. Additivity of intermolecular forces at interfaces I. Determination of the contribution to surface and interfacial tensions of dispersion forces in various liquids. *Phys. Chem.* 1963; 67: 2538-2541.
- Fowkes FM, Mostafa MA. Acid-base interactions in polymer adsorption. *I.E.C. Prod. Res. Dev.* 1978; 17: 3-7.
- Frascione D, Diwoky C, Almer G, Opriessnig P, Vonach C, Gradauer K, Leitinger G, Mangge H, Stollberger R, Prassl R. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO)-based liposomes as magnetic resonance imaging probes. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 2349-59.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Frenkel V. Ultrasound mediated delivery of drugs and genes to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60: 1193-208.
- Fresta M, Villari A, Puglisi G, Cavallaro G. 5-Fluorouracil: Various kinds of loaded liposomes: Encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties. *Int. J. Pharm.* 1993; 99: 145-156.
- Frimpong RA, Dou J, Pechan M, Hilt JZ. Enhancing remote controlled heating characteristics in hydrophilic magnetite nanoparticles via facile co-precipitation. *J. Magn. Mater.* 2010; 322: 326-331.
- Gabriëls M, Plaizier-Vercammen J. Physical and chemical evaluation of liposomes, containing artesunate. *J Pharm Biomed Anal.* 2003; 31: 655-67.
- Gaines RV, Skinner HCW, Foord EE, Mason B, Rosenzweig A. Multiple oxides. En: *Dana's New Mineralogy.* (Ed.: Dana J). New York: John Wiley & Sons. Inc. 1997; pp. 299-300.
- Gao J, Zhong W, He J, Li H, Zhang H, Zhou G, Li B, Lu Y, Zou H, Kou G, Zhang D, Wang H, Guo Y, Zhong Y. Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes. *Int J Pharm.* 2009; 374: 145-52.
- Garcia-Bennett A, Nees M, Fadeel B. In search of the Holy Grail: Folate-targeted nanoparticles for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 976-84.
- García-Jimeno S, Escribano E, Queralt J, Estelrich J. Magnetoliposomes prepared by reverse-phase followed by sequential extrusion: characterization and possibilities in the treatment of inflammation. *Int J Pharm.* 2011; 405: 181-7.

- Gartstein E, Cohen JB, Mason TO. Defect agglomeration in Wüstite at high temperatures-II.: An electrical conduction model. *J. Phys. Chem. Solids.* 1986; 47: 775-781.
- Giri J, Thakurta SG, Bellare J, Nigam AK, Bahadur DJ. Preparation and characterization of phospholipid stabilized uniform sized magnetite nanoparticles. *Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 62.
- Giustini AJ, Ivkov R, Hoopes PJ. Magnetic nanoparticle biodistribution following intratumoral administration. *Nanotechnology.* 2011; 22: 345101.
- Glavas-Dodov M, Fredro-Kumbaradzi E, Goracinova K, Simonoska M, Calis S, Trajkovic-Jolevska S, Hincal AA. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *Int. J. Pharm.* 2005; 291: 79-86.
- Glöckl G, Hergt R, Zeisberger M, Dutz S, Nagel S, Weitschies W. The effect of field parameters, nanoparticles properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2935-S2950.
- Gloria A, Russo T, D'Amora U, Zeppetelli S, D'Alessandro T, Sandri M, Bañobre-López M, Piñeiro-Redondo Y, Uhlarz M, Tampieri A, Rivas J, Herrmannsdörfer T, Dediu VA, Ambrosio L, De Santis R. Magnetic poly( $\epsilon$ -caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposite substrates for advanced bone tissue engineering. *J R Soc Interface.* 2013; 10: 20120833.
- Gonen N, Assaraf YG. Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2012; 15: 183-210.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- González-Carreño T, Morales MP, Gracia M, Serna CJ. Preparation of uniform  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles with nanometer size by spray pyrolysis. *Mater. Lett.* 1993; 18: 151-155.
- Good RJ. Contact angle, wetting and adhesion: A critical review. En: *Contact angle, wettability and adhesion*. (Ed.: Mittal KL). Utrecht: Koninklijke Brill NV. 1993; pp. 3-36.
- Good RJ, Girifalco LA. A theory for estimation of surface and interfacial energies. III. Estimation of surface energies of solids from contact angle data. *J. Phys. Chem.* 1960; 64: 561-565.
- Grange JM, Stanford JL, Stanford CA. Campbell De Morgan's 'Observations on cancer', and their relevance today. *J R Soc Med.* 2002; 95: 296-9.
- Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, Langer RS, Farokhzad OC. Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today.* 2007; 2: 14-21.
- Gu L, Fang RH, Sailor MJ, Park JH. In vivo clearance and toxicity of monodisperse iron oxide nanocrystals. *ACS Nano.* 2012; 6: 4947-54.
- Guan H, McGuire MJ, Li S, Brown KC. Peptide-targeted polyglutamic acid doxorubicin conjugates for the treatment of alpha(v)beta(6)-positive cancers. *Bioconjug. Chem.* 2008; 19: 1813-1821.
- Guo J, Gao X, Su L, Xia H, Gu G, Pang Z, Jiang X, Yao L, Chen J, Chen H. Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. *Biomaterials.* 2011; 32: 8010-20.

- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005; 26: 3995-4021.
- Halbreich A, Roger J, Pons JN, Geldwerth D, Da Silva MF, Roudier M, Bacri JC. Biomedical applications of maghemite ferrofluid. *Biochimie*. 1998; 80: 379-90.
- Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol*. 2008; 26: 57-64.
- Hallahan D, Geng L, Qu S, Scarfone C, Giorgio T, Donnelly E, Gao X, Clanton J. Integrin-mediated targeting of drug delivery to irradiated tumor blood vessels. *Cancer Cell*. 2003; 3: 63-74.
- Hamaker HC. The London-van der Waals attraction between spherical particles. *Physica* 1937; 4: 1058-1072.
- Han HD, Shin BC, Choi HS. Doxorubicin-encapsulated thermosensitive liposomes modified with poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide): drug release behavior and stability in the presence of serum. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006; 62: 110-6.
- Hau P, Fabel K, Baumgart U, Rummele P, Grauer O, Bock A, Dietmaier C, Dietmaier W, Dietrich J, Dudel C, Hübner F, Jauch T, Drechsel E, Kleiter I, Wismeth C, Zellner A, Brawanski A, Steinbrecher A, Marienhagen J, Bogdahn U. Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer*. 2004; 100: 1199-1207.
- Hauschild S, Lipprandt U, Rumpelcker A, Borchert U, Rank A, et al. Direct preparation and loading of lipid and polymer vesicles using inkjets. *Small*. 2005; 1: 1177-80.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

Henry DC. The cataphoresis of suspended particles. Part. I. The equation of cataphoresis. Proc. Roy. Soc. 1931; 133: 106-129.

Herringson TP, Altin JG. Effective tumor targeting and enhanced anti-tumor effect of liposomes engrafted with peptides specific for tumor lymphatics and vasculature. Int J Pharm. 2011; 411: 206-14.

Hergt R, Dutz S, Müller R, Zeisberger M. Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. J. Phys. Cond. Mater. 2006; 18: S2919-S2934.

Hilger I, Andrä W, Hergt R, Hiergeist R, Schubert H, Kaiser WA. Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: In vitro and in vivo studies in human cadavers and mice. Radiology. 2001; 218: 570-575.

Hilger I, Dietmar E, Linß W, Streck S, Kaiser WA. Developments for the minimally invasive treatment of tumours by targeted magnetic heating. J. Phys. Cond. Mater. 2006; 18: S2951-S2958.

Hodenius M, De Cuyper M, Desender L, Müller-Schulte D, Steigel A, Lueken H. Biotinylated Stealth® magnetoliposomas. Chem. Phys. Lipids. 2002; 120: 75-85.

Holzer M, Barnert S, Momm J, Schubert R. Preparative size exclusion chromatography combined with detergent removal as a versatile tool to prepare unilamellar and spherical liposomes of highly uniform size distribution. J. Chromatogr. A. 2009; 1216: 5838-48.

- Hong K, Zheng W, Baker A, Papahadjopoulos D. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett.* 1997; 400: 233-7.
- Horn RG, Israelachvili J. Direct measurement of structural forces between two surfaces in a nonpolar liquid. *J. Chem. Phys.* 1981; 75: 1400-1411.
- Hossann M, Wiggenhorn M, Schwerdt A, Wachholz K, Teichert N, Eibl H, Issels RD, Lindner LH. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1768: 2491-9.
- Hossann M, Wang T, Wiggenhorn M, Schmidt R, Zengerle A, Winter G, Eibl H, Peller M, Reiser M, Issels RD, Lindner LH. Size of thermosensitive liposomes influences content release. *J Control Release.* 2010; 147: 436-43.
- Huang W, Tang X, Felner I, Koltypin Y, Gedanken A. Preparation and characterization of Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>-TiO<sub>2</sub> via sonochemical synthesis. *Materials Research Bulletin.* 2002; 37: 1721-1735.
- Huang SL. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60: 1167-1176.
- Huber DL. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small.* 2005; 1: 482-501.
- Hunter RJ. The interpretation of electrokinetic potentials. *J. Colloid Int. Sci.* 1966; 22: 231-239.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Hunter RJ. Zeta Potential in colloid science. Nueva York: Academic Press 1981.
- Hunter RJ. Foundations of colloid science. Oxford: Oxford University Press 1987.
- Husseini GA, Pitt WG. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60: 1137-52.
- Huwylar J, Drewe J, Krähenbühl S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *Int. J. Nanomed.* 2008; 3: 21-29.
- Hwang BY, Jung BH, Chung SJ, Lee MH, Shim CK. In vitro skin permeation of nicotine from proliposomes. *J Control Release.* 1997; 49: 177-184.
- Hwang T, Park TJ, Koh WG, Cheong IW, Choi SW, Kim JH. Fabrication of nano-scale liposomes containing doxorubicin using Shirasu porous glass membrane. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2011; 392: 250-255.
- Hyeon T, Lee SS, Jongnam Park J, Chung Y, Na HB. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J. Am Chem. Soc.* 2001; 123: 12798-12801.
- Iannone A, Magin RL, Walczack T, Federico M, Swartz HM, Tomasi A, Vannini V. Blood clearance of dextran magnetite particles determined by a non-invasive in vivo ESR method. *Magn. Reson. Med.* 1991; 22: 435-442.
- Ibrahim A, Couvreur P, Roland M, Speiser P. New magnetic drug carrier. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983; 35: 59-61.

- Iglesias-Silva E, Vilas-Vilela JL, López-Quintela MA, Rivas J, Rodríguez M, León LM. Synthesis of gold-coated iron oxide nanoparticles. *J Non Cryst Solids*. 2010; 356: 1233-1235.
- Israelachvili J. Special interactions: Hydrogen-bonding and hydrophobic and hydrophilic interactions. En: *Intermolecular and surface forces*. Londres: Academic Press 1991; pp. 151-168.
- Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng*. 2005; 100: 1-11.
- Ito A, Yamaguchi M, Okamoto N, Sanematsu Y, Kawabe Y, Wakamatsu K, Ito S, Honda H, Kobayashi T, Nakayama E, Tamura Y, Okura M, Yamashita T, Jimbow K, Kamihira M. T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating lymphocytes after hyperthermia using functionalized magnetite nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*. 2013; 8: 891-902.
- James AM. *Surface and colloid science*. New York: Plenum Press 1979.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T. Interpretation of the contact angle in quartz/organic liquid film-water system. *J. Colloid Interface Sci*. 1984; 102: 533-538.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T. Interpretation of the contact angle in marble/organic liquid film-water system. *Mater. Chem. Phys*. 1987; 16: 489-499.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T, González-Caballero F. Surface free energy of celestite and its flotation activity. *Colloids and Surfaces*, 1989; 35: 41-48.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Janczuk B, Chibowski E, Wójcik W, Guindo MC, González-Caballero F. Surface free energy of some lead compounds compared to galena. *Mater. Chem. Phys.* 1994; 37: 64-67.
- Jansson A, Nafari A, Sanz-Velasco A, Svensson K, Gustafsson S, Hermansson AM, Olsson E. Novel method for controlled wetting of materials in the environmental scanning electron microscope. *Microsc Microanal.* 2013; 19: 30-7.
- Jesorka A, Orwar O. Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2008;1: 801-32.
- Jiang W, Xie H, Ghoorah D, Shang Y, Shi H, Liu F, Yang X, Xu H. Conjugation of functionalized SPIONs with transferrin for targeting and imaging brain glial tumors in rat model. *PLoS One.* 2012a; 7: e37376.
- Jiang T, Zhang Z, Zhang Y, Lv H, Zhou J, Li C, Hou L, Zhang Q. Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery. *Biomaterials.* 2012b; 33: 9246-58.
- Jiang H, Wang C, Guo Z, Wang Z, Liu L. Silver nanocrystals mediated combination therapy of radiation with magnetic hyperthermia on glioma cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012c; 12: 8276-81.
- Jogler C, Schüler D. Genetic analysis of magnetosome biomineralization. *Micro Monogr.* 2006; 3: 133-61.
- Jordan A, Wust P, Fähling H, John W, Hinz A, Felix R. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 1993; 9: 51-68.

- Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, Johannsen M, Wust P, Nadobny J, Schirra H, Schmidt H, Deger S, Loening S, Lanksch W, Felix R. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia, *J. Magn. Mater.* 2001; 225: 118-126.
- Justo OR, Moraes AM. Kanamycin incorporation in lipid vesicles prepared by ethanol injection designed for tuberculosis treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57: 23-30.
- Kamaly N, Miller AD. Paramagnetic liposome nanoparticles for cellular and tumour imaging. *Int J Mol Sci.* 2010; 11: 1759-76.
- Karant H, Murthy RS. pH-sensitive liposomes--principle and application in cancer therapy. *J Pharm Pharmacol.* 2007; 59: 469-83.
- Karewicz A, Bielska D, Gzyl-Malcher B, Kepczynski M, Lach R, Nowakowska M. Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011; 88: 231-9.
- Karlsson M, Nolkrantz K, Davidson MJ, Stromberg A, Ryttsen F. Electroinjection of colloid particles and biopolymers into single unilamellar liposomes and cells for bioanalytical applications. *Anal. Chem.* 2000; 72: 5857-62.
- Katas H, Raja MA, Lam KL. Development of Chitosan Nanoparticles as a Stable Drug Delivery System for Protein/siRNA. *Int J Biomater.* 2013; 2013:146320.
- Katsnelson BA, Privalova LI, Sutunkova MP, Tulakina LG, Pichugova SV, Beykin JB, Khodos MJ. Interaction of iron oxide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and alveolar macrophages in vivo. *Bull Exp Biol Med.* 2012; 152: 627-9.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Katzung BG. Farmacología básica y clínica. Méjico: Manual Moderno. 2007.
- Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine*. 2010; 6: 714-29.
- Khan HR, Petrikowski K. Magnetic and structural properties of the electrochemically deposited arrays of Co and CoFe nanowires. *J Magn Magn Mater*. 2002; 249: 458-461.
- Knudsen NØ, Jorgensen L, Hansen J, Vermehren C, Frokjaer S, Foged C. Targeting of liposome-associated calcipotriol to the skin: Effect of liposomal membrane fluidity and skin barrier integrity. *Int. J. Pharm*. 2011; 416: 478-485.
- Ko YT, Bickel U. Liposome-encapsulated polyethylenimine/oligonucleotide polyplexes prepared by reverse-phase evaporation technique. *AAPS PharmSciTech*. 2012; 13: 373-8.
- Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, Kos J, Kristl J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release*. 2007; 120: 18-26.
- Koning GA, Eggermont AM, Lindner LH, ten Hagen TL. Hyperthermia and thermosensitive liposomes for improved delivery of chemotherapeutic drugs to solid tumors. *Pharm Res*. 2010; 27: 1750-4.
- Kono K. Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 53: 307-19.

- Kono K, Yoshino K, Takagishi T. Effect of poly(ethylene glycol) grafts on temperature-sensitivity of thermosensitive polymer-modified liposomes. *J Control Release*. 2002; 80: 321-32.
- Krapf L, Dezi M, Reichstein W, Köhler J, Oellerich S. AFM characterization of spin-coated multilayered dry lipid films prepared from aqueous vesicle suspensions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011; 82: 25-32.
- Kulkarni SB, Vargha-Butler EI, Study of liposomal drug delivery systems. Encapsulation efficiencies of some steroids in MLV liposomes. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 1995; 4: 77-85.
- Kumar CS, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63: 789-808.
- Kunikazu M, Kazuo M, Motoharu I. Spectroscopic investigation of the molecular state of nystatin encapsulated in liposomes. *Int. J. Pharm*. 2000; 201: 37-49.
- Kuribayashi K, Tresset G, Coquet P, Fujita H, Takeuchi S. Electroformation of giant liposomes in microfluidic channels. *Meas. Sci. Technol*. 2006; 17:3121-26.
- Lasch J, Weissig V, Brandl M. Preparation of liposomes. In V. Torchilin, and V. Weissig (eds.), *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press, New York, 2003, p. 3-29.
- Lai TY, Lee WC. Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*. 2009; 204: 148-153.

- Lang C, Schüler D. Biogenic nanoparticles: production, characterization, and application of bacterial magnetosomes. *J Phys Condens Matter*. 2006, 18: S2815–S2828.
- Langbein D. Theory of Van der Waals attraction. New York: Springer-Verlag 1974.
- Lao LL, Ramanujan RV. Magnetic and hydrogel composite materials for hyperthermia applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2004; 15; 1061-1064.
- Lasic DD, Joannic R, Keller BC, Frederik PM, Auvray L. Spontaneous vesiculation. *Adv. Colloid Interface Sci*. 2001; 89: 337-49.
- Laskowski JS, Pugh RJ. Dispersions stability and dispersing agents. En: *Colloid Chemistry in Mineral Processing*. (Eds.: Laskowski JS, Ralston J). Londres: Elsevier 1992; 115-171.
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*. 2008; 108: 2064-110.
- Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2011; 166: 8-23.
- Laverman P, Zalipsky S, Oyen WJ, Dams ET, Storm G, Mullah N, Corstens FH, Boerman OC. Improved imaging of infections by avidin-induced clearance of <sup>99m</sup>Tc-biotin-PEG liposomes. *J. Nucl. Med*. 2000; 41: 912-918.

- Lee DJ, Park GY, Oh KT, Oh NM, Kwag DS, Youn YS, Oh YT, Park JW, Lee ES. Multifunctional poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for luminescence/magnetic resonance imaging and photodynamic therapy. *Int J Pharm.* 2012; 434: 257-63.
- Lee SF, Zhu X, Wang YX, Xuan S, You Q, Chan WH, Wong CH, Wang F, Yu JC, Cheng CH, Leung KC. Ultrasound, pH, and Magnetically Responsive Crown Ether-Coated Core/Shell Nanoparticles as Drug Encapsulation and Release Systems. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013; 5: 1566-74
- Lefèvre CT, Abreu F, Lins U, Bazylnski DA. A bacterial backbone: magnetosomes in magnetotactic bacteria. In: Rai M, Duran N, editors. *Metal nanoparticles in microbiology.* Berlin: Springer-Verlag; 2011.p. 75-102.
- Lemaire L, Arellano M, Malet-Martino MC, Martino R, De Forni M. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil: A question of formulation. *Bull. Cancer* 1994; 81: 1057-1059.
- Lesieur S, Grabielle-Madelmont C, Ménager C, Cabuil V, Dadhi D, Pierrot P, Edwards K. Evidence of surfactant-induced formation of transient pores in lipid bilayers by using magnetic-fluid-loaded liposomes. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 5266-7.
- Li C, Deng Y. A novel method for the preparation of liposomes: freeze-drying of monophasic solutions. *J. Pharm. Sci.* 2004; 93: 1403-1414.
- Li L, ten Hagen TL, Schipper D, Wijnberg TM, van Rhooen GC, Eggermont AM, Lindner LH, Koning GA. Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia. *J Control Release.* 2010; 143: 274-9.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Li LL, Yin Q, Cheng J, Lu Y. Polyvalent mesoporous silica nanoparticle-aptamer bioconjugates target breast cancer cells. *Adv Healthc Mater.* 2012a; 1: 567-72.
- Li Y, Qian Y, Liu T, Zhang G, Liu S. Light-triggered concomitant enhancement of magnetic resonance imaging contrast performance and drug release rate of functionalized amphiphilic diblock copolymer micelles. *Biomacromolecules.* 2012b; 13: 3877-86.
- Li Y, Gao GH, Lee DS. Stimulus-Sensitive Polymeric Nanoparticles and Their Applications as Drug and Gene Carriers. *Adv Healthc Mater.* 2013; 2:388-417.
- Liang B, He ML, Chan CY, Chen YC, Li XP, Li Y, Zheng D, Lin MC, Kung HF, Shuai XT, Peng Y. The use of folate-PEG-grafted-hybranched-PEI nonviral vector for the inhibition of glioma growth in the rat. *Biomaterials* 2009; 30: 4014-4020.
- Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL, Wang LF. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. *Biomaterials* 2009; 30: 5114-5124.
- Lins U, Farina M. Amorphous mineral phases in magnetotactic multicellular aggregates. *Arch Microbiol.* 2001; 176: 323-328.
- Liu ST, Yan Y, Chen ZL, Zhang YZ, Jin X. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2006; 26: 331-334.
- Liu R, Li D, He B, Xu X, Sheng M, Lai Y, Wang G, Gu Z. Anti-tumor drug delivery of pH-sensitive poly(ethylene glycol)-poly(L-histidine-)-poly(L-lactide) nanoparticles. *J Control Release.* 2011; 152: 49-56.

- Lohsse A, Ullrich S, Katzmann E, Borg S, Wanner G, Richter M, Voigt B, Schweder T, Schüler D. Functional analysis of the magnetosome island in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: the mamAB operon is sufficient for magnetite biomineralization. *PLoS One*. 2011; 6:e25561.
- London F. Zur Theorie und systematic der molekularkräfte. *Physik Zeit*. 1930; 63: 245-279.
- López-García JJ, Moya AA, Horno JJ, Delgado AV, González-Caballero F. A network model of the electrical double layer around a colloid particle. *J. Colloid Interface Sci*. 1996; 183: 124-130.
- López-López MT, Durán JDG, Delgado AV, González-Caballero F. Stability and magnetic characterization of oleate-covered magnetite ferrofluids in different nonpolar carriers. *J. Colloid Interface Sci*. 2005; 291: 144-151.
- López-Pérez JA, López-Quintela MA, Mira J, Rivas J. Preparation of magnetic fluids with particles obtained in microemulsions. *IEEE Trans. Magn*. 1997; 33: 4359-4362.
- Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 2009; 13: 256-262.
- Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, Matthias M, Dörken B, Herrmann F, Gürtler R, Hohenberger P, Haas N, Sohr R, Sander B, Lemke AJ, Ohlendorf D, Huhnt W, Huhn D. Clinical experiences with magnetic drug targeting: A phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res*. 1996a; 56: 4686-4693.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Lübbe AS, Bergemann C, Huhnt W, Fricke T, Riess H, Brock JW, Huhn D. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: Tolerance and efficacy. *Cancer Res.* 1996b; 56: 4694-4701.
- Lübbe AS, Bergemann C, Brock JW, McClure DG. Physiological aspects in magnetic drug-targeting. *J.Magn-Magn. Mater* 1999; 194: 149-155.
- Lübbe A, Alexiou C, Bergemann C. Clinical applications of magnetic drug targeting. *J. Surg. Res.* 2001; 95: 200-206.
- Lundberg BB. Preparation and characterization of polymeric pH-sensitive STEALTH® nanoparticles for tumor delivery of a lipophilic prodrug of paclitaxel. *Int J Pharm.* 2011; 408: 208-12.
- Lyklema J, Overbeek JThG. Electrochemistry of silver iodide the capacity of the double layer at the silver iodide-water interface. *J. Colloid Sci.* 1961a; 16: 595-608.
- Lyklema J, Overbeek JThG. On the interpretation of electrokinetic. *J. Colloid Sci.* 1961b; 16: 501-512.
- Lyklema J. Water at interfaces: A colloid-chemical approach. *J. Colloid Interface Sci.* 1977; 58: 242-250.
- Lyklema J. Structure of the solid/liquid interface and the electrical double layer. En: *Solid/liquid dispersions.* (Ed.: Tadros TF). Londres: Academic Press pp. 1987; 63-90.

- Lyklema J. Thermodynamic foundation of interface and colloid science. En: *Fundamentals of Interface and Colloid Science: Solid-Liquid Interfaces*. Londres: Academic Press 1995; 2.1-2.103.
- Lyklema J, Minor M. On surface conduction and its role in electrokinetics. *Colloids Surf. A*. 1998; 140: 33-41.
- Lyon RJP. Infrared absorption spectroscopy. En: *Physical methods, in determinative mineralogy*. (Ed.: Zussman J). Lóndres: Academic Press 1967; pp. 371-399.
- Maeda T, Yamamoto K, Aoyagi T. Importance of bound water in hydration-dehydration behavior of hydroxylated poly(N-isopropylacrylamide). *J Colloid Interface Sci*. 2006; 302: 467-74.
- Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2009; 71: 409-419.
- Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 71-9.
- Mahato R, Tai W, Cheng K. Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63: 659-70.
- Mai J, Song S, Rui M, Liu D, Ding Q, Peng J, Xu Y. A synthetic peptide mediated active targeting of cisplatin liposomes to Tie2 expressing cells. *J. Control. Release* 2009; 139: 174-181.

- Malonne H, Eeckman F, Fontaine D, Otto A, Vos LD, Moës A, Fontaine J, Amighi K. Preparation of poly(N-isopropylacrylamide) copolymers and preliminary assessment of their acute and subacute toxicity in mice. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005; 61: 188-94.
- Mangelsdorf CS, White LR. Effect of stern-layer conductance on electrokinetic transport properties of colloidal particles. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1990; 86: 2859-2870.
- Mangelsdorf CS, White LR. The dynamic double layer part 1: Theory of a mobile stern layer. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998a; 94: 2441-2452.
- Mangelsdorf CS, White LR. The dynamic double layer part 2: Effects of Stern-layer conduction on the high-frequency electrokinetic transport properties. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1998b; 94: 2583-2593.
- Manley S, Gordon VD. Making giant unilamellar vesicles via hydration of a lipid film. *Curr Protoc Cell Biol.* 2008; Chapter 24: Unit 24.3.
- Martina MS, Fortin JP, Ménager C, Clément O, Barratt G, Grabielle-Madelmont C, Gazeau F, Cabuil V, Lesieur S. Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging. *J Am Chem Soc.* 2005; 127: 10676-85.
- Martins S, Sarmiento B, Ferreira DC, Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2007; 2: 595-607.

- Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Mag. Mag.* 1981; 17: 1247-1248.
- Matijević E, Partch TE. Synthesis of monodispersed colloids by chemical reactions in aerosols. En: *Fine particles: Synthesis, characterization and mechanism of growth*. (Ed.: Sugimoto T). New York: Marcel Dekker 2000; pp. 97-113.
- Matijević E, Sapiieszko RS. Forced hydrolysis in homogeneous solutions. En: *Fine particles: Synthesis, characterization and mechanism of growth*. (Ed.: Sugimoto T). New York: Marcel Dekker 2000; pp. 2-34.
- Matijević E. A critical review of the electrokinetics of monodispersed inorganic colloids. En: *Interfacial electrokinetics electrophoresis*. (Ed.: Delgado AV). Nueva York: Marcel Dekker. 2002; pp. 199-218.
- May JP, Li SD. Hyperthermia-induced drug targeting. *Expert Opin Drug Deliv*; 2013; 10: 511-27
- Medina MM, Cerezo A, Sánchez-Morcillo J. Elaboración, caracterización y estudio de la estabilidad de los liposomas. *An. Real Acad. Farm.* 1986; 52: 251-264.
- Meers P. Enzyme-activated targeting of liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 265-272.
- Mercoureff W. Propriétés magnétiques des solides et propriétés similaires. En: *Aspects Modernes de la Physique des Solides*. (Ed.: Mercoureff W). París: Masson & Cie 1969; pp. 75-103.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Meure LA, Foster NR, Dehghani F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *AAPS PharmSciTech*. 2008; 9: 798-809.
- Mitra S, Gaur U, Gosh PC, Maitra AN. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Release* 2001; 74: 317-323.
- Mo R, Sun Q, Li N, Zhang C. Intracellular delivery and antitumor effects of pH-sensitive liposomes based on zwitterionic oligopeptide lipids. *Biomaterials*. 2013; 34: 2773-86.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 283-318.
- Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: Critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* 2003; 42: 463-478.
- Mohammed AR, Weston N, Coombes AG, Fitzgerald M, Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int J Pharm.* 2004; 285: 23-34.
- Mohan H. 2010; *Patología*, 6ª Ed., Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.C.F. (Pág. 192-235).
- Momo F, Fabris S, Stevanato R. Interaction of linear mono- and diamines with dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylglycerol multilamellar liposomes. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 382: 224-31.

- Morales ME, Gallardo V, Calpena AC, Doménech J, Ruiz MA. Comparative study of morphine diffusion from sustained release polymeric suspensions. *J. Control. Release.* 2004; 95: 75-81.
- Moreira JN, Gaspar R, Allen TM. Targeting Stealth liposomes in a murine model of human small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1515: 167-76.
- Moreira JN, Ishida T, Gaspar R, Allen TM. Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity. *Pharm Res.* 2002; 19: 265-9.
- Morrison FA. Electrophoresis of a particle of arbitrary shape. *J. Colloid Interface Sci.* 1970; 34: 210-214.
- Mui B, Chow L, Hope MJ. Extrusion technique to generate liposomes of defined size. *Methods Enzymol.* 2003; 367: 3-14.
- Müller RH, Lherm C, Herbort J, Couvreur P. Propidium-iodide-loaded polyalkylcyanoacrylate particles: Labelling conditions and loading capacity. *Colloid Polymer Sci.* 1991; 269: 147-152.
- Müller RH, Maaßen S, Weyhers H, Specht F, Lucks JS. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1996; 138: 85-94.
- Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 67: 86-95.

- Nanaki SG, Pantopoulos K, Bikiaris DN. Synthesis of biocompatible poly( $\epsilon$ -caprolactone)-block-poly(propylene adipate) copolymers appropriate for drug nanoencapsulation in the form of core-shell nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 2981-95.
- Neumann A, Good RJ. Thermodynamics of contact angles. I. Heterogeneous solid surfaces. *J. Colloid Interface Sci*. 1972; 38: 341-358.
- Neumann A, Omenyi SN, van Oss CJ. Negative Hamaker coefficients. II. Phase separation of polymer solutions. *Colloid Polymer Sci*. 1979; 257: 413-419.
- Ninhan BW, Parsegian VA. Van der Waals forces: Special characteristics in lipid-water systems and a general method of calculation based on the Lifshitz. Theory. *J. Biophys*. 1970; 10: 646-663.
- Nishimura K, Suzuki H, Toyota T, Yomo T. Size control of giant unilamellar vesicles prepared from inverted emulsion droplets. *J Colloid Interface Sci*. 2012; 376: 119-25.
- O'Brien RW, White LR. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J. Chem. Soc. Faraday Trans*. 1978; 274: 1607-1624.
- Ocaña M, Rodríguez-Clemente R, Serna CJ. Uniform colloidal particles in solution: Formation mechanisms. *Adv. Mater*. 1995; 7: 212-216.
- Oh KS, Lee H, Kim JY, Koo EJ, Lee EH, Park JH, Kim SY, Kim K, Kwon IC, Yuk SH. The multilayer nanoparticles formed by layer by layer approach for cancer-targeting therapy. *J Control Release*. 2013; 165: 9-15.

- Ohshima H. Interfacial electrokinetic phenomena. En: *Electrical phenomena at interfaces*. (Eds.: Ohshima H, Furusawa K). Vol. 2. Nueva York: Marcel Dekker 1998; pp. 19-55.
- Okon E, Pouliquen D, Okon P, Kovaleva ZV, Stepanova TP, Lavit SG, Kudryavtsev BN, Jallet P. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat: A histologic and biophysical study. *Lab. Invest.* 1994; 71: 895-903.
- Omer-Mizrahi M, Margel S. Synthesis and characterization of magnetic and non-magnetic core-shell polyepoxide micrometer-sized particles of narrow size distribution. *J Colloid Interface Sci.* 2009; 329: 228-34.
- Önyüksel H, Mohantya PS, Rubinsteina I. VIP-grafted sterically stabilized phospholipid nanomicellar 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin: A novel targeted nanomedicine for breast cancer. *Int. J. Pharm.* 2009; 365: 157-161.
- Overbeek JHG. Theorie der elektroforese. Der relaxationseffekt. *Kolloid Beih.* 1943; 54: 287-364.
- Overbeek JHG. Electrokinetic Phenomena. En: *Colloid Science*. (Ed.: Kruyt HR). Vol. 1. Amsterdam: Elsevier. 1952; 194-244.
- Pan XQ, Lee RJ. In vivo antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal daunorubicin in a murine leukemia model. *Anticancer Res.* 2005; 25: 343-6.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Application of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2003; 36: R167-R181.

- Panofski WKH, Phillips M. Three-dimensional potential problems. En: *Classical electricity and magnetism*. (Eds.: Panofski WKH, Phillips M). Addison-Wesley. Reading 1975; 81-94.
- Park JW, Kirpotin DB, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Papahadjopoulos D, Benz CC. Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced anticancer efficacy due to targeted delivery. *J. Control. Release* 2001; 74: 95-113.
- Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* 2002; 4: 95-99.
- Park JW, Benz CC, Martin FJ. Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. *Semin Oncol.* 2004; 31 (6 Suppl 13): 196-205.
- Park S, Kim HS, Kim WJ, Yoo HS. Pluronic@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with robust incorporation of doxorubicin by thermo-responsiveness. *Int J Pharm.* 2012; 424: 107-14.
- Pascal C, Pascal JL, Favier F. Electrochemical Synthesis for the Control of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *Chem. Mater.* 1999; 11: 141-147.
- Pashley RM. Interparticulate forces. En: *Colloid chemistry in mineral processing*. (Eds.: Laskowski JS, Ralston J). Londres: Elsevier 1992; 91-114.
- Patil YB, Toti US, Khadair A, Ma L, Panyam J. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* 2009; 30: 859-866.

- Patil R, Portilla-Arias J, Ding H, Inoue S, Konda B, Hu J, Wawrowsky KA, Shin PK, Black KL, Holler E, Ljubimova JY. Temozolomide delivery to tumor cells by a multifunctional nano vehicle based on poly( $\beta$ -L-malic acid). *Pharm Res.* 2010; 27: 2317-29.
- Pautot S, Frisken BJ, Weitz DA. Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion. *Langmuir.* 2003; 19: 2870-2879.
- Paylukhina S, Sukhishvili S. Polymer assemblies for controlled delivery of bioactive molecules from surfaces. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63: 822-36.
- Peer D, Margalit R. Physicochemical evaluation of a stability-driven approach to drug entrapment in regular and in surface-modified liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 383:185-190.
- Peng A, Pisal DS, Doty A, Balu-Iyer SV. Phosphatidylinositol induces fluid phase formation and packing defects in phosphatidylcholine model membranes. *Chem Phys Lipids.* 2012; 165: 15-22.
- Pereira-Lachataignerais J, Pons R, Panizza P, Courbin L, Rouch J, López O. Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chem Phys Lipids.* 2006; 140: 88-97.
- Pereira-Leite C, Carneiro C, Soares JX, Afonso C, Nunes C, Lúcio M, Reis S. Biophysical characterization of the drug-membrane interactions: The case of propranolol and acebutolol. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013; 84: 183-91.

- Pérez-Artacho B, Gallardo V, Ruiz MA, Arias JL. Maghemite/poly(d,l-lactide-co-glycolide) composite nanoplatform for therapeutic applications. *J Nanopart Res.* 2012; 14: 768.
- Parsegian VA, Ninham BW. Application of Lifschitz theory to the calcinations of van der Waals forces across thin liquid films. *Nature.* 1969; 224: 1197-1198.
- Petri-Fink A, Hofmann H. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): From Synthesis to *In Vivo* Studies - A Summary of the Synthesis, Characterization, *In Vitro*, and *In Vivo* Investigations of SPIONs with Particular Focus on Surface and Colloidal Properties. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2007; 6: 289-97.
- Pham HL, Shaw PN, Davies NM. Preparation of immuno-stimulating complexes (ISCOMs) by ether injection. *Int J Pharm.* 2006; 310: 196-202.
- Pileni MP. Nanosized particles made in colloidal assemblies. *Langmuir.* 1997; 13: 3266-3276.
- Pileni MP. Magnetic fluids: Fabrication, magnetic properties, and organization of nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* 2001; 11: 323-333.
- Pinkas J, Reichlova V, Zboril R, Moravec Z, Bezdicka P, Matejkova J. Sonochemical synthesis of amorphous nanoscopic iron(III) oxide from Fe(acac)<sub>3</sub>. *Ultrason Sonochem.* 2008; 15: 257-264.
- Plaza RC, Arias JL, Espín M, Jiménez ML, Delgado AV. Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *J. Colloid Interface Sci.* 2002; 245: 86-90.

- Poore GA, Senyei AE. Selective targeting of magnetic albumin to the Yoshida sarcoma: Ultrastructural evaluation of microsphere disposition. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1983; 19: 141-148.
- Popovici E, Dumitrache F, Morjan I, Alexandrescu R, Ciupina V, Prodan G, Vekas L, Bica D, Marinica O, Vasile E. Iron/iron oxides core-shell nanoparticles by laser pyrolysis: Structural characterization and enhanced particle dispersion. *Appl. Surf. Sci.* 2007; 254: 1048-1052.
- Pouliquen D, Chouly C. Magnetic microcarriers for medical applications. En: *The MML series: Medical & biotechnology applications*. (Ed.: Arshady R). Vol. 2. Londres: Citus Books 1999; pp. 343-382.
- Pradhan P, Giri J, Banerjee R, Bellare J, Bahadur D. Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer. *J. Magn. Magn. Mater.* 2007; 311: 208-215.
- Prashant C, Dipak M, Yang CT, Chuang KH, Jun D, Feng SS. Superparamagnetic iron oxide--loaded poly(lactic acid)-D-alpha-tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate copolymer nanoparticles as MRI contrast agent. *Biomaterials.* 2010; 31: 5588-97.
- Puntes VF, Krisnan KM, Alivisatos AP. Colloidal nanocrystal shape and size control: The case of cobalt. *Science* 2001; 291: 2115-2117.
- Purushotham S, Ramanujan RV. Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomater.* 2010; 6: 502-510.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Rapoport N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* 2007; 32: 962-990.
- Rapoport N, Gao Z, Kennedy A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 1095-106.
- Rau B, Wust P, Tilly W, Gellermann J, Harder C, Riess H, Budach V, Felix R, Schlag PM. Preoperative radiochemotherapy in locally advanced or recurrent rectal cancer: regional radiofrequency hyperthermia correlates with clinical parameters. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 48: 381-91.
- Reddy LH. Drug delivery to tumors: Recent strategies. *J Pharm Pharmacol.* 2005; 57: 1231-1242.
- Reddy GR, Bhojani MS, McConville P, Moody J, Moffat BA, Hall DE, Kim G, Koo YEL, Woolliscroft MJ, Sugai JV, Johnson TD, Philbert MA, Kopelman R, Rehemtulla A, Ross BD. Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 6677-6686.
- Reddy LH, Couvreur P. Novel approaches to deliver gemcitabine to cancers. *Curr Pharm Design.* 2008; 14: 1124-1137.
- Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* 2012; 112: 5818–5878.
- Redondo-Morata L, Giannotti MI, Sanz F. Influence of cholesterol on the phase transition of lipid bilayers: a temperature-controlled force spectroscopy study. *Langmuir.* 2012; 28: 12851-60.

- Regazzoni AE, Blesa MA, Maroto AJG. Interfacial properties of zirconium dioxide and magnetite in water. *J. Colloid Interface Sci.* 1983; 91: 560-570.
- Rivas J, Sánchez RD, Fondado A, Izco C, García-Bastida AJ, García-Otero J, Mira J, Baldomir D, González A, Lado I, López-Quintela MA, Oseroff SB. Structural and magnetic characterization of Co particles coated with Ag. *J. Appl. Phys.* 1994; 76: 6564-6566.
- Robb SA, Lee BH, McLemore R, Vernon BL. Simultaneously physically and chemically gelling polymer system utilizing a poly(NIPAAm-co-cysteamine)-based copolymer. *Biomacromolecules.* 2007; 8: 2294-300.
- Rosengart AJ, Kaminski MD, Chen H, Caviness PL, Ebner AD, Ritter JA. Magnetizable implants and functionalized magnetic carriers: A novel approach for noninvasive yet targeted drug delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 633-638.
- Rosensweig RE. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *J. Magn. Magn. Mater.* 2002; 252: 370-374.
- Rubin P. 2003; *Oncología Clínica*, 8ª Ed., Madrid: Elsevier S.A.
- Rudge SR, Kurtz TL, Vessely CR, Catterall LG, Williamson DL. Preparation, characterization, and performance of magnetic iron-carbon composite microparticles for chemotherapy. *Biomaterials.* 2000; 14: 1411-1420.
- Russel WB, Saville DA, Schowalter WR. Electrostatics. En: *Colloidal dispersions*. (Eds.: Russel WB, Saville DA). Cambridge: University Press. 1989; 88-128.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Sabaté R, Barnadas-Rodríguez R, Callejas-Fernández J, Hidalgo-Alvarez R, Estelrich J. Preparation and characterization of extruded magnetoliposomes. *Int J Pharm.* 2008; 347: 156-62.
- Sadhukha T, Niu L, Wiedmann TS, Panyam J. Effective Elimination of Cancer Stem Cells by Magnetic Hyperthermia. *Mol Pharm.* 2013; 10: 1432-41.
- Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Arias JL. Drug delivery systems base on poly( $\epsilon$ -caprolactone) for cancer treatment. *Ars Pharm.* 2009; 50: 83-96.
- Sahoo SK, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int. J. Cancer.* 2004; 112: 335-340.
- Sahoo SK, Labhasetwar V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol Pharm.* 2005; 2: 373-83.
- Schmidt H. Nanoparticles by chemical synthesis, processing to materials and innovative applications. *Appl. Organometall. Chem.* 2001; 15: 331-343.
- Schröder A, Honen R, Turjeman K, Gabizon A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *J. Control. Release* 2009; 137: 63-68.
- Schubert R. Liposome preparation by detergent removal. *Methods Enzymol.* 2003; 367: 46-70.

- Schüler D. Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32: 654-72.
- Schultz-Sikma EA, Joshi HM, Ma Q, Macrenaris KW, Eckermann AL, Dravid VP, Meade TJ. Probing the Chemical Stability of Mixed Ferrites: Implications for MR Contrast Agent Design. *Chem Mater.* 2011; 23: 2657-2664.
- Senyei AE, Widder KJ. Drug targeting: magnetically responsive albumin microspheres- a review of the system to date. *Gynecol Oncol.* 1981; 12: 1-13.
- Shah N, Chaudhari K, Dantuluri P, Murthy RS, Das S. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles surface modified with transferrin and Pluronic((R))P85, an in vitro cell line and in vivo biodistribution studies on rat model. *J Drug Target.* 2009; 17: 533-42.
- Shahin M, Soudy R, El-Sikhry H, Seubert JM, Kaur K, Lavasanifar A. Engineered peptides for the development of actively tumor targeted liposomal carriers of doxorubicin. *Cancer Lett.* 2012. pii: S0304-3835(12)00595-2. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.007.
- Shalviri A, Raval G, Prasad P, Chan C, Liu Q, Heerklotz H, Rauth AM, Wu XY. pH-Dependent doxorubicin release from terpolymer of starch, polymethacrylic acid and polysorbate 80 nanoparticles for overcoming multi-drug resistance in human breast cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 82: 587-97.
- Shalviri A, Chan HK, Raval G, Abdekhodaie MJ, Liu Q, Heerklotz H, Wu XY. Design of pH-responsive nanoparticles of terpolymer of poly(methacrylic acid), polysorbate 80 and starch for delivery of doxorubicin. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 101: 405-13.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Shen JM, Gao FY, Yin T, Zhang HX, Ma M, Yang YJ, Yue F. cRGD-functionalized polymeric magnetic nanoparticles as a dual-drug delivery system for safe targeted cancer therapy. *Pharmacol Res.* 2013; 70: 102-115.
- Shi G, Guo W, Stephenson SM, Lee RJ. Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. *J Control Release.* 2002; 80: 309-19.
- Shinkai M, Ueda K, Ohtsu S, Honda H, Kohri K, Kobayashi T. Effect of functional magnetic particles on radiofrequency capacitive heating. *Jpn J Cancer Res.* 1999; 90: 699-704.
- Shmeeda H, Mak L, Tzemach D, Astrahan P, Tarshish M, Gabizon A. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 818-824.
- Shum HC, Lee D, Yoon I, Kodger T, Weitz DA. Double emulsion templated monodisperse phospholipid vesicles. *Langmuir.* 2008; 24: 7651-3.
- Sikora K, Advani S, Korolchouk V, Magrath I, Levy L, Pinedo H, Schwartzman G, Tattersall M, Yan S. Essential drugs for cancer therapy: A World Health Organization consultation. *Ann. Oncol.* 1999; 10: 385-390.
- Silverstein R, Webster FX. Spectrometry identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons Inc. 1998.

- Simões S, Moreira JN, Fonseca C, Düzgüneş N, de Lima MC. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56: 947-65.
- Sindhu VJ, Vaidya SG, Nerurkar VR, Chitralkha S. Treatment of gamma radiation-induced transplanted leukemia in ICRC mice by liposomally encapsulated 5-fluorouracil. *Leuk. Res.* 1993; 17: 601-607.
- Sivakumar B, Aswathy RG, Nagaoka Y, Suzuki M, Fukuda T, Yoshida Y, Maekawa T, Sakthikumar DN. Multifunctional Carboxymethyl Cellulose-Based Magnetic Nanovector as a Theragnostic System for Folate Receptor Targeted Chemotherapy, Imaging, and Hyperthermia against Cancer. *Langmuir.* 2013; 29: 3453-66.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principios de análisis instrumental.* Madrid: Mc Graw Hill 2001.
- Soares DC, Cardoso VN, de Barros AL, de Souza CM, Cassali GD, de Oliveira MC, Ramaldes GA. Antitumoral activity and toxicity of PEG-coated and PEG-folate-coated pH-sensitive liposomes containing  $^{159}\text{Gd}$ -DTPA-BMA in Ehrlich tumor bearing mice. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 45: 58-64.
- Socaciu C, Jessel R, Diehl HA. Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy. *Chem Phys Lipids.* 2000; 106: 79-88.
- Soenen SJ, Velde GV, Ketkar-Atre A, Himmelreich U, De Cuyper M. Magnetoliposomes as magnetic resonance imaging contrast agents. *Nanomed Nanobiotechnol.* 2011; 3: 197-211.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradation polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 2001; 70: 1-20.
- Stachowiak JC, Richmond DL, Li TH, Brochard-Wyart F, Fletcher DA. Inkjet formation of unilamellar lipid vesicles for cell-like encapsulation. *Lab Chip*. 2009; 9: 2003-9.
- Stano P, Bufali S, Pisano C, Bucci F, Barbarino M, Santaniello M, Carminati P, Luisi PL. Novel camptothecin analogue (gimatecan)-containing liposomes prepared by the ethanol injection method. *J. Liposome Res.* 2004; 14: 87-109.
- Steinke F, Andräa W, Heidec R, Wernera C, Bellemann ME. Rotating magnetic microspheres as heating mechanism for remote controlled drug release. *J. Magn. Magn. Mater.* 2007; 311: 216-218.
- Stover TC, Kim YS, Lowe TL, Kester M. Thermoresponsive and biodegradable linear-dendritic nanoparticles for targeted and sustained release of a pro-apoptotic drug. *Biomaterials*. 2008; 29: 359-69.
- Sullivan CO, Birkinshaw C. In vitro degradation of insulin-loaded poly(*n*-butylcyanoacrylate) nanoparticles, *Biomaterials* 2004; 25: 4375-4382.
- Sun S, Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am Chem. Soc.* 2002; 124: 8204-8205.
- Suryanarayanan R. X-Ray Powder Diffractometry. En: *Physical characterization of pharmaceutical solids*. (Ed.: Brittain HG). New York: Marcel Dekker Inc. 1995; pp. 187-221.

- Szilágyi A, Zrínyi M. Temperature induced phase transition of interpenetrating polymer networks composed of poly(vinyl alcohol) and copolymers of *N*-isopropylacrylamide with acrylamide or 2-acrylamido-2-methylpropyl-sulfonic acid, *Polymer*. 2005; 46: 10011-10016.
- Ta T, Convertine AJ, Reyes CR, Stayton PS, Porter TM. Thermosensitive liposomes modified with poly(*N*-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) copolymers for triggered release of doxorubicin. *Biomacromolecules*. 2010; 11: 1915-20.
- Tagami T, Ernsting MJ, Li SD. Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin. *J Control Release*. 2011; 152: 303-9.
- Tagami T, May JP, Ernsting MJ, Li SD. A thermosensitive liposome prepared with a  $\text{Cu}^{2+}$  gradient demonstrates improved pharmacokinetics, drug delivery and antitumor efficacy. *J Control Release*. 2012; 161: 142-9.
- Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Kawamura T, Shimada S, Matsumoto K, Saida T, Honda H. Heat immunotherapy using magnetic nanoparticles and dendritic cells for T-lymphoma. *J. Biosci. Bioeng*. 2005; 100: 112-115.
- Tanaka K, Kanazawa T, Shibata Y, Suda Y, Fukuda T, Takashima Y, Okada H. Development of cell-penetrating peptide-modified MPEG-PCL diblock copolymeric nanoparticles for systemic gene delivery. *Int J Pharm*. 2010; 396: 229-38.
- Tang QS, Zhang DS, Cong XM, Wan ML, Jin LQ, Using thermal energy produced by irradiation of Mn-Zn magnetic nanoparticles (MZF-NPs) for heat-inducible gene expression, *Biomaterials*. 2008; 29: 2673-2679.

- Tartaj P, Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T, Serna CJ. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D Appl. Phys.* 2003; 36: R182-R197.
- Tartaj P, Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, Gonzalez-Carreno T, Serna CJ. Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Handbook of Magnetic Materials*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; p 403.
- Tartaj P, Gonzalez-Carreño T, Rebolledo AF, Bomatí-Miguel O, Serna CJ. Direct aerosol synthesis of carboxy-functionalized iron oxide colloids displaying reversible magnetic behaviour. *J Colloid Interface Sci.* 2007; 309: 68-71.
- Taupitz M, Schmitz S, Hamm B. Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development. *Rofo.* 2003; 175: 752-65.
- Temming K, Schiffelers RM, Molema G, Kok RJ. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat.* 2005; 8: 381-402.
- Thirawong N, Thongborusite J, Takeuchi H, Srimomsak P. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes. *J. Control. Release.* 2008; 125: 236-245.
- Thomas AM, Kapanen AI, Hare JJ, Ramsay E, Edwards K, Karlsson G, Bally MB. Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy. *J. Control. Release.* 2011; 150: 212-219.

- Toneguzzo P, Viau G, Acher O, Fiévet-Vincent F, Fiévet F. Monodisperse ferromagnetic particles for microwave applications. *Adv. Mater* 1998; 10: 1032-1035.
- Toneguzzo P, Viau G, Acher O, Guillet F, Bruneton E, Fiévet-Vincent F, Fiévet F. CoNi and FeCoNi fine particles prepared by the polyol process: Physico-chemical characterization and dynamic magnetic properties. *J Mater Sci Mater Med*. 2000; 35: 3767-3784.
- Torchilin V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009; 71: 431-44.
- Tseng YC, Mozumbar S, Huang L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2009; 61: 721-731.
- Ulbrich K, Šubr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2004; 56: 1023-1050.
- Vademécum Internacional. 2013; 50<sup>a</sup> Ed., Madrid: Medicom Editorial S.A. (Pág. 2194-2219).
- van den Berg CA, Bartels LW, De Leeuw AA, Lagendijk JJ, Van de Kamer JB. Experimental validation of hyperthermia SAR treatment planning using MR B1+ imaging. *Phys Med Biol*. 2004; 49: 5029-42.
- van den Hoven JM, Nemes R, Metselaar JM, Nuijen B, Beijnen JH, Storm G, Szebeni J. Complement Activation By Pegylated Liposomes Containing Prednisolone. *Eur J Pharm Sci*. 2013; 49: 265-71.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

van Olphen HJ. An introduction to clay colloidal chemistry. Nueva York: Wiley 1977.

van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 1986; 111: 378-390.

van Oss CJ. Interfacial forces in aqueous media. Boca Raton: CRC Press 2006.

van Swaay D, deMello A. Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab Chip.* 2013; 13: 752-67.

Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, Brigger I, Couvreur P. Drug delivery to resistant tumors: The potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Control Release.* 2003; 93: 151-160.

Veintemillas-Verdaguer S, Bomatí O, Morales MP, Di Nunzio PE, Martelli S. Iron ultrafine nanoparticles prepared by aerosol laser pyrolysis. *Materials Letters.* 2003; 57: 1184-1189.

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

Venkatasubbu GD, Ramasamy S, Avadhani GS, Ramakrishnan V, Kumar J. Surface modification and paclitaxel drug delivery of folic acid modified polyethylene glycol functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Powder Technology* 2013; 235: 437-442.

- Vera P, Gallardo V, Salcedo J, Delgado AV. Colloidal stability of a pharmaceutical latex: Experimental determinations and theoretical predictions. *J. Colloid Interface Sci.* 1996; 177: 553-560.
- Vijayakumar R, Kolytyn Y, Xu XN, Yeshurun Y, Gedanken A, Felner I. Fabrication of magnetite nanorods by ultrasound irradiation. *J. Appl. Phys.* 2001; 89: 6324-6328.
- Villar AV, Goñi FM, Alonso A. Diacylglycerol effects on phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and vesicle fusion. *FEBS Lett.* 2001; 494: 117-20.
- Viota JL, Durán JDG, González-Caballero F, Delgado AV. Magnetic properties of extremely bimodal magnetite suspensions. *J. Magn. Magn. Mater.* 2007; 314: 80-86.
- Viota JL, Rudzka K, Trueba A, Torres-Aleman I, Delgado AV. Electrophoretic characterization of insulin growth factor (IGF-1) functionalized magnetic nanoparticles. *Langmuir.* 2011; 27: 6426-32.
- Viota JL, Carazo A, Muñoz-Gamez JA, Rudzka K, Gómez-Sotomayor R, Ruiz-Extremera A, Salmerón J, Delgado AV. Functionalized magnetic nanoparticles as vehicles for the delivery of the antitumor drug gemcitabine to tumor cells. Physicochemical in vitro evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013; 33: 1183-1192.
- Visser J. On Hamaker constants: A comparison between Hamaker constants and Lifshitz-van der Waals constants. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1972; 4: 331-363.
- Wagner E. Programmed drug delivery: Nanosystems for tumor targeting. *Expet. Opin. Biol. Ther.* 2007; 7: 587-593.

## Capítulo 10. Bibliografía

---

- Wang D, Kong L, Wang J, He X, Li X, Xiao Y. Polymyxin E sulfate-loaded liposome for intravenous use: preparation, lyophilization, and toxicity assessment in vivo. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2009; 63: 159-67.
- Wang L, Wang Z, Liu J, Zhang J, Zhang D. Preparation of a new nanosized  $As_2O_3/Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$  thermosensitive magnetoliposome and its antitumor effect on MDA\_MB\_231 cells. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011; 11: 10755-9.
- Webb MS, Wheeler JJ, Bally MB, Mayer LD. The cationic lipid stearylamine reduces the permeability of the cationic drugs verapamil and prochlorperazine to lipid bilayers: implications for drug delivery. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1238: 147-55.
- Widder KJ, Senyei AE, Ranney DF. Magnetically responsive microspheres and other carriers for the biophysical targeting of antitumor agents. *Adv Pharmacol Chemother.* 1979; 16: 213-71.
- Widder KJ, Morris RM, Poore G, Howard DP Jr, Senyei AE. Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78: 579-81.
- Wiersema PH, Loeb AL, Overbeek JTG. Calculation of the electrophoretic mobility of a spherical colloid particle. *J. Colloid Interface Sci.* 1966; 22: 78-99.
- Woodbury DJ, Richardson ES, Grigg AW, Welling RD, Knudson BH. Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *J. Liposome Res.* 2006; 16: 57-80.

- Woodle MC, Collins LR, Sponsler E, Kossovsky N, Papahadjopoulos D, Martin FJ. Sterically stabilized liposomes. Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophys J*. 1992; 61: 902-10.
- Wust P, Cho CH, Hildebrandt B, Gellermann J. Thermal monitoring: invasive, minimal-invasive and non-invasive approaches. *Int J Hyperthermia*. 2006; 22: 255-62.
- Xing L, Zheng H, Cao Y, Che S. Coordination polymer coated mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug release. *Adv Mater*. 2012; 24: 6433-7.
- Xiong S, Yu B, Wu J, Li H, Lee RJ. Preparation, therapeutic efficacy and intratumoral localization of targeted daunorubicin liposomes conjugating folate-PEG-CHEMS. *Biomed Pharmacother*. 2011; 65: 2-8.
- Xiong XY, Guo L, Gong YC, Li ZL, Li YP, Liu ZY, Zhou M. In vitro & in vivo targeting behaviors of biotinylated Pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles through biotin-avidin interaction. *Eur J Pharm Sci*. 2012; 46: 537-544.
- Xu S, Olenyuk BZ, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: Rationale and advances. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013; 65: 121-38.
- Yamaguchi T, Nomura M, Matsuoka T, Koda S. Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome. *Chem Phys Lipids*. 2009; 160: 58-62.
- Yan L, Yue X, Zhang S, Chen P, Xu Z, Li Y, Li H. Biocompatibility evaluation of magnetosomes formed by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Mater. Sci. Eng. C*. 2012a; 32: 1802 -1807.

- Yan L, Zhang S, Chen P, Liu H, Yin H, Li H. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. *Microbiol Res.* 2010b; 167: 507-19.
- Yan C, Wu Y, Feng J, Chen W, Liu X, Hao P, Yang R, Zhang J, Lin B, Xu Y, Liu R. Anti- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  antibody guided three-step pretargeting approach using magnetoliposomes for molecular magnetic resonance imaging of breast cancer angiogenesis. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 245-55.
- Yanase M, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: an in vivo study. *Jpn J Cancer Res.* 1998; 89: 463-9.
- Yang P, Xu QZ, Jin SY, Lu Y, Zhao Y, Yu SH. Synthesis of multifunctional Ag@Au@phenol formaldehyde resin particles loaded with folic acids for photothermal therapy. *Chemistry.* 2012; 18: 9294-9.
- Yasuhara K, Tsukamoto M, Tsuji Y, Kikuchi JI. Unique concentration dependence on the fusion of anionic liposomes induced by polyethyleneimine. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2012; 415; 461-467.
- Yellen BB, Forbes ZG, Halverson DS, Fridman G, Barbee KA, Chorny M, Levy R, Friedman G. Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 647-654.
- Yin M, Willis A, Redl F, Turro NJ, O'Brien SP. Influence of Capping Groups on the Synthesis of  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  Nanocrystals. *J Mater Res.* 2004; 19: 1208-1215.

- Yin Z, Liu Y, Jiang LP, Zhu JJ. Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor  $\alpha$  based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres. *Biosens Bioelectron.* 2011; 26: 1890-4.
- Yingyuad P, Mével M, Prata C, Furegati S, Kontogiorgis C, Thanou M, Miller AD. Enzyme-Triggered PEGylated pDNA-Nanoparticles for Controlled Release of pDNA in Tumors. *Bioconjug Chem.* 2013; 24: 343-62.
- Yoshida M, Sato M, Yamamoto Y, Maehara T, Naohara T, Aono H, Sugishita H, Sato K, Watanabe Y. Tumor local chemohyperthermia using docetaxel-embedded magnetoliposomes: interaction of chemotherapy and hyperthermia, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27: 406-411.
- Zalipsky S, Hansen CB, Oaks JM, Allen TM. Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes. *J Pharm Sci*, 85 (1995) 133-137.
- Zasadzinski JA. Transmission electron microscopy observations of sonication-induced changes in liposome structure. *Biophys J.* 1986; 49: 1119-30.
- Zasadzinski JA, Wong B, Forbes N, Braun G, Wu G. Novel methods of enhanced retention in and rapid, targeted release from liposomes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2011; 16: 203-214.
- Zhang ZY, Shum P, Yates M, Messersmith PB, Thompson DH. Formation of fibrinogen-based hydrogels using phototriggerable diplasmalogen liposomes. *Bioconj. Chem.* 2002; 13: 640-646.

- Zhang CF, Jugold M, Woenne EC, Lammers T, Morgenstern B, Mueller MM, Zentgraf H, Bock M, Eisenhut M, Semmler W, Kiessling F. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res.* 2007; 67: 1555-1562.
- Zhang J, Misra RDK. Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core-shell nanoparticle carrier and drug release response. *Acta Biomater.* 2007; 3: 838-850.
- Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 2008; 13: 1551-1569.
- Zhang Y, Li J, Lang M, Tang X, Li L, Shen X. Folate-functionalized nanoparticles for controlled 5-Fluorouracil delivery. *J Colloid Interface Sci.* 2011; 354: 202-9.
- Zhao L, Feng SS. Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane. *J Colloid Interface Sci.* 2005; 285: 326-35.
- Zheng C, Xu J, Yao X, Xu J, Qiu L. Polyphosphazene nanoparticles for cytoplasmic release of doxorubicin with improved cytotoxicity against Dox-resistant tumor cells. *J Colloid Interface Sci.* 2011; 355: 374-82.
- Zhigaltsev IV, Maurer N, Wong KF, Cullis PR. Triggered release of doxorubicin following mixing of cationic and anionic liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1565: 129-35.

- Zhu G, Ye M, Donovan MJ, Song E, Zhao Z, Tan W. Nucleic acid aptamers: an emerging frontier in cancer therapy. *Chem Commun (Camb)*. 2012; 48: 10472-80.
- Zhu HW, Zhang CP. The preparation of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> composite nanoparticles and spectral properties. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 2004; 24: 25-8.
- Zhu L, Huo Z, Wang L, Tong X, Xiao Y, Ni K. Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive magnetoliposomes. *Int. J. Pharm.* 2009; 370: 136-143.
- Zhu L, Torchilin VP. Stimulus-responsive nanopreparations for tumor targeting. *Integr Biol (Camb)*. 2013; 5: 96-107.
- Zhuang YG, Xu B, Huang F, Wu JJ, Chen S. Solid lipid nanoparticles of anticancer drugs against MCF-7 cell line and a murine breast cancer model. *Pharmazie*. 2012; 67: 925-9.
- Zukoski CF, Saville DA. The interpretation of electrokinetic measurements using a dynamic model of the stern layer: I. The dynamic model. *J. Colloid Interface Sci*. 1986; 114: 32-44.

