

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**Diseño de Nanosistemas Poliméricos
Sensibles a Estímulos Magnéticos para el
Tratamiento del Cáncer**

TESIS DOCTORAL

Gema I. Martínez Soler

Granada, abril 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Gema I. Martínez Soler
D.L.: GR 2736-2011
ISBN: 978-84-694-2956-3

Dña. M^a Adolfin Ruiz Martínez, Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada, D. José Luis Arias Mediano, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada, y Dña. Visitación Gallardo Lara, Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada.

CERTIFICAN:

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

**DISEÑO DE NANOSISTEMAS POLIMÉRICOS SENSIBLES A ESTÍMULOS
MAGNÉTICOS PARA TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

ha sido realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica bajo nuestra dirección, por la Licenciada de Grado Dña. Gema Inmaculada Martínez Soler, y constituye su Tesis Doctoral.

Con esta fecha autorizamos su presentación ante la Comisión Asesora de Doctorado de la Universidad de Granada.

Granada, 8 de marzo de 2011.

Fdo.: M^a Adolfin Ruiz Martínez.

Fdo.: Visitación Gallardo Lara.

La doctoranda,

Gema I. Martínez Soler.

Fdo.: José Luis Arias Mediano.

La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio.

Dr. Gregorio Marañón

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cáncer.....	3
1.1.1. Breve introducción histórica del cáncer	3
1.1.2. ¿Qué es el cáncer?.....	6
1.1.2.1. Tipos	7
1.1.2.2. Origen	10
1.1.3. Abordaje farmacológico.....	12
1.1.3.1. Tipos de fármacos antitumorales.....	16
1.1.3.2. Metotrexato	24
1.2. Sistemas transportadores de fármacos.....	33
1.2.1. Principales estrategias de transporte específico de fármacos a células tumorales.....	34
1.2.1.1. Estrategias de transporte pasivo de fármacos.....	34
1.2.1.2. Estrategias de transporte activo de fármacos.....	38
1.2.2. Sistemas transportadores de fármacos sensibles a gradientes magnéticos aplicados	47
1.2.2.1. Principales características para su utilización en la quimioterapia del cáncer	47
1.2.2.2. Composición de los núcleos magnéticos	48
1.2.2.3. Utilidad en el tratamiento del cáncer	49
 CAPÍTULO 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	 55
2.1. Objetivos.....	56
2.2. Contribución del trabajo propuesto	59
2.3. Metodología y plan de trabajo.....	60
 CAPÍTULO 3. SÍNTESIS Y ESTUDIO MORFOLÓGICO	 63
3.1. Magnetita.....	65
3.1.1. Metodología de síntesis	66
3.1.2. Forma y tamaño	66
3.2. Recubrimiento polimérico: Chitosan.....	67
3.2.1. Aplicaciones farmacéuticas.....	70

3.2.2. Metodología de síntesis	72
3.2.3. Forma y tamaño	73
3.3. Partículas compuestas (magnetita/chitosan)	75
3.3.1. Metodología de síntesis	75
3.3.2. Forma y tamaño	76
3.4. Caracterización estructural de las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan	77
3.4.1. Difractometría de rayos X	77
3.4.1.1. Metodología experimental	79
3.4.1.2. Resultados	79
3.4.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier	81
3.4.2.1. Metodología experimental y de interpretación del espectro	81
3.4.2.2. Resultados	83

CAPÍTULO 4. PROPIEDADES ELÉCTRICAS

SUPERFICIALES	87
4.1. Descripción clásica de la doble capa eléctrica	90
4.2. Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta	97
4.3. Metodología experimental	107
4.4. Resultados	107

CAPÍTULO 5. TERMODINÁMICA SUPERFICIAL

5.1. Interacciones Superficiales	115
5.1.1. Interacciones dispersivas	116
5.1.2. Interacciones no-DLVO	118
5.1.3. Contribuciones a la energía libre superficial. Teoría de van Oss, Good y col.	120
5.2. Metodología experimental	125
5.3. Resultados	128
5.3.1. Componentes de la energía libre superficial de las nanopartículas	129
5.3.2. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba	131
5.3.3. Mecanismo termodinámico de formación de las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan	133

CAPÍTULO 6. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MAGNÉTICAS.....	135
6.1. Metodología experimental.....	138
6.2. Resultados.....	142
CAPÍTULO 7. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE VEHICULIZACIÓN DEL METOTREXATO	147
7.1. Caracterización espectrofotométrica del metotrexato	151
7.1.1. Absorbancia óptica de las disoluciones de metotrexato	153
7.1.2. Validación del método espectrofotométrico	157
7.1.3. Metodología de determinación de la incorporación de metotrexato en las nanopartículas diseñadas	161
7.2. Incorporación de Metotrexato en las nanopartículas magnetita/chitosan.....	163
7.2.1. Adsorción de metotrexato	163
7.2.2. Absorción de metotrexato	166
7.3. Liberación de metotrexato desde las nanopartículas magnetita/chitosan.....	170
7.4. Prueba de Concepto: guiado magnético <i>in vivo</i>	177
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES.....	179
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA.....	187

I. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER

1.1.1. Breve historia del Cáncer (American Cancer Society, 2011).

El cáncer es una enfermedad severa que ha sido descrita desde los albores de los albores de la historia. Algunas de las primeras pruebas de cáncer se encuentran entre los tumores óseos fósiles, de momias humanas en el antiguo Egipto, y manuscritos antiguos. Estos restos óseos presentan crecimientos característicos del cáncer de huesos, el osteosarcoma, y signos de destrucción ósea en el cráneo típicos del cáncer de cabeza y cuello.

La descripción más antigua de cáncer (si bien no se utilizó esta palabra) fue descubierta en Egipto y data del año 1600 a. C. Se trata del Papiro de Edwin Smith, y es una copia de una parte de un texto antiguo egipcio sobre cirugía del trauma. En él se describe 8 casos de tumores o úlceras de la mama que fueron tratados por cauterización, con una herramienta llamada *el simulacro de incendio*. La escritura dice acerca de la enfermedad que "no existe un tratamiento."

El origen de la palabra cáncer se le atribuye al médico griego Hipócrates (460-370 a.C.), considerado el "padre de la medicina". Hipócrates utilizó los términos *carcinosis* y *carcinoma* para describir la formación de tumores no ulcerosos y con formación de úlcera. En griego, estas palabras proceden de la palabra cangrejo, muy probablemente porque en la enfermedad la expansión de la zona afectada recuerda a la forma de un cangrejo. El médico romano, Celso (28-50 a.C.), posteriormente tradujo el término griego a *cáncer*, la palabra latina para el cangrejo. Galeno (130-200 d.C.), otro médico romano, usó la palabra *oncos* (del griego, hinchazón) para describir los tumores. Aunque la analogía del cangrejo de Hipócrates y Celso todavía se utiliza para describir los tumores malignos, el término de Galeno se utiliza actualmente como parte del nombre de especialistas en cáncer (oncólogos).

Durante el Renacimiento, científicos italianos lograron una mayor comprensión del cuerpo humano, científicos como Galileo y Newton comenzaron a utilizar el método científico, que más tarde se utilizaría para estudiar las enfermedades. Las autopsias, realizadas por Harvey (1628), permitieron entender el proceso de circulación

sanguínea en el organismo, hasta entonces desconocido. En 1761, Giovanni Morgagni de Padua fue el primero en describir la realización de autopsias para relacionar la enfermedad del paciente con los hallazgos patológicos después de la muerte. Este hecho sentó las bases de la oncología científica para el estudio del cáncer. El famoso cirujano escocés John Hunter (1728-1793) sugirió que algunos tipos de cáncer pueden ser curados mediante cirugía y describió cómo el cirujano puede decidir qué tipos de cáncer se podían operar, si el tumor no había invadido los tejidos cercanos. Eran "móviles", dijo, "No hay inconveniente en retirarlo." Un siglo más tarde, el desarrollo de la anestesia permitió el florecimiento de la cirugía y operaciones de cánceres clásicos como la mastectomía.

En el siglo XIX nació la oncología científica, con el uso del microscopio óptico en el estudio de los tejidos enfermos. Así como Morgagni había relacionado los resultados de las autopsias con el curso clínico de la enfermedad, Rudolf Virchow, considerado como el fundador de la patología celular, sentó las bases científicas para el estudio moderno del cáncer mediante el estudio de la anatomía patológica. Así pudieron comenzar a comprender mejor los daños que produce el cáncer y se sentaron las bases para el desarrollo de la cirugía del cáncer.

El mayor conocimiento de la biología del cáncer durante el siglo XIX, ha conducido a un notable progreso en la prevención del cáncer, el diagnóstico precoz y el tratamiento. Los científicos han aprendido más sobre el cáncer en las últimas décadas en comparación con los siglos anteriores. Las investigaciones sobre el cáncer continúan avanzando y, actualmente, podemos destacar como principales campos de investigación en la lucha contra el cáncer: la terapia dirigida, la genómica, la cirugía robótica y la nanotecnología. La investigación del cáncer está avanzando en tantos frentes que es difícil elegir los que destacar.

En cuanto a las terapias dirigidas, a medida que más se aprende acerca de la biología molecular del cáncer, los investigadores tienen nuevas dianas farmacológicas para sus novedosos fármacos. Podemos citar como ejemplo los anticuerpos monoclonales, los oligodesoxinucleótidos antisentido y el ARN interferente pequeño (small interfering RNA). Un ejemplo de esto es una nueva clase de terapia dirigida llamada inhibidores de la PARP [PARP es la abreviatura de las enzimas de polimerasa poli-(ADP-ribosa)]. Las células cancerosas utilizan PARP para reparar daños en el ADN, incluyendo el daño causado por la quimioterapia. Estudios recientes en el cáncer de mama han demostrado que el bloqueo de PARP puede hacer que las células

I. Introducción

cancerosas sean más sensibles al tratamiento y promover la muerte celular (Tentori L y Graziani G, 2005; Li Y y col. 1998).

La genómica y la proteómica pretenden analizar los perfiles de expresión de ARN permite a los científicos determinar cientos o incluso miles de moléculas de ARN de una sola vez. Saber qué proteínas o moléculas de ARN están presentes en una célula puede aportar mucha información sobre cómo se comportará la célula. En el cáncer, puede ayudar a distinguir los cánceres más agresivos de los menos agresivos y, a menudo, puede ayudar a predecir frente a qué medicamentos es probable que el tumor responda. El estudio de la proteómica también se está investigando como método de diagnóstico del cáncer. En la mayoría de los tipos de cáncer, la detección de una determinada proteína en la sangre no es muy útil para la detección precoz de la enfermedad. Pero los investigadores tienen la esperanza de que el conocimiento de que ciertas proteínas son anormalmente abundantes y otras son menos abundantes puedan proporcionar información precisa y útil. Esta es un área apasionante de la investigación y los primeros resultados de los estudios realizados en el pulmón y el cáncer colorrectal han sido prometedores (Plaschke J y col. 2004, Xu AJ y col.2010).

El término cirugía robótica se refiere a la manipulación de instrumentos quirúrgicos por control remoto por los brazos del robot y otros dispositivos controlados por un cirujano. Estos sistemas robóticos se han utilizado para varios tipos de cirugía de cáncer, la prostatectomía radical es una de las aplicaciones de este tipo más comunes en cirugía oncológica. Como la tecnología mecánica y el equipo mejoran, algunos investigadores esperan que los futuros sistemas sean capaces de eliminar los tumores de forma más completa y con menos trauma quirúrgico.

Finalmente, la nanotecnología es una novedosa técnica en la que a partir de determinados materiales obtenemos partículas extremadamente pequeñas que nos permiten obtener imágenes para diagnóstico muy exactas donde se muestra con mayor precisión la ubicación de los tumores, así como nuevas formas de administración de fármacos antitumorales más específicos y eficaces a las células cancerosas.

1.1.2. ¿Qué es el Cáncer? (Sociedad Española contra el cáncer, 2011)

Nuestro organismo está constituido por un conjunto de células que se dividen de forma regular con el fin de reemplazar a las ya envejecidas o muertas, y mantener así la integridad y el correcto funcionamiento de los distintos órganos. El proceso de división de las células está regulado por una serie de mecanismos de control que indican a la célula cuándo comenzar a dividirse y cuándo permanecer estática.

Si se produce un daño celular que no puede ser reparado comienza un proceso de autodestrucción celular que impide que el daño sea heredado por las células descendientes. Cuando estos mecanismos de control se alteran en una célula, ésta y sus descendientes inician una división incontrolada, que con el tiempo dará lugar a un masa tumoral. Cuando las células que constituyen dicho tumor no poseen la capacidad de invadir y destruir otros órganos, hablamos de tumores benignos. Pero cuando estas células además de crecer sin control sufren nuevas alteraciones y adquieren la facultad de invadir tejidos y órganos de vecinos (infiltración), y de trasladarse y proliferar en otras partes del organismo (metástasis), hablamos de tumor maligno o cáncer. No todos los tipos cánceres se caracterizan por la presencia de una masa sólida tumoral. En las leucemias las células alteradas crecen e invaden la médula ósea (tejido que se encarga de la formación de las células de la sangre). Con el tiempo, las células salen al exterior e invaden la sangre y otros órganos. La evolución de cada cáncer está sujeta a múltiples factores que van a interactuar entre sí. Estos factores varían dependiendo tanto del tumor como del propio paciente.

Las principales características de las células de un tumor maligno son:

1. *Displasia*: los mecanismos reguladores que mantienen el equilibrio de las células son incapaces de controlar su división, produciendo un cúmulo de células. Normalmente da lugar a un bulto o tumor.

2. *Neoplasia*: las células presentan variaciones en su forma, tamaño y función. Estas células dejan de actuar como deben y adquieren nuevas propiedades que configuran el carácter maligno (cáncer).

3. *Capacidad de invasión*: el cáncer puede extenderse por el organismo, utilizando para ello diferentes vías. Las más comunes son:

La propagación local. Las células tumorales invaden los tejidos vecinos, infiltrándose en ellos. La propagación a distancia. Ocurre cuando algún grupo de

I. Introducción

células malignas se desprende del tumor original donde se generó para trasladarse a otros lugares del organismo. Fundamentalmente, se propagan por los vasos sanguíneos y linfáticos, para después desarrollar tumores malignos secundarios.

1.1.2.1. Tipos (Sociedad Española Contra el Cáncer, 2011)

Para confirmar el diagnóstico de un cáncer es preciso tomar una muestra del tumor (biopsia). La malignidad de un tumor viene determinada por la agresividad de sus células, que le confiere una mayor o menor capacidad de invasión. La valoración de la biopsia no sólo permite determinar si la lesión es un cáncer o no, sino que, además, permite conocer las células que la componen (estudio anatomopatológico). Este estudio permite etiquetar y saber cuál o cuáles son los tejidos y células de las que proviene el tumor y cuáles son las características de las mismas. Estos factores son fundamentales para determinar el tratamiento más adecuado en cada caso.

Existen una serie de alteraciones típicas benignas y/o premalignas de las células cancerosas, en concreto:

- *Hiperplasia*: incremento en el número de células (se dividen más rápido de lo normal) de un tejido en un área específica. El resultado es el agrandamiento del órgano como por ejemplo la hiperplasia benigna de próstata o la aparición de un nódulo benigno.
- *Metaplasia*: sustitución de un tipo de célula por otra de otra localización. Con el tiempo puede aparecer una displasia sobre estas células cambiadas de lugar.
- *Displasia*: se trata de un desarrollo anormal del tejido, debido a un crecimiento de células alteradas. Si se deja evolucionar sin tratamiento en algunos casos la displasia puede evolucionar a un cáncer, por tanto se trata de una lesión premaligna o precancerosa.

Estas alteraciones pueden dar lugar a un cáncer. Existen muchas denominaciones de cáncer según su anatomía patológica, y no sería posible elaborar un listado completo, con la clasificación estricta, de todas las posibilidades. Algunos de los términos aplicados a los tipos de cáncer más comunes son los siguientes:

a) Carcinoma

Es el tumor maligno que se origina en la capa de células epiteliales que recubre los órganos. Aproximadamente el 80% de los tumores cancerosos son carcinomas. Algunas de estas células tienen diferentes características y por tanto su nombre puede ser algo distinto, destacando:

- *Adenocarcinoma*: cáncer que se origina en el tejido glandular (glándulas), por ejemplo en los conductos o lobulillos de la mama o en la próstata.
- *Carcinoma de células escamosas o epidermoide*: cáncer que se origina en las células no glandulares, por ejemplo esófago, cuello de útero, etc.
- *Carcinoma de células basales*: es el tipo de cáncer de la piel más común. Se origina en la capa más profunda de la epidermis, llamada la capa de células basales. Por lo general se origina en zonas corporales expuestas al Sol, especialmente la cabeza y el cuello. El cáncer de células basales crece lentamente y es poco probable que se propague a partes distantes del cuerpo.
- *Melanoma*: tumor maligno que se origina en las células que producen la coloración de la piel (melanocitos). El melanoma es casi siempre curable en sus primeras etapas. Sin embargo, es probable que se propague a otras partes del cuerpo.

b) Sarcoma

Se trata de un tumor maligno que se origina en los tejidos conectivos, tales como los cartílagos, la grasa, los músculos o los huesos. Dependiendo de la célula que lo origina pueden recibir diferentes nombres, siendo los más conocidos:

- *Osteosarcoma*: (osteo = hueso) sarcoma que deriva del hueso.
- *Liposarcoma*: (lipo = grasa) sarcoma que deriva de la grasa.
- *Condrosarcoma*: (condro = cartílago) sarcoma que deriva del cartílago.
- *Angiosarcoma*: (angio = Vaso) sarcoma que deriva de los vasos sanguíneos.

c) Leucemia

Popularmente conocido como cáncer de la sangre. Las personas con leucemia presentan un aumento notable en los niveles de glóbulos blancos o leucocitos. En las leucemias no existe tumoración, se afectan la sangre y la médula ósea. Las leucemias se pueden clasificar en función del tipo de célula alterada en:

- *Leucemia mieloide*, afecta a las células madre
- *Leucemia linfoide*, afecta a los glóbulos blancos o leucitos

Asimismo, se clasifican según el estado de maduración de las células leucémicas, pudiendo ser:

- *Leucemias agudas*: formada por células inmaduras.
- *Leucemias crónicas*: las células están en el último paso de la maduración.

d) Linfoma

Se denomina así al cáncer del sistema linfático. El sistema linfático es una red de ganglios y vasos finos que existe en todo el cuerpo, su función es combatir las infecciones. El linfoma afecta a un grupo de glóbulos blancos llamados linfocitos.

Los dos principales tipos de linfomas son:

- *Enfermedad de Hodgkin*: se caracteriza por la proliferación masiva de células de Reed-Sternberg, linfocitos de mayor tamaño y con más de un núcleo
- *Linfoma no Hodgkin*: se caracterizan por sufrir un proceso de infiltración en los ganglios linfáticos, aumentando de tamaño. Incluye diferentes tipos de linfomas y se pueden dividir en dinámicos (de crecimiento rápido) e indolentes (de crecimiento lento) y pueden estar formados por células B o células T.

1.1.2.2. Origen (Sociedad Española Contra el Cáncer, 2001)

El cáncer se origina cuando las células normales se transforman en cancerígenas, es decir, adquieren la capacidad de multiplicarse descontroladamente e invadir otros tejidos y órganos. Este proceso se denomina *carcinogénesis*. La primera fase comienza cuando determinados agentes actúan sobre la célula alterando su material genético mediante mutaciones. Una primera mutación no es suficiente para que se genere un cáncer, pero es el inicio del proceso. La condición indispensable es que la célula alterada sea capaz de dividirse. Como resultado, las células dañadas comienzan a multiplicarse a una velocidad ligeramente superior a la normal, transmitiendo a sus descendientes la mutación. A esto se le llama *fase de iniciación tumoral* y las células involucradas en esta fase se llaman células iniciadas. La alteración producida es irreversible, pero insuficiente para desarrollar el cáncer.

Si sobre las células iniciadas actúan de nuevo y de forma repetida los agentes carcinógenos, la multiplicación celular comienza a ser más rápida y la probabilidad de que se produzcan nuevas mutaciones aumenta. A esto se le llama *fase de promoción* y las células involucradas en esta fase se denominan células promocionadas. Actualmente conocemos muchos factores que actúan sobre esta fase, como el tabaco, la alimentación inadecuada, el alcohol, etc. Las células iniciadas y promocionadas sufren nuevas mutaciones. Cada vez se hacen más anómalas en su crecimiento y comportamiento. Adquieren la capacidad de invasión, tanto a nivel local infiltrando los tejidos de alrededor, como a distancia, originando las metástasis. Ésta es la *fase de progresión*.

Para que el cáncer se origine deben producirse de cuatro a seis mutaciones o alteraciones genéticas celulares, por lo que todo apunta a que los factores de riesgo deben estar en contacto con el organismo durante un considerable periodo de tiempo (años). Como resultado, se incrementa considerablemente el número de células con alteraciones en forma, tamaño y función; las cuales también se caracterizan por su capacidad de invadir otras partes del organismo. Esto también explicaría que el riesgo de padecimiento de un cáncer aumente con los años. En algunos casos, muy pocos (5 - 7 %), las personas presentan una predisposición genética al desarrollo de ciertos tipos de cánceres. Esto ocurre porque se heredan genes ya alterados. El resultado es

I. Introducción

que en estas personas la probabilidad de padecer cáncer aumenta y el tiempo necesario para su aparición es menor que cuando no existe esta predisposición.

Los hábitos de vida son fundamentales en el desarrollo de enfermedades como la obesidad, las enfermedades cardíacas y el cáncer. Por ejemplo, fumar aumenta las probabilidades de desarrollar cáncer de pulmón, boca, esófago, entre otros; El consumo excesivo de alcohol también aumenta la probabilidad de que se produzca un cáncer de hígado y estómago, por citar algún ejemplo.

El 75 - 80 % de los tipos de cánceres se deben a la acción de agentes externos que actúan sobre el organismo, causando alteraciones en las células. Sin embargo, la persona puede modificar sus hábitos, impidiendo que el organismo entre en contacto con estos agentes, como por ejemplo, evitando el consumo de tabaco, reduciendo las ingesta de alcohol, haciendo ejercicio físico, etc. En el otro 20 - 25 % de los casos, no se conocen con exactitud los mecanismos por los que se produce y desarrolla el cáncer. Se piensa que puede ser debido a mutaciones espontáneas de los genes o por la acción de algún factor externo que aún no se ha identificado. Actualmente es uno de los principales áreas de investigación. A los agentes externos se les denomina *factores de riesgo* o *agentes carcinógenos*. Son las sustancias que, en contacto con un organismo, son capaces de generar en él enfermedades cancerosas. Su naturaleza es variada, habiéndose descrito factores físicos, químicos y biológicos.

La mayoría de los carcinógenos químicos están relacionados con actividades industriales, por lo que gran parte de los tipos de cánceres producidos son más frecuentes en los países desarrollados. De los 7 millones de compuestos químicos conocidos, en unos 2.000 se ha descrito algún tipo de actividad carcinogénica y muy pocos están en contacto directa o indirectamente con el ser humano. Además, independientemente de su composición, la capacidad de una sustancia para producir cáncer va a depender de la dosis recibida y del tiempo de exposición a la sustancia. El amianto, arsénico, benceno, cadmio, mercurio, níquel, plomo, hidrocarburos clorados, naftilamina, son algunos de los agentes con actividad carcinogénica más usuales.

Entre los agentes físicos destacan las radiaciones ionizantes (rayos X), las radiaciones no ionizantes (rayos ultravioleta del Sol) y las radiaciones que emite la propia corteza terrestre (radón). Otra fuente de agentes físicos cancerígenos es la generada por accidentes nucleares como es el caso de las fugas producidas en centrales nucleares.

En los últimos años los agentes biológicos están adquiriendo cada vez un mayor protagonismo en la carcinogénesis humana. Hoy día sabemos que el 18 % de los cánceres son atribuibles a infecciones persistentes provocadas por virus, bacterias o parásitos, entre los que destacan el virus del papiloma humano (cáncer de cuello de útero), el virus de la hepatitis B (cáncer de hígado) y el *helicobacter pylori* (cáncer de estómago).

Tabla 1.1. Relaciona los tipos de cánceres con posibles causas y formas de prevención.

TIPO DE CÁNCER	AGENTES CARCINÓGENOS	PREVENCIÓN
Cáncer de piel	Radiaciones ultravioleta	Tomar adecuadamente el sol
Cáncer de pulmón, de riñón, mesotelioma, de hígado, de piel	Cromo, níquel, cobalto, asbesto, plomo, arsénico	Seguir medidas de seguridad en el trabajo
Cáncer de pulmón y testículo	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (humo de tabaco, hollín, alquitrán, petróleo...)	Evitar el consumo de tabaco y seguir medidas de seguridad en el trabajo
Cáncer de hígado, estómago	Nitrosaminas	Evitar el consumo excesivo de ahumados y embutidos
Cáncer de cuello de útero	Virus del Papiloma Humano (VPH)	Evitar relaciones sexuales y vacunación (GRADASIL [®])
Cáncer de hígado	Virus de la hepatitis B (VHB)	Cumplir el calendario de vacunación y, para población de riesgo, utilización de jeringuillas desechables y preservativo en las relaciones sexuales
Cáncer de estómago	<i>Helicobacter pylori</i> (bacteria)	Tratamiento antibiótico y vacunación.

1.1.3. Abordaje farmacológico.

El tratamiento moderno del cáncer incluye la cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y trasplante de medula ósea, o combinaciones de estos. Durante muchos años, la cirugía fue la única estrategia disponible, en ocasiones tan radical que tenía una alta morbi-mortalidad. Posteriormente, merced a los estudios de los esposos Curie y de Roëntgen entre otros, la radioterapia se convirtió en una exitosa posibilidad, comenzando por las tradicionales agujas de Radium para tratar el

I. Introducción

cáncer de cuello uterino. Las últimas modalidades han sido posibles gracias a los avances en la biología molecular, en la inmunología y en el conocimiento de las diversas fases del ciclo celular y de la apoptosis.

Aunque en los comienzos se pretendía, por medio de devastadores procedimientos quirúrgicos, eliminar hasta la última célula cancerosa, siempre se pensó que debía existir una posibilidad medicamentosa para lograr los mismos fines. Una de las grandes limitaciones estribaba en la destrucción de las células sanas al igual que las tumorales. El desarrollo de la radioterapia mostró que había tumores radiosensibles mientras que otros eran radiorresistentes. Se observó también que había tumores hormono-dependientes. La disponibilidad del trasplante medular óseo permitió la utilización de dosis antitumorales masivas de agentes quimioterápicos, con la seguridad de que se podrá volver a poner en su sitio la medula ósea sana que existía en el paciente antes del tratamiento.

El tratamiento mediante farmacoterapia específica de una patología que no dañe los tejidos sanos del paciente, evitando efectos sistémicos indeseables, fue el objeto de la farmacología del siglo XX. El término “quimioterapia” fue reacuñado por Ehrlich al comenzar dicho siglo, pues ya había sido utilizado en una tesis de 1785 en Wittenberg. A este investigador alemán le llamó mucho la atención la especificidad de un anticuerpo por el antígeno al que neutraliza, y cómo ese anticuerpo es letal para el microorganismo pero no le hace daño al resto de los tejidos del enfermo. Comparó estos anticuerpos con “balas mágicas” y pensó que la naturaleza nos daba un ejemplo para buscar agentes quimioterápicos tremendamente selectivos (concepto que se plasmarían realmente en los anticuerpos monoclonales).

Si bien los agentes quimioterápicos clásicos fueron por mucho tiempo los antibióticos, poco a poco este término se volvió análogo a fármaco oncológico. La historia de los quimioterápicos para el cáncer se remonta a 1887, cuando se descubrieron las propiedades vesicantes de la mostaza sulfurada y del azufre. La acción vesicante de estos compuestos sobre la piel, ojos, y tracto respiratorio que tuvo un uso médico durante la primera guerra mundial, mostró que a todas luces estos preparados tenían un efecto sistémico tóxico caracterizado (Krumbhaar en 1919) por leucopenia, aplasia de la medula ósea, disolución del tejido linfóide y ulceración del aparato digestivo

Como las mostazas nitrogenadas resultaron citotóxicas para el tejido linfóide, Gilman y Goodman estudiaron su efecto sobre el linfoma trasplantado de ratones. En

1942 realizaron los primeros estudios clínicos que dieron inicio a la quimioterapia. Por otro lado, diferentes observaciones epidemiológicas e investigaciones de laboratorio originaron el concepto de agente “carcinógeno”. Los nazis fueron líderes en investigación del cáncer y los primeros en describir los efectos carcinogénicos del tabaco. Una serie de restricciones impuestas a la guerra química, limitó inicialmente las investigaciones. Pero una vez levantadas dichas restricciones, numerosas variantes de la estructura química básica de las mostazas nitrogenadas se formularon. Esto dio lugar a una serie de compuestos muy utilizados en la quimioterapia moderna, como la ciclofosfamida, la mostaza nitrogenada como tal, el clorambucilo, la tiotepa, el bisulfán, las nitrosoureas y el cisplatino, entre otros.

Farber descubrió en 1948 que análogos del ácido fólico, como el metotrexato, y conocidos popularmente como “antifólicos”, producían remisiones importantes de la leucemia, aunque estas eran temporales; el efecto inmunosupresor de los recién descubiertos corticosteroides empezó a investigarse en el tratamiento de la leucemia, y la aparición de la terapia de rescate con ácido fólico permitieron una mayor supervivencia en estos pacientes gravemente enfermos, la mayoría niños. El metotrexato es hoy un fármaco antitumoral muy efectivo por ejemplo en el tratamiento del coriocarcinoma, aunque también en el tratamiento de como la artritis reumatoide o la psoriasis. Estos fármacos fueron agrupados bajo el nombre de antimetabolitos. Dentro de este campo se encuentran también la cincuentenaria 6-mercaptopurina o el primer quimioterápico para tumores sólidos, el 5-fluorouracilo.

Los carcinomas avanzados de mama y de próstata empezaron a beneficiarse del uso de las hormonas sexuales. Los estrógenos se usaban para retardar el crecimiento de los cánceres prostáticos, mientras que los andrógenos se usaron en los cánceres de mama. Esta terapia se modernizó con los antagonistas androgénicos, los moduladores de los receptores estrogénicos, y las gonadorrelinas de larga acción, efectivas aunque costosas, por la alta tecnología involucrada.

La naturaleza también fue la fuente de productos oncológicos. La medicina “folclórica” había señalado a un mirto denominado *Vinca rosea* como una planta con propiedades beneficiosas. Diversos investigadores científicos describieron la actividad antilinfocítica de alcaloides extraídos de esta planta, lo que dio lugar a la comercialización y utilización de la vinblastina y de la vincristina en linfomas y leucemias. Estos principios activos fueron utilizados generalmente en combinación con otros quimioterápicos en regímenes ampliamente estudiados que se denominan con siglas como MOPP, CHOP, etc. Se estudiaron también enzimas como la L-

I. Introducción

asparaginasa, o antibióticos derivados de *Streptomyces* de cuya clase surgieron la actinomicina D, la bleomicina o la doxorubicina por nombrar algunos ejemplos.

Los inmunomoduladores han sido utilizados en otras indicaciones. El levamisol por ejemplo, es un antiparasitario de uso común en veterinaria y el BCG (Bacilo Calmette Guerin) es una vacuna contra la tuberculosis. La invasión biológica de los virus hacia que los linfocitos segregaran unas sustancias que interferían con la infección viral. En 1957 los investigadores de origen judío Isaacs y Leidenmann describieron como interferones a estas glicoproteínas que todavía se utilizan en leucemias, linfomas y tumores metastáticos de diferente origen. Otros productos linfocitarios llamados interleucinas también son utilizados en la quimioterapia del cáncer.

Otro de los grandes adelantos en esta área es el de la disponibilidad de productos biológicos que combaten las citopenias, complicaciones que a menudo obligaban a suspender la quimioterapia durante tiempos prolongados. La eritropoyetina (para la anemia, en un principio para la asociada fallo renal) los factores estimulantes de colonias de granulocitos o de macrófagos (para las leucopenias) y los medicamentos que controlan la trombocitopenia, permiten al oncólogo continuar utilizando dosis efectivas de antitumorales que son también potencialmente tóxicos.

La nueva Ciencia de la Oncología aglutinó entonces a especialistas diversos como radiólogos y hematólogos. Cada día se dispone de nuevas sustancias contra leucemias antes intratables, y por medio de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, se puede dirigir la quimioterapia a los blancos específicos donde se necesita que actúe, lo que disminuye notoriamente su toxicidad. Científicos de Cambridge y Basilea (Milstein, Köhler y Jerne, Premio Nobel en medicina en 1984) fusionaron linfocitos B de ratones productores de anticuerpos con células tumorales, dando lugar a los hibridomas, antitumorales que combinan la especificidad monoclonal con la inmortalidad potencial de las células tumorales.

En 1965 el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos promovió un programa de cribado de agentes oncológicos para analizar su efectividad. El perfeccionamiento de los trasplantes de medula ósea autóloga le supuso el Premio Nobel de 1990 al oncólogo de Seattle E. Donnall Thomas. Estos trasplantes fueron utilizados inicialmente para el tratamiento de las leucemias, al final del siglo eran parte integral de regímenes de quimioterapia para tratar la enfermedad de Hodking, el

mieloma múltiple, los neuroblastomas, el cáncer testicular y algunos tipos de cáncer de mama.

El tratamiento de este último tipo de tumores ha evolucionado notablemente desde 1950. Por ejemplo, las cirugías radicales fueron reemplazadas por las modificadas, o las tumorectomías con linfadenectomía axilar más radioterapia y quimioterapia auxiliar, potenciando el efecto estos tratamientos. Estudios realizados en Norteamérica mostraron la utilidad de estas combinaciones y una de las más usadas hoy, el CMF (ciclofosfamida, metotrexato y 5- fluorouracilo) fue desarrollada en 1976 por el Instituto Nazionale di Tumori de Milán. La investigación en farmacología oncológica es hoy por ejemplo uno de los campos más beneficiados con la Ley de los Medicamentos Huérfanos [reglamento CE 141/2000 Agencia Europea del Medicamento (EMA)].

El pronóstico y tratamiento del cáncer han mejorado gracias a estos descubrimientos y a un diagnóstico precoz, al igual que al desarrollo de campañas preventivas como la antitabáquica, la de protección de los rayos solares, seguridad industrial, dietas y la concienciación masiva sobre esta problemática.

1.1.3.1. Tipos de Fármacos Antitumorales

Los fármacos antitumorales son aquellos que se utilizan para el tratamiento, tanto curativo como paliativo, de los procesos tumorales. Se pueden utilizar solos o en regimenes poli-quimioterápicos, o como coadyuvantes de la cirugía o radioterapia. Se clasifican principalmente en: (Rubin, 2003).

- Agentes alquilantes
 - a) Mostazas Nitrogenadas: ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, melfalan, bisulfan, treosulfan.
 - b) Nitrosoureas: carmustina, lomustina, estramustina, estreptozotocina.
 - c) Otros: clormetina, tiotepa.

- Antibióticos antitumorales: Antraciclinas: daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitoxantrone, bleomicina, mitomicina, actinomicina D, hidroxiurea, procarbazona, dacarbazina

I. Introducción

- Antimetabolitos
 - a) Antagonistas del ácido fólico: Metrotexato
 - b) Análogos de las purinas: mercaptopurina, tioguanina, fludarabina, cladribine, pentostatin
 - c) Análogo de las pirimidinas: 5-fluoruracilo, gemcitabina, capecitabina, citosina arabinosido
- Inhibidores de los microtúbulos
 - a) Alcaloides de la Vinca: vinblastina, vincristina, vindesina, Vinorelbina
 - b) Derivados del Podofilo: etoposido, teniposido
- Inhibidores de la topoisomerasa
 - a) Derivados del taxano: docetaxel, paclitaxel
 - b) Otros: irinotecán y topotecán
- Enzimas
 - a) Asparaginasa (Crisantaspasa)
- Hormonas y antagonistas hormonales
 - b) Esteroides: glucocorticoides
 - c) Estrógenos: fosfestrol, dietilestilbestrol, etinilestradiol
 - d) Progestagenos: medroxiprogesterona, megestrol
 - e) Andrógenos noretisterona
 - f) Análogos de los factores liberadores de gonadotropinas: goserelina, buserelina
 - g) Antiestrogenos: tamoxifeno, formestano
 - h) Antiandrogenos: flutamida, bicalutamida, Ciproterona
 - i) Antiprogestagenos: letrozol, anastrozol

- j) Antiadrenocorticoides: aminoglutetimida, trilostano, formestano, mitotano.
- Sales de Platino: carboplatino, cisplatino, oxaliplatino
- Anticuerpos monoclonales: nimotuzumab, rituximab, trastuzumab
- Modificadores de las respuestas biológicas
 - a) Inmunomoduladores: interleucina, aldesleucina, tretinoína, BCG
 - b) Interferones alfa, beta y gamma.
- Otros: amsacrina, beraxoteno, bortezomib, cetuximab, temozolomida, porfimer , temoporfin y altretamina

A continuación describimos los principales grupos de fármacos antitumorales:

a) Antimetabolitos

Son análogos estructurales de metabolitos celulares (falsos sustratos), disminuyen la biodisponibilidad normal de los precursores de los nucleótidos de purina o pirimidina, interfiriendo en la síntesis de ARN y ADN. Son específicos de la fase S del ciclo celular.

Algunos de los fármacos más característicos dentro de este grupo son:

El metotrexato, análogo del ácido fólico, inhibe la dihidrofolato reductasa. Entre sus efectos adversos específicos están la nefrotoxicidad a dosis altas, toxicidad pulmonar en niños, fibrosis hepática y neurotoxicidad tras la administración intratecal. Su espectro antitumoral es amplio, se emplea en el tratamiento de linfomas (leucemia linfocítica aguda) y en carcinomas de diversos tipos (mama, cabeza y cuello , pulmón de células pequeñas).

El 5- Fluorouracilo, análogo de las pirimidinas, se convierte en un nucleótido fraudulento (5-FdUMP), que interactúa con la timidilato sintetasa, originando depleción de d-TMP, necesario para la síntesis de ADN y el crecimiento celular. Además puede interferir con el procesamiento del ARN. Entre sus efectos adversos están la neurotoxicidad y alteraciones de la consciencia a dosis altas. Su efectividad se

I. Introducción

incrementa si se administra previamente metotrexato. Está indicado principalmente en adenocarcinomas del tubo digestivo (colon y páncreas) y adenocarcinoma de mama.

El Arabinósido de citosina (citarabina o Ara-C), análogo natural de la 2'-desoxicitidina que se transforma intracelularmente en ara-CTP, el cual inhibe competitivamente la ADN-polimerasa e inhibe la elongación de DNA. Se degrada a nivel gastrointestinal, por lo que se administra vía intravenosa o intratecal. Es un potente mielosupresor. Indicado principalmente en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda y crónica, enfermedad de Hodgkin, entre otros.

El 6- Mercaptopurina, análogo de la hipoxantina, actúa como nucleótido fraudulento T-IMP, específica de la fase S del ciclo de división celular. Inhibe la síntesis "de novo" de purinas, inhibe la síntesis de AMP y XMP, y puede incorporarse al ARN y ADN. Indicado para las leucemias agudas.

b) Antibióticos

Son antibióticos citotóxicos que actúan sobre el ADN o el ARN inhibiendo su duplicación o transcripción. En este grupo se encuentra la actinomicina D, capaz de unirse a la doble hélice del ADN impidiendo la transcripción, además, produce roturas de DNA, por su acción sobre la topoisomerasa II. Es muy potente y produce una importante mielosupresión, se utilizada como un componente de varios regímenes quimioterapéuticos en conjunto con la cirugía, con la radioterapia o con ambas en el tratamiento de las formas localizadas o metastásicas de tumor de Wilms (nefroblastoma), rhabdomiosarcoma, sarcoma de Ewing en niños, sarcoma osteogénico y sarcoma de Kaposi, carcinoma de testículo y útero.

Dentro de este grupo también están las antraciclinas, antibióticos que producen rotura del DNA por generación de radicales libres o por su acción sobre la topoisomerasa II. Su utilidad clínica queda limitada por la cardiotoxicidad (irreversible) que producen. Sus principales representantes son la doxorubicina y daunorrubicina y son amplio espectro antitumoral están indicados en leucemia linfoblástica, leucemia mieloblástica aguda, tumor de Wilms, neuroblastoma, sarcoma de partes blandas, y sarcoma óseo, carcinoma de ovárico, carcinoma transicional de vejiga, carcinoma de la glándula tiroides, carcinoma gástrico, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno y carcinoma broncogénico de células pequeñas.

También, destacar en este grupo las bleomicinas, éstas se unen a las hebras de ADN, generando radicales libres que producen su rotura de manera específica. La susceptibilidad a la bleomicina es máxima en fase G2 o mitosis, pero también actúa en la fase G1. Origina una importante toxicidad cutánea y toxicidad pulmonar. Eficaz frente a tumores de células germinativas de testículos y ovarios.

c) Agentes alquilantes

Su acción citotóxica se debe a la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y grupos nucleofílicos del ADN, impidiendo su replicación. También pueden reaccionar con los grupos fosfato y alquilar bases del ARN. La toxicidad común más frecuente es la mielodepresión y alteraciones gastrointestinales. Son teratógenas y carcinógenas. Producen toxicidad pulmonar en forma de fibrosis (especialmente las nitrosoureas) y gastrointestinal.

Entre los agentes alquilantes están las mostazas nitrogenadas y dentro de este grupo destacan: mecloretamina, ciclofosfamida e ifosfamida, estramustina, melfalán. Sirven para tratar la enfermedad de Hodgkin, linfomas, leucemias crónicas y algunos carcinomas de pulmón, mama, próstata y ovario. La ciclofosfamida es el más utilizado. Es un profármaco que se metaboliza por el citocromo P450 a fosforamida (molécula citotóxica) y acroleína (molécula tóxica que origina cistitis hemorrágica). Tiene importantes efectos sobre los linfocitos, y puede administrarse vía oral.

Nitrosoureas son similares a los agentes alquilantes, y trabajan inhibiendo los cambios necesarios para la reparación de DNA. Un rasgo muy importante es que son liposolubles y pueden atravesar la barrera hematoencefálica, hecho que les hace muy útiles en el tratamiento de los tumores cerebrales. También producen un importante efecto acumulativo depresor de la médula ósea, pueden servir para tratar linfomas y melanomas. Las nitrosoureas son administradas por vía oral o intravenosa. Ejemplos de fármacos en esta clase son: carmustina y lomustina.

d) Inhibidores de los microtúbulos

En este apartado diferenciamos dos grupos:

I. Introducción

Los alcaloides de la vinca: vincristina y vinblastina son dos alcaloides de la vinca rosea, vindesina y vinorelbina son análogos semisintéticos. Los alcaloides penetran en la célula a través de un sistema transportador, dentro de ella interaccionan con la tubulina, proteína que forma los microtúbulos del huso acromático en la mitosis, mediante asociación específica con los dímeros proteicos impidiendo su polimerización para formar los microtúbulos. Detienen la mitosis en metafase, por lo que se detiene la división celular. Son relativamente poco tóxicos sobre la médula ósea, y vincristina es neurotóxico. Entre sus indicaciones principales están los cánceres de pulmón, mama, colon y testículo, tumores de Wilms, rhabdomyosarcoma, leucemia linfocítica aguda, enfermedad de Hodgkin, entre otros.

Los taxanos, su mecanismo de acción difiere del de los alcaloides de la vinca aunque ambos tipos de fármacos se fijan a la tubulina. Éstos se unen de manera reversible a la subunidad de la tubulina, favoreciendo la polimerización en microtúbulos estables pero poco funcionales, deteniéndose la división celular. Los principales taxanos son el paclitaxel y el docetaxel, ambos producen efectos tóxicos sobre la médula ósea, lo que puede originar leucopenia o neutropenia. Son activos sobre tumores sólidos de mama, ovario, pulmón, cabeza y cuello, cáncer de próstata hormonoarrefractario y gástrico metastático.

e) Inhibidores de las topoisomerasas

Las topoisomerasas del ADN son enzimas nucleares que controlan, mantienen y modifican las estructuras y la topología del ADN durante los procesos de replicación y traslación del material genético. Los fármacos anticancerosos que ejercen su acción a este nivel estimulan y estabilizan los complejos ADN-enzima provocando la escisión mantenida de la cadena de ADN y la pérdida de su función.

Son inhibidores de la topoisomerasa I el irinotecán y el topotecán. La reacción adversa más limitante es la leucopenia. Son inhibidores de la topoisomerasa II el etopósido y el tenipósido, glucósidos semisintéticos de la podofilotoxina, extraída del *Podophyllum peltatum*, actúan impidiendo de forma irreversible la ruptura de la doble cadena de DNA, deteniéndose el ciclo celular en el final de la fase S-G2. Estos fármacos se incluyen como un componente importante de regímenes curativos de cáncer de células germinales, también se utilizan para el tratamiento del cáncer de pulmón microcítico y no microcítico, y en el cáncer gástrico, linfomas y sarcomas pediátricos.

f) Hormonas esteroideas y sus antagonistas

El tratamiento hormonal del cáncer se basa en el hecho de que las células tumorales conservan, al menos en parte, la memoria biológica de las células de los tejidos normales de los que provienen. A grandes rasgos, este tratamiento puede consistir en supresión hormonal adición hormonal o utilización de las hormonas como potenciadores de otras terapéuticas; las dos primeras modalidades son las que se utilizan más frecuentemente.

Los tumores que son sensibles a un tratamiento con hormonas esteroideas pueden ser tumores que responden al tratamiento con hormonas: tras el tratamiento con una hormona específica, el tumor puede regresar; o dependiente de hormonas, de tal manera que la eliminación del estímulo hormonal puede originar la regresión del tumor.

Destacamos:

Los estrógenos, los más utilizados son etinilestradiol y dietilestilbestrol. Se utilizan para el tratamiento del cáncer de próstata por su capacidad para inhibir el crecimiento del tejido prostático y en el cáncer de mama, por su capacidad de inhibir la síntesis de prolactina.

Los andrógenos son utilizados preferentemente en el carcinoma de mama, aunque también se los ha utilizado en el tratamiento del cáncer renal y en las pancitopenias producidas por fármacos citostáticos. Los más utilizados son el propionato de testosterona y el fenilpropionato de nandrolona.

Los progestágenos La utilización de progestágenos, solos o asociados a otras hormonas, ha tenido gran importancia en la terapéutica del cáncer. Por un lado actuarían a nivel celular, y por otro como controladores de otras hormonas. A nivel celular se ha comprobado que son capaces de inhibir la síntesis de DNA y RNA y por tanto la mitosis.

La aminoglutetimida, inhibe la síntesis de cortisol por bloquear la conversión de colesterol en pregnenolona; también inhibe la aromatasa responsable de la síntesis de estrógeno a partir de androstenodiona, se usa para tratar el cáncer metastásico de mama; también puede usarse como preventivo.

I. Introducción

Leuprolida y goserelina son análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas, por lo que inhiben la LH (hormona luteinizante) y la FSH (hormona folículo estimulante), y subsecuentemente la síntesis de andrógenos y estrógenos. Se usan para el tratamiento del cáncer prostático y de mama. Flutamida es un antiandrógeno que se usa para el tratamiento del cáncer de próstata.

Los antiestrógenos suprimen los efectos promotores del crecimiento de los estrógenos. Se utiliza para el tratamiento del cáncer de mama estrógeno-dependiente. También puede usarse de forma preventiva. El más representativo es el tamoxifeno.

Y los corticoides, principalmente la prednisona, prednisolona y 6-metilprednisolona. Actúan inhibiendo la proliferación leucocitaria, por lo que se usan para tratar leucemias y linfomas.

g) Sales de platino

El cisplatino es el más representativo de este grupo, es un compuesto inorgánico cis-diaminodicloroplatino en el que el platino se encuentra en estado de oxidación +2. Actúa preferentemente sobre las bases del ADN, en particular con el nitrógeno en posición 7 de la guanina debido a su gran nucleofilia. Además, se comporta como un agente bifuncional produciendo enlaces cruzados entre las dos hebras del ADN. Produce de manera importante vómitos y nefrotoxicidad, sus derivados son el carboplatino y el oxaliplatino que mejoran su toxicidad. Indicados en régimen de monoterapia o como parte de una quimioterapia existente para tumores avanzados o metastásicos: carcinoma testicular, carcinoma de ovario, epiteloma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer do de vejiga, carcinoma de pulmón.

h) Enzimas

La L-Asparraginasasa enzima que hidroliza la asparragina, por lo que se priva a las células tumorales de este nutriente, que ellas no pueden sintetizar y que necesario para la síntesis de proteínas. En esto reside su efecto citotóxico.

1.1.3.2. Metotrexato

El metotrexato o ametopterina tiene su origen en la década de 1940 cuando el Dr. Sidney Farber del Hospital Infantil de Boston (E.E.U.U) estudiaba el efecto del ácido fólico en la leucemia aguda infantil. Este médico pidió al Dr. Subbarao, cuyo equipo había conseguido sintetizar por primera vez en 1946 ácido fólico, que creara un *anti-folato*. El medicamento (metotrexato) fue administrado a un grupo de niños enfermos de leucemia, comprobándose su efecto beneficioso, por lo que se considera que el metotrexato marcó el comienzo de la quimioterapia en oncología.

El metotrexato es un antimetabolito de la familia de los folatos. Esta molécula es un análogo de la aminopterina, producto que también deriva del ácido fólico. Fue utilizado inicialmente, en 1948 en el tratamiento de la leucemia linfocítica infantil, y desde entonces, ha sido empleado contra numerosas enfermedades malignas, incluyendo osteosarcomas, linfoma no de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, linfoma cutáneo de células T (micosis fungoides) y cánceres de cabeza y de cuello. El metotrexato es uno de los pocos fármacos que puede ser administrado intratecalmente y actuando en los casos de metástasis que afectan el sistema nervioso central. El metotrexato también posee efectos inmunosupresores y es utilizado en el tratamiento de la artritis reumatoide, en la prevención de rechazo tras transplantes y en otras enfermedades autoinmunes como la psoriasis (Floréz, 2004).

a) Indicaciones

Se ha mostrado muy eficaz, «curativo», en el tratamiento de la enfermedad trofoblástica. Forma parte de la mayoría de los esquemas de tratamiento de casi todos los tumores sólidos (ORL (otorrinos), mama, ovario, testículo, pulmón, etc.). La utilización de dosis altas parece haber modificado el pronóstico del sarcoma osteogénico. Es sumamente eficaz en el tratamiento de la leucemia aguda infantil y también se ha mostrado útil en el tratamiento de la micosis fungoide y en los linfomas no-Hodgkin (Rubin, 2003).

b) Estructura química.

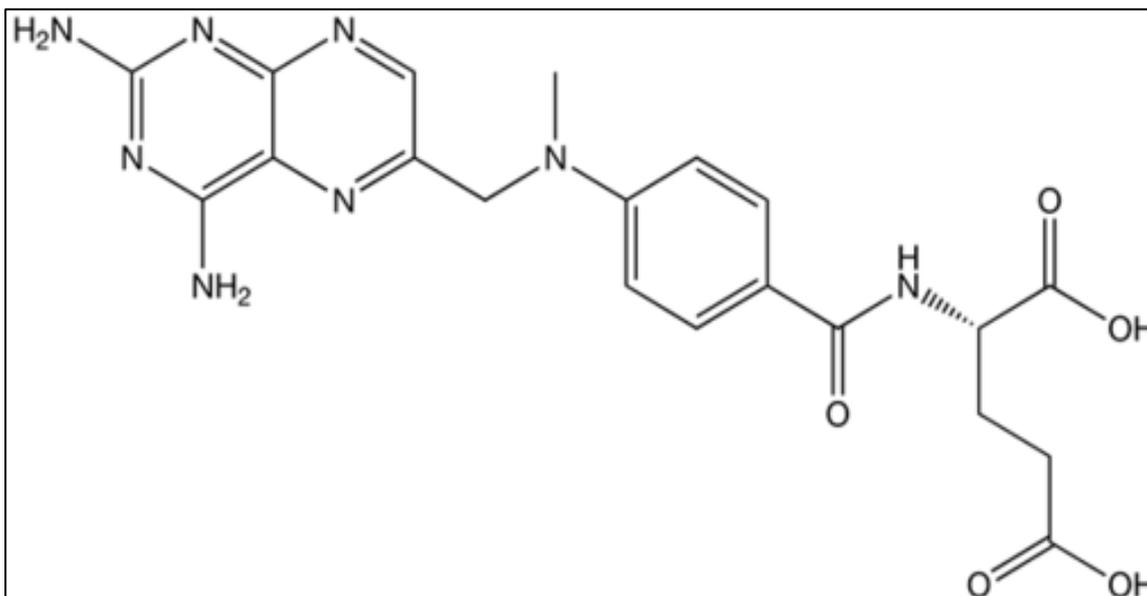


Figura 1.1. Estructura química del metotrexato (C₂₀H₂₂N₈O₅).

Fórmula química IUPAC: (2S) -2 - [[4 - [(2,4-diaminopteridin-6-il)]] metilamino metil-benzoil amino] ácido pentenodioico.

c) Mecanismo de acción (Morales, 2006)

El metotrexato inhibe competitivamente la dihidrofolato-reductasa, enzima responsable de convertir el ácido fólico a tetrahidrofolato, el cofactor necesario para la transferencia de un carbono en muchas reacciones metabólicas. Algunas de estas reacciones afectan la proliferación celular, incluyendo la síntesis de ácido timidílico y de los precursores nucleótidos del ADN y ARN. La inhibición de la timidilato-sintasa es, quizás, el efecto más importante del metotrexato resultando en una inhibición de la síntesis del ADN. Los efectos inhibidores del metotrexato dependen de sus concentraciones intracelulares, y los tejidos con mayor metabolismo celular y crecimiento más rápido son los más afectados. Entre estos, se encuentran los tejidos neoplásicos, los folículos capilares, las células epiteliales del tracto digestivo y las células de la médula ósea. El metotrexato inhibe la proliferación celular en la fase S del ciclo celular. En dosis altas (> 30 mg/m²) el metotrexato inhibe las células en la fase S y ralentiza el paso desde G1 a S.

El metotrexato también puede inhibir la síntesis de proteínas debido a la disminución en la concentración de folato. Parece ser que éste es el mecanismo por el cual las dosis altas de metotrexato detienen las células en la fase G1. Un factor crítico sobre los efectos citotóxicos del metotrexato es la duración de la exposición al mismo. Una exposición prolongada, incluso a dosis bajas, puede producir citotoxicidad y toxicidad significativas. El metotrexato penetra en las células utilizando dos sistemas de transporte. El primero utiliza un transportador de folato reducido que muestra una alta afinidad hacia el metotrexato y a los folatos reducidos. El segundo sistema de transporte consiste en un proceso de difusión pasiva. Este último mecanismo no reviste gran importancia a menos que el metotrexato se administre en dosis muy altas (concentraciones séricas > 100 mM).

Una vez en el interior de la célula, el metotrexato experimenta la polimerización de la cadena lateral de ácido glutámico para formar el poliglutamato de metotrexato (PG-MTX). Tanto el metotrexato como su derivado poliglutámico inhiben la dihidrofolato-reductasa. Sin embargo, el mayor tamaño del PG-MTX le hace resistir mejor el transporte hacia el exterior, mecanismo por el que las células eliminan los productos tóxicos. La formación del complejo PG-MTX se lleva a cabo con mayor facilidad en células tumorales que en células sanas, lo que explica la relativa selectividad del fármaco hacia las células tumorales. Esta formación depende tanto de la concentración intracelular del fármaco, como de la duración de la exposición. A pesar de su toxicidad, la administración de dosis elevadas de metotrexato pretende originar grandes concentraciones extracelulares como medio para evitar la aparición de resistencias en las células tumorales relacionadas con los cambios en los sistemas de transporte de membrana. La resistencia de las células tumorales al metotrexato se desarrolla principalmente mediante uno o más de los siguientes mecanismos:

- Disminución de la entrada del fármaco en la célula
- Reducción de la unión del metotrexato a la dihidrofolato-reductada o
- Aumento de la concentración o actividad de la dihidrofolato-reductasa
- Disminución de la formación del PG-MTX, lo que supone desarrollo de resistencias incluso a grandes dosis del fármaco

Los dos primeros mecanismos son los usualmente involucrados en el desarrollo de resistencia al metotrexato. La disminución de la formación del PG-MTX sólo tiene lugar cuando las exposiciones de la célula al antitumoral son cortas (< 24 horas). Los blastos de la leucemia mielocítica son intrínsecamente resistentes al

I. Introducción

metotrexato. Se cree que esta resistencia se debe a que estas células retienen menos tiempo el metotrexato al ser más reducida la poliglutamación.

El metotrexato posee igualmente propiedades inmunosupresoras y también puede mostrar propiedades anti-inflamatorias. En dosis bajas, el metotrexato inhibe la proliferación y funcionalidad de los linfocitos T y B, siendo capaz de suprimir la liberación de interleucina-1, interferón gamma, el factor de necrosis tumoral y otras citocinas que intervienen en la función de los neutrófilos. Así, en la psoriasis, la producción de células epiteliales que está aumentada en relación con la piel normal es reducida por el metotrexato.

d) Reacciones adversas

En general, la incidencia y la gravedad de las reacciones adversas producidas por el metotrexato son dependientes de las dosis y de la frecuencia de la administración.

Las reacciones adversas que se observan con mayor frecuencia son la estomatitis ulcerativa, náuseas, vómitos y molestias abdominales. Las náuseas y vómitos empeoran con dosis altas y requieren una premedicación con antagonistas de la serotonina y corticosteroides. Aproximadamente el 10% de los pacientes con psoriasis o artritis reumatoide tratados con metotrexato experimentan este tipo de reacciones adversas. La estomatitis es también muy frecuente cuando se emplean dosis elevadas de metotrexato, apareciendo los primeros síntomas aparecen a los 3 - 5 días del comienzo del tratamiento. La estomatitis se presenta en un 20 % de los pacientes con cáncer tratados con metotrexato, pudiendo ser minimizada si se administran dosis adecuadas de leucovorina. Otros efectos secundarios gastrointestinales incluyen gingivitis, glositis, faringitis, anorexia, diarrea, hematemesis, sangrado gastrointestinal, perforación gastrointestinal, enteritis, y pancreatitis. En el caso de vómitos y diarrea intensos puede producirse una deshidratación. Las reacciones adversas digestivas pueden ser el factor limitante de las dosis a utilizar en un tratamiento oncológico.

Después de un tratamiento con metotrexato y dependiendo de la dosis y pauta de tratamiento se produce rápidamente una supresión de la médula ósea. El metotrexato puede suprimir la hematopoyesis produciendo anemia, leucopenia,

neutropenia, pancitopenia o trombocitopenia. La función hematológica debe ser monitorizada durante un tratamiento con metotrexato, debiendo garantizar que esta se recupere antes de iniciar un nuevo tratamiento. La administración previa de leucovorina minimiza la supresión medular. Además, la mielotoxicidad puede ser mayor en pacientes con alteraciones de la función renal. Raras veces se han señalado casos de hipogammaglobulinemia después de un tratamiento con metotrexato.

El metotrexato puede causar una elevación de las enzimas hepáticas y hepatotoxicidad manifestada por fibrosis portal y cirrosis. Estos incrementos suelen ser pasajeros y asintomáticos y no son predictores de una enfermedad hepática subsiguiente. Sin embargo, el uso prolongado de metotrexato puede conducir a una hepatotoxicidad crónica, potencialmente fatal. Como las pruebas de la función hepática pueden ser normales durante un tratamiento prolongado con metotrexato independientemente de que se esté desarrollando una fibrosis o cirrosis, se recomiendan llevar a cabo periódicamente biopsias hepáticas.

En los pacientes con enfermedades neoplásicas tratados con $> 1 \text{ g/m}^2$ de metotrexato puede desarrollarse una hepatitis química, si bien esta reacción adversa no es frecuente. Igualmente, en estos pacientes pueden desarrollar enfermedades oportunistas graves. La neumonía por *Pneumocystis carinii* es la infección más frecuente. También se han comunicado otras infecciones bacterianas, fúngicas y víricas, cuya gravedad aumenta a medida que es mayor la mielosupresión del paciente.

Se ha observado ocasionalmente un síndrome neurológico similar al síndrome neurológico maligno en algunos pacientes tratados con dosis elevadas de metotrexato. Las manifestaciones de una encefalopatía pueden ser confusión, hemiparesia, convulsiones y coma. Se han comunicado serios efectos neurotóxicos manifestados por convulsiones focales o generalizadas en niños con leucemia linfoblástica aguda tratados con 1 g/m^2 de metotrexato. La retirada del fármaco no siempre resulta en una recuperación total.

Con dosis bajas de metotrexato se han descrito ocasionalmente episodios de disfunción cognitiva, alteraciones del estado de ánimo, leucoencefalopatías y encefalopatías. La leucoencefalopatía crónica se produce sobre todo en pacientes que recibieron 2 o 3 tratamientos con metotrexato sistémico, metotrexato intratecal y craneal. Para el tratamiento de la leucoencefalopatía inducida por el metotrexato se utilizan altas dosis de leucovorina o teofilina. Puede ocurrir una leucoencefalopatía

I. Introducción

desmielinizante necrotizante meses o años después de una terapia con metotrexato. Esta enfermedad se caracteriza por un deterioro neurológico progresivo que puede llegar a ser fatal.

La administración intratecal de metotrexato puede producir síntomas de neurotoxicidad que se manifiestan como cefaleas, dolor de espalda, rigidez de la nuca y fiebre. La reacción adversa más usual es una aracnoiditis química y se encuentra probablemente relacionada con las concentraciones tan altas que alcanza el metotrexato en el líquido cefalorraquídeo.

Se han descrito neumonitis intersticiales que pueden llegar a ser fatales y enfermedad pulmonar intersticial obstructiva durante el tratamiento con metotrexato. La aparición de síntomas pulmonares como tos seca no productiva o neumonitis inespecífica, puede ser indicativa del desarrollo de una fibrosis que requiere la interrupción del tratamiento. El paciente con enfermedades pulmonares inducidas por el metotrexato usualmente se presenta con fiebre, tos, disnea, hipoxemia e infiltrados pulmonares visibles en las radiografías. Estas lesiones pueden producirse en cualquier momento y con dosis tan bajas como 7.5 mg/semana.

La toxicidad renal asociada al metotrexato incluye azoemia, cistitis, hematuria e insuficiencia renal. Estos efectos suelen ir asociados a dosis más altas de metotrexato. La nefrotoxicidad es debida primariamente a la precipitación del metotrexato o del 7-hidroxi metotrexato en los túbulos renales produciendo cristaluria y obstrucción tubular. Por este motivo, durante los tratamientos con dosis medias y altas de metotrexato, se recomienda alcalinizar la orina con bicarbonato oral o parenteral así como mantener una buena hidratación del paciente que permita mantener una excreción de orina superior a 100 mL/hora. La nefrotoxicidad inducida por el metotrexato puede, a su vez, prolongar los niveles séricos del fármaco con las correspondientes reacciones adversas, en particular estomatitis y mielosupresión. Es esencial monitorizar la función renal, incluyendo los niveles de creatinina sérica, el estado de hidratación, la alcalinización de la orina y los niveles séricos de metotrexato

Se han descrito ocasionalmente reacciones adversas dermatológicas graves, incluyendo necrosis epidérmica tóxica, síndrome de Stevens-Johnson, dermatitis exfoliativa, necrosis de piel y eritema multiforme en pacientes tratados con metotrexato por vía intravenosa, intramuscular, intratecal y oral, tanto en adultos como en niños. Otras reacciones adversas hematológicas son *rash* eritematoso, prurito, urticaria, alopecia, fotosensibilidad, equimosis, telangiectasia, acné y forunculosis. Los

pacientes tratados con metotrexato deben evitar la exposición al sol y deben protegerse con filtros solares de elevado factor de protección durante al menos 15 días después de una administración

El metotrexato puede ocasionar una pequeña supresión gonadal representada por una oogénesis defectuosa, inhibición de la espermatogénesis, oligospermia transitoria, disfunción menstrual, amenorrea, flujo vaginal, ginecomastia e infertilidad. Las alteraciones de la espermatogénesis suelen ser leves y transitorias, desapareciendo en unas pocas semanas después de discontinuar el fármaco. La amenorrea no es muy frecuente entre las mujeres, incluso después de dosis altas. La amenorrea está relacionada con la edad de las mujeres y las que tienen más de 40 años, suelen experimentar la menopausia en el año siguiente al tratamiento con metotrexato. Son muy raras las ocasiones en las que se ha comunicado impotencia o pérdida de la libido.

Aproximadamente el 25 % de los pacientes tratados con metotrexato se desarrolla una irritación ocular con conjuntivitis y deterioro de la visión. Esta reacción adversa comienza a la semana de iniciarse el tratamiento y desaparece una semana después de interrumpir el tratamiento. En los pacientes tratados con dosis bajas de metotrexato puede desarrollarse un linfoma que puede desaparecer al suspender la mediación sin necesidad de ser tratado.

Otras reacciones adversas mucho más raras que se han atribuido al metotrexato son vasculitis, artralgia, mialgia, osteoporosis, diabetes y reacciones anafilácticas.

e) Precauciones de uso, contraindicaciones e interacciones (Lepori, 2003)

Hay que tener especial cuidado con el uso de metotrexato en casos de pacientes con úlcera péptica o colitis ulcerosa, infección activa, insuficiencia renal, enfermedad hepática previa o actual, especialmente si es debida al alcohol. Se debe controlar mediante monitorización hematológica, hepática, renal y niveles séricos de metotrexato, con radiografía de tórax y biopsia hepática. El metotrexato puede producir la supresión de la hematopoyesis, inducir a síndrome de lisis tumoral, provocar hepatitis aguda y hepatotoxicidad crónica (fibrosis hepática y cirrosis), puede aparecer

I. Introducción

neumonitis intersticial aguda o crónica de causa no infecciosa. A dosis elevadas puede aparecer síndrome neurológico agudo transitorio. En lesiones de psoriasis pueden agravarse por exposición de rayos UV. Evitar embarazo entre 3 meses y 1 año después de finalizar tratamiento. Además la administración intravenosa e intratecal de metotrexato puede desencadenar en encefalitis aguda y encefalopatía aguda con desenlace fatal.

El uso de metotrexato está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad, en estado de embarazo y lactancia, con síndromes de inmunodeficiencia clínica, discrasias sanguíneas (depresión de médula ósea, leucopenia, trombocitopenia o anemia significativa), en pacientes con psoriasis o artritis reumatoide que tengan hepatopatía alcohólica, crónica o alcohólicos, con insuficiencia hepática (bilirrubina > 5 mg/dl), insuficiencia renal grave, con hepatopatía alcohólica, hepatopatía crónica o pacientes alcohólicos. En pacientes que deben un régimen de vacunación concurrente con vacunas de microorganismos vivos o atenuadas, con infecciones graves, agudas o crónicas (tuberculosis y VIH, úlceras de la cavidad oral y enfermedad ulcerosa gastrointestinal activa conocida).

Las principales interacciones medicamentosas que presenta el metotrexato pueden ser diversas. Debido a su capacidad de unión a las proteínas plasmáticas, puede ser desplazado de las mismas por algunos fármacos, tales como los salicilatos, antibacterianos, hipoglicemiantes, diuréticos y sulfonamidas, hidantoína, tetraciclinas, cloranfenicol, ácido p-aminobenzoico y antiinflamatorios no esteroideos. Este desplazamiento originaría un aumento de metotrexato libre en el plasma y consiguientemente un mayor riesgo de toxicidad. Usado simultáneamente con probenecid, debe estar bajo estricto control médico, debido a que este último disminuye el transporte tubular renal. La administración simultánea de metotrexato intratecal con aciclovir puede producir anomalías neurológicas. Aumenta el riesgo de hepatotoxicidad con el alcohol o medicamentos hepatotóxicos. El metotrexato aumenta la concentración de ácido úrico en sangre, por lo que resulta necesario readecuar la dosificación de alopurinol, colchicina o probenecid. Aumenta la actividad anticoagulante y el riesgo de hemorragias por disminuir la síntesis hepática de los factores de coagulación, por lo que se regulará la dosis de anticoagulantes derivados de la cumarina. El uso de AINE (antiinflamatorios no esteroideos) aumenta el riesgo de agranulocitosis (fenilbutazona). La asparaginasa puede bloquear los efectos del metotrexato al inhibir la replicación celular. La administración de citarabina después de iniciada la terapéutica con metotrexato pueden producir un efecto citotóxico sinérgico.

El ácido fólico puede interferir con los efectos antifolato del metotrexato. La kanamicina administrada por vía oral aumenta la absorción del metotrexato oral. El probenecid y salicilatos pueden inhibir la excreción renal del metotrexato. La pirimetamina, triamtereno o trimetoprina pueden aumentar los efectos tóxicos del metotrexato debido a sus acciones similares como antagonistas del ácido fólico.

f) Propiedades fisicoquímicas (Chamberlin y col., 1976)

El metotrexato es el (2S) -2 - [[4 - [(2,4-diaminopteridin-6-il)]] metilamino metilbenzoil amino] ácido pentenodioico y su estructura química $C_{20}H_{22}N_8O_5$. También es denominado como ácido 4-amino-10-metilfólico o ametofterina y su peso molecular es 454.46.

Es un polvo de color amarillo-naranja brillante e inoloro. Generalmente, presenta un grado de hidratación en torna 8 – 10%dando la sensación de ser untuoso, y suele presentarse en forma de clorohidrato (1: 0.3) o hidrato (1: 2.5) de metotrexato. En cuanto a su solubilidad, el metotrexato es prácticamente insoluble en agua, alcohol, cloroformo y éter. Siendo soluble en soluciones diluidas alcalinas, ácidas y carbonatadas.

En estado sólido es estable conservado en un bote opaco tapado y a temperatura ambiente. En solución acuosa de bicarbonato sódico y a pH 7, concentraciones de metotrexato comprendidas entre 0.5 mg y 0.05mg/ml, se mantienen estables a temperatura ambiente conservadas tanto en oscuridad como bajo luz artificial. En souciones ácidas, el grupo amida del metotrexato puede ser hidrolizado, obteniendose ácido N-metil-4-amino-4- desoxi pteróico y ácido glutámico. En soluciones alcalinas, y especialmente a elevadas temperaturas, los principales productos de descomposición que se obtienen son el ácido (N-metil) fólico, ácido (N-metil) pteroico y ácido fólico (todos como iones carboxilados). En cuanto a su fotosensibilidad y termosensibilidad, el metotrexato es estable ante la luz y la temperatura.

1.2. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

La actividad biológica de una sustancia terapéuticamente activa (un fármaco) depende, ante todo, de la naturaleza de su interacción con el tejido u órgano diana. Para que la interacción se produzca, es necesario, en primer lugar, que el fármaco esté en el sitio deseado en cantidad suficiente como para conseguir la respuesta buscada. Esto implica que el agente terapéutico debería liberarse en un lugar concreto del organismo y a una velocidad controlable. Cuando un fármaco es administrado a un paciente, debe atravesar una serie de membranas lipídicas hasta llegar al lugar donde se necesita su acción farmacológica.

Aunque la mayoría de los principios activos son administrados mediante formas de dosificación convencionales (tabletas, cápsulas, disoluciones inyectables, etc.), hay ocasiones en que éstas son inapropiadas. A menudo, las formas de dosificación convencionales requieren una administración repetida con objeto de mantener la concentración plasmática de fármaco en la sangre a un nivel suficientemente alto como para asegurar un efecto terapéutico. La administración crónica puede resultar un inconveniente para el paciente, conduciendo a un pobre cumplimiento del régimen de dosificación prescrito. Además, una administración crónica inadecuada puede provocar considerables fluctuaciones en los niveles plasmáticos de fármaco entre dosis, causando a veces efectos tóxicos secundarios a una respuesta inadecuada al principio activo si las concentraciones plasmáticas se encuentran por encima del nivel terapéutico.

Por tanto, el mayor obstáculo para asegurar una actividad farmacológica eficaz y segura es la distribución no específica del fármaco en tejidos y órganos sanos tras su administración. Esta es la razón por la que surgió la idea de diseñar sistemas transportadores de fármacos, y más concretamente, el desarrollo de la nanomedicina. Los nanosistemas transportadores de fármacos están constituidos por partículas que presentan unas dimensiones nanoescalares. De esta forma, la nanotecnología puede ser utilizada para modificar o incluso controlar la distribución de los fármacos a nivel tisular, celular o subcelular

El enorme avance que ha experimentado la ciencia de los materiales así como un mejor conocimiento de los procesos fisiopatológicos asociados a una enfermedad,

han permitido desarrollar nanodispositivos “inteligentes” capaces de liberar la dosis deseada de fármaco en el momento y en el lugar deseado. Los nanosistemas pueden incluso ser útiles para mejorar las técnicas de imagen del diagnóstico in vivo. Por lo tanto, aunque aun estemos lejos del concepto ideal de “magic bullet” (bala mágica) propuesto en el siglo pasado por el premio Nobel en inmunología Paul Erlich, hoy la nanotecnología ya ha logrado muchos de los objetivos necesarios para alcanzar esta meta.

En general, el diseño de estos nanotransportadores “inteligentes” de fármacos les debe proporcionar la capacidad de

1. Camuflar el principio activo de ser reconocido por los sistemas inmunológicos de defensa, como el sistema fagocítico mononuclear (SFM) y evitar su retirada antes de cumplir su efecto farmacológico.
2. Combinar distintos componentes activos en el interior de su estructura para que actúen sobre dianas terapéuticas complementaria. Por ejemplo agentes antiangiogénicos y ADN intercalado.
3. Liberar el fármaco de forma controlada en respuesta a estímulos externos, como pH, temperatura o gradiente magnético.
4. Proteger al principio activo de ser captado por componentes del organismo implicados en procesos de detoxificación, por ejemplo enzimas degradativas o proteínas de eflujo.
5. Transportar específicamente el fármaco al tejido, célula o compartimento subcelular diana mediante la conjugación del sistema transportador con ligandos moleculares específicos de receptores sobreexpresados en la zona diana. Por ejemplo anticuerpos monoclonales, hormonas, péptidos, vitaminas etc.
6. Liberación intracelular de principios activos que no pueden difundir por sí mismo hacia el interior de las células diana.
7. Combinar agentes farmacológicos y agentes de contraste de técnicas de diagnóstico de imagen para así lograr de forma simultánea el diagnóstico y tratamiento personalizado de un paciente (“Nanoteragnosis”)

1.2.1. Principales estrategias para el transporte específico de fármacos en las células tumorales.

Con el objetivo de maximizar la selectividad de acción de los fármacos antitumorales por las células cancerosas, se ha propuesto su transporte en nanopartículas biodegradables diseñadas según unas revolucionarias estrategias de transporte pasivo y activo de fármaco.

1.2.1.1. Estrategias de transporte pasivo de fármacos

El transporte pasivo de nanopartículas hasta el lugar diana se basa en el paso de los nanotransportadores a través de los capilares tumorales defenestrados hacia el espacio intersticial y células del tumor por convección o difusión pasiva. Estos sistemas nanoparticulares explotan las características de crecimiento anormal de los nuevos vasos sanguíneos que irrigan la masa tumoral para su transporte pasivo. En condiciones normales, el tumor recibe un bajo aporte de oxígeno y nutrientes, y tiene una baja capacidad para eliminar los productos secundarios de sus procesos metabólicos. Sin embargo, el tumor es capaz de superar esta limitación mediante la producción de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso denominado angiogénesis (Naimov y col. 2006).

El resultado de la angiogénesis son capilares tortuosos que presentan anomalías en su estructura y una déficit de pericitos su el revestimiento endotelial (Torchilin V.P. 2000; Hobbs y col. 1998) que da lugar a unas paredes incompletas con poros o canales de un tamaño entre 100nm y 2µm dependiendo del tipo de tumor (Maeda y col. 2009). Además, la presión intersticial es mayor en la zona central del tumor que en la periferia debido a que los tumores carecen de un sistema linfático bien definido y funcionan. El aumento de la presión interna provoca una difusión hacia el exterior de líquido intersticial, disminuyendo la difusión del fármaco desde el centro del tumor (Haley y col. 2008). De forma que los fármacos y las nanopartículas que acceden al espacio intersticial tumoral permanecen retenidos más tiempo que en un tejido normal. La combinación de estos capilares con fugas y el deficiente drenaje linfático da lugar a lo que se conoce como efecto de permeabilidad y retención aumentadas (Enhanced permeability and retention effect, EPR effect). Las nanopartículas más pequeñas pueden atravesar los poros de los vasos sanguíneos,

alcanzando el espacio intersticial y quedar retenidos en el tumor (figura 1.1) (Krasnici y col. 2003). El tamaño de poro es de especial interés para los transportadores magnéticos de fármacos porque éste permite usar partículas ferromagnéticas que pueden alcanzar una muy elevada magnetización, facilitando su inmovilización por un campo magnético externo.

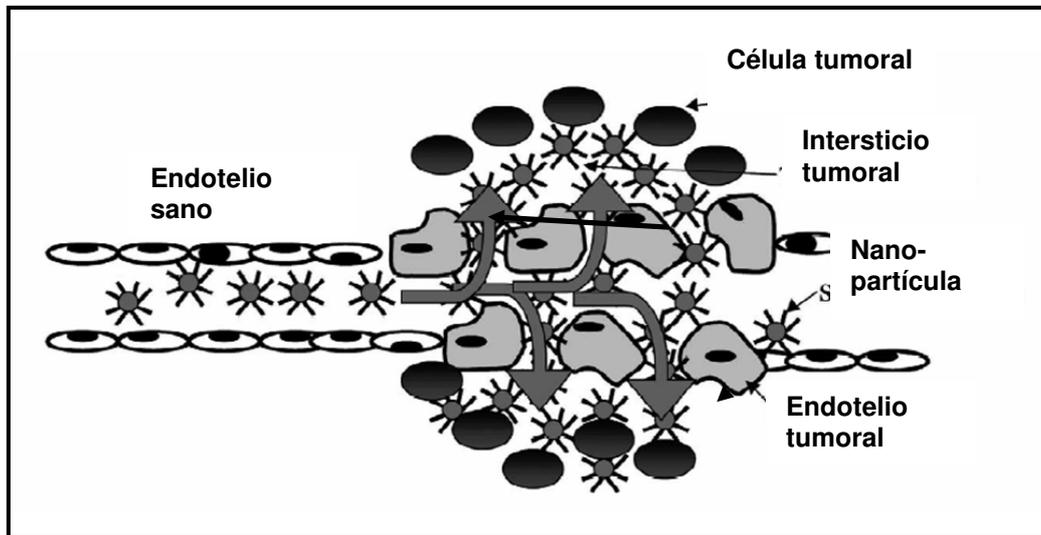


Figura 1.1. Proceso de extravasación de nanopartículas mediante difusión pasiva o convección a través del endotelio tumoral que está alterado (más permeable).

El transporte pasivo también implica el uso de otras características innatas de las nanopartículas que inducen su focalización en el tumor, como la carga eléctrica superficial. Por ejemplo, los liposomas catiónicos se unen por interacciones electrostáticas a las cabezas de los fosfolípidos cargados negativamente que se expresan preferentemente en las células endoteliales tumorales (Hatakeyama y col. 2007).

a) La Teoría del efecto de permeabilidad y retención aumentadas. Fisiopatología y anatomía de la vasculatura tumoral.

Cuando las células tumorales se multiplican, se agrupan y alcanzan un tamaño de 2 a 3 mm, la angiogénesis es inducida para satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes del tumor en crecimiento (Byrne y col. 2008). Esta neovasculatura difiere ampliamente con respecto a la de los tejidos sanos en su estructura anatómica microscópica (Betancourt y col. 2007). Por ejemplo, los vasos sanguíneos en el tumor

I. Introducción

irregulares, dilatados, con poros o defectuosos, y las células endoteliales están poco alineadas o desorganizados con grandes fenestraciones. También, las células perivasculares y la membrana basal, o la capa de músculo liso frecuentemente presentan anomalías o están ausentes. La luz de los vasos tumorales es más ancha, mientras que el drenaje linfático es deficiente (Skinner y col. 1990).

Esta anatomía defectuosa junto con las anomalías funcionales, es lo que produce la mayor permeabilidad de los componentes del plasma sanguíneo, tales como macromoléculas, nanopartículas y partículas lipídicas, hacia el tejido tumoral. Por otra parte, el lento retorno venoso y el pobre aclaramiento linfático hacen que las macromoléculas sean retenidas en el interior del tumor, mientras la extravasación en el intersticio tumoral continúa. Este fenómeno denominado efecto de permeabilidad y retención aumentadas, fue descrito hace ya casi 20 años, y es la base para el transporte selectivo de fármacos macromoleculares hacia el tumor sólido (Satchi-Fainaro y col. 2006). Pudiéndose alcanzar concentraciones locales de fármacos muy superiores, por ejemplo de 10 a 50 mayores que en un tejido normal en uno o dos días.

Más recientemente, conjugados poliméricos, micelas o liposomas cargados con fármacos anticancerosos, y anticuerpos conjugados se basan en este mecanismo y el efecto EPR se está convirtiendo en una estrategia muy importante para asegurar la acción específica del agente quimioterápico sobre las células tumorales (Lee y col. 2006). Sin embargo, el efecto EPR no se aplica a principios activos de bajo peso molecular por su rápida difusión hacia la circulación sanguínea y su rápido aclaramiento (Maeda y col. 2001).

b) Factores que determinan el efecto de permeabilidad y retención aumentadas (Iyer y col. 2006)

Factores anatómicos:

- Extensa angiogénesis y alta densidad vascular
- Falta de capa de músculo liso, pericitos, bajo flujo sanguíneo, se da dilatación pasiva que activa la angiotensina II, generando un estado de hipertensión y mayor fuga
- Defectos de la arquitectura vascular, produce más difusión

- Aclaramiento linfático escaso, produce mayor retención de macromoléculas, fármacos y partículas lipídicas en el espacio intersticial
- Lento retorno venos, produce mayor acumulación de las macromoléculas

Factores que favorecen la generación del efecto EPR:

- Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
- Bradiquininas y prostaglandinas
- Óxido nítrico
- Peróxido nítrico
- Metaloproteinasas de la matriz celular
- Otras proteinasas (cascada proteasa)
- Otras citoquinas (factor de necrosis tumoral, interleucina II)

1.2.1.1. Estrategias de transporte activo de fármacos

Hay situaciones en las que para tratar el tejido tumoral es necesario aplicar estrategias de transporte activo debido al rápido paso de la circulación sanguínea por la región diana y a la baja concentración de nanopartículas que alcanzan la región tumoral, a pesar del efecto EPR. Bajo estas condiciones, se obtienen concentraciones de principio activo por debajo del nivel terapéutico. El transporte activo se basa en la expresión exclusiva de diferentes epítomos o receptores en la superficie de las células tumorales o en el endotelio de los vasos sanguíneos que irrigan al tumor. Por otro lado, también existe la posibilidad de utilizar materiales especiales en el diseño de las nanopartículas que transportaran al fármaco hasta el lugar deseado. Estos materiales biodegradables deberán caracterizarse por ser sensibles a estímulos externo (por ejemplo, luz, pH, ultrasonidos, sistemas enzimáticos, gradientes magnéticos, etc.), ante los cuales se alteran. Este comportamiento permitirá la liberación del agente quimioterápico exclusivamente en el lugar donde se encuentre aplicado este estímulo. Es importante señalar que ambos tipos de estrategias de transporte activo pueden combinarse en el diseño de un mismo sistema transportador, para así aumentar aún más la acumulación del principio activo antitumoral en el interior de la célula cancerosa. Un aspecto fundamental de este tipo de estrategia de transporte activo es la selección de ligandos específicos que incorporados en la superficie de los nanotransportadores, sean capaces de interactuar con sus receptores específicos de las células cancerosas sobreexpresados a nivel superficial. Estos ligandos sólo interactúan con receptores que se sobreexpresan en las células cancerosas o en la

I. Introducción

vasculatura tumoral y no en los tejidos sanos, activándose la captación de la nanopartícula generalmente por endocitosis. (Kirpotin y col. 2006; Linuma y col. 2003).

Los ligandos pueden ser anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos o ligandos de otra naturaleza (moléculas de bajo peso molecular, péptidos, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos poliinsaturados). La afinidad de los ligandos por sus receptores determina la capacidad de penetración en el tumor.

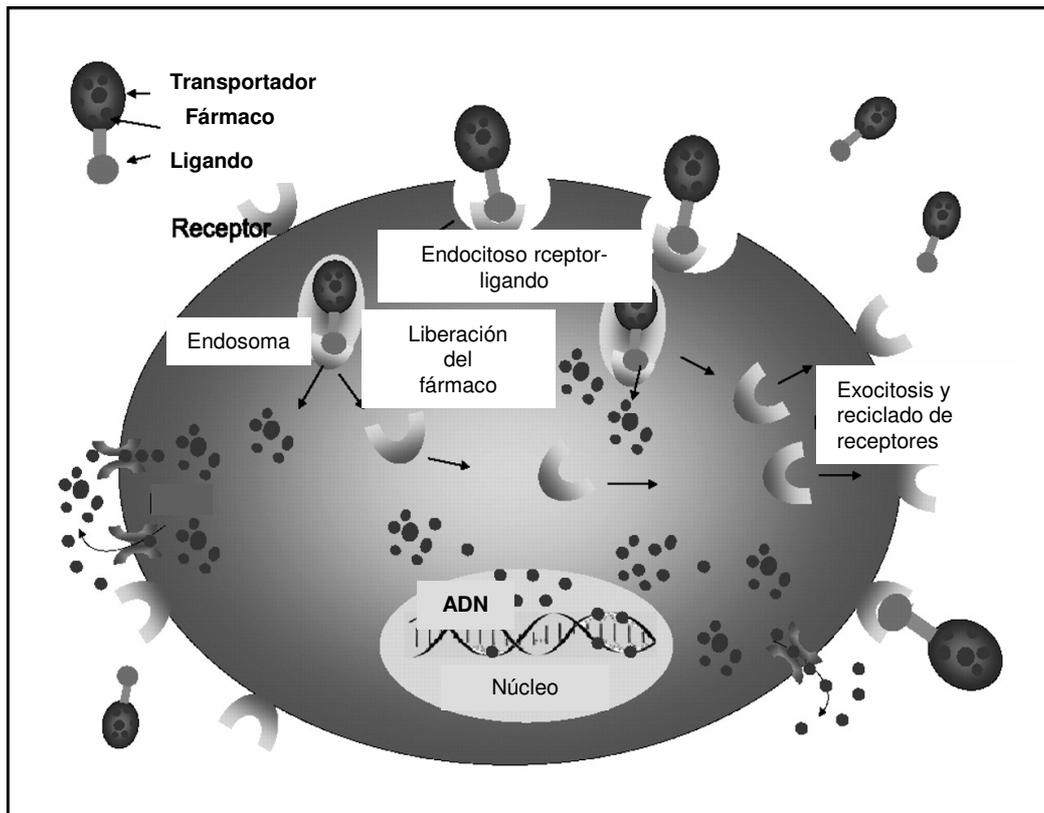


Figura 1.2. Esquema de internalización de nanopartículas conjugadas con ligandos o anticuerpos tumor-específicos a través de receptores de la superficie celulares.

a) Transporte activo mediado por ligandos:

En función del tipo de ligando, las estrategias de transporte activo de fármacos que usan ligandos para llegar al objetivo, se clasifican, principalmente en los siguientes grupo.

Transporte selectivo del sistema transportador mediado por anticuerpos monoclonales.

El descubrimiento de antígenos que se sobreexpresan en la superficie de las células tumorales, llevó a la idea de poder usar determinados anticuerpos como marcadores selectivos de las células tumorales, permitiendo diferenciar entre tejidos enfermos y tejidos sanos (Liu y col. 1996). Los anticuerpos monoclonales que muestran una mayor especificidad de unión a los antígenos específicos de las células cancerosas y pueden ser usados como vehículos específicos de agentes citotóxicos (Adams y col. 2001). Estos anticuerpos se localizan en la superficie de las nanopartículas cargadas con fármaco y se unen a los antígenos de las células cancerosas. De esta manera el sistema transportador entra en la célula por endocitosis mediada por ligandos, seguido de la liberación del fármaco transportado en el interior celular. Un ejemplo de la utilización de anticuerpos monoclonales fijados a nanovehículos es la fijación de epitopos CD19 a liposomas pegilados con lo que consigue un notable incremento de la eficacia terapéutica sobre células de linfoma B; la fijación de fragmentos de anticuerpo Fab'a liposomas de doxorubicina estéricamente estabilizados muestran un incremento de la actividad frente a los liposomas no vectorizados en aquellos tumores que presentan una sobreexpresión del receptor HER2 o la fijación del anticuerpo CC52 a liposomas los cuales muestran una acumulación específica en modelos de adenocarcinoma de colon en ratas (Matsumura y col. 2004).

Transporte selectivo del sistema transportador mediado por péptidos.

El uso de determinados péptidos cuya secuencias son reconocidas por receptores asociados al tumor, es una perspectiva interesante en el transporte específico de fármacos quimioterápicos. Actualmente, el número de péptidos y de nanopartículas transportadoras de fármacos asociadas a con agentes citotóxicos que tienen afinidad por receptores de células cancerosas ha surgido como un potencial agente quimioterápico tumor-específico. Por ejemplo: péptidos gastrointestinales, somatostatina y sus análogos, bombesinas (Gosk y col. 2008).

Transporte selectivo del sistema transportador mediado por ácido fólico y derivados.

El ácido fólico pertenece a la familia de la vitamina B. Es un compuesto importante en el proceso de formación de nuevas células porque participa en la biosíntesis de las bases nucleotídicas. El ácido fólico procedente de los alimentos es transportado a las células epiteliales a través de un tipo de endocitosis mediada por ligandos, llamada "potocitosis" (Miele y col. 2009).

Existen dos tipos de receptores de membrana del ácido fólico (α y β). La expresión de estos receptores en tejidos normales es muy baja y queda restringida a determinados tipos células epiteliales como la placenta, el plexo corioideo, los pulmones, las glándulas tiroideas y los riñones. Sin embargo, estos receptores se sobreexpresan en varios tumores, particularmente en cáncer de ovario y de endometrio. Un estudio con radiomarcadores, mostró que la unión del ácido fólico en las células tumorales es 20 veces superior que en las células epiteliales normales o fibroblastos (Cho y col. 2008). De esta manera, amplios estudios muestran que las nanopartículas transportadoras de fármacos antitumorales cuando son conjugadas con ácido fólico como ligando muestran la misma afinidad por las células tumorales como el estudio de los radiomarcadores, es decir, su capacidad de unión a los receptores expresados en las células cancerosas es muy superior a los de las células sanas.

Transporte selectivo del sistema transportador mediado por transferrina.

La transferrina es una glicoproteína sérica que transporta hierro por la sangre y hasta las células mediante su captación por receptores de transferrina y su consecuente internalización por endocitosis mediada por receptores. El receptor de la transferrina es una proteína vital implicada en la homeostasis del hierro y en la regulación del crecimiento celular. Los altos niveles de expresión de los receptores de transferrina en las células cancerosas, que pueden llegar a ser 100 veces superior a la expresión media en las células sanas, y su accesibilidad extracelular, permite su internalización y jugar un papel fundamental en la patología del cáncer, haciendo de este receptor un atractivo objetivo en el tratamiento del cáncer (Daniela y col. 2006). Por ejemplo, la transferrina se puede fijar a nanopartículas y favorecer el paso a través

de la membrana de las células tumorales con lo que se consigue un mayor efecto antitumoral de fármacos como la doxorubicina.

Transporte selectivo del sistema transportador mediado por glicoproteínas superficiales celulares, las lecitinas.

Las lecitinas son proteínas de origen no inmunitario capaces de reconocer y unirse específicamente a fracciones hidrocarbónicas de glicoproteínas que se expresan en la superficie celular. Las células cancerosas expresan más frecuentemente diferentes glicoproteínas comparado con células normales. La interacción de las lecitinas con determinados carbohidratos es muy específica. Las lecitinas pueden ser incorporadas en nanopartículas como fracciones que son directamente reconocidas por carbohidratos de la superficie celular o, por el contrario, que fracciones de carbohidratos sean acopladas a las nanopartículas para unirse específicamente a lecitinas. El uso de lecitinas y de neogliconjugados como estrategia de transporte directo o inverso es un enfoque tradicional en el tratamiento de cáncer de colon (Acharya y col. 2009).

Transporte selectivo del sistema transportador mediado por aptámeros.

Los aptámeros son tramos cortos de ADN o ARN que actúan como los anticuerpos pero con un peso molecular más reducido (del orden de 20 kDa), que han mostrado ser ligandos prometedores de las nanopartículas transportadoras de fármacos para el transporte selectivo de los agentes antitumorales hacia la región diana. Aunque se han aislado diversos aptámeros que se unen a antígenos sobreexpresados en células tumorales, sin embargo poseen una utilidad terapéutica limitada mientras que cada vez es mayor el número de trabajos que se orientan hacia la preparación de bioconjugados de nanopartículas con aptámeros. En general estos nanosistemas están constituidos por nanopartículas, conteniendo agentes antineoplásicos o agentes de contraste, que llevan en su superficie cadenas de PEG a las cuales se fija el aptámero. Por ejemplo, recientemente se ha publicado el primer estudio in vivo de nanopartículas de docetaxel y el aptámero A10 RNA que se une al antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) (Hurst, 2001).

b) Transporte activo basado en la utilización de materiales biodegradables sensibles a estímulos externos:

El desarrollo de nanosistemas sensibles a ciertos estímulos está recibiendo un gran interés y se basan en que los tejidos tumorales tienen un pH más bajo y una temperatura más elevada que los tejidos normales con lo que es posible que el fármaco sea liberado solo cuando se dan estas especiales características fisiopatológicas de los tumores; igualmente, la presencia de determinados sistemas enzimáticos en tejidos tumorales, puede ser utilizada para conseguir una liberación del fármaco vía estímulos externos. (j.l.vila jato y p. calvo). Numerosos trabajos de investigación muestran que tejidos inflamados o neoplásicos presentan un pH (acidosis) o una mayor temperatura (hipertermia) que un tejido sano (Yahara y col. 2003). Por tanto, el transporte hacia tumores sólidos puede realizarse mediante el diseño de transportadores de fármacos sensibles a estos estímulos. De tal manera que se produzca un proceso de desintegración de la nanopartícula y liberación de los principios activos transportados.

Sistemas transportadores de fármacos sensibles a estímulos ácidos

El pH intersticial de los tumores juega un papel importante en la terapia del cáncer (Couvreur y Vauthier, 2006). En un organismo sano, el pH extracelular de los tejidos y de la sangre se mantiene en torno a 7.4. A diferencia de lo que ocurre con el entorno a 5.5 – 6.5 del tejido tumoral, que presenta valores de pH inferiores, dependiendo de la histología y del volumen del tumor (Dellian y col. 1996; Yatvin y col. 1980). El descenso de los valores del pH en la masa cancerosa se debe principalmente a la pobre organización de la vasculatura tumoral, que provoca un descenso de la presión sanguínea, hipoxia local y acumulación de metabolitos ácidos. Esta diferencia de pH entre los tejidos sanos y cancerosos puede ser utilizada en el desarrollo de sistemas transportadores sensible al pH (figura 1.3.) (Shin y col. 2003). Así, por ejemplo se han diseñado liposomas con componentes DOPE (dioleilfosfatidil etanolamina) y otros lípidos ligeramente ácidos como colesterilhemisuccinato o ácido oleico, PEG carboxilados o copolímeros de derivados hidrofóbicos de N-isopropilacrilamida (NIPAM) que a pH neutro mantienen la estructura de la bicapa lipídica pero a pH ácido sufren una protonización, se colapsan y sufren una

desestabilización y rotura de la bicapa lipídica que permite la rápida liberación del fármaco anticanceroso transportado.

Los liposomas sensibles a pH ácidos han demostrado ser útiles en cultivos celulares para el transporte de los fármacos y su liberación a nivel citoplasmático. Sin embargo, la eficacia de estos liposomas *in vivo* esta más limitada debido a los procesos de opsonización y reconocimiento del sistema transportador por el sistema inmune. Estos problemas de estabilidad *in vivo* se han solventado mediante la incorporación de determinados tipos de lípidos en la formulación como el dipalmitoil succinilglicerol o de polímeros como el polietilenglicol (PEG) (Simoes y col. 2004; Roux y col. 2002). La incorporación de cadenas de PEG en los liposomas prolonga su semivida plasmática evitando su reconocimiento por los macrófagos y retirada por los órganos del sistema fagocítico mononuclear (SFM) como hígado y bazo. Generalmente, estas modificaciones aumentan la estabilidad de los liposomas sensibles a pH ácidos en el plasma, aunque, los valores de pH a los cuáles se desestabilizan se hacen más ácidos (Slepushkin y col. 1997).

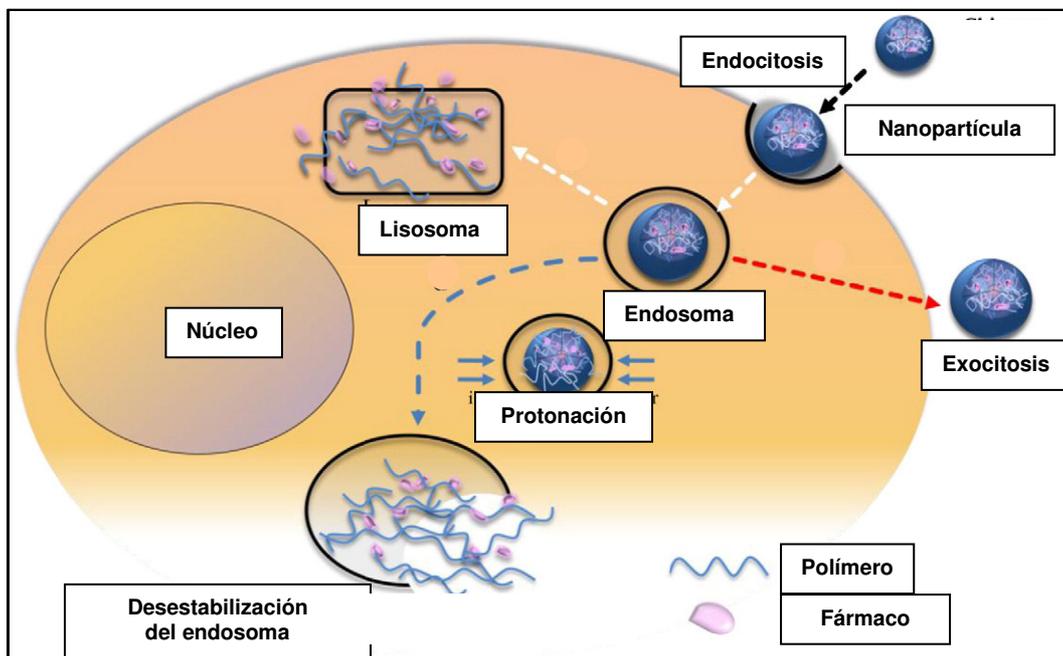


Figura 1.3. Proceso de liberación de fármacos desde nanopartículas como consecuencia de la degradación de éstas en entornos ácidos del interior de la célula tumoral.

Sistemas transportadores de fármacos sensibles a la temperatura

El uso de la hipertermia local para el transporte específico de fármaco a la masa tumoral fue propuesto en 1978 por Yatvin y cols. Este enfoque se basa en el diseño de liposomas formados por fosfolípidos caracterizados por una temperatura de transición/desestabilización justo por encima de 37 °C. Además, la hipertermia tumoral es citotóxica *per se*, y facilita la acumulación de los nanosistemas en el tumor debido al incremento del flujo sanguíneo y el aumento de permeabilidad del endotelio tumorales. Otro nuevo enfoque para la liberación de fármacos provocada por calor ha sido presentado recientemente mediante incorporación de lisofosfolípidos en la membrana liposomal. Cuando los liposomas se calientan por encima de la temperatura de transición de los lisofosfolípidos, éstos abandonan la bicapa produciendo un aumento de la permeabilidad de la membrana liposomal y la salida del anticanceroso (Kong y col. 2000; Needham y col. 2000).

Sistemas transportadores de fármacos sensibles a sistemas enzimáticos

La sobreexpresión de ciertos sistemas enzimáticos en tejidos tumorales también ha sido objeto de investigación con la finalidad de conseguir una vectorización vía estímulo externo como por ejemplo la fosfolipasa A2 o proteasas como metaloproteasas. La inclusión de cadenas de PEG permite que las nanopartículas presenten una larga permanencia en la circulación sanguínea pero disminuyen la interacción con las membranas celulares lo cual representa un importante problema para aquellas formulaciones que contienen fármacos que deben actuar en el interior de la célula (Vasir y col. 2005). Así por ejemplo, para resolver este problema, se ha propuesto recientemente que entre las cadenas lipídicas y de PEG se sitúe un espaciador constituido por un péptido cuya unión se rompe por la acción de metaloproteasas existentes en el fluido extracelular de numerosos tumores (figura 1.4).

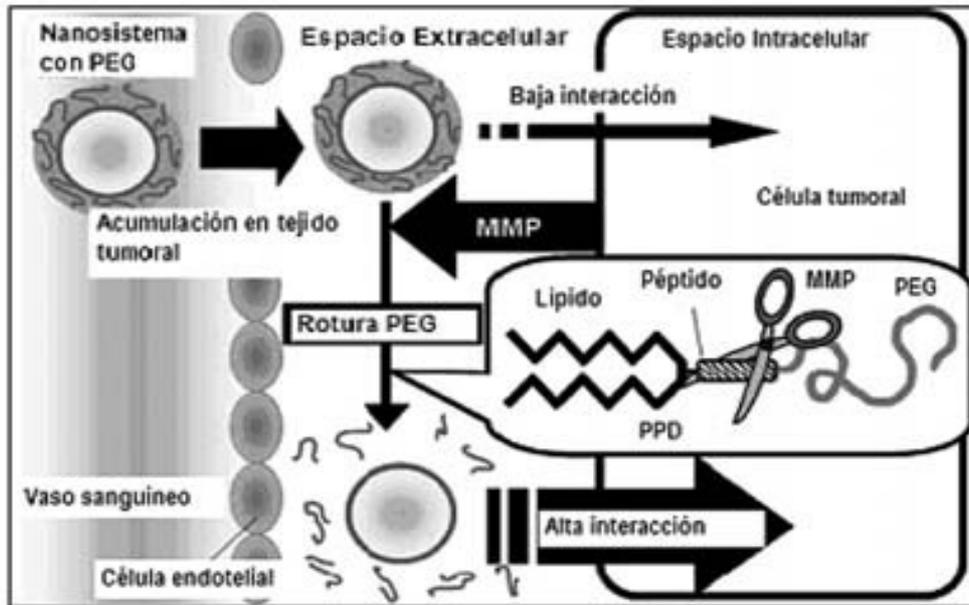


Figura 1.4. Esquema de un nanosistema que posee un péptido espaciador entre su superficie y las cadenas de PEG. Por la acción de las metaloproteasas, existentes en el espacio extracelular, se desprenden las cadenas poliméricas de PEG.

1.2.2. Sistemas transportadores de fármacos sensibles a gradientes magnéticos aplicados

Dentro de los diferentes sistemas coloidales diseñados para el transporte específico de fármacos destacan, por sus grandes posibilidades, los transportadores magnéticos coloidales. La Tecnología de Transportadores Magnéticos surgió en los años 40 en el contexto de la purificación de las aguas residuales. Debido a sus interesantes propiedades (forma y tamaño, propiedades magnéticas, biocompatibilidad, etc.), los coloides magnéticos en los rangos de tamaño submicrométrico y nanométrico han encontrado numerosas y prometedoras aplicaciones biomédicas. Dentro de las aplicaciones biológicas de esta tecnología destacan: 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, el transporte de fármacos y los biosensores (Pankhurst y col. 2003), la terapia celular (separación y etiquetado celular), el tratamiento de tumores mediante hipertermia, resonancia magnética de imagen (como agentes de contraste), la reparación de tejidos y, particularmente, el transporte de fármacos (Arias y col. 2001, 2007).

I. Introducción

Los principales beneficios de estos sistemas dentro del campo terapéutico son la eliminación de reacciones adversas que frecuentemente derivan de la distribución sistémica de los fármacos y la posibilidad de reducir la dosis precisa de un agente terapéutico por peso corporal, disminuyendo los posibles efectos adversos derivados de las dosis tradicionales. Además, se solucionan los problemas de inestabilidad en los fluidos biológicos o *in vivo* del fármaco. Por otro lado, el reconocimiento y la eliminación del sistema coloidal por el sistema fagocítico mononuclear (SFM) se verían retrasados, al estar concentradas las partículas en un lugar determinado del organismo por acción de un campo magnético, lo que impediría su libre distribución y llegada a órganos de este sistema como el hígado.

1.2.2.1 Principales características para su utilización en la quimioterapia del cáncer.

Las características que idealmente debe tener un buen sistema transportador magnético de fármacos son (Durán y col. 2008; Gupta y Gupta, 2005):

- Pequeño tamaño (inferior a 500 nm), para permitir la distribución a nivel capilar y la perfusión uniforme al órgano o tejido diana.
- 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.
- Una respuesta magnética adecuada a los campos y gradientes magnéticos externos aplicados, a la velocidad de flujo presente en los sistemas fisiológicos. De forma que permita el control del complejo fármaco-transportador antes, durante y después de la liberación de fármaco en su destino.
- Velocidad de liberación del fármaco controlable (o predecible) en la región diana.
- Propiedades superficiales que permitan una máxima biocompatibilidad y una mínima antigenicidad.

- Biodegradabilidad y productos de degradación que posean una toxicidad mínima.

Estas características ideales, por su parte van a depender de factores fundamentales como son las propiedades magnéticas de las partículas, los campos de fuerza que actúan sobre ellas, la morfología, las propiedades químicas de los componentes que forman las partículas magnéticas compuestas, la composición química de su superficie y la toxicidad de las partículas y de sus productos de degradación.

A pesar de que muchos estudios *in vivo* muestran las posibilidades de estos sistemas, todavía deben salvarse algunas dificultades para su aplicación en humanos: *i)* la pobre respuesta a campos magnéticos de estos sistemas en zonas no tan superficiales del organismo (>2cm de profundidad); *ii)* la escasa retención en el lugar diana cuando se retira el campo magnético; y *iii)* sus mejorables propiedades de vehiculización y liberación de fármaco. No obstante, cada vez hay un mayor número de ensayos clínicos que respaldan su eficacia y posibilidades (Lübbe y col. 2001; Rudge y col. 2000).

1.2.2.2. Composición de los núcleos magnéticos

Las partículas magnéticas más comúnmente utilizadas para aplicaciones biomédicas son las ferritas como la magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y el hierro o aleaciones a base de hierro. Las primeras ferritas con rango nanométrico se obtuvieron por primera vez en la década de los 60 (Papell, 1965) mediante pulverización húmeda de polvo micrométrico de magnetita en presencia de surfactantes idóneos para obtener ferrofluidos estables en agua y solventes orgánicos.

1.2.2.3. Utilidad en el tratamiento del cáncer

La orientación magnética es una atractiva estrategia que está acaparando una gran atención para su aplicación en el transporte de fármacos. Aquí, los fármacos están atrapados en la superficie o en el interior de micro- o nanopartículas magnéticas. Este tipo de transporte específico de agentes quimioterápicos permite

I. Introducción

aumentar la eficacia y reducir la toxicidad sistémica asociada a estos fármacos. Esto implica la incorporación de quimioterápicos en micro- o nanopartículas magnéticas que sean biocompatibles, y pueden resultar más eficaces debido a que permiten obtener mayores concentraciones de fármaco en la región tumoral, limitando la toxicidad sistémica asociada (Harivardhand L. 2005; Safarik y Safarikova 2002).

Estos transportadores magnéticos, después de su administración intravenosa, pueden ser concentrados en el lugar de acción usando un gradiente externo magnético, después de su acumulación en el tejido tumoral *in vivo*, los principios activos son liberados desde el transportador magnético y captados específicamente por las células del tumor (figura 1.5.). La eficacia de esta acumulación depende de varios parámetros incluidos la intensidad del campo magnético, el volumen de flujo sanguíneo y las características superficiales del transportador (Pankhurst y col. 2003; Guo y Szoka 2003).

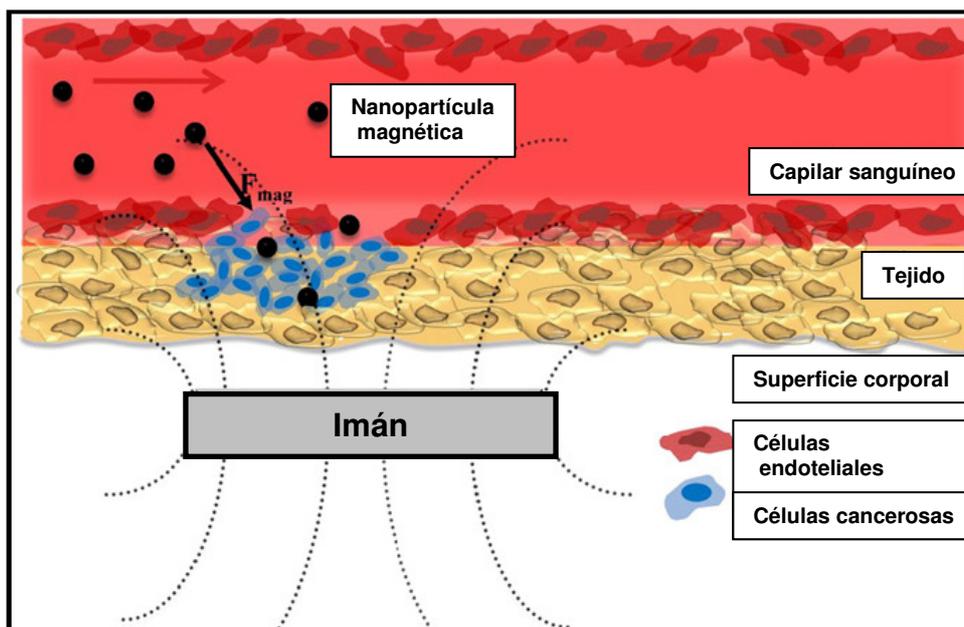


Figura 1.5. Acumulación selectiva de nanopartículas magnéticas en la masa tumoral, como consecuencia de la influencia de un gradiente magnético aplicado.

Por otro lado, la aplicación de un gradiente magnético alterno provoca la vibración de las partículas magnéticas calentando el tejido diana, este aumento de temperatura facilita la liberación del anticanceroso por aumento de la permeabilidad de las nanopartículas o acelerar la degradación de la matriz no magnética que alberga el

fármaco (Wagner, 2007). Las vibraciones del campo magnético convierten a las diminutas partículas magnéticas en calentadores capaces de mantener la temperatura ligeramente superior a 42 °C durante 30 minutos o más, llevando a la muerte de las células tumorales. Esta prometedora técnica, está siendo objeto de investigación (Herat y col. 2006; Hilger y col. 2006).

A consecuencia de su pequeño tamaño, los sistemas magnéticos coloidales se caracterizan por una elevada relación superficie/volumen. Estas características morfológicas le confieren la capacidad de transportar una gran variedad de moléculas bioactivas, pudiendo transformar a las nanopartículas en sistemas multifuncionales (Service RF, 2005). Esta multifuncionalidad es la base del desarrollo de nanopartículas compuestas con un núcleo, magnético o no magnético, y un recubrimiento de naturaleza orgánica, como polímeros sintéticos, polisacáridos, almidones; e inorgánica, como la sílice o el carbón.

Esto permite que las características del núcleo y del recubrimiento de las partículas puedan ser modificadas en función de los requerimientos específicos para su uso farmacéutico, manipulando las diferentes superficies y la mayoría de las características como: mojabilidad (balance hidrófilo/hidrófobo), carga superficial, composición química, capacidad de unir ligandos, capacidad de adsorción/absorción, cinéticas de liberación, degradación del transportador, cinética de aclaración, estabilidad coloidal y respuesta magnética.

Las características distintivas que hacen de los coloides magnéticos particularmente idóneos para sus aplicaciones biomédicas, se basan en capacidad de:

- Ser visualizados por resonancia magnética de imagen (RMI)
- Pueden ser dirigidos y mantenidos en lugar diana mediante el gradiente de un campo magnético aplicados
- Ser calentados mediante la aplicación de un gradiente magnético alterno para iniciar la liberación del fármaco o provocar hipertermia en el tejido diana.

A continuación se exponen una serie de fenómenos que pueden resultar importantes en cuanto a la utilidad de los sistemas magnéticos coloidales en la quimioterapia del cáncer.

a) *Tiempo de Residencia en el organismo.*

La velocidad de aclaramiento plasmático puede ser muy variable, dependiendo del tamaño del sistema transportador y de la vía de administración. Como regla general, en la administración por vía parenteral, cuando las nanopartículas no son retenidas en el lugar de acción por un campo magnético externo, las partículas no biodegradables son captadas para su degradación en un periodo de tiempo que es inversamente proporcional al diámetro de las partículas.

Por tanto, un mayor tiempo de residencia en la circulación sistémica se corresponde con aquellas partículas cuyo radio es menor a ~20 nm (como el óxido de hierro superparamagnético), antes de ser acumulados en los nódulos linfáticos y ser eliminados por orina o heces. Partículas con un diámetro entre 40-200 nm pueden ser eliminadas por el hígado o el bazo en un periodo menor de tiempo que las partículas más pequeñas. Las partículas de mayor tamaño (>200 nm diámetro) tienen la semivida plasmática más corta porque pueden ser eliminadas por procesos de opsonización activados por el sistema retículo endotelial en el hígado, bazo, pulmones y médula ósea. Por último, las moléculas solubles producidas por la descomposición de la cubierta biodegradable que normalmente recubre a los núcleos magnéticos, pueden ser captadas por cualquier célula por pinocitosis (Durán y col. 2008).

b) *Efectos terapéuticos.*

Como en cualquier sistema transportador de fármacos, los efectos terapéuticos de un transportador magnético también dependen de la cantidad de fármaco liberado. El principio activo no está biodisponible hasta que no se disocia del transportador, de forma que la liberación del fármaco debe darse en el momento en el que la diana es alcanzada. Una liberación prematura tendría el mismo resultado que la administración del fármaco libre, y por el contrario, una liberación tardía puede desembocar a que no se dé el efecto terapéutico deseado en el lugar de acción. Si el complejo fármaco-transportador es retenido en el tejido diana por acción de un gradiente magnético aplicado, la concentración de agente quimioterápico en dicho tejido puede ser muy superior a nivel intratumoral, en comparación con lo que se alcanzaría si administrásemos el principio activo libre (Durán y cols. 2008).

La acción del principio activo liberado por un transportador magnético coloidal en el lugar diana puede desarrollarse mediante varios mecanismos (Belikov y cols. 2001):

- El fármaco es liberado del sistema transportador detenido por el campo magnético en la pared del vaso, y ejerce su acción según el mecanismo habitual.
- El principio activo (de carácter enzimático) actúa al mismo tiempo que está unido al sistema transportador inmovilizado en la pared del vaso sanguíneo que origina el tumor.
- El fármaco es transportado junto con el sistema transportador desde el vaso sanguíneo directamente al tejido o al interior de la célula diana.

c) Coloides magnéticos para la obtención de imágenes e hipertermia en el cáncer

Los coloides magnéticos pueden ser utilizados como agentes de contrastes RMI. Los óxidos de hierro (magnetita, maghemita u otra ferrita insoluble) de tamaño inferior a 20nm son superparamagnéticas, es decir, poseen un momento magnético grande cuando se les aplica un campo magnético, pero no conservan la magnetización neta cuando el campo es retirado. En la resonancia magnética de imagen, la presencia de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético conduce a una reducción del tiempo de excitación de los protones circundantes como resultado del campo magnético no homogéneo que se forma alrededor de las partículas (Couvreur y col., 2006). Así, en las imágenes obtenidas, este efecto aparece como un contraste en negativo que genera una señal hipotensa de RMI (Bonnemain, 1998).

Los coloides de óxido de hierro incorporados dentro de una matriz polimérica, se encuentran estabilizados evitando su agregación en el medio fisiológico. Esta primera generación de coloides magnéticos, generalmente recubiertos de dextrano, presentaban un gran tamaño y una amplia distribución, con buenas características para la RMI ya que se concentraban en los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear (SFM) convirtiéndose en herramientas útiles para el diagnóstico de tumores o de metástasis en el hígado y en el bazo (Kubaska

I. Introducción

y col., 2001). Las imágenes de los tumores se consiguieron por la ausencia de acumulación de estas partículas en el tejido enfermo debido a la ausencia de células de Kúpffer en esas zonas, generando un buen contraste entre el tejido sano y el tumor mediante RMI (resonancia magnética de imagen), para diseñar óxidos de hierro superparamagnéticos capaces de evitar su captación por los macrófagos y aumentar su semivida plasmática. Se ha determinado que estas nanopartículas recubiertas por dextrano tenían una mayor vida media en la circulación debido a su menor tamaño. Estas partículas han sido utilizadas en angiografía, obteniéndose imágenes de la angiogénesis de los tumores, y en linfografías de resonancia magnética para detectar la metástasis. Algunos investigadores como Wessler y sus colaboradores demostraron, en experimentos en los que trabajaban con células de glioma, que los coloides de óxido de hierro después de pasar a través de los vasos hiperpermeables que riegan un tumor intracraneal, son captados no sólo por los macrófagos asociados al tumor sino también por las células cancerosas en proliferación, obteniendo un mejor contraste entre los tejidos enfermos y sanos en RMI del cerebro.

La tercera generación de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas presenta una mayor selectividad por el tejido diana gracias a su conjugación con ligandos específicos de receptores sobreexpresados en la superficie de las células diana, como los anticuerpos monoclonales (Artemov y col., 2003).

Las nanopartículas magnéticas también se utilizan en la hipertermia del cáncer. Dependiendo de si la vía de administración es local o sistémica, se pueden distinguir 2 principales procesos de hipertermia mediada magnéticamente con partículas magnéticas. En primer lugar, las partículas magnéticas pueden producir hipertermia después de su administración local directa en el tejido tumoral. Este enfoque fue investigado por el grupo japonés de Kobayashi mediante el diseño de liposomas catiónicos magnéticos (Shinkai y cols. 1998). Los liposomas magnéticos, donde las partículas de magnetita están encapsuladas en el interior de las vesículas, fueron inyectados 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 electrostáticas con las membranas celulares. El resultado fue la completa regresión de los tumores en el 90% de las ratas tratadas después de 3 periodos de hipertermia de 30 minutos cada uno (Yanase y col, 1998). En un estudio similar, con inyección

directa de coloides magnéticos en ratones con cáncer de pecho subcutáneo, el grupo de investigación de Hilger y sus colaboradores. Obtuvieron resultados similares de completa regresión de los tumores por calentamiento de la masa tumoral (Hilger y col., 2001).

En segundo lugar, tras administración sistémica de los coloides magnéticos la hipertermia se produce en el interior de las células tumorales. La idea de producir hipertermia intracelular es fascinante porque eso implica que se dé un transporte específico a las células cancerosas y un mayor daño de la hipertermia sobre las estructuras vitales. Las posibilidades de este calentamiento intracelular fueron estudiadas por Halbreich y col. (1997) y Bacri y col. (1998) las nanopartículas magnéticas incubadas con monocitos humanos y macrófagos de ratón a concentraciones a los 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 citolisis inducida magnéticamente, probablemente debido a la generación de hipertermia intracelular tras la captación de las nanopartículas magnéticas.

A diferencia de los macrófagos, las células tumorales no son células fagocíticas “profesionales”. Por tanto, para mejorar la captación de los coloides magnéticos se les incorpora en su superficie determinados ligandos específicos (transporte activo). Por ejemplo, estudios *in vivo* fueron llevados a cabo por Shinkai y col. (2001) en ratones con carcinoma de células renales humanas, tratados con magnetosomas catiónicos con anticuerpos monoclonales incorporados en su superficie. Se observó un mayor tiempo de supervivencia en los ratones tratados con los liposomas e hipertermia en comparación con el grupo control. Nanopartículas de maghemita superparamagnética conjugadas con folatos también han sido sintetizadas para el tratamiento de tumores sólidos mediante hipertermia intracelular. En este caso también se observó una internalización específica de las partículas conjugadas con folatos con respecto al grupo control (Sonvico y col. 2003).

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. OBJETIVOS.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo central el diseño de coloides magnéticos como sistemas transportadores de fármacos antitumorales para el tratamiento del cáncer. Con ese fin, se ha realizado un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas constituidas por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico biocompatible (chitosan), lo que debe posibilitar el transporte y la liberación del fármaco antineoplásico metotrexato de forma selectiva en el órgano o tejido diana.

La eficacia del recubrimiento y las ventajas que aporta a la capacidad de las partículas para transportar los principios activos se determinarán mediante el análisis comparativo de la estructura y la composición química de los tres tipos de materiales (magnetita, chitosan y partículas compuestas), así como de las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales de éstos. La caracterización de las propiedades magnéticas de los núcleos de magnetita y de las partículas compuestas, permitirá determinar la capacidad de estos sistemas para responder a gradientes magnéticos aplicados y el grado de influencia del recubrimiento polimérico sobre estas propiedades.

Una parte esencial de la investigación es la determinación de la capacidad de vehiculización del metotrexato por parte de las partículas sintetizadas. Esta capacidad se determinará de forma exhaustiva mediante los dos métodos convencionales de incorporación de fármacos: adsorción superficial y absorción en la matriz del coloide. Para ello, los factores determinantes de la vehiculización de fármaco se estudiarán por técnicas espectrofotométricos y electrocinéticas. De esta manera se pondrá a punto un método óptimo y reproducible de incorporar el fármaco anticanceroso en las nanopartículas compuestas (magnetita/chitosan).

Otro objetivo básico ha sido el análisis del proceso de liberación *in vitro* del fármaco antineoplásico desde las partículas recubiertas, determinando espectrofotométricamente la cantidad liberada y los factores que afectan a la liberación, como el tipo de unión fármaco-partícula coloidal puede condicionar su liberación.

II. Objetivos y plan de trabajo

Finalmente, como “prueba de concepto” (proof of concept) del sistema que proponemos, se ha determinado la influencia que la aplicación de un gradiente magnético externo en la región diana tiene sobre la biodistribución de las nanopartículas en modelos experimentales animales. Esto nos permitirá aventurar las posibilidades reales que este sistema magnético transportador de fármacos puede tener en clínica.

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

1. Síntesis de las partículas coloidales compuestas por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico biodegradable (chitosan). Nos basaremos en el método de coacervación (precipitación en interfase) que se utiliza ampliamente para la obtención de las nanopartículas de polímero puro.
2. Caracterización de su forma, tamaño, propiedades magnéticas, composición química y estructura. Se analizarán las condiciones (composición del medio de polimerización) en las que se obtenga el mejor recubrimiento y la máxima homogeneidad en tamaño de las nanopartículas magnetita/chitosan.
3. Estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de partículas (magnetita, chitosan y partículas recubiertas) mediante electroforesis. Uso de modelos teóricos para evaluar su carga eléctrica superficial. Control de la misma en función de las características iónicas del medio de suspensión.
4. Análisis comparativo de las propiedades termodinámicas superficiales de los tres tipos de partículas, 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 partículas.
5. Determinación de la capacidad de incorporación del metotrexato, por las partículas compuestas mediante métodos espectrofotométricos y electrocinéticos. Estudio de los diferentes factores fundamentales que influyen en este proceso. Análisis del efecto del mecanismo de vehiculización empleado (adsorción superficial frente a absorción en matriz).

6. Evaluación de las características de liberación por las partículas compuestas. Análisis de los mecanismos implicados.
7. Análisis de la influencia que la aplicación de un gradiente magnético externo en la región diana tiene sobre la biodistribución *in vivo* de las nanopartículas compuestas (magnetita /chitosan). En concreto, este estudio se realizó en ratones con un tumor subcutáneo inducido mediante inyección de células cancerosas L/2/0.

El presente trabajo está englobado dentro de la línea de investigación “Aplicaciones Biofarmacéuticas de los Fluidos Magnetorreológicos”, del grupo de investigación “Farmacia Práctica” (CTS-205).

2.2. CONTRIBUCIÓN DEL TRABAJO PROPUESTO.

Dentro del campo de la investigación y del desarrollo de los transportadores magnéticos coloidales, la aportación principal de esta Tesis Doctoral es el diseño de un sistema de liberación modificada de metotrexato constituido por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico biocompatible (chitosan), con el que se podrá lograr el guiado de este fármaco antineoplásico hasta el tejido u órgano diana, y su retención en dicho lugar. Cabe esperar, utilizando este tipo de sistemas coloidales, que se reduzcan las reacciones adversas derivadas de la distribución a sistémica y de la poca especificidad de este principio activo por las células tumorales diana. Así, se necesitarán dosis netamente inferiores para conseguir la misma acción terapéutica. Este campo de investigación es extenso y se encuentra en constante crecimiento, por lo que el trabajo que proponemos se centra en algunos aspectos muy concretos del mismo. Especialmente, pensamos que nuestra investigación podría contribuir en los siguientes aspectos:

1. Desarrollo de un procedimiento novedoso de síntesis de nanocomponentes magnéticos. El método a seguir se aplica por primera vez, que sepamos, al sistema chitosan-magnetita superparamagnética.
2. Uso de métodos de análisis fisicoquímico de superficies, que muestran la sensibilidad de éstos a las transformaciones experimentadas por las partículas al recubrirlas de chitosan o al cargarlas de metotrexato. Análisis de la capacidad para

II. Objetivos y plan de trabajo

responder a gradientes magnéticos aplicados mediante caracterización del ciclo de histéresis de las nanopartículas.

3. Análisis de la capacidad de estas partículas compuestas como sistemas transportadores de fármacos, en concreto del antineoplásico metotrexato. Ésta es una contribución esencial de nuestro trabajo, dado que las partículas sintetizadas podrían ser excelentes vehículos de fármacos por su capacidad de respuesta a gradientes magnéticos externos o a implantes magnéticos (localizados en el paciente mediante cirugía menor), y adecuadas igualmente como sistema de liberación basado en la descomposición de un polímero biocompatible.

4. Prueba de concepto de la utilidad real de este tipo de estrategia de transporte de fármacos antitumorales al tejido canceroso diana.

2.3. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.

El presente trabajo de investigación constará, principalmente, de las siguientes etapas:

1. Síntesis de partículas compuestas por un recubrimiento polimérico biocompatible (chitosan) y un núcleo magnético (magnetita). La metodología seguida está basada en un proceso de coarcepción donde las partículas se obtienen tras una precipitación por entrecruzamiento químico en un medio en el que se encuentra en suspensión los núcleos magnéticos.

2. Evaluación de la efectividad del recubrimiento. Dadas las diferencias en cuanto a carga superficial (y, especialmente, en referencia a la dependencia de ésta con el pH y con la fuerza iónica) entre la magnetita y el chitosan, la determinación del potencial zeta de los tres tipos de partículas en función del pH y de la fuerza iónica debe ser un excelente procedimiento de evaluación de la calidad del recubrimiento conseguido. Lo mismo puede decirse de las propiedades termodinámicas superficiales de los materiales sintetizados. La determinación de los ángulos de contacto de determinados líquidos patrón permitirá evaluar el carácter hidrófilo o hidrófobo de las partículas: éste debe cambiar de los núcleos a las partículas mixtas, dado que la magnetita es un material hidrófilo y el chitosan tiene un carácter hidrófobo. Finalmente, otro tipo de

tecnicas analíticas tratará de confirmar la obtención de un material “ mixto” magnetita/chitosan, y en su capacidad de respuesta a gradientes magnéticos.

3. Evaluación de la capacidad de vehiculización del metotrexato. Se realizará un estudio de la absorbancia óptica de disoluciones de metotrexato con objeto de encontrar las condiciones óptimas de trabajo y determinar el coeficiente de absorción molar mediante la obtención de una curva de calibrado. Además, se realizará una validación del método espectrofotométrico utilizado. Esto permitirá determinar espectrofotométricamente la capacidad de incorporación (superficie y matriz) de fármaco por las partículas compuestas. La utilización de técnicas electroforéticas como complemento de tipo analítico, puede ser una herramienta útil en este estudio, además de una aproximación sumamente original al problema.

4. Ensayos de liberación *in vitro*. Se determinará la cantidad de metotrexato liberada y el proceso de liberación por parte de partículas compuestas. Se analizarán las características del medio de liberación, tipo de vehiculización de fármaco y cantidad de fármaco incorporada.

5. “Prueba de concepto”: Análisis de la influencia que la aplicación de un campo magnético externo en la región diana tiene sobre la biodistribución *in vivo* de las nanopartículas compuestas (magnetita/chitosan). Este estudio ha sido desarrollado en un modelo de animales basado en ratones DBA/2 a los que se les ha inducido un tumor sólido subcutáneo mediante la inoculación de células tumorales L/2/0.

**III. SÍNTESIS Y
ESTUDIO
MORFOLÓGICO**

3.1. MAGNETITA

En los últimos tiempos, la Nanotecnología ha dirigido sus esfuerzos a la obtención de nanopartículas para aplicaciones biomédicas. Dentro de la gran variedad de nanopartículas destacan, por sus propiedades químicas y físicas, aquellas de naturaleza inorgánica. En concreto, los óxidos de hierro han centrado numerosas investigaciones para el desarrollo de aplicaciones biomédicas *in vitro* e *in vivo* debido a sus interesantes características magnéticas.

A lo largo de los años, se han puesto a punto numerosos procedimientos de síntesis de este tipo de partículas. Métodos físicos como la deposición en fase gaseosa y la litografía de rango electrónico, tienen el inconveniente de su incapacidad para garantizar la obtención de un tamaño de partícula del orden de nanómetros. Entre los métodos secos para la obtención de óxidos de hierro, realizados a elevadas temperaturas, destacan: la oxidación de hierro metálico por agentes oxidantes, la desproporción de óxido ferroso y la descomposición de diferentes sales férricas o ferrosas. Sin embargo, son los métodos húmedos, los que permiten un mejor control de la morfología (forma y tamaño y composición química de las partículas de óxido de hierro (Durán y cols., 2008). Estos métodos están basados en la coprecipitación de sales férricas y ferrosas en solución acuosa, mediante la adición de una base. Es interesante resaltar que con un apropiado control de la composición del medio químico de reacción (tipo de sal utilizado, la proporción $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$, pH y fuerza iónica) se logra definir perfectamente la morfología y composición de las nanopartículas de óxido de hierro así obtenidas (Gupta y Gupta, 2005; Tarjat y col., 2003).

Dentro de los diversos tipos de nanopartículas de óxido de hierro son de especial interés las nanopartículas superparamagnéticas por sus aplicaciones biomédicas [en la separación y etiquetado celular (detoxificación de fluidos biológicos), reparación de tejidos, transporte de fármacos, resonancia magnética de imagen (como agentes de contraste), hipertermia y magnetofección (transporte magnético de genes a las células diana)] (Durán y col., 2008). Su pequeño tamaño y su gran área superficial específica determina la gran susceptibilidad magnética y el comportamiento superparamagnético de estos materiales (Gupta y Gupta, 2005).

3.1.1. Metodología de Síntesis

La magnetita se obtiene mediante un proceso de síntesis basado en la adición de una base de dos disoluciones acuosas de sales férrica y ferrosa a una base fuerte que da lugar a un proceso de co-precipitación (Massart R., 1981). La reacción se realiza mediante: (i) se preparan 40 mL de una disolución 1 mol/L de cloruro férrico (FeCl_3) y 10 mL de otra disolución 2 mol/L de cloruro ferroso (FeCl_2) y 2 mol/L de ácido clorhídrico (HCl); (ii) ambas disoluciones se adicionan sobre 500 mL de una solución acuosa 0.7 mol/L de amoníaco (NH_4OH) simultáneamente y poco a poco, y bajo agitación mecánica (700r.p.m.); (iii) las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) se forman rápida y espontáneamente; (iv) se mantiene la agitación durante 1 hora y posteriormente se elimina el sobrenadante mediante decantación magnética.

Una vez obtenidas las partículas magnéticas, es necesario asegurar la estabilidad de las mismas en solución acuosa. Debemos tener en cuenta que por su pequeño tamaño, las nanopartículas de magnetita tienden a asociarse en agregados para mejorar la estabilidad termodinámica del sistema. El tratamiento químico a realizar depende del pH de las suspensiones con la que se trabajará. Si el medio es básico, las partículas se van a dispersar en una disolución acuosa 1 mol/L de hidróxido de tetrametilamonio; si el medio con el que se va a trabajar es ácido, como es en nuestro caso, las partículas se dispersan en una disolución 2 mol/L de ácido perclórico. Las partículas obtenidas se dejan durante 12 horas en esta disolución. A continuación, se retiran las nanopartículas de la disolución de ácido perclórico y se redispersan en agua bidestilada. En el caso de que se vayan a conservar para una utilización más tardía se procede a desecarlas en un horno de convección a $60\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$ (Digitronic, J.P. Selecta s.a.).

3.1.2. Forma y Tamaño

La caracterización del tamaño de las partículas se realizó mediante dos técnicas analíticas: espectroscopia de correlación de fotones (“photon correlation spectroscopy”, PCS Malvern 4700 analyzer, Malvern instruments, Inglaterra) y microscopía de transmisión de alta resolución (HRTEM, microscopio electrónico de alta resolución STEM Philips CM20, Holanda). Con respecto a la primera técnica, el ángulo de “scattering” utilizado fue de 60° y se analizaron suspensiones acuosas diluidas de

III. Síntesis y estudio morfológico

partículas de magnetita ($\sim 0.1\%$, p/v). De esta manera se determinó que el tamaño medio de las partículas de magnetita era 11 ± 2 nm (índice de polidispersión: 0.073).

Estos resultados se confirmaron mediante el análisis de microfotografías HRTEM. En este caso se prepararon suspensiones acuosas diluidas de magnetita ($\sim 0.1\%$, p/v) las cuales se sonicaron durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos y a continuación, se depositaron sobre una rejilla de cobre con película de fomvar, unas gotas de esta suspensión. Por último, estas rejillas se secaron a 35 ± 0.5 °C en un horno de convección. Como puede apreciarse en la figura 3.1, las nanopartículas presentan un tamaño muy pequeño, en concreto, un diámetro de 11 ± 3 nm, tal y como se determinó en 150 partículas de magnetita.

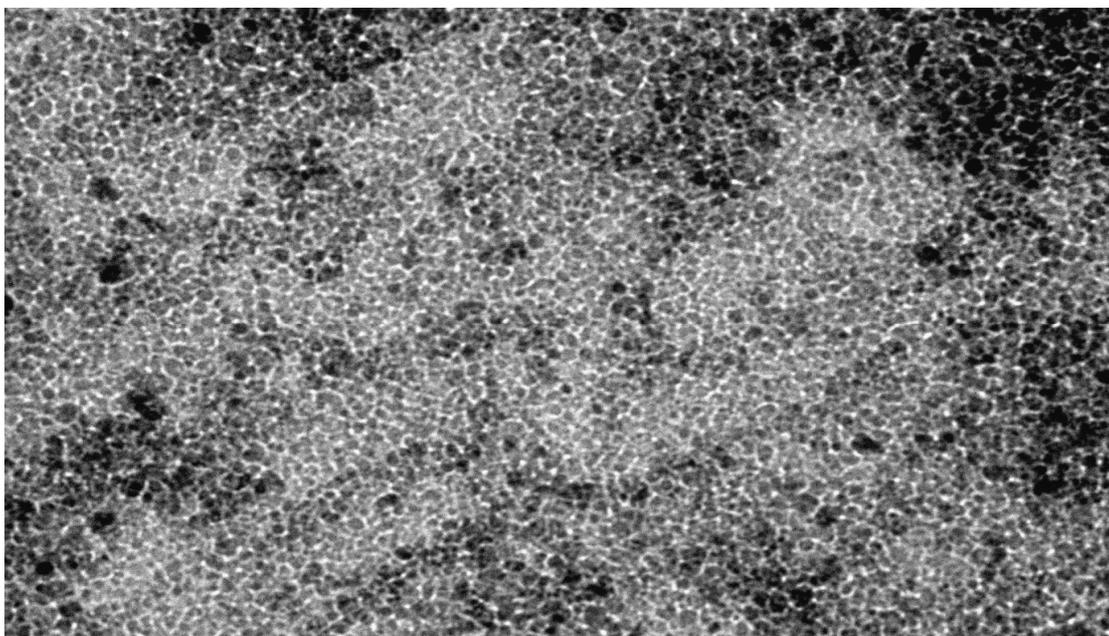


Figura 3.1. Microfotografía electrónica de transmisión de alta resolución de las partículas de magnetita (Fe_3O_4). Longitud de barra: 100 nm.

3.2. RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO: CHITOSAN

El chitosan es un biopoliaminosacárido obtenido mediante desacetilación alcalina de la quitina. Las primeras investigaciones realizadas sobre este polímero datan de hace dos siglos (Rouget, 1859). Sin embargo, no ha sido hasta los últimos

veinte años cuando ha resurgido el interés en este polímero biodegradable por sus numerosas e importantes aplicaciones, como en la industria textil, industria alimentaria, cosmética, biomedicina, agricultura y dietética. Recientemente, el quitosán está siendo muy investigado por sus posibilidades en el diseño de formulaciones farmacéuticas y en el transporte selectivo de fármacos al lugar de acción, por su capacidad de vehiculización de principios activos de muy diversa naturaleza, la capacidad de controlar la liberación de éstos y sus propiedades mucoadhesivas. El quitosán puede obtenerse, como comentaremos, a partir de una fuente natural, y ha demostrado ser biocompatible y biodegradable (Dodane y Vilivalam, 1998).

El quitosán es un copolímero lineal β -(1-4) de los azúcares 2-acetamino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi- β -D-glicopiranososa (figura 3.2). Este polímero se puede obtener fácilmente por *N*-desacetilación de la quitina, un polisacárido de origen natural presente en los caparazones de crustáceos, como los cangrejos o los camarones, y en las micelas fúngicas. Con respecto a las micelas fúngicas, la producción de complejos quitosán – glucanos está asociada a procesos de fermentación, similares a los realizados en la producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, y *Streptomyces spp.*, los cuáles implican la realización de tratamientos alcalinos. El álcali elimina las proteínas y desacetila la quitina simultáneamente y, dependiendo de la concentración de éste, algunos glicanos solubles también son eliminados.

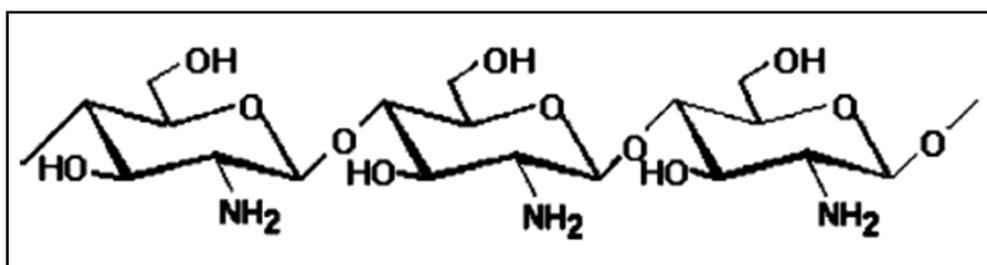


Figura 3.2. Estructura de química del polímerobiodegradable quitosán.

Actualmente, la principal fuente de quitina y de quitosán son los desechos de cangrejos y de camarones de las industrias alimentarias de Estados Unidos y Japón, y de diversas flotas de pesca en el Antártico. El tratamiento de los caparazones de crustáceos supone, de forma general, la eliminación de proteínas y la disolución del carbonato cálcico presente en elevada concentración en estos caparazones. La quitina

III. Síntesis y estudio morfológico

así obtenida se desacetila con hidróxido sódico al 40 %, a una temperatura de 120 °C y durante unas 3 horas. De esta forma se obtiene un 70 % de quitosán desacetilado (Dodane y Vilivalam, 1998).

La quitina y el quitosán tienen especial interés comercial debido a su riqueza en nitrógeno, el cuál se encuentra en el quitosán en forma de grupos amino primarios alifáticos. Los derivados del quitosán se obtienen fácilmente bajo condiciones suaves y pueden considerarse como sucedáneos de glucanos.

Casi todas las propiedades funcionales del quitosán dependen de la longitud de la cadena, la densidad de carga y su distribución, la formación de sales y el grado de desacetilación. Además, el pH al que es utilizado determina las propiedades de este polímero como sistema de transporte y liberación de fármacos (Artursson y col., 1994; Lehr y col., 1992; Kotzé y col., 1997; Sabnis y col., 1997; Tengamnuay y col., 1997).

El término quitosán se utiliza para designar una serie de polímeros de quitosán que presentan diferentes pesos moleculares (50 kDa – 2000 kDa), una viscosidad variable (< 2000 mPaS) y un grado de desacetilación entre el 40 % y el 98 %. El quitosán es una base débil que, de forma general, es insoluble en agua y disolventes orgánicos a pHs neutros o alcalinos, y es capaz de formar sales con ácidos orgánicos e inorgánicos como el ácido glutámico, el ácido hidroclorehídrico, el ácido láctico y el ácido acético. Tras disolverse, los grupos amino del polímero se encuentran protonados y el polisacárido soluble resultante presenta una carga positiva. Las formas más comunes de sales de quitosán son el glutamato de quitosán y el cloruro de quitosán.

Las sales de quitosán son solubles en agua, dependiendo la solubilidad de éstas del grado de desacetilación (y, por tanto, el valor de pK_a del quitosán) y del pH. Si el quitosán presenta un grado de desacetilación bajo ($\approx 40\%$), es soluble en soluciones acuosas de $pH < 9$, mientras que si presenta un grado de desacetilación entorno al 85 %, es soluble sólo hasta un $pH = 6.5$, por ejemplo, soluciones acuosas de ácidos diluidos como el acético o el fórmico. La solubilidad del quitosán también está fuertemente condicionada por la adición de sales al medio de disolución, de tal manera que, cuanto mayor sea la fuerza iónica del medio, menor será la solubilidad. La viscosidad de las soluciones de quitosán es mayor, cuanto mayor es la concentración de éste en el medio y menor es la temperatura. La viscosidad también aumenta con el grado de desacetilación del copolímero. Esto es debido a la

variabilidad de la configuración de la molécula en función del grado de desacetilación de ésta. Si el grado de desacetilación es elevado, situación en la que la molécula está altamente cargada, el quitosán presenta una conformación extendida con una cadena más flexible. Sin embargo, si la molécula presenta un grado de desacetilación bajo, el copolímero presenta una estructura más compacta o enrollada, debido a su baja carga eléctrica (Illum, 1998).

A nivel comercial, el quitosán (Sigma-Aldrich, Alemania) se encuentra disponible en forma de escamas secas, en solución o en forma de polvo fino. El peso molecular oscila entre 38 y 2000 kDa, y el grado de desacetilación entre el 66 y el 95 %. El tamaño de partícula, la densidad, la viscosidad, el grado de desacetilación y el peso molecular son importantes características de este polímero biodegradable y no tóxico, que determinan las propiedades de sus formulaciones farmacéuticas (Sinha y col., 2004).

3.2.1. Aplicaciones farmacéuticas

Las principales aplicaciones del quitosán en Tecnología Farmacéutica pueden resumirse en (Dodane y Vilivalam, 1998; Illum, 1998; Ravi-Kumar, 2000; Sinha y col., 2004):

- ***Administración de fármacos por vía oral***

La biodisponibilidad de los fármacos por vía oral puede ser mejorada mediante el uso de formas de dosificación mucoadhesivas, al lograr incrementarse así la residencia del fármaco en el lugar de absorción. El quitosán posee excelentes propiedades mucoadhesivas, incluso mejores que otros compuestos como la hidroxipropilcelulosa y la carboximetilcelulosa. Esta característica del quitosán ha sido ampliamente utilizada en el desarrollo de formas de dosificación mucoadhesivas. Además, esta propiedad hace del quitosán un candidato ideal para la liberación bucal de principios activos. A nivel oral, el quitosán se ha utilizado en el diseño de microesferas, microcapsulas, liposomas o microvesículas como sistemas transportadores de fármacos.

III. Síntesis y estudio morfológico

Como excipiente, el quitosán ha sido incluido en formulaciones farmacéuticas para lograr una liberación sostenida y aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles. La formación de películas mediante entrecruzamiento químico entre quitosán y glutamato han sido utilizados en el recubrimiento de pellets y comprimidos en el desarrollo de sistemas de liberación modificada de fármacos.

- ***Administración de fármacos por vía parenteral***

Los sistemas transportadores poliméricos biodegradables ofrecen interesantes ventajas, como por ejemplo, modificar las características físicas de los principios activos o protección de los mismos frente a una rápida metabolización, en la liberación prolongada de fármacos de bajo peso molecular o macromoléculas. La susceptibilidad del quitosán a la acción de lisozimas lo hace biodegradable y, de esta manera, un transportador ideal. Se ha ensayado con éxito la vehiculización de numerosos principios activos por esta vía y, por ejemplo, estudios de inmunogenicidad *in vivo* demuestran la ausencia de toxicidad de este polímero.

- ***Administración de fármacos por vía ocular***

La pobre biodisponibilidad de la mayoría de los fármacos administrados a nivel ocular, implica la necesidad de una frecuente instilación para conseguir una acción terapéutica. Se ha investigado el uso de sistemas transportadores basados en el quitosán para la administración de principios activos por vía ocular. Gracias a las propiedades mucoadhesivas de este polímero, se ve aumentado el tiempo de residencia de la formulación en el ojo y, así, la biodisponibilidad y la duración de la acción terapéutica del fármaco administrado. Además, se ha comprobado la buena tolerancia de estas formulaciones y el logro de una liberación retardada de los fármacos.

- ***Administración de fármacos por vía nasal***

Para aumentar la biodisponibilidad de principios activos administrados por vía nasal, se han utilizado numerosos potenciadores de la absorción como agentes surfactantes, sales biliares o ciclodextrinas. Sin embargo, el uso de estas sustancias implica también la aparición de numerosos efectos adversos. Ante esto, diversos estudios han demostrado la utilidad del quitosán como un sistema seguro y eficaz para

la administración nasal de principios activos, sólo observándose pequeños cambios estructurales a nivel histológico, sin ningún tipo de consecuencia tóxica en comparación con los potenciadores de la absorción clásicamente utilizados.

- ***Aplicaciones en terapia génica***

El desarrollo de nuevos sistemas transportadores en terapia génica representa un paso importante para el tratamiento de muchas enfermedades de origen genético. Una barrera crítica a superar para poder lograr una terapia génica eficaz, es la formulación de un vehículo seguro y eficaz. Entre los diferentes sistemas transportadores de naturaleza no viral, investigados destaca nuevamente el polímero chitosan. Se han obtenido prometedores resultados en la formación de complejos entre DNA y chitosan, los cuáles logran unirse a una serie de ligandos específicos de los receptores de membranas celulares. La entrada del gen terapéutico en el interior de la célula se produce mediante un proceso de endocitosis mediada por receptores. Además, se ha comprobado la baja toxicidad del chitosan a nivel celular. De esta manera el polímero permite un transporte eficaz de genes, que carece de la toxicidad asociada a otros vectores sintéticos.

3.2.2. Metodología de Síntesis

El procedimiento seguido en la síntesis de las nanopartículas de chitosan está basado en un método de coacervación que implica la obtención de las nanopartículas poliméricas por precipitación y entrecruzamiento químico. La síntesis implica la solubilización del polímero en una solución acuosa de ácido acético diluido a la que se añade una determinada cantidad de una solución de sulfato sódico, la cuál provoca la formación de un derivado insoluble de chitosan que precipita en el medio de la reacción (Berthold y col., 1996; Sinha y col., 2004; Arias y col., 2010).

Brevemente, utilizando un ultrasonidos, se preparan 100 mL de una solución de ácido acético al 2 % (v/v) y de pluronic® F-68 al 1 % (p/v), con una concentración del 0.25 % (p/v) de chitosan. A esta solución de polímero se le añaden, poco a poco (5 mL/min), 25 mL de una solución de sulfato sódico al 20 % (p/v), bajo agitación mecánica (2000 rpm). La formación de las nanopartículas de chitosan se produce instantáneamente conforme se adiciona la solución de sulfato sódico. Tras finalizar la

III. Síntesis y estudio morfológico

mezcla de las dos soluciones, se mantuvieron las condiciones de agitación mecánica (2000 rpm) durante una hora más. Como veremos posteriormente, estas son las condiciones óptimas de síntesis que permiten obtener unas nanopartículas de quitosan con el menor tamaño posible y una morfología adecuada. Posteriormente, la suspensión blanquecina obtenida de partículas poliméricas fue sometida a un procedimiento de limpieza consistente en repetidos ciclos de centrifugación (9000 rpm y 25 minutos, centrífuga de alta velocidad Centrikon T-124, Kontron, Francia) y redispersión en agua bidestilada. La suspensión de nanopartículas se consideró limpia cuando la conductividad del sobrenadante fue inferior a 10 $\mu\text{s}/\text{cm}$ (Conductimeter 525, crisol).

Para analizar la influencia que la concentración de la solución de sulfato sódico y la velocidad de agitación tienen en las características del material obtenido (rendimiento, morfología, y tamaño medio y distribución de tamaños), la síntesis fue repetida: *i*) en un rango de concentraciones de solución de sulfato sódico del 10 al 30 % (p/v); y *ii*) utilizando una velocidad de agitación de 500 a 2000 rpm.

3.2.2. Forma y Tamaño

La utilización de ambas variantes (concentración de sulfato sódico y velocidad de agitación) no indujo cambio alguno en el rendimiento de las síntesis realizadas, ni en la morfología de las partículas (siempre esférica). Además, sólo la velocidad de agitación demostró ser un parámetro determinante del tamaño medio de las nanopartículas y de la distribución de tamaños. Puede concluirse del análisis de los datos de la tabla 3.1 que las condiciones óptimas de la preparación de las nanopartículas de quitosan implican la utilización de una solución de sulfato sódico con una concentración del 20 % (p/v) y una velocidad de agitación de 2000 rpm. Los datos de tamaño que mostramos fueron obtenidos mediante la técnica PCS anteriormente comentada, y confirmados mediante análisis de microfotografías HRTEM. Para ello, se utilizaron suspensiones acuosas de partículas de quitosan con una concentración de 0.1%, (p/v). Bajo estas condiciones de síntesis se obtuvo el menor tamaño de partícula posible (150 ± 30 nm, índice de polidispersión: 0.062), adecuado para la vía de administración parenteral (figura 3.3).

Tabla 3.1. Características de las nanopartículas de quitosán sintetizadas.

Concentración de la solución Na ₂ SO ₄ [% (p/v)]	Velocidad de agitación (rpm)	Tamaño medio (nm)
10	1000	470 ± 140
20	1000	430 ± 130
30	1000	510 ± 110
20	500	880 ± 210
20	2000	150 ± 30

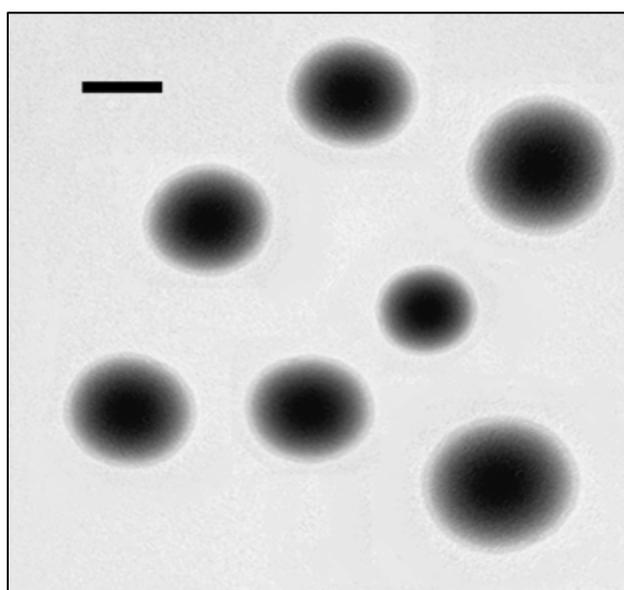


Figura 3.3. Microfotografía electrónica de transmisión de alta resolución de las partículas de quitosán. Longitud de barra: 100 nm.

Los resultados de tamaño de partícula alcanzados, incluso mejoran los obtenidos por otros autores que han empleado el mismo procedimiento de preparación, pero con otras condiciones (Berthold y col., 1996). Estas son, por lo tanto, las condiciones de la síntesis de las nanopartículas de quitosán que seguiremos en todo este trabajo.

3.3. PARTÍCULAS COMPUESTAS

3.3.1. Metodología de Síntesis

El procedimiento de síntesis que proponemos, está basado en las condiciones óptimas utilizadas en la síntesis de las nanopartículas de quitosán, es decir, el método de obtención de las partículas compuestas es el de coacervación. De esta manera, pretendemos que la precipitación del polímero ocurra bajo idénticas condiciones a las descritas en el apartado anterior, pero incorporando en la fase acuosa los núcleos magnéticos, en suspensión. Así, la formación de las nanopartículas de polímero en presencia de magnetita provoque el recubrimiento de ésta.

En primer lugar, utilizando un ultrasonidos, se preparan 100 mL de una solución de ácido acético al 2 % (v/v) y de pluronic® F-68 al 1 % (p/v), con una concentración del 0.25 % (p/v) de quitosán. A esta solución de polímero se le añade la magnetita (en proporción 3/4, magnetita/chitosán) y se homogeniza el medio usando nuevamente un ultrasonidos. A continuación se preparan 25 mL de una solución de sulfato sódico al 20 % (p/v), que se añade a la solución anterior de polímero y magnetita, con una frecuencia de 5ml/minuto y bajo agitación mecánica (2000 rpm). La formación de las nanopartículas compuestas magnetita/chitosán, se produce instantáneamente conforme se adiciona la solución de sulfato sódico, de forma que al precipitar el polímero, engloba a la magnetita. Tras finalizar la mezcla de las dos soluciones, se mantuvieron las condiciones de agitación mecánica (2000 rpm) durante una hora más. Se seleccionó la proporción magnetita/chitosán 3/4, ya que la amplia experiencia de nuestro grupo de investigación en la formulación de coloides magnéticos compuestos óxido de hierro/polímero biodegradable respalda a éstas como las mejores condiciones de síntesis en cuanto a rendimiento y tamaño (Arias y col., 2001,2007, 2008).

Los residuos de la síntesis fueron eliminados mediante ciclos consecutivos de decantación magnética mediante exposición a un campo magnético de 400 mT y redispersión en agua bidestilada mediante ultrasonidos. Este proceso de limpieza se dió por concluido cuando el sobrenadante de la suspensión de nanopartículas era transparente y su conductividad fue inferior a 10 $\mu\text{s/cm}$ (Conductimeter 525, crisol).

Todos los reactivos químicos empleados en el trabajo de laboratorio del presente trabajo de investigación son de calidad analítica y han sido suministrados por Panreac (España), excepto la formamida (Carlo Erba, Italia), el pluronic F-68, el quitosán y el metotrexato (Acofarma, España), y el diiodometano, el KOH y la acetona (Merck, Alemania). El agua utilizada ha sido doblemente destilada y desionizada en un lecho mixto de intercambio iónico, en cuya salida se encontraba un filtro de 0.2 μm (Milli-Q Reagent Water System, Millipore, USA).

3.3.2. Forma y tamaño

Tal y como se procedió en el caso de los dos tipos de partículas anteriores, el tamaño medio y distribución fue obtenido mediante la técnica de PCS anteriormente comentada. De igual forma, estos resultados fueron confirmados mediante el análisis de microfotografías HRTEM de la muestra de partículas compuestas magnetita/chitosán. Para ello, se utilizaron suspensiones acuosas de nanopartículas compuestas magnéticas con una concentración del 0.15 (p/v). El tamaño medio e índice de polidispersión de nanopartículas magnetita/chitosán es 270 ± 40 nm y 0.138, respectivamente, siendo éste un tamaño adecuado para la vía de administración parenteral. Como puede apreciarse en la figura 3.4, los núcleos magnéticos quedan embebidos dentro de una matriz de polímero biodegradable. Debido a la fusión de la cubierta de quitosán de las partículas compuestas durante el proceso de preparación de las muestras, nos fue imposible obtener una foto de las nanopartículas aisladas, con los medios disponibles. Este hecho fue previamente observado durante el análisis de microfotografías HRTEM de las muestras de nanopartículas de quitosán puro.

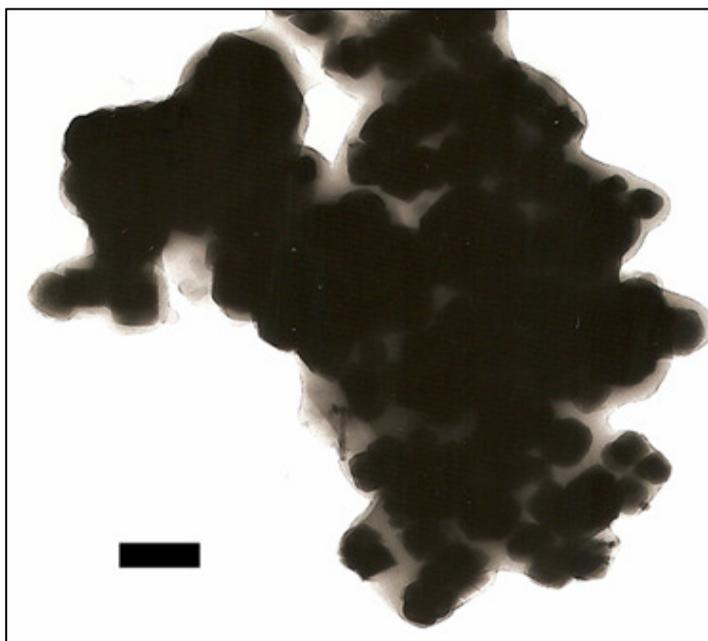


Figura 3.4. Microfotografía electrónica de transmisión de alta resolución de las partículas compuestas magnetita/chitosan. Longitud de barra: 200 nm.

3.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURAL DE LAS PARTÍCULAS COLOIDALES SINTETIZADAS

3.4.1. Difractometría de rayos x

La difractometría de rayos X permite caracterizar 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 que se resumen a continuación (Suryanarayanan, 1995):

- ***Análisis cualitativo de materiales sólidos***

La difractometría de rayos X es utilizada para la identificación de estructuras sólidas. Esto es porque 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 no deseada 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 menor aplicación en la identificación de materiales no cristalinos (amorfos).

- ***Grado de cristalinidad de sólidos***

Con frecuencia, la difracción de rayos X, se emplea en la determinación del grado de cristalinidad de los productos farmacéuticos, en especial de los polímeros. Muchos de ellos muestran características asociadas a los materiales cristalinos como por ejemplo la evolución con el tiempo del calor latente al enfriar el polímero fundido, y a 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.

- ***Cinética de reacciones en estado sólido***

Es posible caracterizar de forma fiable la cinética con la que transcurren reacciones en el estado si el patrón de rayos X del reactivo y el producto final de la reacción son diferentes.

- ***Análisis cuantitativo de materiales sólidos***

Cuando tenemos 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.

3.4.1.1. Metodología experimental

Nos centramos en la aplicación de la difracción de rayos X en el análisis cualitativo de materiales sólidos, ya que con este fin hemos utilizado esta técnica en nuestra investigación.

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. Cuando se deposita 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 se deposita sobre el soporte afecta a la orientación de los cristalitos. 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.

El difractograma de rayos X de los tres tipos de materiales (magnetita, quitosán y partículas compuestas magnetita/quitosán) se obtuvo empleando el método de Debye-Scherrer. El dispositivo utilizado fue un difractómetro Philips PW 1710 (Holanda) y la longitud de onda fue 1.5405 \AA (Cu – $K\alpha$). La masa empleada de los materiales fue 0.5 g en todos los casos. Estas muestras se obtuvieron mediante desecación de las correspondientes suspensiones acuosas a $35 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ en una estufa de desecación con circulación forzada aire (Digitronic, J.P. Selecta S.A.).

3.4.1.2. Resultados

En la figura 3.5. se recogen los difractogramas obtenidos para la magnetita (Fe_3O_4), el quitosán y las partículas compuestas (magnetita/quitosán). Al comparar los difractogramas de la magnetita y las partículas compuestas con el de la "American Society for Testing and materials" (ASTM) de la magnetita (ver figura insertada en figura 3.5.), se comprueba la perfecta coincidencia de las líneas del difractograma con las del patrón, lo que permite identificar mediante esta técnica a este material sintetizado como magnetita y apreciar la elevada cristalinidad de

ésta, incluso tras ser recubierta por el polímero biodegradable (véase por ejemplo el pico señalado con una flecha roja en la figura 3.5.). Las características semicristalinas del chitosan también quedas reflejadas en los difractogramas. Los picos característicos de este polímero están presentes en el difractograma de rayos X de las partículas magnéticas compuestas. Por lo tanto, la difracción de rayos X constituye una prueba cualitativa de la eficacia de metodología de síntesis desarrollada para la obtención de las partículas magnéticas magnetita/chitosan.

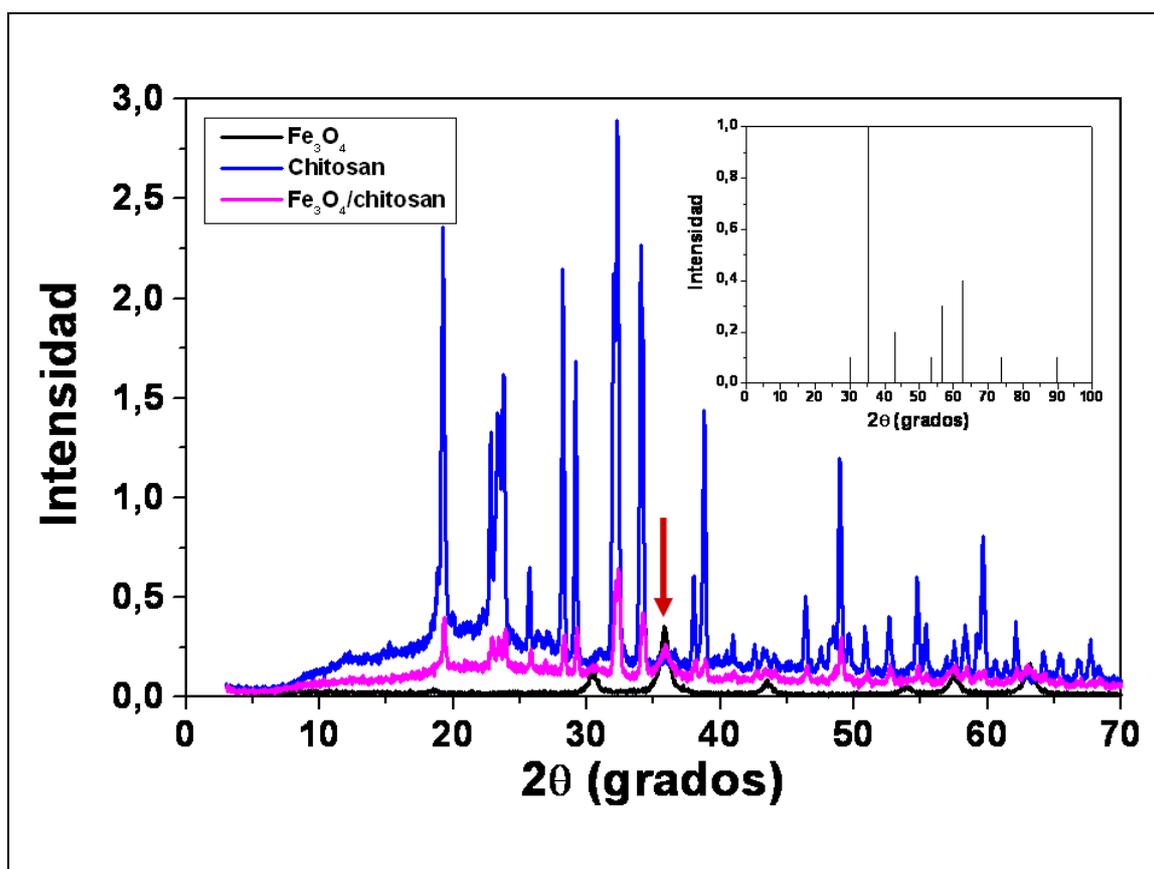


Figura 3.5. Difractograma de rayos X de las partículas de magnetita (Fe_3O_4) (línea negra), chitosan (línea azul), y compuestas Fe_3O_4 /chitosan (línea magenta). Figura insertada: Patrón de difracción de rayos X de la magnetita. La intensidad está expresada en unidades normalizadas.

3.4.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.

La radiación infrarroja se encuentra localizada en el espectro electromagnético entre la zona del visible y la zona del 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 cm^{-1} y 400 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 (κ). 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 dipolar de la molécula se observan en el infrarrojo. Esto es debido a que la alternancia del campo eléctrico, producido por el cambio en la 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 cm^{-1} , bandas fundamentales demasiado débiles para ser observadas, ausencia de un cambio en el momento dipolar, etc.).

3.4.2.1. Metodología experimental y de interpretación del espectro

Los tres tipos de muestra analizados (magnetita, chitosan y partículas compuestas magnetita/chitosan) se obtuvieron mediante desecación de las

correspondientes suspensión acuosas a 35 ± 0.5 °C en un horno de desecación por convección (Digitronic, J.P. Selecta S.A.). A continuación, se toma una pequeña cantidad de la muestra (0.5 – 1.0 mg) y se mezcla con aproximadamente 100 mg de bromuro potásico pulverizado y seco. La mezcla se realiza en un mortero de ágata y es prensada a 15000 kPa para obtener un disco transparente. Como consecuencia de este tratamiento, es de esperar la aparición de bandas en torno a 3450 cm^{-1} debidas a la humedad que contiene la muestra (Silverstein y Webster, 1998).

Para la obtención del interferograma se utilizó un espectrómetro de infrarrojos (Nicolet 20 SXB, USA), con una resolución de 2 cm^{-1} . La técnica implica la división de una radiación que contiene todas las longitudes de onda (en nuestro caso: $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$) en dos rayos (Silverstein y Webster, 1998). Uno tiene un camino óptico fijo y el otro variable (mediante un espejo móvil). La superposición de ambos 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 transformación de Fourier a sucesivos puntos a lo largo de esta variación da lugar a un espectro de infrarrojos completo. El paso de esta radiación a través de una muestra expone al compuesto a una banda amplia de energías, generándose un completo espectro de infrarrojos.

No hay reglas establecidas para la interpretación de espectros de infrarrojos. Sin embargo existen ciertos requisitos previos a la interpretación del espectro (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 y el método de manipulación de la muestra debe especificarse.

La frecuencia o la longitud de onda de absorción dependen de las masas relativas de los átomos, de las constantes de fuerza de los enlaces, 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. No es posible 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

III. Síntesis y estudio morfológico

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 referencia a tablas de la absorción característica de grupos funcionales. 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 infrarrojos se distinguen tres zonas características (Silverstein y Webster, 1998):

- La región de los grupos funcionales (4000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1}). Si no hay absorción en esta zona podría considerarse que la molécula problema carece de grupos funcionales.
- La zona de la “huella dactilar” (1300 cm^{-1} a 900 cm^{-1}). La absorción en esta región es única y característica para toda especie molecular.
- La región entre 900 cm^{-1} y 650 cm^{-1} . La ausencia de absorción en esta zona generalmente indica una estructura no aromática.

3.4.2.2. Resultados

En la figura 3.6 se recoge el espectro de infrarrojos de los tres tipos de partículas. Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento, dado que permite la identificación de los grupos funcionales del polímero en las partículas compuestas. Sin embargo, las bandas son menos intensas como consecuencia de la menor cantidad relativa de polímero presente en estas partículas compuestas magnetita/chitosan (Arias y cols., 2007). Las bandas más representativas han sido identificadas por comparación con la bibliografía de referencia (Silverstein y Webster, 1998). En concreto son:

- **A:** Banda característica de absorción correspondiente a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo libres de la molécula. Se localiza a 3446 cm^{-1} . Consideramos que a la intensidad total de la banda contribuye la banda debida a la humedad que adquieren las muestras, durante su proceso de manipulación.

- **B:** A 2874 cm^{-1} se localiza la banda perteneciente a la vibración de estiramiento del enlace C-H de una estructura alcánica cíclica. En concreto, corresponde a la vibración de elongación asimétrica del CH_2 ($\nu_{AS}\text{CH}_2$).
- **C:** Banda que corresponde a la vibración molecular del enlace C=O (1653 cm^{-1}).
- **D:** Banda ancha de absorción que se genera como consecuencia del solapamiento de diferentes bandas asociadas a varios grupos moleculares (1294 a 1427 cm^{-1}). Pensamos que a esta absorción total contribuye la banda correspondiente a la vibración molecular de flexión del enlace O-H y la banda correspondiente a la vibración del enlace C-H de la misma estructura (un alcohol primario). Además, puede estar incluida la banda correspondiente a vibración molecular de flexión de los enlaces C-H de un alcano cíclico.
- **E:** A 1075 cm^{-1} , aparece una banda ancha que corresponde a la vibración de elongación y de flexión del grupo C-CO-C, que es característica de cetonas alifáticas, y que resulta de la vibración de elongación y flexión de la cadena C-C-C presente en este grupo.
- **F:** Única banda ausente en el espectro de las nanopartículas de quitosan. Aparece a 591 cm^{-1} y es una banda ancha y relativamente intensa característica de los óxidos de hierro (Arias y cols. 2001).

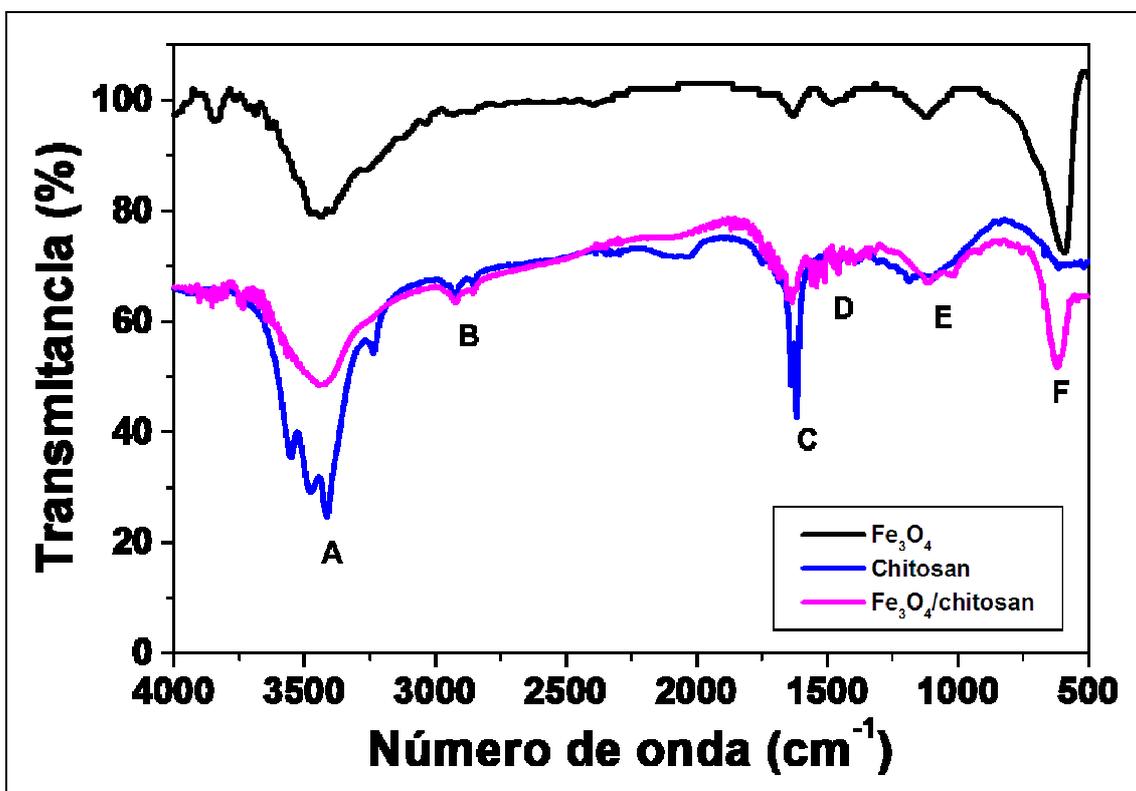


Figura 3.6. Espectro de infrarrojos de las partículas de magnetita (Fe₃O₄) (línea negra), chitosan (línea azul), y compuestas Fe₃O₄/chitosan (línea magenta).

**IV. PROPIEDADES
ELÉCTRICAS
SUPERFICIALES**

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

En este contexto, los fenómenos electrocinéticos y las técnicas asociadas a ellos demuestran su importancia. Son manifestaciones de las propiedades eléctricas de la interfase, y de aquí que merezcan atención por sí mismas. Además, son una fuente de información importante (única, en muchos casos) de estas propiedades eléctricas, por poder ser determinadas experimentalmente.

Como describiremos, la electroforesis (al igual que los demás fenómenos electrocinéticos) constituye una poderosa técnica para obtener información directa sobre el estado eléctrico de la interfase. En este trabajo hemos investigado la movilidad electroforética (u_e) de los tres tipos de partículas (núcleos magnéticos, polímero puro y partículas compuestas), como método de evaluación de la calidad y eficiencia del recubrimiento. Esto es posible dado que el comportamiento eléctrico superficial de la magnetita y del quitosán son claramente diferentes, como veremos (Arias y cols., 2007). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que una partícula de magnetita recubierta adecuadamente de quitosán se pueda diferenciar de una no

IV. Propiedades eléctricas superficiales

recubierta, analizando su comportamiento en electroforesis. Idealmente, la partícula compuesta debería incluso mostrar un potencial zeta idéntico al del látex.

4.1. DESCRIPCIÓN CLÁSICA DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA.

Admitiremos como un hecho experimental que la mayoría de los sólidos adquieren una carga eléctrica superficial cuando se dispersan en un disolvente polar, en particular, en una disolución de electrolito. Los orígenes de esta carga son diversos (Hunter, 1981, 1987; Lyklema, 1987, 1995):

1. Adsorción preferente de iones en disolución. Este es el caso de la adsorción de tensioactivo iónico. Las entidades cargadas deben tener una elevada afinidad por la superficie, para evitar la repulsión electrostática por los iones ya adsorbidos.

2. Adsorción/desorción de iones de la red. Un ejemplo típico son las partículas de yoduro de plata en disoluciones Ag^+ o I^- : los iones de la red cristalina pueden encontrar fácilmente un camino entre los espacios del cristal y pasar a formar parte de la superficie. Por ello, se denominan *iones determinantes del potencial*.

3. Disociación o ionización de grupos superficiales. Este es el mecanismo mediante el que la mayoría de los polímeros adquieren carga. Así, los grupos ácidos como el sulfato o el carboxilo son responsables de la carga negativa de las redes de polímero aniónico. 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.

4. Red de carga incompleta: sustitución isomórfica. Este es el mecanismo típico, casi exclusivo, de adquisición de carga por los minerales de arcilla: parte de los cationes Si^{4+} y Al^{3+} de la estructura ideal son sustituidos por otros iones de menor carga y, prácticamente, el mismo tamaño. Como consecuencia de esto, el cristal podrá

estar cargado negativamente y esta carga estructural habrá de ser compensada por cationes superficiales, fácilmente intercambiables en disolución (van Olphen, 1977).

Cualquiera que sea el mecanismo, y hay situaciones en las que participa más de uno de ellos, la carga neta superficial debe estar compensada por iones en torno a la partícula de modo que se mantenga la electroneutralidad del sistema. La carga superficial y su contracarga compensadora en disolución forman la doble carga eléctrica (DCE). A pesar de utilizarse la palabra “doble”, su estructura 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 o sobre ella, se pueden encontrar cargas responsables de la carga superficial σ_0 . En su proximidad inmediata, podrían localizarse los iones capaces de sufrir adsorción específica: la distancia al sólido será del orden de un radio iónico, dado que se puede suponer que han perdido su capa de hidratación, al menos en la dirección de la superficie del sólido. Llamemos σ_i a la carga superficial en un determinado plano de átomos, localizados a una distancia β_i desde el sólido (figura 4.1.). Si aceptamos que la interfase tiene una geometría plana, y que x es la distancia externa normal a esta, podemos decir que la región entre $x = 0$ y $x = \beta_i$ está libre de carga, y podemos identificar un condensador cuyas placas son la superficie y el plano β_i . Si C_i es su capacidad específica (por unidad de área):

$$\psi_0 - \psi_i = \frac{\sigma_0}{C_i} \quad (4.1)$$

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

IV. Propiedades eléctricas superficiales

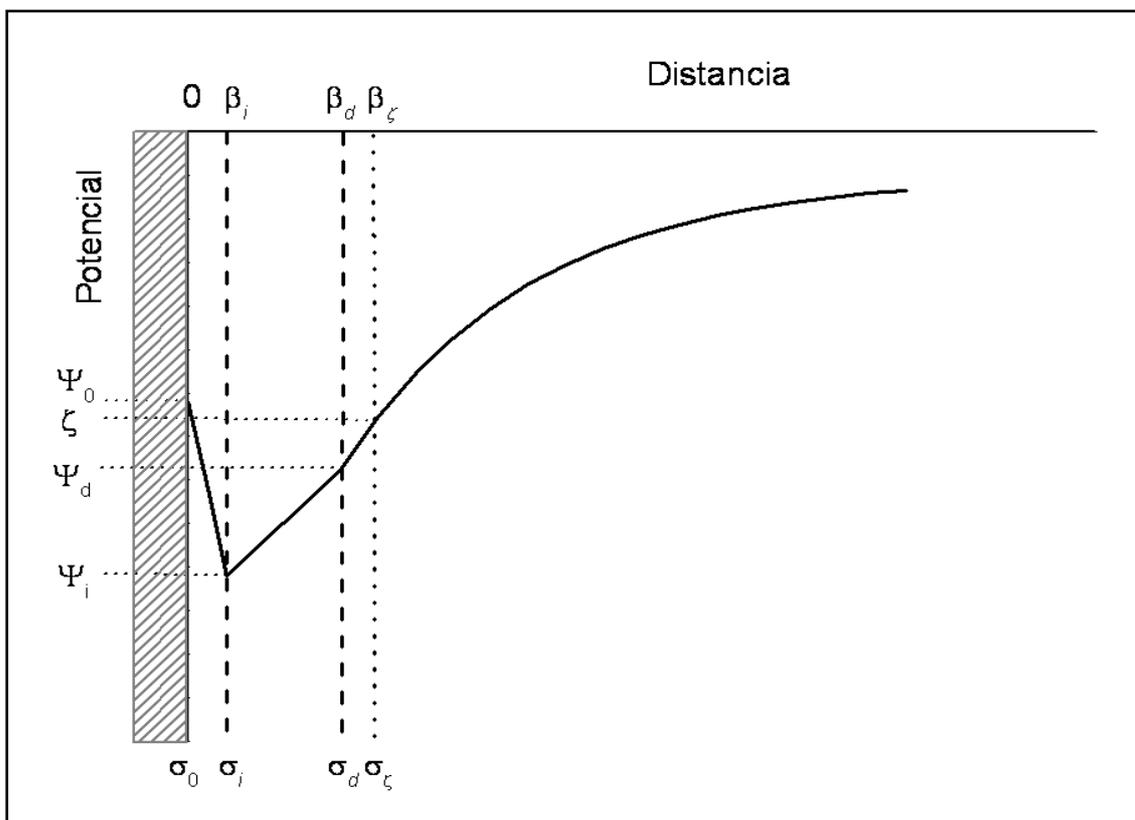


Figura 4.1. Representación esquemática de la distribución de potencial en una interfase cargada negativamente.

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: de hecho están distribuidos en un cierto volumen cuya densidad de carga es $\rho(x)$, aunque en la práctica se introduce una densidad superficial de carga difusa σ_d , localizada en $x = \beta_d$, de acuerdo con la expresión:

$$\sigma_d = \int_{\beta_d}^{\infty} \rho(x) dx \quad (4.2)$$

para una interfase plana, o:

$$\sigma_d = \frac{1}{(a + \beta_d)^2} \int_{\beta_d}^{\infty} r^2 \rho(r) dr \quad (4.3)$$

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

Debido a la electroneutralidad:

$$\sigma_0 = -\sigma_i - \sigma_d \quad (4.4)$$

Con el objetivo de familiarizarnos con la nomenclatura (desafortunadamente, hay casi tantos criterios como autores en lo concerniente a los símbolos utilizados para los diferentes potenciales), mencionaremos:

1. La distribución volúmica de carga que se extiende desde $x = \beta_d$ se denomina *capa difusa* o *parte difusa de la doble capa*.
2. 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*.
3. 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 describirse matemáticamente de una manera simple: la condición de equilibrio para los iones en esta capa puede escribirse (Russel y cols., 1989):

$$-ez_i \nabla \psi - k_B T \nabla \ln n_i = 0, \quad i = 1, \dots, N \quad (4.5)$$

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 4.5 bajo la condición $n_i = n_i^0(\infty)$ para $\psi = 0$, da lugar a la distribución de Boltzmann:

$$n_i(\vec{r}) = n_i^0(\infty) \exp[-ez_i \psi(\vec{r}) / k_B T], \quad i = 1, \dots, N \quad (4.6)$$

IV. Propiedades eléctricas superficiales

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 nos dará la relación entre el potencial y las concentraciones iónicas:

$$\nabla^2 \Psi(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0} \rho(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0} \sum_{i=1}^N e z_i n_i^0(\infty) \exp\left[-\frac{e z_i \Psi(\vec{r})}{k_B T}\right] \quad (4.7)$$

siendo $\epsilon_{rs}\epsilon_0$ la permitividad eléctrica del medio de dispersión. La ecuación 4.7 (ecuación de Poisson-Boltzmann) es el punto de partida de la descripción de Gouy-Chapman de la capa difusa.

Debe estar claro que no hay una solución general a esta ecuación en derivadas parciales, excepto en determinados casos, tales como (Dukhin, 1974; Russel y col., 1989):

a) Una interfase plana, con potencial bajo. En este caso:

$$\Psi = \Psi_d e^{-\kappa x} \quad (4.8)$$

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

$$\kappa^{-1} = \left\{ \frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0 k_B T}{\sum_{i=1}^N e^2 z_i^2 n_i^0(\infty)} \right\}^{1/2} \quad (4.9)$$

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

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

$$y(x) = 2 \ln \left[\frac{1 + e^{-\kappa x} \tanh(y_d / 4)}{1 - e^{-\kappa x} \tanh(y_d / 4)} \right] \quad (4.10)$$

donde y es el potencial adimensional:

$$y = \frac{ze\Psi}{k_B T} \quad (4.11)$$

y puede darse una expresión similar para y_d .

c) Una interfase esférica (radio a) a potenciales bajos (aproximación de Debye):

$$\Psi(r) = \Psi_d \left(\frac{a}{r} \right) e^{-\kappa(r-a)} \quad (4.12)$$

mientras que deben aplicarse soluciones numéricas o expresiones analíticas aproximadas en otros casos. Esto se ilustra en la figura 4.2., donde se comparan las ecuaciones 4.9 y 4.10 para la interfase plana; y en la figura 4.3., donde la solución aproximada (ecuación 4.10), se representa junto a resultados numéricos (López García y col., 1996).

IV. Propiedades eléctricas superficiales

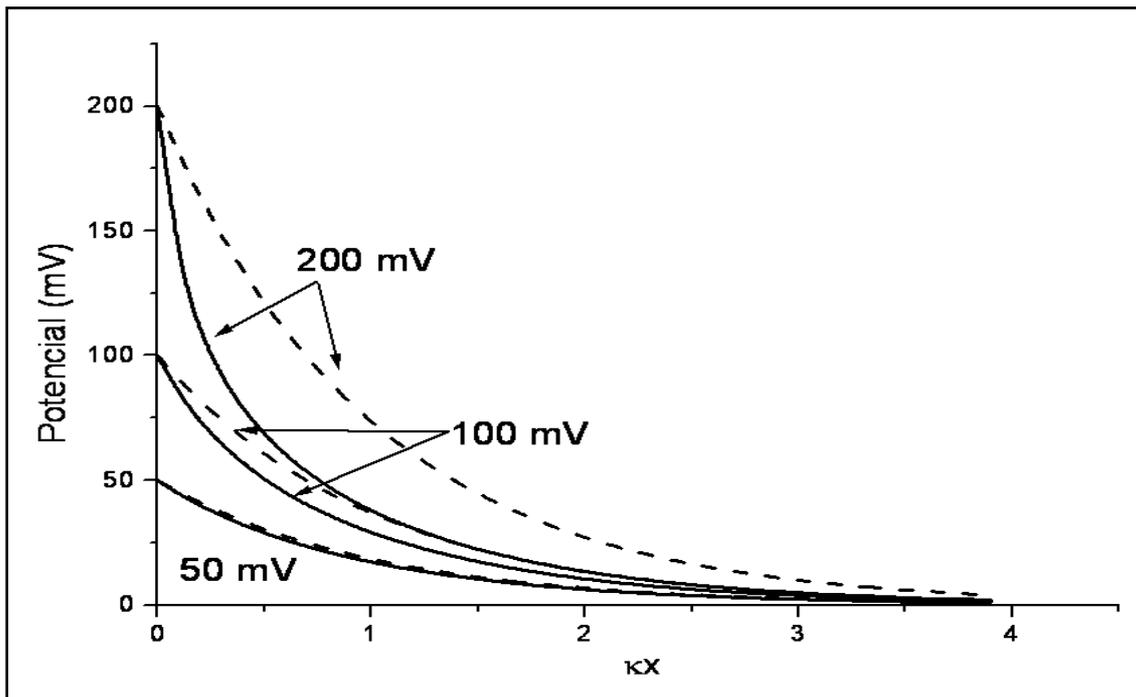


Figura 4.2. Distribución del potencial en una interfase plana, calculado mediante la fórmula aproximada de Debye-Hückel [Ecuación 4.8, (---)] y el cálculo completo [Ecuación 4.10, (-)] para los valores de ψ_d indicados. Electrolitos monovalentes.

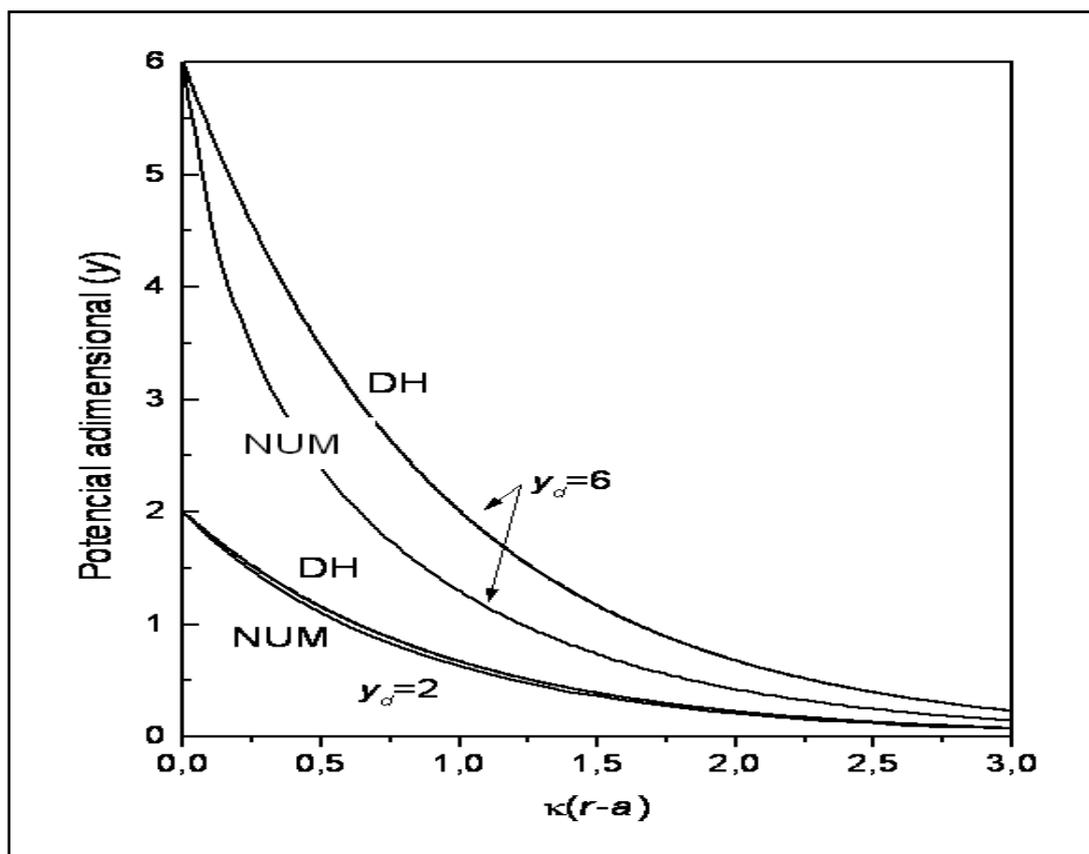


Figura 4.3. Potencial adimensional en torno a una partícula esférica en función de la distancia reducida a la superficie, para electrolitos monovalentes. *DH*: aproximación de Debye-Hückel; *NUM*: cálculo totalmente numérico (López García y cols., 1996).

4.2. FENÓMENOS ELECTROCINÉTICOS. POTENCIAL ZETA.

Supongamos que se aplica un campo eléctrico paralelamente a la interfase sólido/disolución de la figura 5.1. y que la superficie sólida está fija en nuestro sistema de coordenadas. De lo expuesto anteriormente, debe haber quedado claro que el líquido adyacente al sólido tiene una carga eléctrica neta opuesta a la de la superficie. Parte de los iones de este líquido probablemente estarán unidos fuertemente a la superficie mediante fuerzas atractivas de corto alcance y pueden considerarse inmóviles (esto es una aproximación; tales iones pueden ser móviles y, en tal caso, no es raro que su movilidad tenga un valor próximo al del núcleo de la disolución); lo mismo se admitirá con respecto al líquido en esta región. Sin

IV. Propiedades eléctricas superficiales

embargo, los iones y el líquido externo podrán ser desplazados por el campo externo: de hecho la fuerza eléctrica actuará sobre los iones (principalmente contraiones) y arrastrará líquido en su movimiento. Se producirá un movimiento relativo entre el sólido y el líquido: este es el fundamento del fenómeno electrocinético.

El potencial existente en el límite entre las fases móvil e inmóvil es conocido como *potencial electrocinético* o *potencial zeta* (ζ). La localización exacta (distancia β_ζ en la figura 5.1.) del también llamado *plano de cizalladura* o *plano de deslizamiento* es un tema de investigación y, 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 un valor infinito en la capa de Stern, a un valor finito en la atmósfera difusa. Una posible forma de salvar, al menos formalmente, esta incertidumbre es suponer una variación gradual de la viscosidad η desde la superficie hasta el inicio de la parte difusa (Dukhin, 1974; 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, donde quiera que este localizado. Tratar de extraer más información es peligroso y muy dependiente del modelo de doble capa elegido (Dukhin, 1974).

Los avances recientes de la teoría de los fenómenos electrocinéticos (Dukhin y Derjaguin, 1974; Zukoski y Saville, 1986; Mangelsdorf y White, 1990; Mangelsdorf y White, 1998a,b; Lyklema y Minor, 1998) 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 para su estimación una investigación experimental bien planificada y, a menudo, experimentos utilizando diferentes técnicas electrocinéticas.

Los diferentes fenómenos electrocinéticos pueden distinguirse mediante las fases móvil - inmóvil, la naturaleza del campo aplicado y la magnitud que debe

ser determinada experimentalmente. Comentaremos brevemente la técnica de la electroforesis, por ser la que hemos empleado en nuestra investigación.

Sea una partícula esférica de radio a en presencia de un campo eléctrico que, lejos de la partícula, es \vec{E}_∞ . Se considera que la partícula no es conductora y tiene una permitividad 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 4.9) y el radio:

$$\kappa^{-1} \gg a \quad \text{o} \quad \kappa a \ll 1 \quad (4.13)$$

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

$$\begin{aligned} \vec{F}_S &= -6\pi\eta a\vec{v}_e \\ \vec{F}_E &= Q\vec{E}_\infty \\ \vec{F}_S + \vec{F}_E &= 0 \end{aligned} \quad (4.14)$$

En estas ecuaciones, η es la viscosidad del medio de dispersión, y Q es la carga total superficial de la partícula. De la Ecuación 25:

$$\vec{v}_e = \frac{Q}{6\pi\eta a} \vec{E}_\infty \quad (4.15)$$

Si recordamos que el potencial en la superficie (Panofski y Phillips, 1975) bajo la condición de la Ecuación 24 es:

IV. Propiedades eléctricas superficiales

$$V(a) = \frac{1}{4\pi\epsilon_{rs}\epsilon_0} \frac{Q}{a} \quad (4.16)$$

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

$$\bar{v}_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} \zeta \bar{E}_\infty \quad (4.17)$$

o la movilidad electroforética (μ_e):

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} \zeta \quad (4.18)$$

a la 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:

$$\kappa^{-1} \ll a \quad \text{o} \quad \kappa a \gg 1 \quad (4.19)$$

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 todavía posible.

Hasta el momento seguimos aceptando una partícula esférica con un potencial superficial constante (ζ); otra suposición importante es que la conductividad superficial de la doble capa eléctrica es lo suficientemente pequeña como para tener una influencia despreciable en la distribución del potencial inducido por el campo. El problema se resuelve mejor si se utiliza un sistema de referencia centrado en la esfera. Como en el laboratorio, el líquido no se mueve lejos de la partícula, la utilización de un sistema de coordenadas fijo a la partícula generará una velocidad del líquido igual a $-\bar{v}_e$ a grandes distancias.

La figura 4.4. es un esquema de la situación descrita. Admitiendo la situación de doble capa, la velocidad tangencial del líquido a una distancia r de la superficie de la partícula [lo suficientemente grande cuando se compara con el grosor de la doble capa, pero pequeña cuando se compara con el radio de la partícula ($a \gg r - a \gg \kappa^{-1}$)], puede estimarse si se conoce para una interfase plana, y además es mucho más sencillo que el problema general. De hecho, la distribución de la velocidad tangencial del líquido con respecto a una interfase sólida plana con un potencial igual a ζ bajo la acción de un campo tangencial E_t es (Hunter, 1981; Lyklema, 1995; Dukhin y Derjaguin, 1974):

$$v_t(x) = -\frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} [\zeta - \psi(x)]E_t \quad (4.20)$$

donde $x = r - a$, y $\psi(x)$ es la distribución del potencial de la doble capa en equilibrio. La Ecuación 31 describe la distribución x de la velocidad electroosmótica, y para distancias que exceden el grosor de la doble capa, cuando $\psi(x) \rightarrow 0$, la velocidad se denomina velocidad electroosmótica (\vec{v}_s):

$$\vec{v}_s = -\frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} \zeta \vec{E}_t \quad (4.21)$$

IV. Propiedades eléctricas superficiales

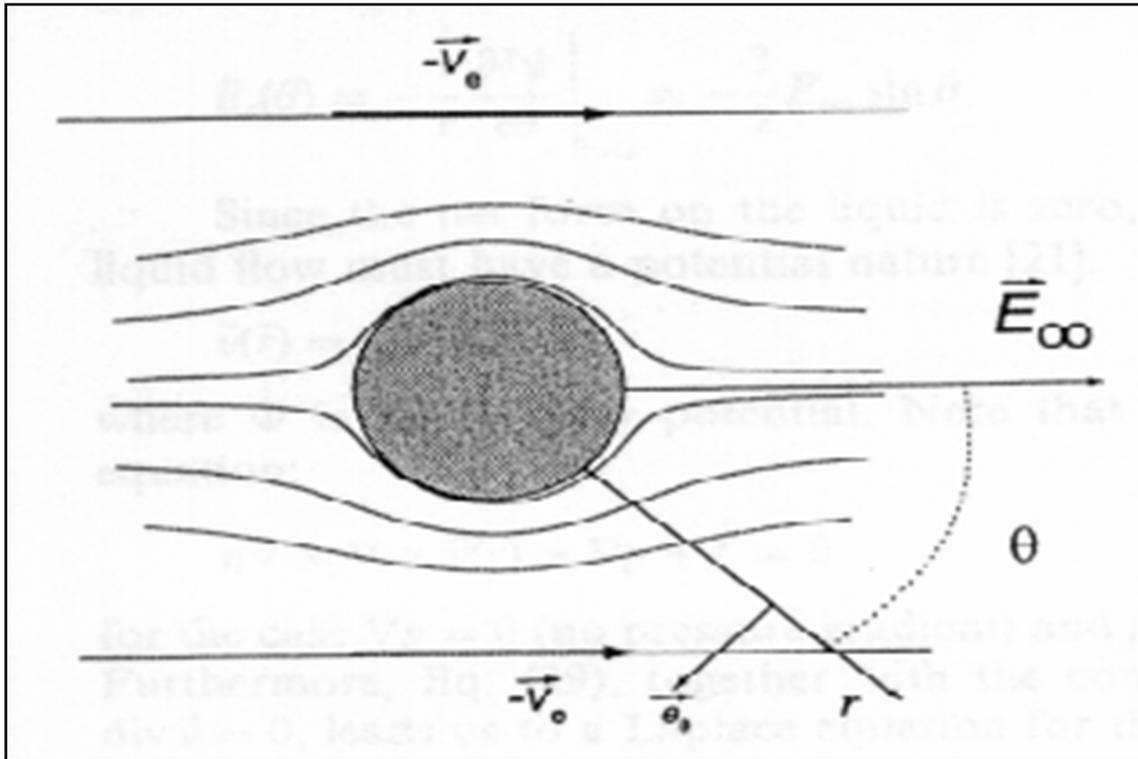


Figura 4.4. Esquema del flujo de líquido en torno a una partícula esférica cargada negativamente. Lejos de la interfase, el líquido se mueve a una velocidad constante

$$-\vec{v}_e.$$

Utilizando la ecuación 4.21 para cualquier porción casi plana de la doble capa de nuestra partícula esférica podríamos escribir:

$$\vec{v}_s(\theta) = -\frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} \zeta \vec{E}_t(\theta) \quad (4.22)$$

donde $\vec{v}_s(\theta)$ es la velocidad tangencial del líquido próximo a la superficie de la partícula, fuera de la doble capa plana y en una posición caracterizada por el ángulo θ con la dirección del campo, donde el campo tangencial es $\vec{E}_t(\theta)$.

Teniendo en cuenta que el potencial $\delta\psi(\vec{r})$ debido al campo externo en torno a la esfera viene dado por (Ohshima, 1988; Panofski y Phillips, 1975):

$$\delta\psi(\vec{r}) = -E_\infty r \cos \theta - \frac{E_\infty a^3}{2r^2} \cos \theta \quad (4.23)$$

el campo tangencial será:

$$E_t(\theta) = -\frac{1}{r} \frac{\partial \delta\psi}{\partial \theta} \Big|_{r=a} = -\frac{3}{2} E_\infty \sin\theta \quad (4.24)$$

Por otro lado, fuera de la doble capa, la fuerza eléctrica neta sobre el líquido es cero y, como no se aplica gradiente de presión, el flujo de líquido debe tener una naturaleza potencial (Landau y Lifshitz, 1959):

$$\vec{v}(\vec{r}) = -\nabla\phi(\vec{r}) \quad (4.25)$$

donde ϕ es el potencial de velocidad. Como se trata de un fluido incompresible ($\nabla \cdot \vec{v} = 0$), el potencial de velocidad obedece la ecuación de Laplace:

$$\nabla^2 \phi = 0 \quad (4.26)$$

La velocidad normal del líquido (la componente radial de $\nabla\phi$) debe ser cero en la superficie de la partícula:

$$\nabla_r \phi \Big|_{r=a} = 0 \quad (4.27)$$

Las ecuaciones 4.26 y 4.27 tienen versiones formalmente idénticas para el potencial eléctrico:

$$\begin{aligned} \nabla^2 \delta\psi &= 0 \\ \nabla_r \delta\psi \Big|_{r=a} &= 0 \end{aligned} \quad (4.28)$$

por lo tanto, el potencial de velocidad en el exterior de la doble capa debe tener una dependencia de la posición similar a la de $\delta\psi$ (Ecuación 34):

$$\phi = -\vec{v}_\infty \cdot \vec{r} - \frac{1}{2} \frac{a^3}{r^3} \vec{v}_\infty \cdot \vec{r} \quad (4.29)$$

donde \vec{v}_∞ es la velocidad uniforme del líquido lejos de la partícula (al igual que \vec{E}_∞ era el campo externo uniforme). Utilizando las ecuaciones 4.22, 4.24 y 4.29:

IV. Propiedades eléctricas superficiales

$$-\frac{1}{r} \frac{\partial \phi}{\partial \theta} \Big|_{r=a} = -\frac{3}{2} v_{\infty} \sin \theta = v_s = -\frac{\epsilon_{rs} \epsilon_0}{\eta} \zeta \left[-\frac{3}{2} E_{\infty} \sin \theta \right] \quad (4.30)$$

por lo tanto, la velocidad del líquido lejos de la partícula podrá ser:

$$\bar{v}_{\infty} = -\frac{\epsilon_{rs} \epsilon_0}{\eta} \zeta \bar{E}_{\infty} \quad (4.31)$$

La ecuación 4.31 es conocida como la ecuación de Smoluchowski para la electroósmosis.

Volviendo al laboratorio, la velocidad electroforética de la partícula será $\bar{v}_e = -\bar{v}_{\infty}$:

$$\bar{v}_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta \bar{E}_{\infty} \quad (4.32a)$$

y de aquí, se obtiene la fórmula de Smoluchowski para la movilidad electroforética:

$$\mu_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta \quad (4.32b)$$

A partir de toda esta deducción queda claro que la Ecuación 4.32b es válida para cualquier geometría a condición de que (Morrison, 1970; Overbeek, 1950):

- La partícula dispersa adquiere carga superficial que se compensa mediante un exceso de carga de signo opuesto en el medio.
- La partícula es rígida y de forma arbitraria, con potencial eléctrico superficial uniforme (ζ) con respecto al líquido lejos de la interfase.
- Las dimensiones de la partícula son tales que el radio de curvatura de la interfase en cualquier posición es mucho mayor que el grosor de la doble capa.

- La partícula no es conductora y los efectos de la conductancia superficial son despreciables.
- La constante dieléctrica y la viscosidad del medio son independientes de la posición.
- 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.

Henry (1931) fue el primer autor que eliminó la tercera restricción anterior, y resolvió el problema para esferas (también para cilindros infinitos) de cualquier radio a , es decir, cualquier valor κa , aunque para pequeños potenciales zeta, ya que se acepta que la ecuación 4.12 determina la distribución de potencial en la doble capa en equilibrio. Restringiéndonos al caso de la esfera, la ecuación de Henry para partículas no conductoras es:

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta f(\kappa a) \quad (4.33)$$

donde:

$$f(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - 5 \frac{(\kappa a)^3}{48} + \dots \quad (4.34)$$

Una fórmula aproximada para $f(\kappa a)$ ha sido publicada por Ohshima (1998).

Una contribución crucial para entender y evaluar la movilidad electroforética y, en general, la física del fenómeno electrocinético se debió a Overbeek (1943, 1950). Booth (1948a,b, 1950) también elaboró una teoría que siguió líneas similares, para esferas en ambos casos. 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 (Dukhin y Derjaguin, 1974). El problema matemático es mucho más complejo y hasta la aparición de los ordenadores sólo estaban disponibles teorías aproximadas (bajo

IV. Propiedades eléctricas superficiales

ζ , gran κa (Booth, 1948a,b; Overbeek 1943, 1950). Los primeros tratamientos (numéricos) del problema, válidos para valores arbitrarios del radio, el potencial zeta o las concentraciones iónicas, fueron elaborados por Wiersema y cols. (1966), y O'Brien y White (1978).

Como no es relevante describir estos tratamientos, simplemente mostraremos algunos resultados en la figura 5.5. La validez de la fórmula de Smoluchowski para valores elevados de κa y potenciales zeta de bajos a moderados es claramente apreciable; también es evidente que el tratamiento de Henry es válido para un ζ bajo, independientemente del grosor de la doble capa.

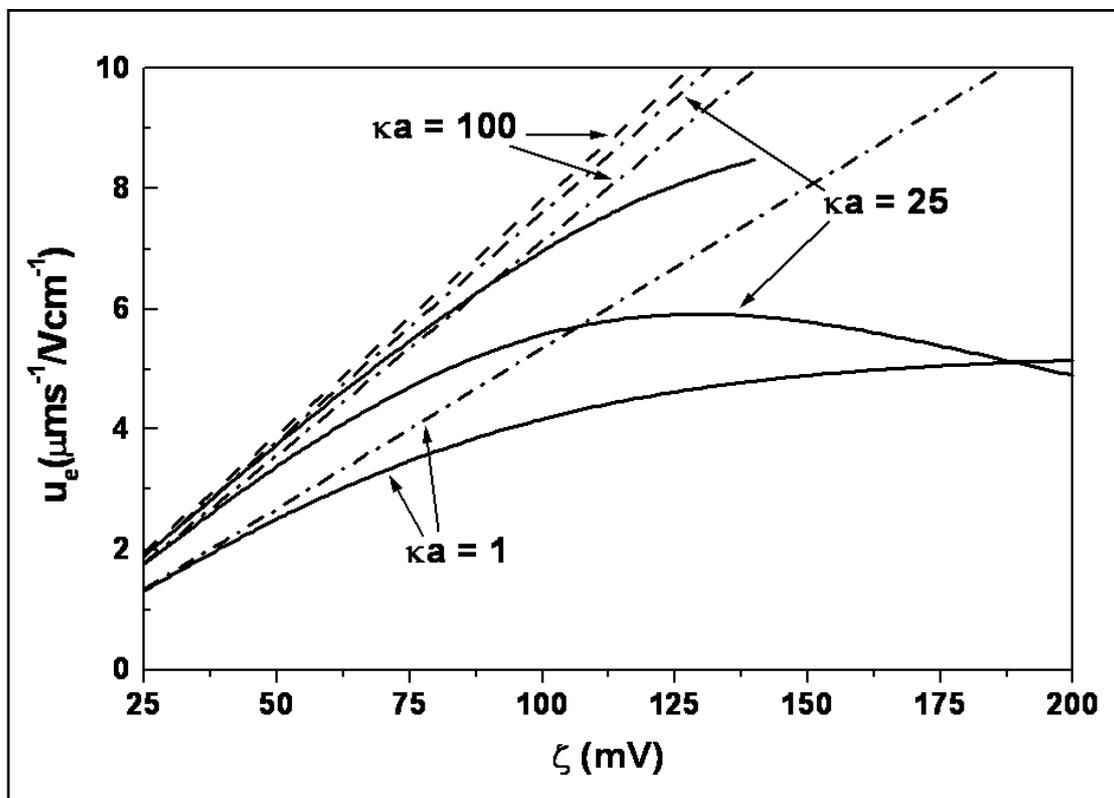


Figura 4.5. Movilidad electroforética frente potencial zeta para partículas esféricas de radio $a = 100$ nm y para $\kappa a = 1, 25$ y 100 en disoluciones de KCl. Línea discontinua (---): ecuación de Smoluchowski; líneas discontinuas-punteadas (-.-): fórmula de Henry (1931); líneas continuas (—): teoría de O'Brien y White (1978).

4.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La determinación de la movilidad electroforética de los tres tipos de partículas en suspensión (magnetita, chitosan y compuestas) se llevó a cabo a temperatura ambiente (25 °C) utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra), cuyo funcionamiento está basado en el análisis de la autocorrelación de la luz láser dispersada por las partículas en movimiento. Este aparato permite determinar u_e con errores del 5 % o inferiores. La temperatura es mantenida constante durante las determinaciones (hasta ± 0.2 °C) utilizando un módulo Peltier.

Las suspensiones estudiadas tienen una concentración de partículas aproximada del 0.1 % (p/v). Antes de preparar la suspensión se fijó la concentración de electrolito deseada y se ajustó, en su caso, el pH con HCl y NaOH. Debido a la laboriosidad del ajuste de ciertos pHs, la preparación de las suspensiones se realizó cuando estos eran estables, ya que las diferentes partículas habrían estado demasiado tiempo en disolución antes de medir, con el consiguiente riesgo para la estabilidad de sus propiedades eléctricas superficiales (fenómenos de oxidación y de degradación, principalmente) (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 ± 0.5 °C y bajo agitación mecánica a 50 r.p.m. Antes de medir se comprobó y reajustó el pH, en caso de que fuera necesario. Los datos presentados son el promedio de doce determinaciones, cambiando la muestra cada seis.

4.4. RESULTADOS

Debido a que las propiedades de los óxidos de hierro son extremadamente sensibles a las variaciones de pH (Plaza y col., 2002), lo cual no es predecible en el caso del chitosan debido a la naturaleza de los grupos amino responsables de su carga eléctrica (Arias y col., 2010), analizaremos en primer lugar el efecto del pH sobre la movilidad electroforética (u_e) y el potencial zeta (ζ) de las partículas. Utilizamos la teoría de O'Brien y White (1978) para convertir los valores de u_e en valores de ζ . La figura 4.6. muestra los valores de movilidad electroforética y potencial zeta en función del pH del medio y en presencia de NaCl 10^{-3} M.

IV. Propiedades eléctricas superficiales

Observamos que las nanopartículas de magnetita presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero bien definido en las proximidades del pH = 7, de forma que a pHs ácidos los valores de potencial zeta son positivos y a partir de pH=7 la carga eléctrica superficial es negativa. Sin embargo, en las partículas de quitosán presentan una carga eléctrica superficial neta positiva en todo el intervalo de pHs estudiado (de 3 a 9).

Resulta interesante resaltar que las nanopartículas de quitosán presentan una carga eléctrica superficial positiva a pesar de que se utilizan iones sulfato como agentes precipitantes del polímero para la obtención de las mismas, y de que grupos terminales provenientes de las moléculas terminales disociadas del agente estabilizador, pluronic[®] F-68, podrían incorporarse en la superficie del polímero biodegradable. Esto nos hace pensar que sólo parte de los grupos amino del polímero son neutralizados durante el proceso de formación de las nanopartículas de quitosán (Arias y col., 2010).

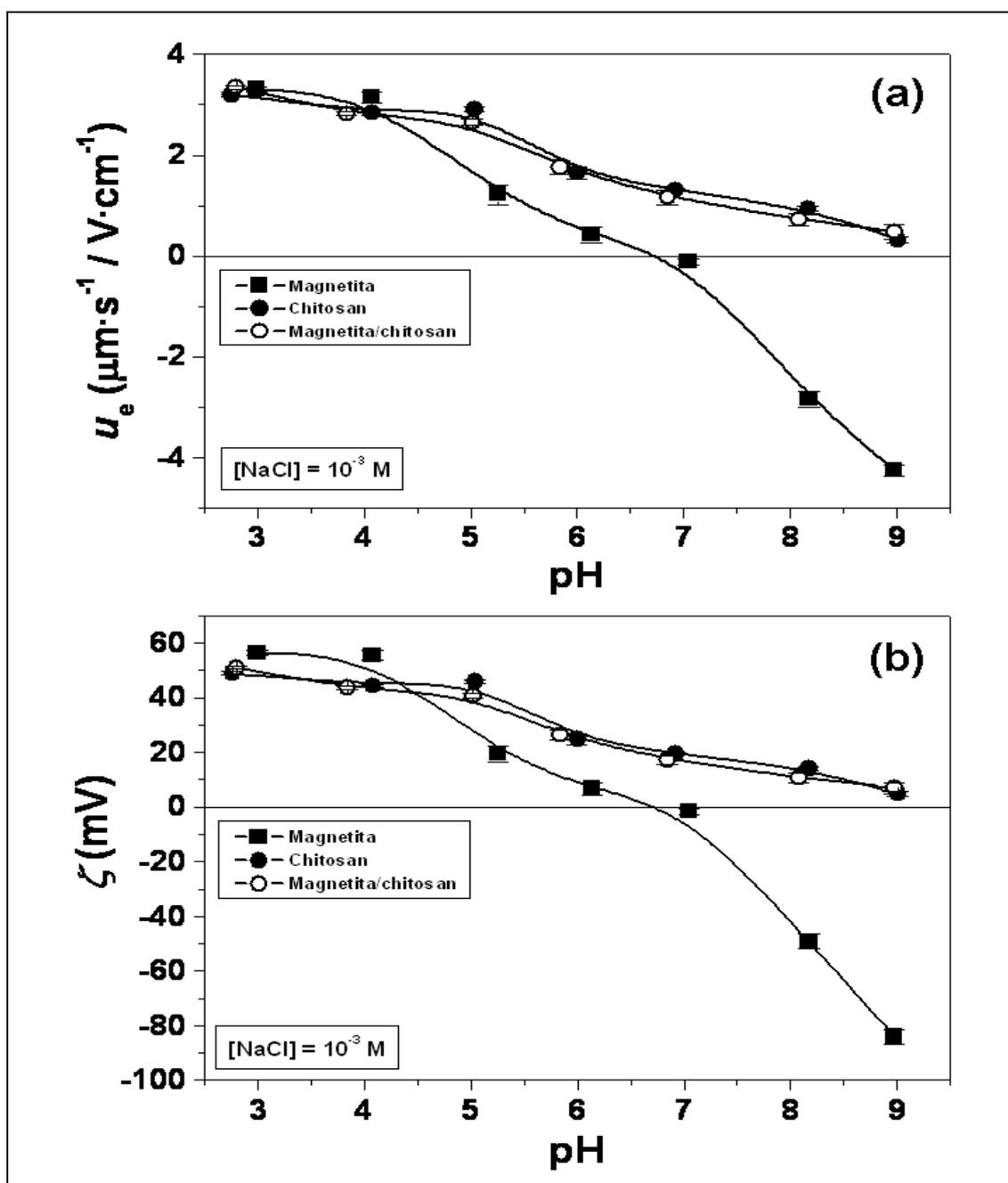


Figura 4.6. Movilidad electroforética (u_e) (a) y potencial zeta (ζ) (b) de las partículas de magnetita (■), chitosan (●) y compuestas magnetita/chitosan (○) en función del pH, en presencia de NaCl 10^{-3} M.

Las diferencias entre el comportamiento electrocinético de los núcleos magnéticos y el polímero convierten a la electroforesis en una herramienta muy útil para comprobar cualitativamente la eficacia del recubrimiento. De hecho, la figura 4.6. muestra claramente que las partículas compuestas presentan un comportamiento muy similar a las de chitosan sólo. Por lo tanto, puede afirmarse que el recubrimiento polimérico oculta eficazmente el núcleo magnético, haciendo

IV. Propiedades eléctricas superficiales

que la superficie de las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan, sea casi indistinguible de la de las nanopartículas de polímero.

Para confirmar estos resultados, realizamos la determinación del potencial zeta en función de la concentración de NaCl a pH natural (≈ 4), siguiendo la misma metodología. Los resultados de este análisis se representan en la figura 4.7., y de nuevo la electrosimilitud entre el polímero y las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan; y las diferencias con respecto a la magnetita.

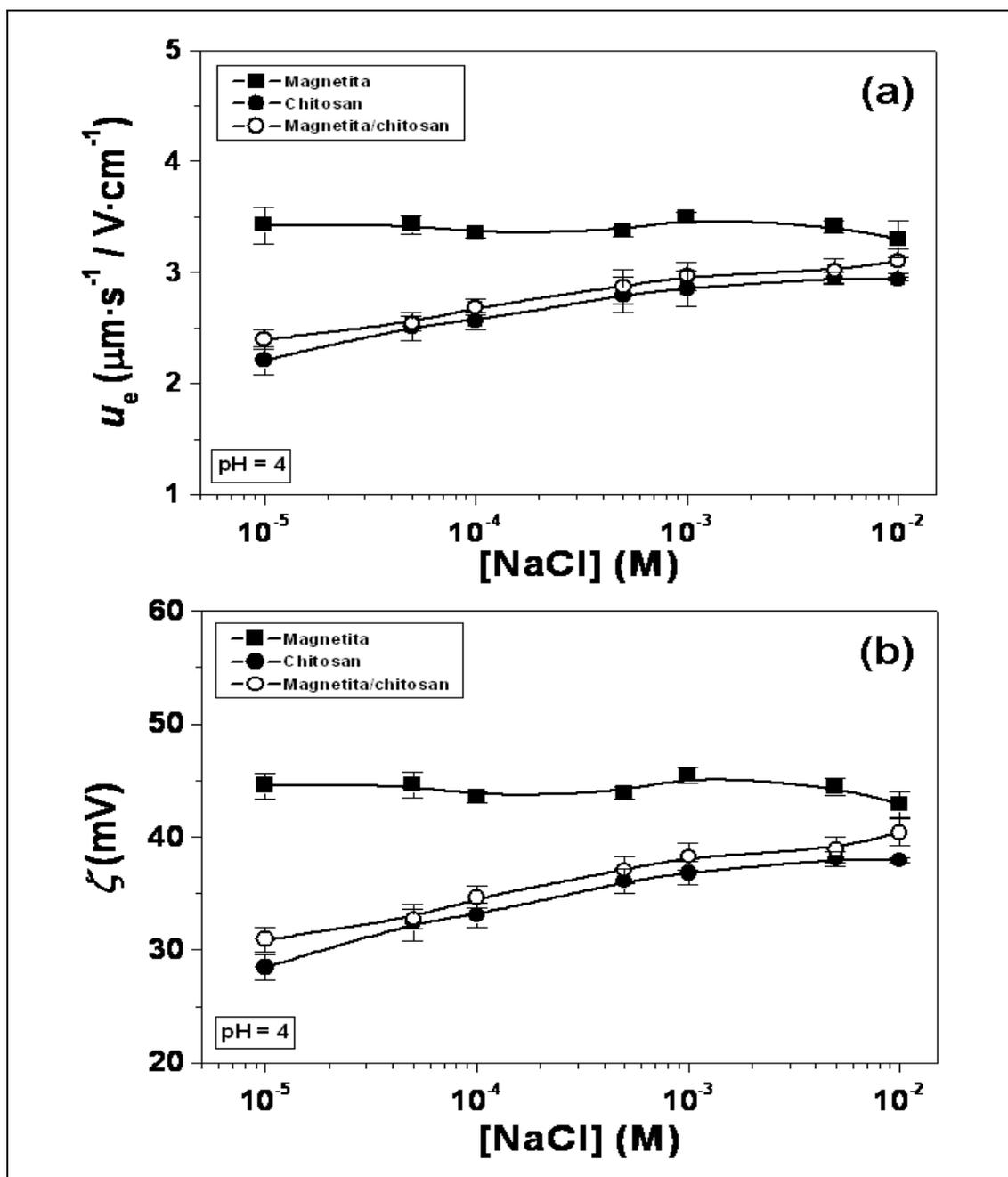


Figura 4.7. Movilidad electroforética (u_e) (a) y potencial zeta (ζ) (b) de las partículas de magnetita (■), chitosan (●) y compuestas magnetita/chitosan (○) en función de la concentración de NaCl a pH natural (pH = 5).

**V. PROPIEDADES
TERMODINÁMICAS
SUPERFICIALES**

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

De esta manera, podemos estimar la importancia de las contribuciones no electrostáticas al balance total de la energía de interacción entre las partículas de los sistemas analizados. Para ello, se utilizarán los datos experimentales de los ángulos de contacto formados por líquidos seleccionados con nuestros tres tipos de sistemas (núcleo magnético, recubrimiento polimérico y partícula compuesta). Además, se prestará especial atención al análisis comparativo de la energía libre superficial de los diferentes tipos de materiales puros: magnetita, chitosan y nanopartícula compuesta magnetita/chitosan.

5.1. INTERACCIONES SUPERFICIALES.

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

- Las interacciones dispersivas, denominadas así debido a su relación con fenómenos de dispersión de luz en el visible y ultravioleta. Son también conocidas como interacciones electrodinámicas o Lifshitz-van der Waals (*LW*) y estarán siempre

V. Propiedades termodinámicas superficiales

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) denominadas en general, interacciones no-DLVO: electrón-donante/electrón-aceptor, o ácido-base de Lewis (*AB*). El modelo teórico que nos permitirá analizarlas es el desarrollado por van Oss y col. (1986).

5.1.1. Interacciones dispersivas.

Van der Waals fue el primer autor en sugerir que en los líquidos y gases no ideales, existe entre los átomos y las moléculas una interacción de naturaleza diferente de la electrostática, a la que posteriormente se denominó interacción de van der Waals. Más adelante, numerosos investigadores analizaron la naturaleza de esta forma de interacción. Según Keesom (1921), Debye (1921) y 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, descritas por Keesom. La energía es proporcional a la cuarta potencia del momento dipolar (μ):

$$V_{Keesom} = -\frac{\mu^4}{k_B T l^6} \quad (5.1)$$

siendo k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y l la distancia interatómica (Overbeek, 1952).

- Interacciones entre dipolos permanentes y dipolos inducidos en otros átomos o moléculas (fuerzas de inducción de Debye). La energía de Debye es proporcional a la polarizabilidad (α) y al cuadrado del momento dipolar (μ):

$$V_{Debye} = -\frac{\alpha \mu^2}{l^6} \quad (5.2)$$

- Interacciones producidas entre dipolos instantáneos originados por fluctuaciones de carga eléctrica y dipolos inducidos (fuerzas de dispersión de London). La energía de London es proporcional a la energía característica ($h\nu$) y al cuadrado de la polarizabilidad (α):

$$V_{London} = -\frac{3}{4} \frac{\alpha^2 h\nu}{l^6} \quad (5.3)$$

Como vemos, 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 (Fowkes, 1963), siendo en este caso su contribución muy superior a las de Keesom y Debye, que requieren que haya dipolos permanentes (Fowkes y Mostaza, 1978). En efecto, Chaudhury y Good (1983) demostraron que, macroscópicamente, las interacciones en fase condensada son principalmente de dispersión (London-van der Waals), siendo la contribución neta de las otras dos formas del orden del 2 – 3 % del total de la energía de interacción dispersiva. En todo caso, se ha demostrado, usando el planteamiento de Lifshitz (1955), que para 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 (Chaudhury y Good, 1983). Por eso, todas ellas se pueden agrupar dentro del conjunto de interacciones electrodinámicas, denominadas genéricamente interacciones Lifshitz-van der Waals (*LW*).

Debe recordarse que aunque las interacciones dispersivas son débiles en comparación con las electrostáticas responsables del alcance iónico o del covalente, se ha podido comprobar que afectan de forma considerable a un variado conjunto de fenómenos relacionados con los sistemas de partículas coloidales, tales como adhesión, adsorción, agregación de partículas en suspensión o estructura de macromoléculas condensadas, como polímeros o proteínas (Israelachivili, 1991). Resumiendo, las características esenciales de estas interacciones son:

V. Propiedades termodinámicas superficiales

- Pueden ser efectivas entre 0.2 y 10 nm de distancia.
- Pueden ser tanto atractivas como repulsivas: en general son atractivas, pero (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. Se realiza mediante la teoría de Lifshitz de la atracción entre sistemas macroscópicos (Ninhan y Parsegian, 1970; Parsegian y Ninhan, 1969) y se denomina componente LW o Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) a la componente de la tensión superficial o energía libre superficial asociada a estas interacciones.

5.1.2. Interacciones no-DLVO.

Existen 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, como por ejemplo, el hinchamiento espontáneo de arcillas secas cuando están en contacto con agua (Van Olphen, 1977). Como tampoco se explica por qué las dispersiones de sílice no coagulan en el punto isoeléctrico en el seno de disoluciones salinas concentradas (Allen y Matijević, 1969). En nuestro grupo de investigación se han encontrado comportamientos similares en suspensiones de sulfato de zinc (Durán y col., 1995) o de látex de etilcelulosa (Vera y cols., 1995), y en general aparecen en la bibliografía numerosas observaciones de esta naturaleza en los últimos años (Laskowski y col., 1992; Pashley, 1992).

Por este motivo, ha sido necesario incluir las denominadas fuerzas no-DLVO (cuyo alcance es del orden de pocos nanómetros), entre las que se incluyen la repulsión “hidrófila”, la atracción “hidrófoba”, los enlaces de hidrógeno, los enlaces π , o la presión osmótica en suspensiones muy concentradas de polímeros. De todo este conjunto de fuerzas, las 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, 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, y los valores de estas magnitudes son diferentes de los que adquieren en el seno del líquido. Por tanto, el potencial de interacción entre moléculas situadas a esas distancias, puede ser muy distinto del esperado en teorías del continuo. Así, 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 (Israelachivili, 1991).

Si consideramos un modelo líquido formado por moléculas esféricas, su solvatación (o estructuración) en torno a una molécula de soluto o incluso del propio disolvente vendrá determinada principalmente por la geometría de las moléculas y por su capacidad de empaquetamiento. Cuando las interfases presentes son líquido – líquido o sólido – líquido se producen claras oscilaciones de densidad, pero en el caso de una interfase líquido – vapor tales oscilaciones no existen (Israelachivili, 1991).

Si se trata de dos interfases separadas una distancia determinada, el efecto es aún más notable. Sólo con consideraciones geométricas, sin tener en cuenta interacciones atractivas entre las moléculas de disolvente y las paredes, las moléculas se ven forzadas a acomodarse entre las dos superficies siguiendo un cierto ordenamiento que origina la fuerza oscilatoria de solvatación (Christenson, 1988; Christenson y Horn, 1985; Horn e Israelachivili, 1981).

Esta situación se complica más en los sistemas físicos reales en los que las moléculas de líquido no son esféricas, interaccionan mediante potenciales anisótropos y, además, las interfases no son estrictamente lisas desde un punto de vista atómico. Cuando se da 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, tiene una componente repulsiva de largo alcance. Por el contrario, si la interacción superficie – líquido es más débil que

V. Propiedades termodinámicas superficiales

la interacción líquido – líquido, la fuerza de solvatación oscilatoria tiene una componente monótona atractiva.

La capacidad del agua para formar enlaces de hidrógeno, parece estar relacionada con las repulsiones hidrófilas y las atracciones hidrófobas. En el primer caso, la intensidad de la repulsión vendría dada por la energía necesaria para romper los enlaces entre las moléculas de agua y la superficie sólida. De igual forma, si la superficie es hidrófoba, el enlace de hidrógeno entre la misma y las moléculas de agua será muy débil o incluso inexistente. La orientación de las moléculas en las proximidades de tal superficie es desfavorable desde el punto de vista entrópico. Las moléculas de agua, prefieren entonces enlazarse entre sí y “salir” de la región donde se da esta restricción, produciéndose así una reducción de la energía libre superficial del sistema y una atracción neta entre las superficies sólidas.

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

5.1.3. Contribuciones a la energía libre superficial. Teoría de van Oss, Good y col.

Para poder predecir el valor que adquieren las interacciones ya descritas [Lifshitz-van der Waals (LW) y ácido-base (AB)] es necesario hacer previamente una caracterización termodinámica superficial. Para ello, consideraremos el proceso reversible de acercar dos sistemas físicos en el vacío, formados por un sólido o líquido, 1 , hasta formar una fase continua (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 ella podremos definir la tensión superficial (o energía libre superficial) del material 1 (γ_1) de la forma:

$$\Delta G_{C,1} = -W_{C,1} = -2\gamma_1 \quad (5.4)$$

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

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 1 – 2. Se define entonces la tensión interfacial (γ_{12}) mediante la ecuación:

$$\Delta G_{A,12} = -W_{A,12} = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad (5.5)$$

conocida como ecuación de Dupré (Adamson, 1982).

Cuando se unen dos sistemas físicos como los descritos, 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, con lo que la ecuación de Dupré queda de la forma:

$$\Delta G_{123} = \gamma_{13} - \gamma_{12} - \gamma_{23} \quad (5.6)$$

Esa variación de energía libre será una medida de la energía de interacción entre los sistemas 1 y 3 en el medio 2. Si 1 y 3 son el mismo material, 1, en el medio 2:

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} \quad (5.7)$$

Este es el caso de la interacción entre partículas idénticas en suspensión en un medio líquido.

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 nuestros sistemas físicos, nos permitirá determinar los valores de energía libre superficial e interfacial y, a partir de ellos, evaluar la naturaleza y el alcance de las interacciones de origen no electrostático en la interfase.

Las investigaciones sobre la tensión superficial y sus componentes han sido realizadas principalmente por van Oss y col. (van Oss, 1993, 1994; van Oss y Good, 1989; van Oss y col., 1986, 1987a,b, 1988a,b). La ecuación que

V. Propiedades termodinámicas superficiales

constituye la base para el desarrollo de su modelo 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):

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + \gamma_1^{AB} \quad (5.8)$$

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 5.8 se puede hacer extensiva a la energía libre de la interfase $1/2$:

$$\gamma_{12} = \gamma_{12}^{LW} + \gamma_{12}^{AB} \quad (5.9)$$

A continuación, se expresará matemáticamente cada uno de los dos sumandos de la tensión superficial de la ecuación 5.9. Utilizando la regla de Good y Girifalco (1960), el primer término γ_{12}^{LW} queda de la forma:

$$\gamma_{12}^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}} \right)^2 = \gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW} - 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} \quad (5.10)$$

La obtención del segundo sumando (γ_{12}^{AB}) no puede hacerse mediante la regla anterior, pues como ya indicó Fowkes (van Oss, 1994) no es aplicable a las interacciones AB , que son esencialmente asimétricas. Se postula entonces, y esta es la contribución esencial de estos autores, la siguiente regla de combinación para la componente AB de la tensión interfacial:

$$\gamma_{12}^{AB} = 2\left(\sqrt{\chi_1^+\chi_1^-} + \sqrt{\chi_2^+\chi_2^-} - \sqrt{\chi_1^+\chi_2^-} - \sqrt{\chi_1^-\chi_2^+}\right) = 2\left(\sqrt{\chi_1^+} - \sqrt{\chi_2^+}\right)\left(\sqrt{\chi_1^-} - \sqrt{\chi_2^-}\right) \quad (5.11)$$

donde χ^+ y χ^- 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 56 para una fase queda de la forma:

$$\gamma_1^{AB} = 2\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} \quad (5.12)$$

Sustituyendo la Ecuación 5.12 en la Ecuación 5.8:

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + 2\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} \quad (5.13)$$

Sustituyendo las Ecuaciones 5.10 y 5.11 en la ecuación 5.9, y teniendo en consideración la ecuación 5.13, se obtiene:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2\sqrt{(\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW})} - 2\sqrt{(\gamma_1^+ \gamma_2^-)} - 2\sqrt{(\gamma_1^- \gamma_2^+)} \quad (5.14)$$

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

Es usual hacer una clasificación de las sustancias 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 finalmente, apolares si se anulan ambas componentes.

Como se puede observar, si una sustancia es monopolar, no existe el término γ^{AB} y la tensión superficial total (γ) es entonces igual al término LW . No obstante, tales sustancias pueden interactuar 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. No obstante, cuando 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, 1963; Hamaker, 1937; Visser, 1972), siempre que la componente apolar del líquido (γ_2^{LW}) cumpla: $\gamma_1^{LW} < \gamma_2^{LW} < \gamma_3^{LW}$ (Neumann y col., 1979; van Oss y col., 1988a).

V. Propiedades termodinámicas superficiales

En cuanto a la componente AB , la interacción neta entre dos cuerpos polares en un medio líquido puede ser repulsiva, siempre y cuando los dos cuerpos sean del mismo material y se verifique que los valores de γ^+ y $\bar{\gamma}$ del líquido estén comprendidos entre los valores de γ^+ y $\bar{\gamma}$ del material polar (van Oss, 1994).

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 γ^{LW} y γ^\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 la fase 2 será:

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} = -2\left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}}\right)^2 - 4\left(\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}\right) \quad (5.15)$$

Nótese que un valor positivo de ΔG_{121} implicaría una repulsión neta entre las superficies (*presión de hidratación* o interacción *hidrófila*). Teniendo en cuenta que ΔG_{121}^{LW} es siempre negativo, el carácter atractivo o repulsivo de la interacción, representado por el valor de ΔG_{121} , dependerá de la contribución ácido-base ΔG_{121}^{AB} . En medio acuoso, la componente AB de la energía de cohesión del agua, debido a sus enlaces por puentes de hidrógeno es 102 mJ/m^2 , valor 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 $\bar{\gamma} \neq 0$) (van Oss y col., 1988a), 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 verifica 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*, por lo que, dichas interacciones tienen su origen en intercambios AB (ácido – base de Lewis) entre la superficie de las partículas dispersas y el medio de dispersión, generalmente agua. En ambos casos, la componente AB del cambio de energía libre de Gibbs

asociado a dicha interacción, sería la fuerza termodinámica responsable de la misma.

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. 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 (Chibowski y col., 1993; Durán y col., 1994, 1995). En este trabajo nos centramos en una breve descripción de la técnica de medida de ángulos de contacto, ya que es la utilizada en nuestra investigación.

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

La definición termodinámica del ángulo de contacto viene dada por la ecuación de Young. Para una superficie sólida, 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 col., 1972):

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_L \cos \theta \quad (5.16)$$

donde γ_{SV} , γ_{SL} y γ_L son, respectivamente, las tensiones interfaciales sólido – vapor y sólido – líquido, y la tensión superficial del líquido. La Ecuación 61 se puede escribir de la forma:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta + \pi_e \quad (5.17)$$

V. Propiedades termodinámicas superficiales

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

$$\pi_e \equiv \gamma_s - \gamma_{SV} \quad (5.18)$$

esto es, la presión bidimensional que ejerce el vapor adsorbido sobre la superficie sólida. En el caso de que γ_s sea superior a γ_L , esta adsorción provoca una disminución de la tensión superficial del sólido, hasta alcanzar, en caso de saturación, el valor de la tensión superficial del líquido (Janczuk y col., 1987, 1989).

Bajo estas condiciones límite, $\pi_e = \gamma_s - \gamma_L$ (Janczuk y col., 1989). En el caso contrario, que corresponde generalmente a sólidos de poca energía superficial como los utilizados en este trabajo, π_e es despreciable y la ecuación de Young se puede escribir:

$$\gamma_s = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta \quad (5.19)$$

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 se retrae tras ser depositada y se desplaza sobre zonas ya mojadas), siendo los respectivos ángulos de contacto θ_a (avance) y θ_r (retroceso). Se verifica que θ_r es siempre inferior a θ_a . Este fenómeno puede dificultar la estimación del verdadero ángulo de contacto, pues existe una gran dependencia entre la amplitud de la histéresis y el volumen de la gota utilizado. Este efecto se puede minimizar disminuyendo el volumen de la gota de líquido.

Good (1977) justifica el fenómeno de la histéresis como una consecuencia de la heterogeneidad de la superficie: los ángulos de avance supondrían una interacción preferente del líquido con las zonas de menor energía superficial y viceversa. No obstante, un trabajo más 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). Nuestras medidas experimentales se han realizado sobre el ángulo de avance.

Una vez medidos los ángulos de contacto es posible determinar las componentes de la energía superficial del sólido. Sustituyendo en la ecuación 5.19 el valor de γ_{SL} dado por la ecuación 5.14, se obtiene:

$$2\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+} = \gamma_L(1 + \cos\theta) \quad (5.20)$$

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 como la ecuación 5.20 con la que calcular los valores de las componentes del sólido. Por lo general, se suelen utilizar dos líquidos polares y uno apolar.

El análisis termodinámico superficial se ha realizado en los tres tipos de partículas sintetizadas: núcleo magnético (magnetita), polímero biodegradable (chitosan) y partículas compuestas (magnetita/chitosan). Los líquidos empleados son: diiodometano (Merck, Alemania), agua bidestilada (Milli-Q Academic, Millipore, Francia) y formamida (Carlo Erba, Italia). En la aplicación del modelo de van Oss se utilizaron los datos bibliográficos recogidos en la tabla 5.1., donde se especifican los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba utilizados (van Oss y Good, 1989).

Tabla 5.1. Componentes de la tensión superficial (mJ/m²) a 20 °C de los líquidos utilizados en el experimento de medida del ángulo de contacto, en y a 20 °C.

Líquido	γ^W	γ^+	γ^-	γ
Agua	21.8	25.5	25.5	72.8
Formamida	39.0	2.28	39.6	58.0
Diiodometano	43.6	0.0	0.0	43.6

La medida de los ángulos de contacto se ha realizado a 25.0 ± 0.5 °C utilizando un telegoniómetro Ramé-Hart 100-0.7-00 (USA) para observar las gotas de líquido depositadas sobre un sólido. Este aparato dispone de un conjunto de tornillos

V. Propiedades termodinámicas superficiales

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 Gilson permite controlar el volumen de la gota depositada entre 2 y 4 μL . La superficie del sólido a estudiar se obtuvo por compresión del material seco en una prensa hidráulica Spepac a una presión fijada de 148 MPa durante 5 minutos. Los comprimidos obtenidos tenían un radio de 1.3 cm.

5.3. RESULTADOS

El objetivo de este estudio es obtener una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento de los núcleos de magnetita por el polímero biodegradable chitosan. La caracterización de las propiedades termodinámicas superficiales de los materiales utilizados en nuestro trabajo comienza con la determinación de los valores de los ángulos de contacto formados por tres líquidos seleccionados en la superficie de estos. En la figura 5.1 se recogen los valores de ángulo de contacto promedio de 12 determinaciones realizadas midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Los resultados ponen de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los tres tipos de partículas.

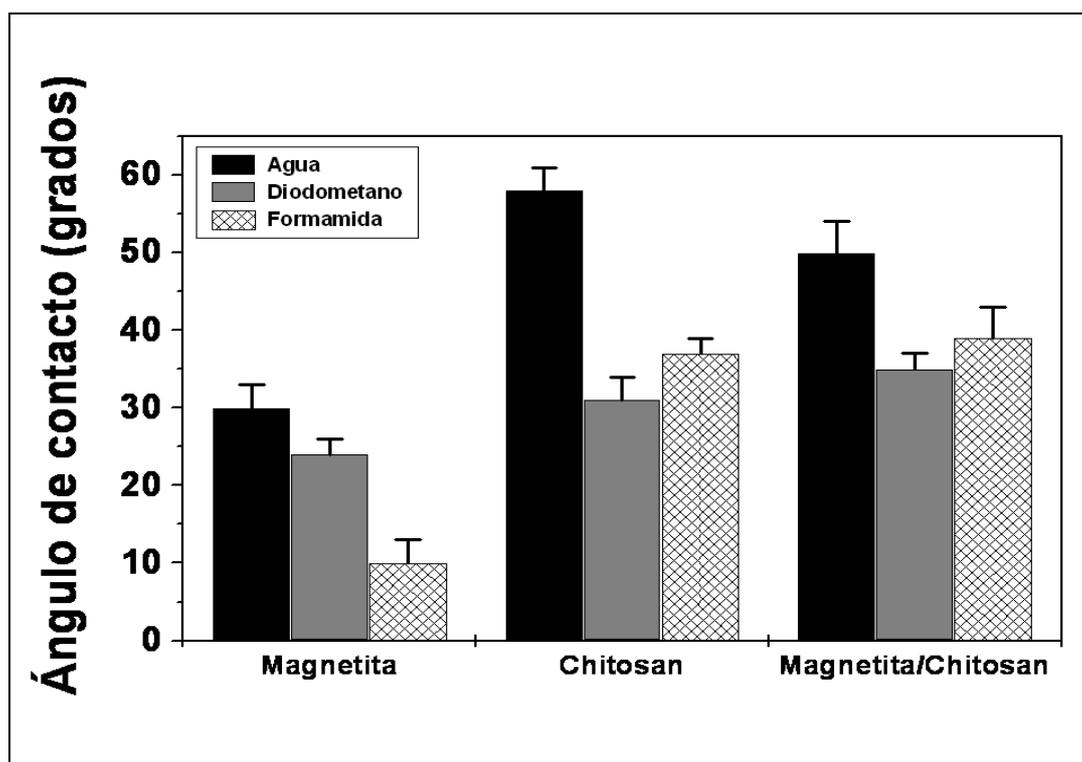


Figura 5.1. Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones en comprimido con magnetita, chitosan y partículas compuestas magnetita/chitosan.

5.3.1. Componentes de la energía libre superficial

Los componentes de la energía libre superficial (γ_s^{LW} , γ_s^+ , γ_s^-) de los tres tipos de partículas constituyen un grupo de magnitudes físicas que pueden ser analizadas para demostrar la eficiencia del recubrimiento. Los valores de estas componentes (figura 5.2) confirman en gran medida nuestras estimaciones basadas en las propiedades electrocinéticas, en particular, para cualquier componente considerado, sus valores para las partículas compuestas son similares a los del polímero. La componente Lifshitz-van der Waals es la menos afectada por el tratamiento superficial, como suele ser habitual (Plaza y cols., 1998). Respecto a la componente electrón-aceptor (γ_s^+), a pesar de ser pequeña en los tres casos, adquiere valores menores para el chitosan y para las partículas compuestas.

En concreto, 0.511 mJ/m^2 y 0.216 mJ/m^2 , respectivamente, frente a 0.766 mJ/m^2 en el caso de los núcleos de magnetita. La contribución electrón-donante (γ_s^-) presenta un valor elevado en la magnetita, mucho mayor que el encontrado para

V. Propiedades termodinámicas superficiales

polímero y para las partículas magnetita/chitosan. El elevado valor de esta última componente en el caso de la magnetita confirma su carácter monopolar electrón-donante, en el sentido dado al término por van Oss: puede tener interacciones ácido – base con fases de cualquier polaridad (γ^+ , γ^- , o ambas, diferentes de cero) pero las fuerzas AB no contribuyen a su energía libre de cohesión. Debemos decir que es bastante general el comportamiento monopolar en los materiales inorgánicos (Durán y col., 1994, 1995; Chibowski, 1992; Chibowski y Holysz, 1992), si bien Janczuk y col., (1989, 1993) han encontrado un carácter bipolar en la calconita y la galena.

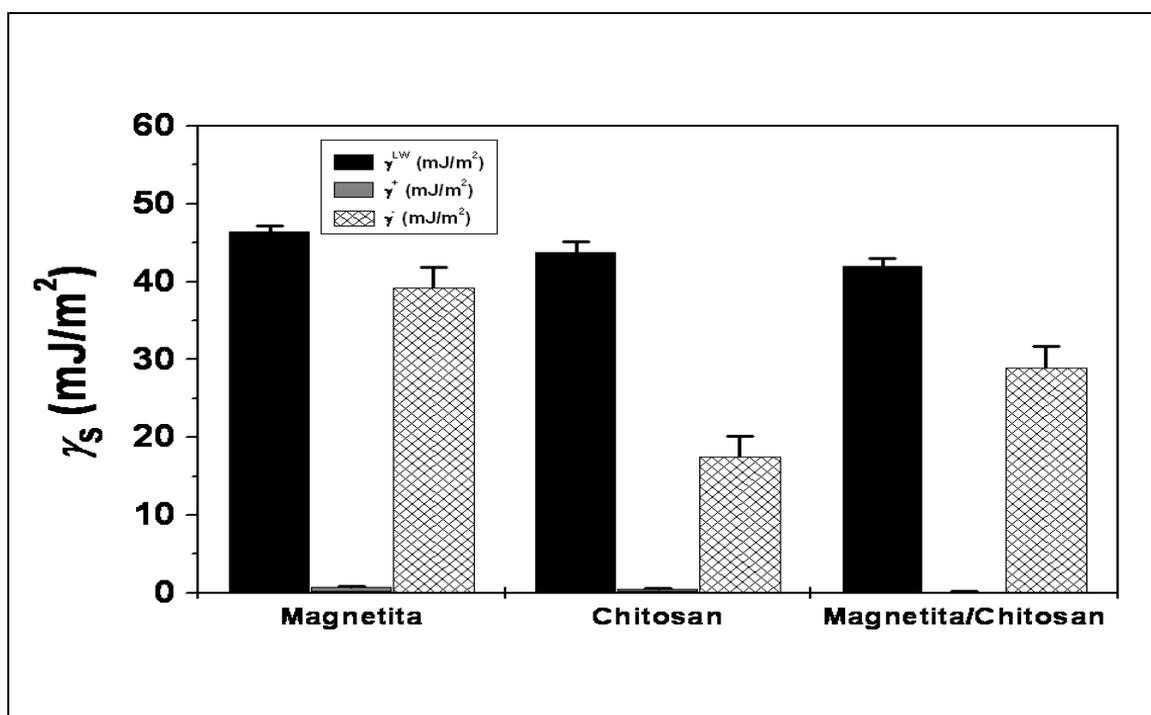


Figura 5.2. Componentes de la energía libre superficial (γ_s^{LW} , γ_s^+ , γ_s^-) de los tres tipos de partículas: magnetita (Fe_3O_4), chitosan, y compuestas magnetita/chitosan

Al igual que ocurre con la caracterización electrocinética de las partículas, el análisis termodinámico de estas sugiere que el recubrimiento es completo, ya que las componentes de γ_s de las partículas compuestas magnetita/chitosan son similares a las correspondientes al polímero puro.

5.3.2. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba

Las interacciones implicadas en la determinación de la energía libre superficial de los sólidos se manifiestan en fenómenos como la agregación de partículas en suspensión o su adhesión a diferentes sustratos. La idea que subyace a nuestro estudio es que las metodologías empleadas, junto con su base teórica, permiten, por un lado, especificar completamente la componente LW de la energía de interacción entre partículas dispersas (contemplada, junto con la repulsión electrostática entre dobles capas, en la teoría clásica $DLVO$), y, por otro lado, cuantificar igualmente las contribuciones no- $DLVO$ a la energía total, que se relacionan con la componente AB de la tensión 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 las partículas descritas en este trabajo (fase 1) en medio acuoso (fase 2):

$$\Delta G_{121} = \Delta G_{121}^{LW} + \Delta G_{121}^{AB} \quad (5.21)$$

Haciendo uso de la ecuación 5.15, pueden obtenerse los valores de ΔG_{121}^{LW} y ΔG_{121}^{AB} que se muestran en la tabla 5.2, en la que se puede observar 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 (Plaza y col., 1998). 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 partículas. 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 ΔG_{121} . Por el contrario, tanto las partículas compuestas como el chitosan tienen valores negativos de ΔG_{121} (atracción hidrófoba), que se añaden a la atracción de van der Waals (Arias y col., 2007).

V. Propiedades termodinámicas superficiales

Tabla 5.2. Energía libre de interacción entre las partículas y sus componentes *AB* y *LW* en medio acuoso.

	ΔG_{121}^{LW}	ΔG_{121}^{AB}	ΔG_{121}
Magnetita	-9.245±	20.376±	11.131±
Chitosan	-7.597±	-14.848±	-22.445±
Compuestas	-6.58±	6.092±	-0.488±

Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los materiales estudiados. De acuerdo con van Oss (1994), puede utilizarse el siguiente criterio para determinar cuándo un material puede considerarse hidrófilo o hidrófobo. Si ΔG_{121} resulta ser negativo, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las partículas, y son consideradas hidrófobas. La hidrofilia y repulsión, estará asociada a valores positivos de ΔG_{121}^{TOT} . La figura 5.3 muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de partículas. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde, al ser recubierta por el polímero hidrófobo, una clara indicación, de nuevo, de que dicho recubrimiento es eficaz.

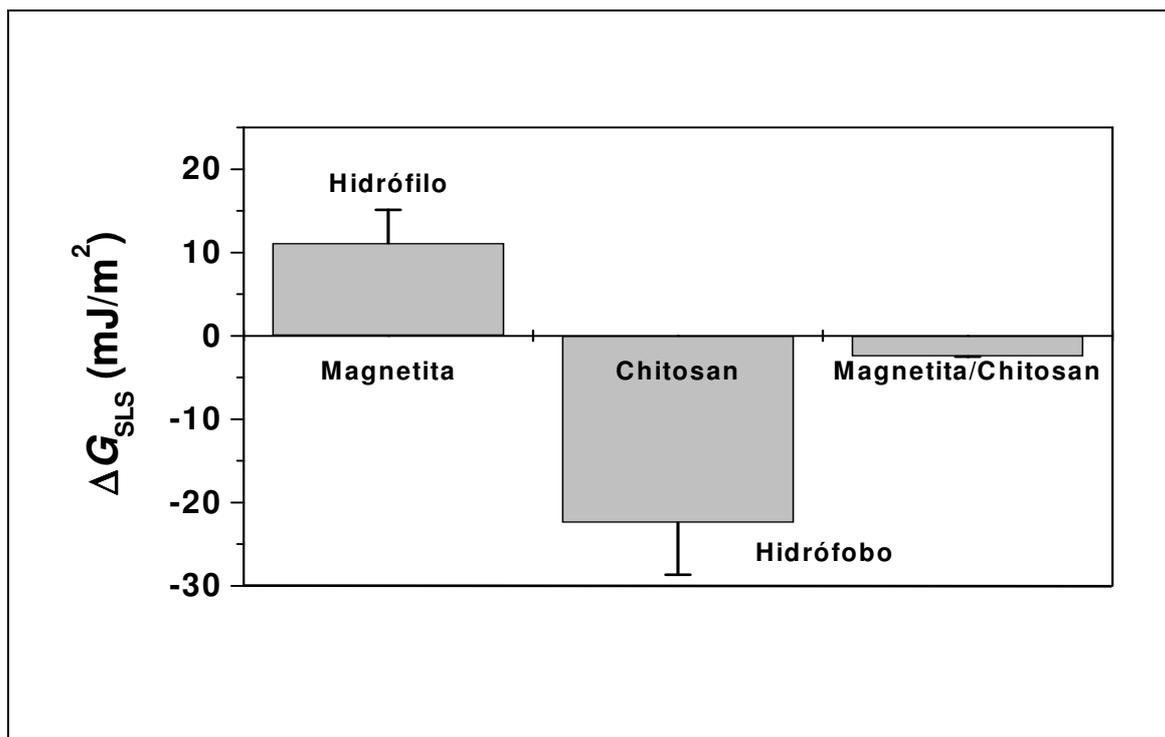


Figura 5.3. Valores de ΔG_{SLS} (mJ/m²) y carácter hidrófobo/hidrófilo de los tres tipos de partículas: magnetita (Fe₃O₄), chitosan, y compuestas magnetita/chitosan.

5.3.3. Mecanismo termodinámico de formación de las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan

La información ya descrita sobre las características superficiales de los materiales implicados, permite argumentar el mecanismo por el que la capa polimérica se deposita sobre la superficie de la magnetita. A partir de los valores de las componentes de la energía libre superficial de los tres tipos de materiales, puede calcularse la energía libre de interacción entre la magnetita (*M*) y el chitosan (*P*) en el medio acuoso (*A*) (figura 5.2), puede calcularse utilizando la ecuación de Dupré (Adamson, 1982):

$$\Delta G_{MAP} = \gamma_{MP} - \gamma_{MA} - \gamma_{PA} \quad (5.22)$$

V. Propiedades termodinámicas superficiales

donde las energías libres interfaciales se obtienen mediante la ecuación 5.10 para cada par de interfases involucradas. El resultado del cálculo de la ecuación de Dupré es -4.9 ± 0.7 mJ/m². Esto significa que las interacciones ácido-base y de van der Waals entre la magnetita y el quitosán son netamente atractivas. Es decir, termodinámicamente hablando es más favorable para el quitosán permanecer en contacto con la magnetita antes que estar aislado en el medio acuoso (Arias y cols. 2001).

VI. EVALUCIÓN DE LAS 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 orbital del electrón alrededor del núcleo. El electrón, siendo una carga en movimiento, puede ser considerado como una pequeña espira de corriente que genera un campo magnético muy pequeño y tiene un momento magnético a lo largo de su eje de rotación. El otro momento magnético se origina del espín del electrón y, por 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, 1996).

El diamagnetismo es una forma muy débil de magnetismo que no es permanente y persiste sólo mientras el campo externo está presente. Está asociado a átomos cuyo momento magnético neto es nulo y se debe a un cambio en el movimiento orbital de los electrones debido al campo magnético aplicado. La permeabilidad magnética relativa (μ_r) es ligeramente menor que la unidad y la susceptibilidad magnética (χ) es negativa. Recuérdense las ecuaciones de estas magnitudes: la susceptibilidad χ es una magnitud característica de cada material (en general, depende de la temperatura, de la orientación de la muestra respecto al campo aplicado y del valor de éste) y relaciona la imanación M (momento magnético por unidad de volumen) y el campo magnético H :

$$M = \chi \times H \quad (6.1)$$

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

$$B = \mu_0 (H + M) \quad (6.2)$$

Siendo μ_0 la permeabilidad magnética del vacío. Aplicando la Ec. 6.1:

$$B = \mu_0 (1 + \chi) H = \mu_0 \mu_r H = \mu H \quad (6.3)$$

VI. Evaluación de las propiedades magnéticas

que constituye la definición de permeabilidad magnética relativa (μ_r) y absoluta (μ).

El paramagnetismo es característico de aquellos átomos o moléculas que tienen momentos magnéticos permanentes que no interaccionan entre sí y que en ausencia de campo externo están orientados al azar, de modo que una porción cualquiera de material no posee imanación neta permanente. Estos dipolos atómicos son libres para girar y se producirá paramagnetismo cuando, mediante rotación, se alineen de forma preferente con un campo externo. La susceptibilidad es positiva y depende de la temperatura, y la permeabilidad será ligeramente mayor que la unidad.

En los materiales ferromagnéticos 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 permeabilidad magnética relativa en torno a 10^5 y una susceptibilidad magnética positiva y muy grande, ambas dependientes de H y de la temperatura.

El antiferromagnetismo es un fenómeno de acoplamiento entre los momentos magnéticos que produce un alineamiento antiparalelo, de modo que no mostrarán imanación espontánea distinta de cero. Estos materiales tienen: $\mu_r > 1$ y χ_m positiva.

En los materiales ferrimagnéticos, la interacción de intercambio entre momentos magnéticos favorece también la alineación antiparalela, pero los momentos no son idénticos en módulo, por lo que no se cancelan completamente. Su comportamiento será por ello parecido al de los ferromagnéticos.

6.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas de magnetita y compuestas magnetita/chitosan quedan muy bien definidas mediante la determinación del ciclo de histéresis. Ésta determinación se realizó a temperatura ambiente utilizando un equipo

magnetómetro-susceptibilímetro Manics DSM-8 en el centro de instrumentación científica de la Universidad de Granada.

Cualquier material ferromagnético o ferrimagnético (Callister, 1996; Mercouruff, 1969) a temperaturas inferiores a la temperatura de Curie está formado por pequeñas regiones tridimensionales en que cuales todos los momentos magnéticos están alineados en la misma dirección. 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 que 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.

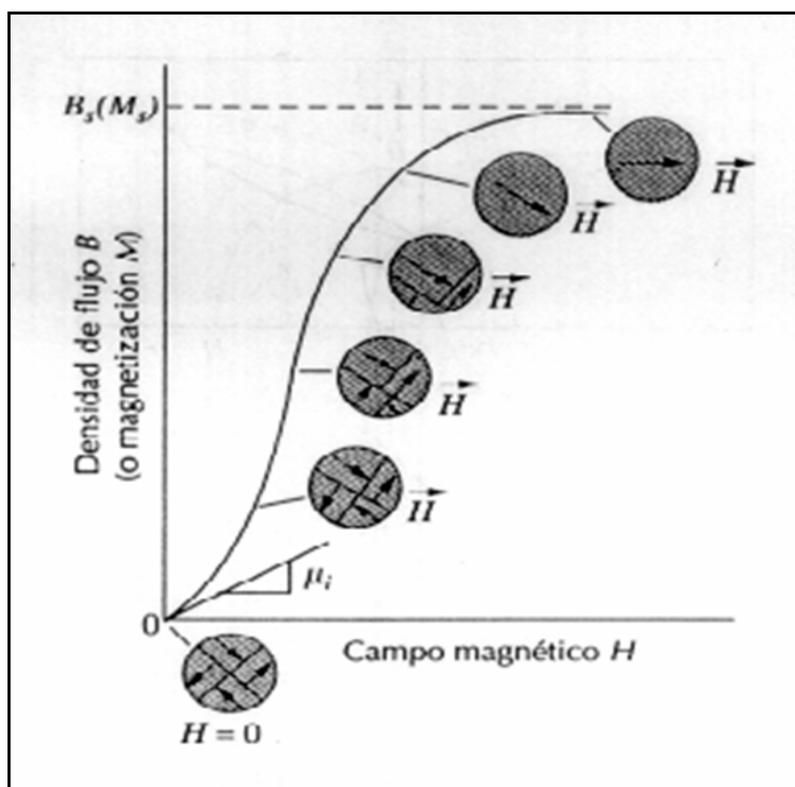


Figura 6.1. Comportamiento de B frente a H de un material ferromagnético o ferrimagnético que estaba inicialmente desmagnetizado. Se representan las configuraciones de los dominios durante varios estadios de la imanación.

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

VI. Evaluación de las propiedades magnéticas

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 $B = \mu \times H$, la permeabilidad (μ) 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 (μ_i), tal como se indica en la figura 6.1.

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 alineados 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, que 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 en el que 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 ; el material permanece imanado en ausencia de un campo externo H .

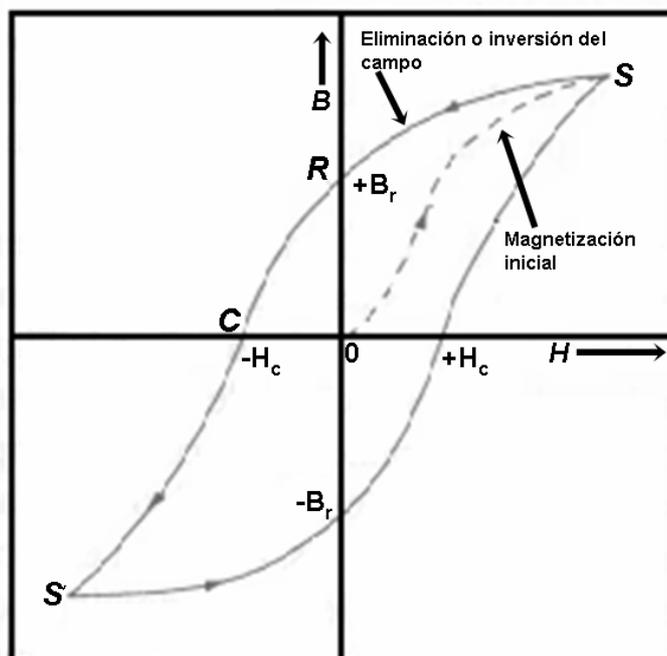


Figura 6.2. Densidad de flujo magnético frente a la intensidad del campo magnético de un material ferromagnético para la saturación en ambas direcciones (puntos S y S'). La curva de histéresis viene representada por la curva sólida y la curva discontinua indica la primera imanación. La remanencia B_r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

El comportamiento de histéresis y la imanación permanente pueden explicarse por el movimiento de las paredes de los dominios. Al invertir la dirección del campo desde la saturación (punto S de la figura 6.2.), el proceso mediante el que cambia la estructura de los dominios se invierte. En primer lugar, existe rotación del dominio único con el campo invertido. Más tarde, los dominios con los momentos magnéticos alineados con el nuevo campo crecen a expensas de los primeros. Para esta explicación es crucial la resistencia al movimiento de las paredes de los dominios que ocurre en respuesta al aumento del campo magnético en la dirección opuesta. Esto explica el desfase entre B y H , es decir, a histéresis. Cuando el campo aplicado se hace nulo, todavía existe una fracción neta de dominios orientados en la dirección inicial, lo que explica la existencia de la remanencia B_r .

Para reducir a cero el campo B dentro de la muestra (punto C de la figura 6.2.), se debe aplicar un campo H de magnitud a $-H_c$ en la dirección opuesta a la del campo original. H_c se denomina coercitividad, o bien, algunas veces fuerza coercitiva. Al continuar aplicando el campo en la dirección contraria a la del campo original, tal como

VI. Evaluación de las propiedades magnéticas

se indica en la figura, finalmente se alcanza la saturación en la dirección opuesta, correspondiendo al punto S' . Una segunda inversión del campo 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 6.2. representa un ciclo de histéresis hasta saturación. Desde luego, no es necesario aumentar el campo H hasta la saturación antes de invertir su dirección. Además, es posible invertir la dirección del campo en cualquier punto a lo largo de la curva y generar otros ciclos de histéresis.

Para investigar la capacidad de respuesta a temperatura ambiente de las partículas recubiertas a un campo magnético externo aplicado, se llevaron a cabo observaciones microscópicas (cualitativas). Para ello, se preparó una suspensión acuosa de partículas compuestas con una concentración del 0.5 % (p/v), la cual fue sometida a un imán permanente de 400 mT. El comportamiento de la suspensión se siguió mediante simple inspección visual (comportamiento macroscópico) o utilizando un microscopio con zoom estereoscópico Nikon SMZ800 (Japón) (comportamiento microscópico). En este último caso, una gota de suspensión acuosa de las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan, se colocó en un portaobjetos y fue sometida al imán de 400 mT localizando en diferentes posiciones con respecto a la suspensión de nanopartículas. La visualización del comportamiento microscópico de la suspensión se logró utilizando el objetivo de aumento de 40 volúmenes.

6.2. RESULTADOS

La determinación del modo de variación de la imanación de la muestra con el campo externo aplicado es la herramienta adecuada para caracterizar (a nivel macroscópico) el comportamiento magnético de nuestras partículas (Arias y cols., 2007).

La figura 6.3. recoge el ciclo de histéresis de las nanopartículas magnéticas. En el caso de las nanopartículas puras de magnetita, como era de esperar, no se observa histéresis por el carácter superparamagnético de éstas. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que este superparamagnetismo es consecuencia del pequeño tamaño de la magnetita (< 20 nm) (López – López y col., 2005). De la región lineal del ciclo de histéresis (zona de campo magnético bajo) puede estimarse la susceptibilidad magnética inicial (χ_i) de los materiales: 0.13 ± 0.03 en el caso de la

magnetita, y 2.57 ± 0.17 en el caso de las partículas compuestas magnetita/chitosan. Al igual que en este caso, también se puede apreciar un aumento considerable en el valor de la magnetización de saturación de los núcleos magnéticos cuando quedan atrapados por recubrimiento de polímero biodegradable: 10 ± 3 kA/m en el caso de la magnetita, y 211 ± 14 kA/m para las partículas compuestas magnetita/chitosan. Estas propiedades magnéticas de las nanopartículas compuestas nos hacen pensar que el sistema coloidal diseñado tiene las características adecuadas para su utilización en el transporte de fármacos a un órgano o tejido diana: un recubrimiento polimérico que permitirá el transporte de cantidades suficientes de principios activos y su liberación a una velocidad sostenida, y unos núcleos magnéticos con enorme capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados. Por este último motivo, la direccionabilidad de las nanopartículas compuestas en el organismo quedará asegurada.

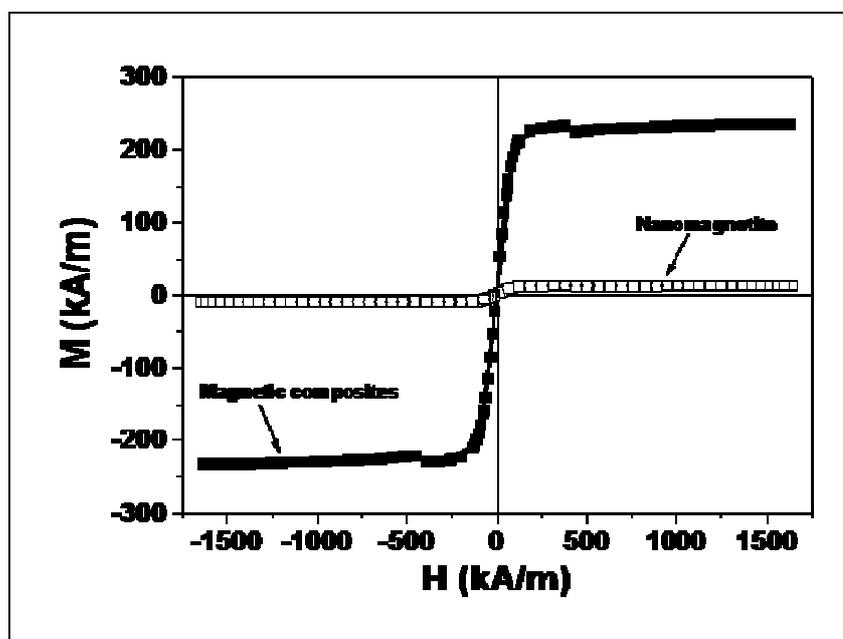


Figura 6.3. Curva de histéresis de la magnetita (●) y de las partículas compuestas (■).

La capacidad de respuesta a un campo magnético aplicado de las nanopartículas de magnetita y de las compuestas magnetita/chitosan fue analizada cualitativamente mediante visualización del efecto que ejerce un imán de 400 nT sobre una suspensión acuosa de estas nanopartículas. Como puede apreciarse en la figura 6.4., las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan son atraídas muy rápidamente por el imán, lo que confirma las grandes propiedades magnéticas del sistema diseñado. El sobrenadante de la suspensión queda completamente transparente en

VI. Evaluación de las propiedades magnéticas

sólo 45 segundos desde que se sometiera al acción del imán. Por el contrario, la suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita mantiene su aspecto homogéneo incluso tras 24 horas de exposición al campo magnético externo. El carácter superparamagnético de este material justifica la ausencia de respuesta a gradientes magnéticos aplicados.

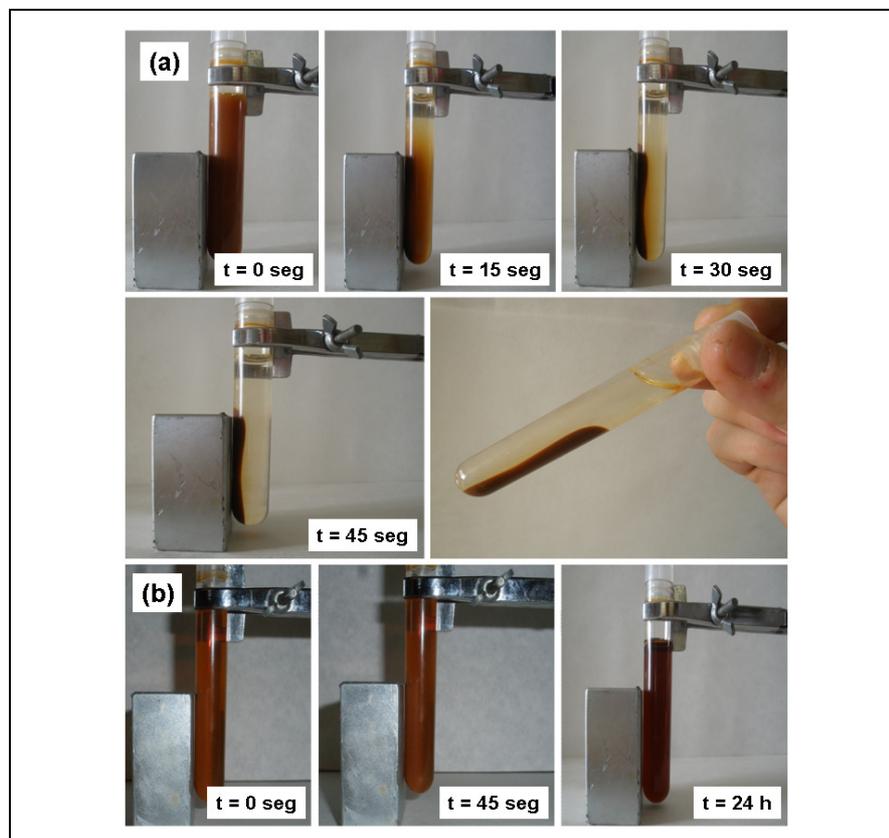


Figura 6.4. observación visual de la decantación magnética de las partículas de magnetita (Fe_3O_4) y de las partículas compuestas Fe_3O_4 /chitosan bajo la influencia de un imán permanente de 1.1 T, localizado en el lateral de las muestras.

Con el fin de analizar el comportamiento microscópico de las suspensiones acuosas de las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan, seguimos su evolución bajo la influencia de un gradiente magnético aplicado de 400 mT mediante microscopía óptica. Como puede observarse en la figura 6.5.a. la suspensión acuosa de nuestras partículas es muy homogénea en ausencia del imán. Sin embargo, cuando la gota de la suspensión es sometida al gradiente magnético generado por el imán de 400 mT, las nanopartículas magnéticas tienden a formar agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección del gradiente magnético aplicado (figura 6.5.b. en adelante).

VI. Evaluación de las propiedades magnéticas

Este comportamiento puede explicarse si tenemos en cuenta que las interacciones magnéticas entre las nanopartículas son de mayor intensidad en comparación con las interacciones coloidales de tipo DVLO (interacciones electrostáticas tipo van der Waals y de hidratación o ácido base), a pesar de la presencia del recubrimiento polimérico en torno a los núcleos magnéticos.

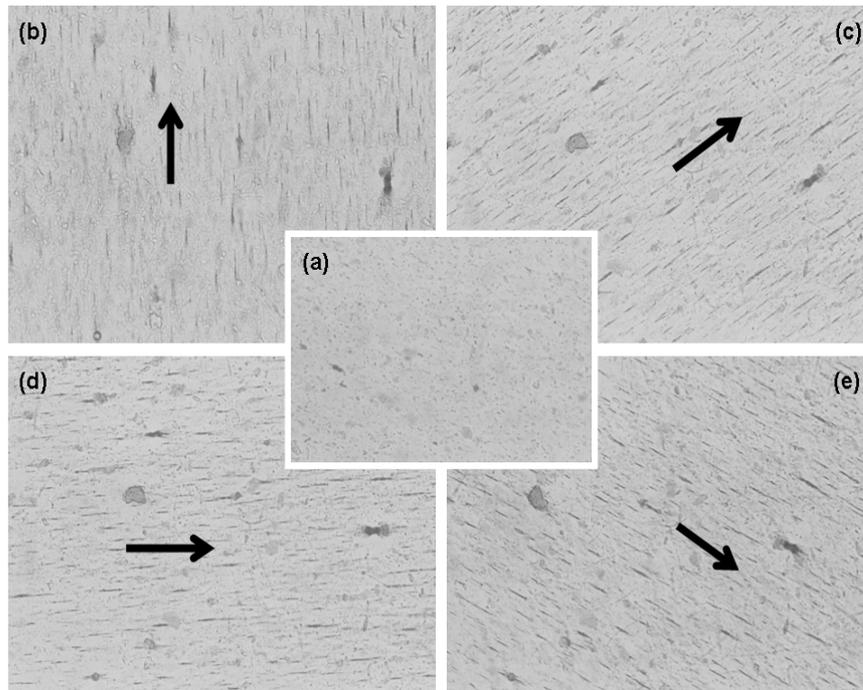


Figura 6.5. Fotografías de microscopio óptico (magnificación 63×) de una suspensión acuosa de nanopartículas recubiertas en ausencia (a) o bajo la influencia de un campo magnético externo ($B = 1.1$ T) en la dirección de la flecha.

**VII. EVALUACIÓN DE
LA CAPACIDAD DE
VEHICULIZACIÓN DE
METOTREXATO**

Para que un agente antitumoral actúe eficazmente es condición indispensable que acceda en concentración suficiente a todas las células malignas sensibles a él. Si bien es cierto que los fármacos antimorales pueden actuar mejor que otras herramientas terapéuticas en determinadas situaciones (grupos de células no visibles por su tamaño, metástasis múltiples, y masas tumorales poco accesibles al bisturí o a las radiaciones), en otras pueden no hacerlo porque sus características farmacocinéticas se lo impiden, por desarrollar las células tumorales mecanismos de resistencia o porque la dosis a administrar al paciente para lograr una concentración eficaz en la masa tumoral estaría asociada a una severa toxicidad (Reddy, 2005). Una alternativa muy prometedora al problema de la acumulación específica de agente antitumoral en la masa de células cancerosas es la utilización de sistemas transportadores basados en nanopartículas biodegradables de origen polimérico o lipídico (Jain, 2001; Davis y col., 2008). Numerosas experiencias *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la asociación de un agente antitumoral con un sistema transportador de este tipo permite controlar el destino biológico de la dosis de quimioterápico administrada, ya que se minimiza su biodistribución y se optimiza su acumulación en el intersticio tumoral o en el interior de las células cancerosas (Brigger y col., 2002; Reddy, 2005). Además, la liberación controlada y sostenida de las moléculas de fármaco logra acrecentar el tiempo de exposición de las células tumorales a estos principios activos, mientras que se mejora su estabilidad *in vitro* e *in vivo* (Jain, 2001).

Entre los diferentes tipos de polímeros utilizados en la formulación de sistemas transportadores de fármacos biocompatibles, biodegradables y no tóxicos, quitosán recibe gran atención, especialmente en las vías de administración parenteral y oral (Sinha y col., 2004). Este polímero ha demostrado una enorme versatilidad para la vehiculización de principios activos de muy diversa naturaleza, como por ejemplo, moléculas antitumorales, fármacos antidiabéticos, agentes antihipertensivos, diuréticos, antiinflamatorios, antiinfecciosos, antitrombóticos, esteroides, péptidos, proteínas, aminoácidos y vacunas (Pitt, 1990; Thanoo y col., 1992; Nordtveit y col., 1994; Sinha y col., 2004; Arias y col., 2010a, 2011). En concreto, se ha demostrado su capacidad para mejorar la biodisponibilidad de sustancias biodegradables como las proteínas, o para aumentar la absorción de moléculas hidrófilas a través de barreras epiteliales (Sinha y col., 2004). Además, la susceptibilidad *in vivo* de este polímero a las lisozimas y a los pHs ligeramente ácidos, lo convierten en biodegradable y en un excelente candidato para asegurar una liberación controlada de fármacos antitumorales, por ejemplo, Gemcitabina, en el interior de las células cancerosas

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

(Sinha y cols., 2004; Arias y cols., 2011). Sin embargo, hasta la fecha chitosan no ha sido aprobado como excipiente farmacéutico de tipo polimérico para uso parenteral, aunque se espera que los estudios preclínicos actualmente en desarrollo faciliten la introducción en clínica de nanopartículas de chitosan como sistemas transportadores de fármacos de administración parenteral (Mitra y col., 2001; Zhang y col., 2008; Trickler y col., 2010; Arias y col., 2011).

La utilización de un sistema de liberación modificada constituido por un núcleo magnético (nanopartículas de magnetita) y un recubrimiento polimérico biodegradable (chitosan) debe permitir el transporte magnéticamente controlado de fármacos anticancerígenos como el metotrexato hasta el tejido diana de interés. De esta manera, a los principales beneficios derivados del uso de estos sistemas ya comentados (Durán y cols., 2008), se sumarían los derivados de la mejora del perfil farmacocinético (rápida metabolización, vida media muy corta) de este principio activo. También se solucionaría la posible aparición de resistencias, al localizarse magnéticamente el sistema transportador en íntimo contacto con las células tumorales, favoreciéndose así su internalización mediante endocitosis (Brigger y col., 2002; Reddy, 2005; Durán y col., 2008).

En el presente capítulo realizaremos, en primer lugar, un estudio de la absorbancia óptica de las disoluciones de metotrexato con el objetivo de determinar el coeficiente de absortividad molar, mediante la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración de fármaco, y de lograr la validación del método analítico espectrofotométrico. Realizaremos una justificación de la metodología de medida empleada en la determinación de la incorporación de fármaco en los nanocompuestos magnetita/chitosan, la cual está basada en la aplicación de la extensión de la ley de Beer a mezclas de sustancias absorbentes. En la metodología de medida de la cantidad de fármaco vehiculizado por las partículas y liberado por éstas, tenemos en cuenta el efecto de los residuos de la síntesis y de los productos de degradación sobre la absorbancia de los sobrenadantes, ya que pueden afectar las determinaciones de fármaco en solución. Dos son los mecanismos investigados de incorporación de metotrexato en las nanopartículas mixtas: la absorción en el interior de la matriz polimérica (al encontrarse el fármaco en íntimo contacto con el polímero en solución durante su proceso de precipitación en torno a los núcleos magnéticos), y la adsorción superficial (tras la incubación de los nanocompuestos en una solución acuosa de fármaco), detectable mediante medidas espectrofotométricas ultravioleta-visible. Entre los factores que afectan a la vehiculización de metotrexato por las

nanopartículas magnetita/chitosan, sólo la concentración de anticancerígeno resultó ser significativo. Las condiciones óptimas de vehiculización de fármaco antitumoral se utilizaron en los estudios de liberación *in vitro* de metotrexato desde las nanopartículas mixtas (a pH = 7.4), estudiándose la influencia en ésta del mecanismo de incorporación de fármaco por las nanopartículas.

7.1. CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE METOTREXATO

Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible 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 linealmente con la absorbancia como recoge la siguiente ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

(7.1)

donde A es la absorbancia, T es la transmitancia, P y P_0 son las intensidades transmitida e incidente, respectivamente, ϵ es la absorptividad molar, b es el camino óptico de la radiación y c es la concentración del analito absorbente. Esta ecuación es una representación matemática de la ley de Beer (De Verdière y col., 1997).

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 su espectro se solapa (Nematí y col., 1996). 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:

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

$$A_{total} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 b c_1 + \varepsilon_2 b c_2 + \dots + \varepsilon_n b c_n$$

(7.2)

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 absorptividades 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 hallado desviaciones de la proporcionalidad entre la medida de la absorbancia y la concentración cuando *b* es constante (De Verdière y col., 1997). 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 resultado de cambios químicos asociados con cambios de concentración (desviaciones químicas).

Recuérdese que la ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas. A concentraciones altas, generalmente superiores a 0.01 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 0.01 M, entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes aparecen algunas excepciones.

La absorción de radiación ultravioleta o visible 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. Más importantes, sin embargo, son las aplicaciones en la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes.

El espectrofotómetro utilizado en nuestro trabajo (Dynko, Spectrometer 8500 UV-Vis, Dinamarca) 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, con el objetivo de poder obtener un espectro que cubra desde los 180 nm hasta los 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.

7.1.1. Absorbancia óptica de las disoluciones de metotrexato

Las primeras etapas de un análisis espectrofotométrico son el establecimiento de las condiciones de trabajo y la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración de la especie a estudiar. Las medidas de absorbancia espectrofotométricas se hacen normalmente a una longitud de onda correspondiente a un pico de máxima absorción, ya que el cambio en la absorbancia por unidad de concentración es mayor en este punto, lográndose así una máxima sensibilidad. Además, bajo estas circunstancias se puede esperar una buena observancia de la ley de Beer y las medidas son menos sensibles a las incertidumbres que surgen de las limitaciones del instrumento (Nèmati y col., 1996).

Si bien la metodología seguida en la síntesis de las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan determina las condiciones de trabajo (el fármaco se encuentra disuelto en una solución acuosa acidulada de polímero), un aspecto crucial previo es la clarificación de las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de metotrexato. Este estudio se realizó prestando especial atención a las concentraciones de fármaco y a los pHs de las disoluciones utilizados. El metotrexato (Sigma-Aldrich, Alemania) es un polvo cristalino amarillo, inodoro, con un peso molecular de 454.46 g/mol y estable al aire.

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

En nuestro estudio, el primer paso es preparar una curva de calibrado de metotrexato, a partir de una batería de disoluciones acuosas (concentraciones molares: 10^{-6} , 3×10^{-6} , 5×10^{-6} , 7×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} y 10^{-2} M). De esta manera, determinaremos la longitud de onda de máxima absorbancia y el coeficiente de absortividad molar, fundamental en los estudios de incorporación y liberación *in vitro* de fármaco por las nanopartículas compuestas. Transcurridas 24 horas desde su preparación, se analizó el espectro de absorción ultravioleta-visible de cada una de las soluciones acuosas, realizando un barrido de longitudes de onda desde 1100 a 180 nm, con intervalos de 1.0 nm. Se utilizó como blanco en la calibración previa del aparato agua bidestilada para eliminar las posibles interferencias en el espectro de metotrexato generadas por el medio de disolución.

Cabe resaltar en primer lugar los enormes problemas de solubilidad que presenta este principio activo en medio acuoso a altas concentraciones (Chamberlin y col., 1976). En concreto, por este motivo no pudieron prepararse concentraciones de metotrexato superiores a 10^{-3} M, y las disoluciones entre 10^{-4} y 10^{-3} M no resultaron ser estables en el tiempo, ni siquiera cuando se almacenaban a 4.0 ± 0.5 °C y protegidas de la luz, ya que se producía la recristalización del fármaco disuelto. De esta forma, los estudios de vehiculización de metotrexato en los diferentes tipos de nanopartículas se realizaron siempre con concentraciones de agente quimioterápico $\leq 10^{-4}$ M.

El espectro ultravioleta-visible de las disoluciones que sí se pudieron medir (concentraciones $\leq 10^{-4}$ M) se caracteriza por presentar señal sólo por debajo de 400 nm. Además, la absorción de las disoluciones de metotrexato es mayor al aumentar su concentración en el medio de disolución. El único pico de absorción que presenta una longitud de onda de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones es el que aparece a 304 nm (figura 7.1) (Chamberlin y col., 1976). Por lo tanto, descartamos el pico que se genera a menor longitud de onda y los espectros obtenidos a concentraciones superiores a 10^{-4} M, ya que a partir de esta concentración la inestabilidad de las disoluciones era más que considerable y también es patente la tendencia de los dos picos del espectro a fundirse en uno, hecho que se produce a una concentración de antitumoral 10^{-3} M. Además, el espectro es irregular a estas altas concentraciones, lo que hace imposible realizar cualquier tipo de medida ya que pierde validez el coeficiente de absortividad molar calculado. Esta desviación de la ley de Beer podría justificarse por el hecho de que aunque, normalmente, el efecto de las

interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a 0.01 M, el metotrexato puede pertenecer al grupo de moléculas orgánicas donde aparecen algunas excepciones (Lemaire y col., 1994; Lyklema, 1987).

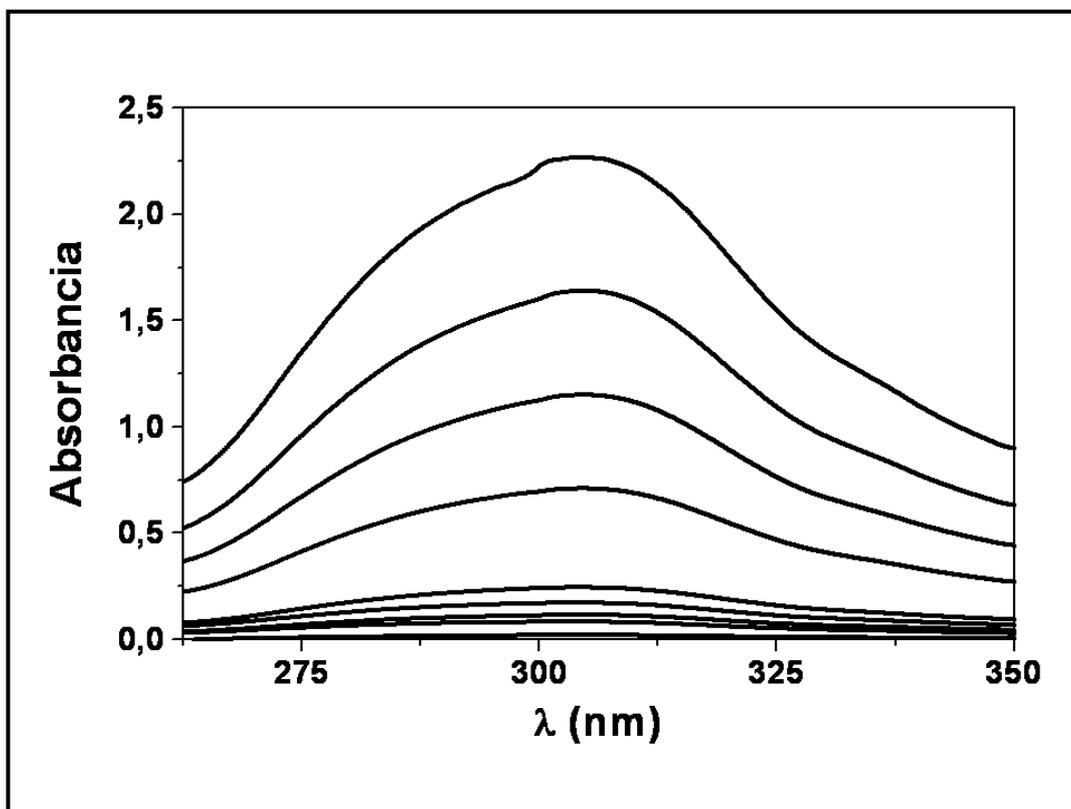


Figura 7.1. Detalle del espectro de absorción ultravioleta-visible de disoluciones acuosas de metotrexato. Las concentraciones molares de anticancerígeno en orden creciente de absorbancia son: 10^{-6} , 3×10^{-6} , 5×10^{-6} , 7×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7×10^{-5} y 10^{-4} .

La determinación del coeficiente de absortividad molar (ϵ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y concentración mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue $\epsilon = 22860 \pm 160 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. En la figura 7.2 se muestran los datos y la recta de ajuste. Es destacable cómo los valores de absorbancia a diferentes concentraciones, obtenidos para la longitud de onda de máxima absorbancia cumplen la ley de Beer.

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

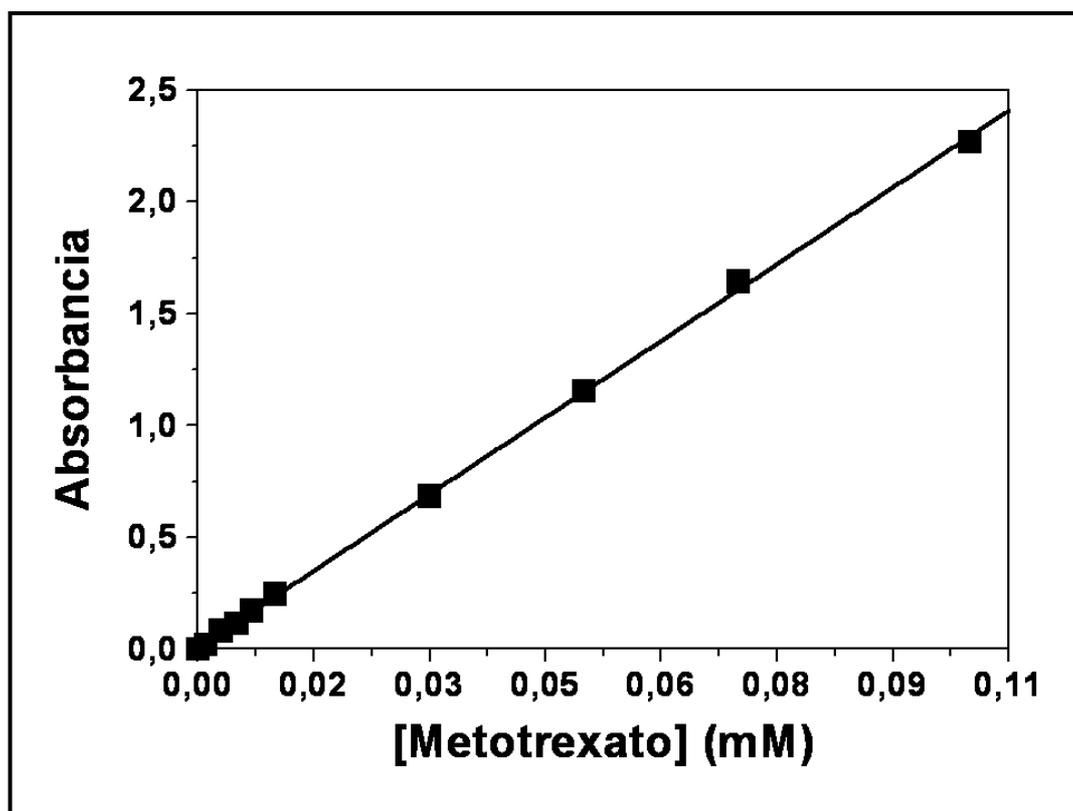


Figura 7.2. Determinación del coeficiente de absortividad molar de las disoluciones de metotrexato para la longitud de onda de máxima absorbancia (304 nm).

Con el objetivo de estudiar si el espectro de absorción ultravioleta-visible de este fármaco antitumoral se veía afectado por el pH del medio de disolución, especialmente por el pH utilizado en los estudios de liberación *in vitro* ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$), investigamos la influencia de la concentración de H^+ y del tampón $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$) en las propiedades de absorbancia óptica de las disoluciones de metotrexato. Preparamos para ello, una batería de soluciones de agente antitumoral 10^{-5} M con concentraciones crecientes de ácido acético, para obtener un rango de pHs entre 2 y 6, y una solución de metotrexato de igual concentración, pero utilizando como medio de disolución tampón $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$. La preparación de 250 mL de la disolución tampón se realizó mezclando 125 mL de una disolución de KH_2PO_4 0.1 M, 97.75 mL de una disolución NaOH 0.1 M y diluyendo hasta 250 mL con agua (Perrin y Dempsey, 1974). Tras 24 horas, se determinó el espectro de absorción según la metodología previamente descrita. El análisis de los espectros obtenidos sirvió para comprobar la estabilidad de las

soluciones de metotrexato en todos los pHs investigados, y la independencia del coeficiente de absorptividad molar con respecto a estos pHs.

7.1.2. Validación del método espectrofotométrico

El método espectrofotométrico utilizado para la determinación de la cantidad de metotrexato vehiculizado o liberado por las nanopartículas compuestas magnetita/chitosan, fue previamente validado, verificando su precisión, linealidad y exactitud (Caraballo y col., 1998). Como las soluciones de metotrexato son estables en todo el margen de pHs investigados, siendo válido el coeficiente de absorptividad molar determinado para todos estos valores de pH, se prepararon seis réplicas de soluciones estándar de fármaco antitumoral de concentración entre 10^{-6} y 10^{-4} M en agua bidestilada o en tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4 ± 0.1).

En la tabla 7.1 se recogen los valores de absorbancia de las soluciones acuosas de metotrexato en función de su concentración. Mostramos 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 numéricos de los coeficientes de variación (< 5 % en todos los casos) señalan la adecuada precisión del método espectrofotométrico desarrollado. La linealidad de la relación absorbancia (*A*)-concentración molar (*C*) es adecuada [$A = (0.007 \pm 0.007) + (22860 \pm 160) \times C$], con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

Tabla 7.1. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones de metotrexato para cada una de las concentraciones indicadas. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
10^{-6}	0.0229 ± 0.0011	4.78
3×10^{-6}	0.0694 ± 0.0007	1.01
5×10^{-6}	0.1152 ± 0.0003	0.26
7×10^{-6}	0.1607 ± 0.0012	0.75
10^{-5}	0.2288 ± 0.0021	0.92
3×10^{-5}	0.6836 ± 0.0298	4.36
5×10^{-5}	1.1539 ± 0.0066	0.57
7×10^{-5}	1.6105 ± 0.0111	0.69
10^{-4}	2.2782 ± 0.0211	0.93

Con el propósito de comprobar la exactitud del método analítico desarrollado, utilizamos los datos de absorbancia de las concentraciones de la tabla 7.1 (“concentración actual” en la tabla 7.2), para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las seis réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas en la tabla 7.2 como “estimadas”. Como antes, los bajos valores de los C.V. y sus errores relativos (E.R.) son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico desarrollado.

Tabla 7.2. Comparación de las concentraciones “actuales” de metotrexato en solución con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas.

Los valores de concentraciones “estimadas” son la media ($\pm D.E.$) de las seis réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimada – actual)/estimada], también se muestran los *C.V.*

Actual (M)	Estimada (M)	E.R. (%)	C.V. (%)
10^{-6}	$(1.0074 \pm 0.0481) \cdot 10^{-6}$	0.73	4.78
3×10^{-6}	$(3.0354 \pm 0.0306) \cdot 10^{-6}$	1.17	1.01
5×10^{-6}	$(5.0411 \pm 0.0131) \cdot 10^{-6}$	0.82	0.26
7×10^{-6}	$(7.0306 \pm 0.0525) \cdot 10^{-6}$	0.44	0.75
10^{-5}	$(1.0008 \pm 0.0092) \cdot 10^{-5}$	0.08	0.92
3×10^{-5}	$(2.9903 \pm 0.1303) \cdot 10^{-5}$	0.32	4.36
5×10^{-5}	$(5.0477 \pm 0.0291) \cdot 10^{-5}$	0.94	0.57
7×10^{-5}	$(7.0451 \pm 0.0485) \cdot 10^{-5}$	0.64	0.69
10^{-4}	$(9.9659 \pm 0.0924) \cdot 10^{-5}$	0.34	0.93

En cuanto a las seis réplicas preparadas de las disoluciones de metotrexato en tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4 ± 0.1) con una cantidad conocida de este principio activo, se obtuvieron resultados similares, como mostramos a continuación. De esta manera, puede afirmarse que queda demostrada la precisión, linealidad y exactitud del método espectrofotométrico a este pH.

La tabla 7.3. contiene los valores de absorbancia de las disoluciones de metotrexato en función de su concentración, 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.*). En todos los casos, el coeficiente de variación tiene un valor inferior al 5 %, lo que indica la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (*A*)-concentración molar (*C*) es adecuada [$A = (0.0003 \pm 0.001) + (22920 \pm 40) \times C$], con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

Tabla 7.3. Absorbancia (media \pm *D.E.*) de las disoluciones de metotrexato para cada una de las concentraciones indicadas, en presencia tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4 \pm 0.1). El *C.V.* se calculó mediante cociente entre la *D.E.* y el valor medio.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
10 ⁻⁶	0.0228 \pm 0.0008	3.51
3 \times 10 ⁻⁶	0.0679 \pm 0.0021	3.09
5 \times 10 ⁻⁶	0.1149 \pm 0.0013	1.13
7 \times 10 ⁻⁶	0.1606 \pm 0.0032	1.99
10 ⁻⁵	0.2291 \pm 0.0027	1.18
3 \times 10 ⁻⁵	0.6864 \pm 0.0139	2.02
5 \times 10 ⁻⁵	1.1392 \pm 0.0167	1.47
7 \times 10 ⁻⁵	1.6122 \pm 0.0218	1.35
10 ⁻⁴	2.2893 \pm 0.0184	0.81

La exactitud del método analítico fue comprobada utilizando los datos de absorbancia de las concentraciones de la tabla 7.3 (“concentración actual” en la tabla 7.4), para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las seis réplicas. Las concentraciones medias y sus *D.E.* quedan recogidas en la tabla 7.4 como “estimadas”. Al igual que anteriormente, los bajos valores de los *C.V.* y sus errores relativos (*E.R.*) son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico propuesto.

Tabla 7.4. Comparación de las concentraciones “actuales” de metotrexato en solución con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas.

Los valores de concentraciones “estimadas” son la media ($\pm D.E.$) de las seis réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimada – actual)/estimada], también se muestran los *C.V.*

Actual (M)	Estimada (M)	E.R. (%)	C.V. (%)
10^{-6}	$(9.9476 \pm 0.3491) \cdot 10^{-7}$	0.53	3.51
3×10^{-6}	$(2.9625 \pm 0.0916) \cdot 10^{-6}$	1.26	3.09
5×10^{-6}	$(5.0131 \pm 0.0567) \cdot 10^{-6}$	0.26	1.13
7×10^{-6}	$(7.0069 \pm 0.1396) \cdot 10^{-6}$	0.09	1.99
10^{-5}	$(9.9956 \pm 0.1178) \cdot 10^{-5}$	0.04	1.18
3×10^{-5}	$(2.9948 \pm 0.0606) \cdot 10^{-5}$	0.18	2.02
5×10^{-5}	$(4.9703 \pm 0.0729) \cdot 10^{-5}$	0.59	1.47
7×10^{-5}	$(7.0341 \pm 0.0951) \cdot 10^{-5}$	0.48	1.35
10^{-4}	$(9.9882 \pm 0.0802) \cdot 10^{-5}$	0.12	0.81

7.1.3. Metodología de determinación de la incorporación de metotrexato en las nanopartículas diseñadas

La determinación cuantitativa de la incorporación (y liberación) del fármaco antineoplásico metotrexato en (desde) los nanocompuestos magnetita/chitosan se basa en la metodología de tipo espectrofotométrico aplicada por otros autores también en sistemas transportadores poliméricos biodegradables (Fawaz y col., 1997; Müller y col., 1991). Este método ha sido puesto a punto por nuestro grupo de investigación, incluso en el caso de la vehiculización de fármacos de diversa naturaleza en nanopartículas de chitosan (Arias y col., 2006a; Arias y col., 2006b; Arias y col., 2005). En concreto, la metodología está basada en la aplicación de la ley de Beer a un medio que contiene más de un tipo de sustancias absorbentes. Como ya se ha descrito en la ecuación 7.2, 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 estas. De esta manera, se acepta la contribución de cada una de las sustancias presentes en el medio donde se ha producido la formación de las nanopartículas a la absorbancia total del sistema, o de las sustancias que se han

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

generado durante el proceso de liberación del fármaco antitumoral desde las nanopartículas.

Respecto al proceso de vehiculización de metotrexato, podemos citar como sustancias susceptibles de contribuir a esta absorción total el propio principio activo no incorporado por las nanopartículas, los residuos resultantes del proceso de precipitación del polímero (restos de polímero todavía en solución) y los restos de otros componentes del medio (de agente tensioactivo pluronic® F-68, de ácido acético y de sulfato sódico, principalmente). Por lo tanto, siguiendo esta metodología puede estimarse la cantidad de metotrexato que no ha sido incorporada por las nanopartículas restando a la absorción total del sistema, la correspondiente al resto de sustancias presentes (residuos del proceso de formación de las nanopartículas y restos de otros componentes del medio acuoso). Y, por diferencia entre la concentración inicial y final del fármaco antineoplásico en el medio, conoceremos la cantidad total incorporada por las nanopartículas.

La vehiculización de metotrexato por las nanopartículas biodegradables fue expresada en términos de eficacia de incorporación (*entrapment efficiency, EE, %*) y carga de fármaco (*drug loading, DL, %*):

$$EE(\%) = \frac{\text{metotrexato}_{\text{incorporado}}(\text{mg})}{\text{metotrexato}_{\text{inicial}}(\text{mg})} \times 100 \quad (7.3)$$

y

$$DL(\%) = \frac{\text{metotrexato}_{\text{incorporado}}(\text{mg})}{\text{nanopartículas}(\text{mg})} \times 100 \quad (7.4)$$

En cuanto al proceso de liberación de metotrexato desde las nanopartículas desarrolladas, podemos citar como sustancias susceptibles de contribuir a la absorción total del medio de liberación, el propio fármaco liberado, los residuos de la degradación del polímero y los restos de otros componentes del medio (tampón NaOH-KH₂PO₄). Por lo tanto, podría estimarse la cantidad de metotrexato liberado por las nanopartículas restando a la absorción total del sistema, la correspondiente al resto de sustancias presentes (residuos de la degradación del polímero y otros componentes del medio acuoso de liberación). De esta manera, planteamos la

determinación de la cantidad de agente quimioterápico liberada por las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan restando a la absorbancia total del sistema la correspondiente al resto de especies absorbentes (Arias y col., 2006a; Arias y col., 2006b; Arias y col., 2005).

7.2. INCORPORACIÓN DE METOTREXATO EN LAS NANOPARTÍCULAS MAGNETITA/CHITOSAN

La vehiculización de fármaco en los nanocompuestos magnetita/chitosan se ha investigado mediante dos métodos fundamentales: *i*) la incorporación del principio activo en la fase acuosa en íntimo contacto con el polímero todavía en solución y con los núcleos magnéticos en suspensión, quedando el fármaco antitumoral atrapado esencialmente en el interior de la matriz polimérica; y, *ii*) la adsorción de metotrexato en la superficie de las nanopartículas ya formadas, tras su incubación en una disolución acuosa de éste. Es previsible que la mayor captación de fármaco anticanceroso se consiga mediante el método de absorción en matriz (Arias y col., 2005; 2006a; 2006b; Soppimath y col., 2001), como ya ha descrito nuestro grupo de investigación en otros estudios de vehiculización de principios activos en nanopartículas de chitosan (Arias y col, 2010a, 2011).

7.2.1. Adsorción de metotrexato

El estudio de la incorporación superficial de metotrexato en los núcleos magnéticos de óxido de hierro (magnetita), las nanopartículas poliméricas de chitosan y los nanocompuestos magnetita/chitosan se fundamentó en determinaciones de tipo espectrofotométrico. Asimismo, analizamos el factor que más críticamente debe contribuir a este proceso: la concentración de principio activo utilizada.

Para estimar la adsorción de metotrexato, determinamos la absorbancia óptica de los sobrenadantes obtenidos tras poner en contacto los tres tipos de nanopartículas con los que trabajamos (magnetita, chitosan y nanocompuestos magnetita/chitosan) con soluciones de concentraciones prefijadas de agente quimioterápico, durante 24 horas, a 25.0 ± 0.5 °C y bajo agitación mecánica (50 rpm). Para ello, preparamos una serie de disoluciones acuosas de 5 mL de volumen con diferente concentración molar

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

de fármaco (10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7×10^{-5} y 10^{-4}), respetando su pH natural ($\text{pH} \approx 6$). Una vez retirada una muestra del medio para la posterior comparación, se procedió a añadir las nanopartículas correspondientes en cantidad suficiente como para tener una concentración final del 0.1 % (p/v). Tras 24 horas de contacto se procedió a la separación de los sobrenadantes mediante doble centrifugación a 11000 rpm durante 40 minutos, para la determinación del espectro de absorción de éstos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Como ya se ha justificado, el cálculo de la adsorción de principio activo sobre las nanopartículas se realizó mediante la comparación de la absorbancia del medio de adsorción con la correspondiente al sobrenadante obtenido tras doble centrifugación y tras eliminar la absorbancia propia de los productos residuales que puedan interferir en esta determinación.

Los resultados del ensayo de adsorción de metotrexato en los tres tipos de nanopartículas quedan recogidos en la figura 7.3. La cantidad máxima vehiculizada de esta molécula antitumoral, expresada como eficacia de incorporación (y carga de fármaco), por los núcleos de magnetita, las nanopartículas de quitosán y los nanocompuestos magnetita/quitosán es 14.8 ± 0.6 % (0.67 ± 0.02 %), 10.7 ± 1.3 % (0.48 ± 0.07 %) y 11.8 ± 1.4 % (0.54 ± 0.08 %), respectivamente. Cabe destacar en primer lugar el efecto positivo que ejerce la concentración de fármaco utilizada sobre la vehiculización de metotrexato en la superficie de las nanopartículas. Por ejemplo, en el caso de los núcleos de magnetita los valores de eficacia de incorporación pasan de 2.2 ± 0.2 % a 14.8 ± 0.6 %, cuando la concentración inicial de metotrexato pasa de 10^{-5} M a 10^{-4} M, respectivamente. Igual ocurre con las nanopartículas de quitosán [de 1.5 ± 0.4 % (10^{-5} M) a 10.7 ± 1.3 % (10^{-4} M)] y con las nanopartículas magnetita/quitosán [de 1.6 ± 0.7 % (10^{-5} M) a 11.8 ± 1.4 % (10^{-4} M)]. Este hecho ya ha sido previamente descrito en el caso moléculas de fármaco y nanopartículas de polímero de diversa naturaleza (McCarron y col., 2000; Arias y col., 2007), incluso en el caso de nanopartículas de quitosán (Arias y col., 2010a, 2011).

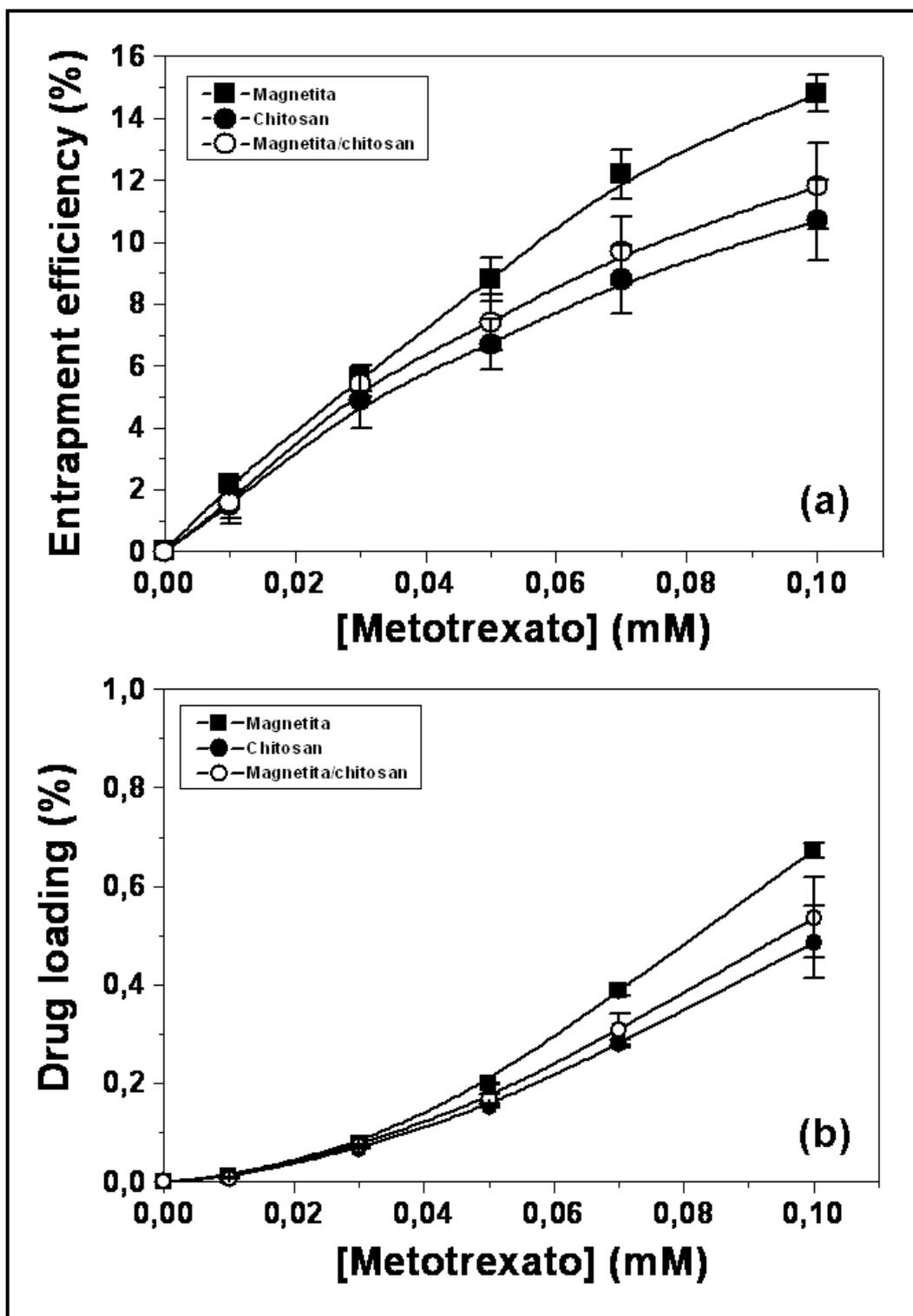


Figura 7.3. Eficacia de incorporación (*entrapment efficiency*, %) (a) y carga de fármaco (*drug loading*, %) de los núcleos de magnetita (■), nanopartículas de chitosan (●) y nanocompuestos magnetita/chitosan (○), en función de la concentración de metotrexato y mediante el método de adsorción. Las líneas son simples guías visuales.

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

Por otro lado, existe una ligera mayor vehiculización de principio activo en la superficie de los núcleos de magnetita, en comparación con la superficie de las nanopartículas de quitosan y de magnetita/chitosan. Creemos que esto puede ser debido a una mejor interacción de tipo electrostático entre las moléculas de metotrexato cargadas negativamente en el medio de disolución [carga proveniente de la disociación de los grupos de ácido carboxílico de su estructura química (pK_a de metotrexato = 4.8), véase la figura 1.1] y la superficie de los núcleos magnéticos, la cuál presenta una carga eléctrica superficial positiva superior a la de las nanopartículas de quitosan y a la de los nanocompuestos magnetita/chitosan (véanse las figuras 4.6 y 4.7). Trabajos previos de nuestro grupo de investigación ya han descrito la importancia de las interacciones de tipo electrostático en la vehiculización de fármacos de diversa naturaleza sobre nanopartículas poliméricas biodegradables (Arias y cols., 2007, 2008a, 2009a,b). Estos resultados justifican que antes de realizar la incorporación del agente antitumoral en los nanocompuestos mediante absorción en matriz, dejemos las nanopartículas de magnetita que constituirán los núcleos magnéticos de los nanocompuestos magnetita/chitosan durante 24 horas de tiempo de contacto con la cantidad de fármaco a vehicular.

7.2.2. Absorción de metotrexato

Una vez estudiada la adsorción de metotrexato en la superficie de los tres tipos de nanopartículas, nos centraremos en la investigación de la contribución del, a priori, principal método de vectorización del fármaco antitumoral: la incorporación de metotrexato en la fase acuosa donde se encuentra el polímero en disolución y los núcleos de magnetita en suspensión. Este método excluye a los núcleos magnéticos pues son nanopartículas presintetizadas. Analizaremos la influencia del que consideramos será el principal factor determinante de la eficacia de la absorción: la concentración de principio activo utilizada. De esta manera, pretendemos determinar las condiciones óptimas que permiten una incorporación máxima de fármaco y desarrollaremos una síntesis optimizada de las nanopartículas magnetita/chitosan con metotrexato incorporado.

La experiencia de nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto previamente que otros parámetros que podrían considerarse como determinantes de

la incorporación de fármaco en las nanopartículas, no tienen en la práctica una influencia significativa. Principalmente, estos factores son la concentración de agente tensioactivo pluronic® F-68 y la concentración de polímero. Sin embargo, sí son parámetros a fijar perfectamente en la síntesis de las nanopartículas para que éstas presenten unas características apropiadas para la vía de administración parenteral. En lo referente al agente tensioactivo pluronic® F-68, su inclusión en la fase acuosa asegura la obtención de nanopartículas de reducido tamaño y distribución de tamaños homogénea (Llovet y col., 1995; Arias y col., 2007, 2008a,b, 2009a,b, 2010b, 2011). En el caso de la concentración de polímero, el único efecto que puede llegar a producir un incremento en la cantidad de chitosan utilizada es la formación de una mayor cantidad de nanopartículas de chitosan con la misma carga de fármaco o incluso sin metotrexato en su interior (al quedar la cantidad utilizada de éste agotada). En el caso de la síntesis de nanocompuestos magnetita/chitosan, la utilización de grandes concentraciones de polímero llevará asociada el riesgo de formación de nanopartículas de chitosan puro (con o sin principio activo en su interior) como subproducto de la reacción cuando queden los núcleos magnéticos agotados (Llovet y col., 1995; Stolnik y col., 1995; McCarron y col., 2000; Arias y col., 2005, 2006a,b, 2008a,b, 2009b, 2010a,b, 2011).

La influencia de la concentración de principio activo presente en el medio donde se produce la síntesis del sistema transportador es un fenómeno muy estudiado que, de forma general, implica un efecto positivo del aumento de la concentración de fármaco sobre la eficacia de la vehiculización en las nanopartículas (Losa y cols., 1991; Fawaz y cols., 1997; Fontana y cols., 1998; McCarron y cols., 2000; Arias y cols., 2007, 2008a, 2009a,b, 2010a,b, 2011). En nuestro caso, el análisis de la influencia de la concentración de metotrexato sobre su incorporación por las nanopartículas de chitosan y en los nanocompuestos magnetita/chitosan se realizó siguiendo la rutina de síntesis y el procedimiento de determinación espectrofotométrico, ya descritos y justificados. Para ello, la única variable que se introdujo en el protocolo de síntesis de ambos tipos de nanopartículas fue la inclusión de una determinada concentración de fármaco antitumoral en el medio de síntesis. Las concentraciones molares utilizadas fueron: 10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7×10^{-5} y 10^{-4} . Como queda justificado en el apartado 7.3.1, la fase acuosa donde se disolverá el polímero debe prepararse con 24 horas de antelación para así permitir que los núcleos de magnetita estén en contacto con el fármaco antitumoral disuelto (bajo agitación mecánica a 50 rpm) y que, por lo tanto, éste se adsorba en su superficie. Así se pretende incrementar la vehiculización de metotrexato en los nanocompuestos

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

magnetita/chitosan ya que de esta manera los núcleos magnéticos contribuirán a la absorción de agente quimioterápico en el interior de estas nanopartículas magnéticas. Los experimentos se repitieron tres veces con cada una de las concentraciones molares de principio activo.

La cantidad de metotrexato absorbida por las nanopartículas poliméricas y por los nanocompuestos magnetita/chitosan queda recogida en la figura 7.4. Como puede apreciarse en ambos casos, la absorción aumenta con la concentración de fármaco antitumoral presente en el medio acuoso de síntesis, sugiriéndose una tendencia a la saturación para concentraciones superiores a las ensayadas. Por lo tanto, y al igual que se observó en el caso del método de adsorción, puede establecerse la existencia de un efecto positivo del aumento de la concentración de agente quimioterápico sobre la eficacia de la vehiculización en las nanopartículas. Como hemos señalado previamente, este efecto se encuentra ampliamente descrito en la literatura para diferentes tipos de materiales (incluido chitosan) y de fármacos (Losa y col., 1991; Fawaz y col., 1997; Fontana y col., 1998; McCarron y col., 2000; Arias y col., 2007, 2008a, 2009a,b, 2010a,b, 2011).

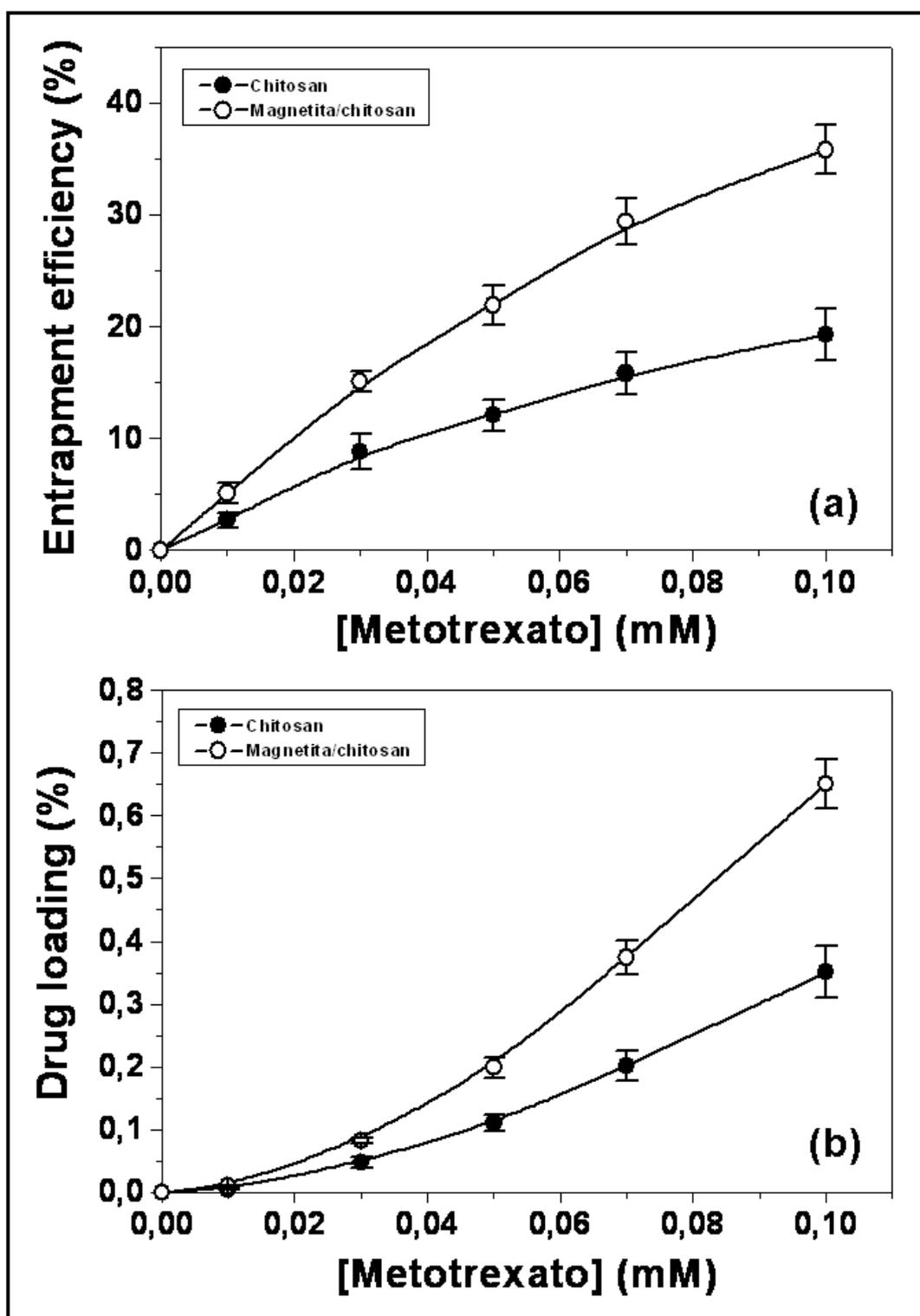


Figura 7.4. Eficacia de incorporación (*entrapment efficiency*, %) (a) y carga de fármaco (*drug loading*, %) en las nanopartículas de chitosan (●) y nanocompuestos magnetita/chitosan (○), en función de la concentración de metotrexato y mediante el método de absorción en matriz. Las líneas son simples guías visuales.

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

Cabe destacar además cómo los valores obtenidos de incorporación de metotrexato son muy superiores a los alcanzados mediante el procedimiento de adsorción en superficie. En concreto, la eficacia de incorporación de metotrexato en las nanopartículas de quitosán y en los nanocompuestos magnetita/chitosán pasa de $10.7 \pm 1.3 \%$ y $11.8 \pm 1.4 \%$, respectivamente en el caso de la metodología de adsorción en superficie (figura 7.3a), hasta $19.3 \pm 2.3 \%$ y $35.8 \pm 2.2 \%$, respectivamente cuando el método seguido es el de absorción en matriz (figura 7.4a). De esta manera, señalamos esta metodología de vehiculización como la ideal para la síntesis de las nanopartículas mixtas magnetita/chitosán cargadas con metotrexato. Pensamos que esto puede ser debido a un mejor atrapamiento mecánico en matriz por el contacto tan íntimo existente entre el fármaco anticanceroso y el polímero, cuando este último precipita en forma de nanopartículas al añadir sulfato sódico como agente precipitante. Además, esta interacción está facilitada desde un punto de vista electrostático, ya que debe existir una atracción entre las moléculas de fármaco cargadas negativamente y el polímero con carga positiva.

Queda patente también cómo la vehiculización es superior en los nanocompuestos magnetita/chitosán en comparación con las nanopartículas de quitosán. Por ejemplo, los valores de eficacia de incorporación y carga de fármaco en las nanopartículas de quitosán cuando la concentración utilizada de metotrexato es 10^{-4} M son $19.3 \pm 2.3 \%$ y $0.351 \pm 0.042 \%$, respectivamente. Sin embargo, en el caso de las nanopartículas magnetita/chitosán los valores para la misma concentración de fármaco antitumoral son $35.8 \pm 2.2 \%$ y $0.651 \pm 0.039 \%$, respectivamente. Este hecho puede justificarse si recordamos la capacidad de los núcleos de magnetita de incorporar fármaco en su superficie (figura 7.3), por lo que es de esperar que en la interfase magnetita-polímero quede principio activo atrapado.

7.3. LIBERACIÓN DE METOTREXATO DESDE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNETITA/CHITOSAN

Una vez analizadas las condiciones óptimas de vehiculización de metotrexato en las nanopartículas mixtas magnetita/chitosán mediante los métodos de incorporación en matriz y en superficie, seleccionamos las condiciones que permiten una mayor carga de fármaco antitumoral: absorción en para preparar las nanopartículas de quitosán o las nanopartículas compuestas que se utilizarán en los

ensayos de liberación: absorción en matriz, 10^{-4} M de metotrexato, 0.25 % (p/v) de quitosán, 0.1 % (p/v) de magnetita y 1 % (p/v) de pluronic® F-68 (véase el apartado 7.3.). Estas son las nanopartículas mixtas magnetita/chitosán a las que se realizó el ensayo de liberación *in vitro* de principio activo. Si bien, para estudiar la influencia que tiene el método de vehiculización de metotrexato sobre la velocidad con que éste es liberado desde los nanocompuestos, también se realizó este ensayo a nanopartículas con agente quimioterápico incorporado mediante adsorción y utilizando una concentración 10^{-4} M de metotrexato.

El ensayo de liberación *in vitro* de metotrexato se realizó por triplicado a 37.0 ± 0.5 °C. Se utilizó el método de diálisis y el tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4 ± 0.1) como medio de liberación. Las bolsas de diálisis se dejaron sumergidas en 5 mL de medio de liberación 12 horas antes de comenzar el ensayo. La bolsa de diálisis (Spectrum® Spectra/Por® 6, EE.UU.) tienen un tamaño de poro de 2000 Da y son capaces de retener los nanocompuestos en su interior, dejando sólo pasar a su través el fármaco liberado hasta el medio de liberación. El ensayo comenzó llenando las bolsas de dialysis con 2 mL una suspensión acuosa de nanopartículas mixtas magnetita/chitosán (concentración de metotrexato: 5 mg/mL). Los extremos de la bolsa se cerraron con pinzas. A continuación, se sumergió la bolsa en 200 mL de medio de liberación contenido en un recipiente de crystal. La agitación mecánica se mantuvo constante durante todo el ensayo a 200 rpm. A intervalos de tiempo prefijados (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 160 y 184 horas), se tomó 1 mL de medio de liberación. Este volumen de medio se analizó mediante la metodología espectrofotométrica ultravioleta-visible (a 304 nm), para así determinar la cantidad de fármaco liberado tras cada intervalo de tiempo. Un volumen igual de tampon conservado también a 37.0 ± 0.5 °C se añadió al medio de liberación tras cada toma de muestra para así mantener las condiciones *sink*. La misma metodología de medida utilizada en la determinación de la vehiculización de fármaco fue seguida en los ensayos de liberación.

La figura 7.5. muestra la liberación de metotrexato en función del tiempo desde los nanocompuestos magnetita/chitosán en los que la incorporación de agente quimioterápico se ha realizado a nivel superficial y en matriz. Al comparar la liberación desde ambos tipos de nanopartículas (con fármaco vehiculizado mediante adsorción o absorción) se aprecia claramente una importante diferencia en cuanto a la velocidad con la que se produce la salida del fármaco antitumoral desde los nanocompuestos.

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

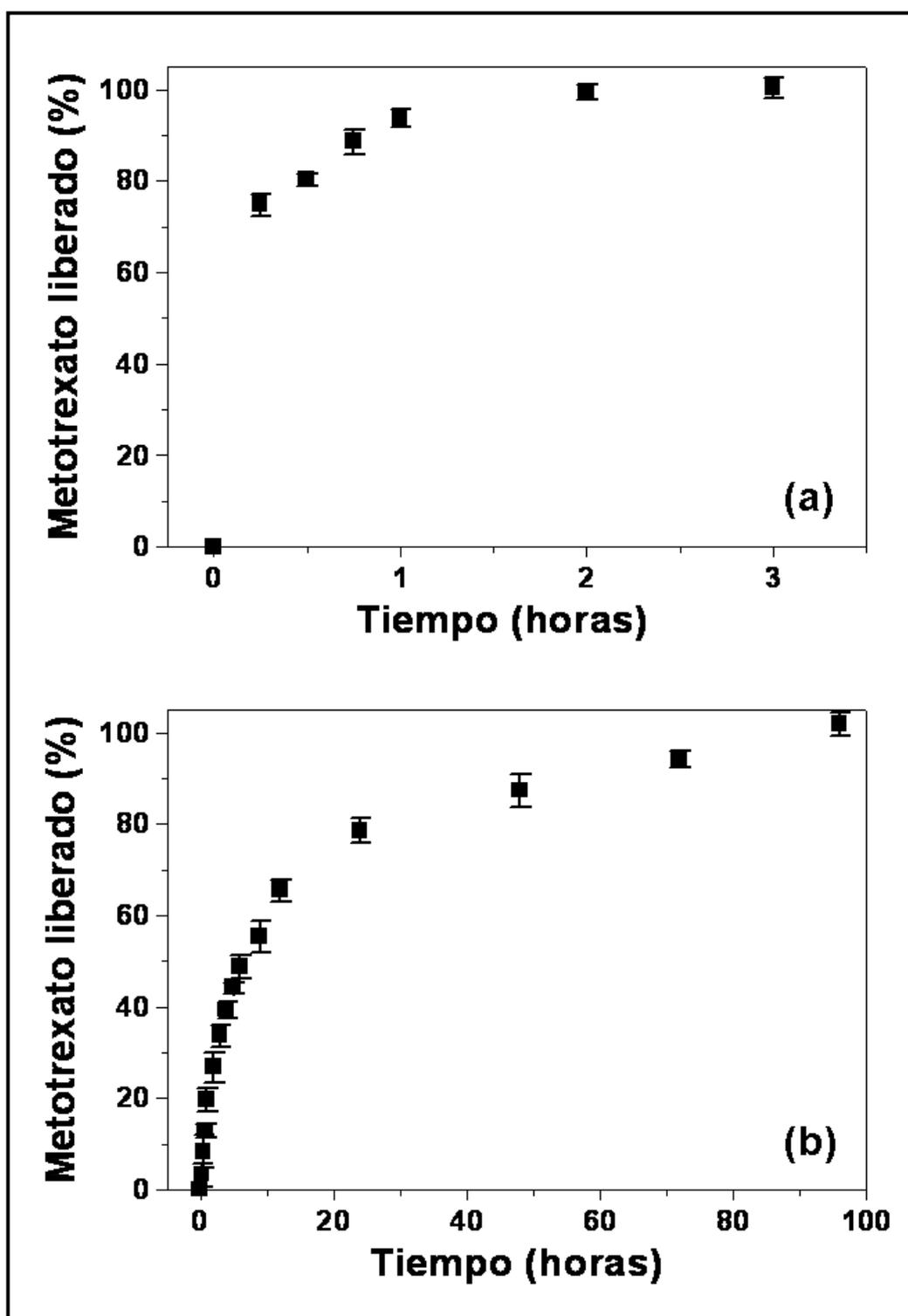


Figura 7.5. Liberación de metotrexato (%) adsorbido (a) o absorbido (b) desde las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4 ± 0.1) a 37.0 ± 0.5 °C.

En el caso de la liberación de metotrexato incorporado en la superficie de las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan, el proceso es bifásico y se completa tras 2 horas (figura 7.5.a). Esta rápida liberación de agente quimioterápico sugiere que la cantidad vehiculizada de éste se encuentra adsorbida exclusivamente en la superficie externa de los nanocompuestos. Este tipo de liberación ya ha sido descrita por nuestro grupo de investigación en nanopartículas de chitosan con metronidazol (Arias y col., 2010a) y gemcitabina (Arias y col., 2011).

Sin embargo, cuando el principio activo es liberado desde las nanopartículas mixtas en las que el metotrexato es absorbido en matriz, el proceso también es bifásico pero no es completo hasta pasadas 96 horas (figura 7.5.b). En primer lugar, debe producirse una fase de liberación rápida de fármaco antitumoral que probablemente significa la cesión de la fracción de principio activo asociado a la superficie de las nanopartículas o débilmente atrapado en éstas (Brasseur y cols., 1991; Ubrich y cols., 2004; Arias y cols., 2010a, 2011). En concreto, la fracción de metotrexato liberada durante esta primera fase es $\approx 20\%$ durante la primera 1 hora. Sin embargo, la liberación más lenta que ocurre durante la segunda fase del proceso ($\approx 80\%$ en las 95 horas restantes) podría atribuirse a un proceso de difusión del agente quimioterápico a través de la matriz polimérica. Este tipo de mecanismo de liberación de fármaco incorporado en la matriz es característico de las nanopartículas de chitosan, como ya ha sido descrito previamente por diversos autores (Papadimitriou et al., 2008; Arias y col., 2010a, 2011). Pensamos también que esta liberación de metotrexato tan sostenida en el tiempo es consecuencia de que parte del principio activo se encuentra adsorbido en la superficie de los núcleos de magnetita cuando se produce el recubrimiento de éstos por el polímero en la formación de las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan. De esta manera, la parte de fármaco localizada en la superficie de los núcleos magnéticos debe difundir a través de toda la cubierta polimérica para poder salir al exterior, lo que ralentiza mucho más el proceso de cesión de metotrexato desde las nanopartículas. Finalmente, este perfil bifásico sugiere que la mayor parte del fármaco se localiza en el interior de la matriz polimérica, en lugar de a nivel superficial. Además, este proceso es característico del polímero chitosan y ya ha sido descrito en fármacos de muy diversa naturaleza, por ejemplo, aceclofenaco, carvacrol, docetaxel, dorzolamida, gemcitabina, metoprolol, metronidazol y pramipexol (Papadimitriou et al., 2008; Nagda y col., 2010; Arias y col., 2010a, 2011; Keawchaon y Yoksan, 2011; Saremi y col., 2011; Ur-Rehman y col., 2011).

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

Para finalizar el estudio de liberación de metotrexato en función del tiempo desde las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan, realizamos el ajuste cinético de los perfiles de liberación utilizando para ello el criterio de Akaike (*AIC*). Según este criterio, el menor valor de *AIC* corresponde con la ecuación de la cinética que mejor se ajusta a los resultados obtenidos (Doménech y cols., 1998; Morales y cols., 2004).

$$AIC = n \times \ln SSQ + 2p \quad (7.5)$$

siendo n , el número de pares de valores experimentales (cantidad liberada/tiempo); SSQ , la suma de los cuadrados de los residuales; y , p , el número de parámetros de la función de ajuste.

En la tabla 7.5 se recogen los valores de *AIC* correspondientes al ajuste cinético de la liberación de metotrexato desde las nanopartículas magnetita/chitosan. En el caso de la liberación de fármaco antitumoral desde los nanocompuestos obtenidos mediante el método de adsorción superficial de metotrexato, los valores de *AIC* obtenidos señalan claramente que la liberación de agente quimioterápico se produce según una cinética raíz cúbica. La ecuación de la cinética raíz cúbica que describe este proceso de liberación de metotrexato desde estas nanopartículas mixtas magnetita/chitosan es:

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 1.16439 + 1.20557 \times \sqrt{t} \quad (7.6)$$

siendo Q_{100} , la cantidad total de principio activo antitumoral liberado en el ensayo; Q , la cantidad de metotrexato liberada en cada instante de tiempo t ; y , t , el tiempo.

Tabla 7.5. Valores de AIC obtenidos en el estudio estadístico de los residuales del perfil de cantidades acumuladas de metotrexato liberado en función del tiempo desde las nanopartículas magnetita/chitosan.

	Valor de AIC			
	Cinética de orden cero	Cinética de orden uno	Cinética raíz cuadrada	Cinética raíz cúbica
Nanocompuestos con metotrexato incorporado mediante adsorción	34.04 ± 0.08	36.48 ± 0.12	39.17 ± 0.09	25.33 ± 0.03
Nanocompuestos con metotrexato incorporado mediante absorción (fase rápida de liberación)	29.53 ± 0.20	23.49 ± 1.25	29.06 ± 0.86	17.31 ± 0.92
Nanocompuestos con metotrexato incorporado mediante absorción (fase lenta de liberación)	38.62 ± 0.01	62.31 ± 0.12	48.22 ± 0.17	54.03 ± 0.01

Finalmente, en cuanto a la liberación de metotrexato desde las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan obtenidas mediante absorción en matriz del fármaco antitumoral, debemos diferenciar en la realización del ajuste cinético las dos fases características del proceso (fase inicial rápida: 1 hora; y fase de liberación lenta: 95 horas) y así calcularemos los valores de *AIC* de cada una de estas etapas. En la primera etapa, los valores de *AIC* obtenidos apuntan de forma patente que la liberación de metotrexato se produce también según una cinética raíz cúbica. La ecuación que describe este proceso es:

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = -2.50353 + 0.68875 \times \sqrt{t} \quad (7.7)$$

VII. Evaluación de la capacidad de vehiculización de metotrexato

Sin embargo, la liberación de agente antineoplásico desde los nanocompuestos magnetita/chitosan durante la segunda etapa se realiza según una cinética de orden cero, como era de esperar ya que la liberación es mucho más sostenida en el tiempo (no es completa hasta pasadas 96 horas). Así queda definido por el menor valor de AIC correspondiente al ajuste de nuestros datos de liberación a la cinética de orden cero (tabla 7.5). La ecuación que describe este proceso es:

$$Q_{100} - Q = 58.74776 - 0.71888 \times t \quad (7.8)$$

Pensamos que esta liberación sostenida de metotrexato en el tiempo es idónea para lograr un efecto antitumoral óptimo *in vivo*. Es decir, casi toda la dosis de principio activo vehiculizada en los nanocompuestos se liberará exclusivamente en el intersticio tumoral, una vez que las nanopartículas magnetita/chitosan se acumulen de forma selectiva a este nivel con la ayuda del gradiente magnético aplicado.

VIII. CONCLUSIONES

El principal objetivo del presente trabajo de investigación es el desarrollo de las condiciones óptimas de formulación de un nanosistema transportador de agentes quimioterápicos como el metotrexato. En concreto, el sistema debe estar constituido por nanopartículas biodegradables formadas por un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico. En resumen y de forma principal, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Sobre la síntesis de las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan.

Se ha conseguido un procedimiento reproducible de síntesis de nanopartículas de composición mixta, formadas por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico (magnetita), ambos biodegradables. La metodología de síntesis de los núcleos de óxido de hierro es muy sencilla y permite la obtención de nanopartículas de magnetita superparamagnéticas, por su pequeño tamaño. El procedimiento de formulación de los nanocompuestos se fundamenta en una pequeña variación del método de coacervación tan ampliamente utilizado en la preparación de nanopartículas de chitosan.

Por lo tanto, se ha diseñado un nanosistema de liberación modificada de fármacos constituido por: *i*) un núcleo magnético, responsable del pequeño tamaño y propiedades magnéticas de las nanopartículas obtenidas; y, *ii*) un recubrimiento polimérico muy apropiado para el transporte y liberación modificada de fármaco.

2. Sobre la estructura, la composición química y las propiedades magnéticas.

Mediante la comparación de los difractogramas de rayos X obtenidos para la magnetita y las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan con el patrón ASTM de este óxido de hierro, se comprobó la perfecta coincidencia de las líneas de estos difractogramas con las del patrón. Esto permite identificar las muestras como magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta, a pesar de quedar incluida en el interior de una matriz polimérica. De esta manera, es de esperar que las propiedades magnéticas persistan tras quedar los núcleos magnéticos recubiertos por el polímero biodegradable.

VIII. Conclusiones

El análisis del espectro de infrarrojos constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento, ya que permitió la identificación de los grupos funcionales del polímero en las nanopartículas compuestas. Las bandas del espectro de los nanocompuestos magnetita/chitosan son menos intensas debido a la presencia de una menor cantidad de polímero en éstas.

La determinación del ciclo de histéresis de las nanopartículas mixtas ha resultado ser muy útil en la caracterización de sus propiedades magnéticas. Al quedar englobado un gran número de núcleos de óxido de hierro en el interior de la matriz polimérica que corresponde a una nanopartícula, la imanación de ésta resulta ser muy elevada por su carácter superparamagnético.

Por lo tanto, de este apartado puede concluirse que nuestras nanopartículas compuestas magnetita/chitosan cumplen el requisito que buscábamos: su superficie es comparable a la del polímero, pero tienen la propiedad de ser magnetizables, por lo que constituyen un vehículo ideal para el transporte de fármacos.

3. Sobre las propiedades eléctricas superficiales.

El análisis comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de nanopartículas mediante electroforesis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento de las nanopartículas de óxido de hierro por la matriz polimérica. Ésta oculta muy eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan sea indistinguible de la de las nanopartículas poliméricas.

4. Sobre la termodinámica superficial.

Ha sido posible realizar una extensa caracterización termodinámica superficial de las nanopartículas sintetizadas, gracias a la utilización de un modelo termodinámico aplicable a la interfase sólido/líquido. Para ello, se ha determinado experimentalmente el ángulo de contacto de los líquidos agua, formamida y diiodometano, sobre comprimidos de los tres tipos de nanomateriales.

El modelo posibilita la caracterización del sólido mediante tres componentes de su energía libre superficial: γ_s^{LW} (Lifshitz-van der Waals, representativa de las

interacciones no polares o dispersivas en la interfase), γ_S^+ (aceptor de electrones o ácido de Lewis) y γ_S^- (donante de electrones o base de Lewis).

La diferente naturaleza de las superficies de magnetita, quitosan y nanopartículas mixtas magnetita/chitosan, se manifiesta en los cambios sufridos por las interacciones interfaciales entre el sólido y los líquidos de ensayo, y en general, en las 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 tres tipos de nanomateriales. La naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde al ser recubierta por el polímero hidrófobo, lo que se considera una prueba muy interesante de la eficacia del recubrimiento.

5. Sobre el mecanismo de formación del recubrimiento polimérico en las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan.

Se ha podido justificar el mecanismo que permite la formación de la cubierta polimérica sobre los núcleos magnéticos basándonos en la información obtenida del estudio termodinámico de los nanomateriales. El recubrimiento polimérico se forja gracias a que las interacciones ácido-base y de van der Waals entre la magnetita y el quitosan son netamente atractivas. Es decir, termodinámicamente es más favorable para el polímero permanecer en contacto con los núcleos de óxido de hierro que estar aislado en el medio acuoso.

6. Sobre la capacidad de vehiculización de metotrexato.

Se ha diseñado un procedimiento sencillo para la determinación de la incorporación de agente antitumoral en los nanocompuestos magnetita/chitosan. Este método se fundamenta en técnicas espectrofotométricas y permite la cuantificación de la vehiculización de principio activo por las nanopartículas magnéticas de forma reproducible. Se basa en la corrección de los valores de absorción obtenidos tras el ensayo de vehiculización, mediante la eliminación de las absorbancias generadas por los residuos de la síntesis de las nanopartículas. Este método ha sido validado y utilizado también en la cuantificación de la cantidad de metotrexato liberada al medio en los ensayos de liberación.

VIII. Conclusiones

Hemos estudiado y definido las condiciones óptimas de vehiculización del fármaco antineoplásico metotrexato en las nanopartículas mixtas, mediante dos métodos: i) la adición del principio activo en el medio acuoso donde se encuentran el polímero disuelto y los núcleos magnéticos en suspensión, antes de que se desencadene la formación de los nanocompuestos; y ii) la adsorción tras la formación e incubación de las nanopartículas mixtas en una disolución de principio activo antitumoral.

El análisis espectrofotométrico de la incorporación superficial de metotrexato por las nanopartículas magnetita/chitosan pone de manifiesto la contribución de la adsorción superficial al proceso de vehiculización de este principio activo antitumoral. Se ha observado un efecto positivo de la concentración de antineoplásico en el medio de contacto sobre la cantidad adsorbida por las nanopartículas mixtas. Además, la adsorción de metotrexato en la superficie de los núcleos magnéticos es utilizada en la formulación de nanocompuestos con este agente quimioterápico incorporado en matriz. De esta manera, la contribución de la interfase magnetita – chitosan a la absorción de metotrexato mejora considerablemente su vehiculización. Todas estas condiciones han sido empleadas en la obtención de nanopartículas magnetita/chitosan con metotrexato incorporado que serán utilizadas en los ensayos de liberación *in vitro* de fármaco.

La absorción en matriz de metotrexato mejora considerablemente los resultados de vehiculización de este fármaco antitumoral en superficie. Creemos que la adsorción previa de metotrexato en la superficie de los núcleos de óxido de hierro, junto con la intensa interacción electrostática entre el fármaco y el polímero durante la precipitación de este último, justifican los interesantes resultados de vehiculización obtenidos. Existe también un importante efecto positivo de la concentración de fármaco utilizada sobre los resultados de vehiculización. En cuanto al resto de parámetros (concentración de agente tensioactivo, cantidad de polímero utilizada, etc.), si bien no ejercen un efecto significativo en la vehiculización de metotrexato, sí son variables muy importantes a tener en cuenta para la obtención de nanopartículas magnetita/chitosan para uso parenteral.

El estudio de la liberación *in vitro* de metotrexato incorporado en la superficie de las nanopartículas mixtas revela un perfil de cesión muy rápido de fármaco antitumoral. Completo en 2 horas y que se ajusta a una cinética de liberación raíz cúbica. La liberación de metotrexato incorporado en los nanocompuestos mediante

absorción en matriz resulta ser mucho más interesante para obtener un óptimo efecto antitumoral. En concreto, la liberación se produce mediante un proceso bifásico que no es completo hasta transcurridas 96 horas. Además, es en la segunda etapa de este proceso donde se produce la liberación de la mayor fracción de metotrexato ($\approx 80\%$ en 95 horas), según una cinética de orden cero. Por lo tanto, la vehiculización del antitumoral mediante absorción permite obtener una mayor incorporación de fármaco en las nanopartículas y una cinética mucho más lenta de liberación, en comparación con la metodología de adsorción superficial.

Finalmente, hemos desarrollado una “prueba de concepto” *in vivo* de las interesantes posibilidades que podrían ofrecer las nanopartículas magnetita/chitosan como sistemas transportadores de metotrexato en la quimioterapia del cáncer. Para ello, se ha aplicado un método histológico de tinción de los núcleos de óxido de hierro en un modelo de tumor subcutáneo L1210 desarrollado en ratones DBA/2. El método se basa en la reacción de éstos con ferrocianuro potásico formando un precipitado azul verdoso de ferrocianuro férrico o azul de Prusia. La tinción de los núcleos de magnetita de las nanopartículas mixtas permite visualizar una excelente acumulación de los nanocompuestos en los cortes histológicos de la masa tumoral. En concreto, sólo los cortes de las masas tumorales de los ratones tratados con las nanopartículas mixtas magnetita/chitosan bajo la influencia de un campo magnético aplicado en el lugar de acción, mostraron una importante acumulación de hierro en el intersticio tumoral. Es de esperar que las experiencias que estamos preparando revelen un excelente efecto antitumoral de los nanocompuestos de metotrexato, consecuencia del transporte selectivo magnético de éstos hasta el tumor.

IX. BIBLIOGRAFÍA

ACHARYA S., DILNAWAZ F., SAHOO S.K., Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy, *Biomaterials* 30 5737–5750 (2009).

ADAMS G.P., SCHIER R., McCALL A.M., SIMMONS H.H., HORAK E.M., ALPAUGH R.K., MARKS J.D., WEINER L.M., High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules, *Cancer Res.* 61 4750–4755 (2001).

ADAMSON, A. W. *Physical chemistry of surfaces*, 4^º Ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1982).

AIROLDI, M., PEDANI, F., BRANDO, V., GABRIELE, P., GIORDANO, G., Vinorelbine treatment of recurrent salivary gland carcinomas, *Tumori* 75, 252 (1989).

ALKSNE, J. F., FINGERHUT, A. G., RAND, R. W., The steady-state magnetic field in the transition region between the magnetosphere and the bow shock , *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 30, 159 (1967).

ALLEN, L. M., MATIJEVIĆ, E., Stability of colloidal silica : I. Effect of simple electrolytes. *J. Colloid Interface Sci.* 31, 287 (1969).

AMERICAN CANCER SOCIETY, web on-line, (2010)

ANDRESEN T. L., JENSEN S. S., JORGENSEN K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release, *Prog. Lipid Res.* 44:68Y97 (2005).

ARIAS J. L., GALLARDO, V., GÓMEZ-LOPERA, S. A., PLAZA, R. C., DELGADO, A. V., Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core, *J. Control. Rel.* 77, 309 (2001).

ARIAS, J. L., GALLARDO, V., GÓMEZ-LOPERA, S. A., DELGADO, A. V., Loading of 5-Fluorouracil to poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core, *J. Biomed. Nanotech.* 1(2), 214 (2005).

IX. Bibliografía

ARIAS, J. L., GALLARDO, V., LINARES MOLINERO, F., DELGADO, A. V., Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles, *J. Colloid. Interface Sci.* 299, 599 (2006).

ARIAS J. L, GALLARDO V, RUIZ MA, DELGADO A. V. Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(butylcyanoacrylate) nanospheres. *Int. J. Pharm.* 337, 282-290 (2007).

ARIAS, J. L., GALLARDO, V., RUIZ, M. A., DELGADO, A. V., Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-Fluorouracil delivery systems for active targeting, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 54 (2008a).

ARIAS JL, LÓPEZ-VIOTA M, LÓPEZ-VIOTA J, DELGADO A. V. Development of iron/ethylcellulose (core/shell) nanoparticles loaded with diclofenac sodium for arthritis treatment. *Int J. Pharm.* 382, 270-276(2009b).

ARIAS, J. L., LÓPEZ-VIOTA, M., RUIZ, M. A., LÓPEZ-VIOTA, J., DELGADO, A. V., Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(butylcyanoacrylate) nanospheres, *Int. J. Pharm.* 339, 237 (2007).

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* 77, 111-116(2010b).

ARIAS, J. L., LINARES-MOLINERO, F., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., Study of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) (core/shell) particles as anticancer drug delivery systems: Loading and release properties, *Eur. J. Pharm. Sci.* 33, 252 (2008a).

ARIAS J.L., MARTÍNEZ-SOLER G.I., LÓPEZ-VIOTA M., RUIZ M.A. Formulation of chitosan nanoparticles loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett. Drug Des. Discov.* 7, 70-78 (2010a).

ARIAS JL, REDDY LH, COUVREUR P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J. Drug Target.* 17, 586-598(2009a).

ARIAS, J. L., RUIZ, M. A., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles, *J. Control. Rel.* 125, 50 (2008b).

ARIAS J.L., REDDY L.H. COUVREUR P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* 12, 97-104(2011).

ARRUEBO M, FERNÁNDEZ-PACHECO R, IBARRA MR, SANTAMARÍA J. Magnetic nanoparticles for drug delivery, *Nanotoday* 2:22–32 (2007).

ARTEMOV D., MORI N., OKOLLIE B., BHUJWALLA Z. M. MR molecular imaging of the Her-2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles, *Magn. Reson. Med.* 49:403Y408 (2003).

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER, 2010.

BACRI J. C., DA SILVA M. F., PERZYNSKI R., PONS J. N., ROGER J., SABOLOVIC D., HALBREICH A. Use of magnetic nanoparticles for thermolysis of cells in a ferrofluid". In U. Hafeli, W. Schutt, J. Teller, U. Hdfeli, W. Schutt, and M. Zborowski (eds.), *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Plenum Press, New York, 1997, pp. 597Y606.

BARBERI-HEYOB, M., WATELET M., MERLIN J. L., BLEYER, C., SCHROEDER, B., In-vivo evaluation of sustained release microspheres of 5-FU in rabbits, *Bull. Cancer.* 82(12), 1025 (1995).

BARRY, J. W., BOOKSTEIN, J. J., ALKSNE, J. F., Ferromagnetic embolization, *Radiology* 138, 341 (1981).

BELIKOV, V. G., KUREGYAN, A. G., Identification of the magnetic compound synthesized by a new method, *Pharm. Chem. J.* 35(2), 88 (2001).

BELLOCQ N.C., PUN S.H., JENSEN G.S., DAVIS M.E., Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery, *Bioconjug. Chem.* 14 1122–1132 (2003).

IX. Bibliografía

BETANCOURT T., BROWN B., BRANNON-PEPPAS L., Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation, *Nanomed* 2 (2) 219–232 (2007).

BONNEMAIN B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. *J. Drug Target.* 6:167Y174 (1998).

BOOTH, F., Surface conductance and cataphoresis, *Trans. Faraday Soc.* 44, 955 (1948a).

BOOTH, F., Theory of electrokinetic effects, *Nature* 161, 83 (1948b).

BOOTH, F., The electroviscous effect for suspensions of solid spherical particles, *Proc. Roy. Soc.* 203 A, 514 (1950).

BRADFIELD, J. W. B., A new look at reticuloendothelial blockade, *Brit. J. Exp. Pathol.* 61, 617 (1980).

BRADFIELD, J. W. B. *Microspheres and Drug Therapy*. Ed. : Davis, S. S., Illum, L., McVie, J. G., Tomlinson, E. Elsevier, New York, pp. 25-37 (1984).

BRASSEUR, N., BRAULT, D., COUVREUR, P., Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release, *Int. J. Pharm.* 70, 126 (1991).

BRIGGER, I; DUBERNET, C; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54, 631-651.

BROWN, I., WARD, H. W. C., Therapeutic consequences of antitumour drug interactions: methotrexate and 5-fluorouracil in the chemotherapy of C3H mice with transplanted mammary adenocarcinoma, *Cancer Lett.* 5, 291 (1978).

BUGAY, D. E., *Magnetic Resonance Spectroscopy*. En: *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*, Ed.: Brittain, H. G., Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 93-125 (1995).

BUXTON DN, LEE SC, WICKLINE SA, FERRARI M. Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute Nanotechnology Working Group. *Circulation* 108:2737–2742 (2003).

BYRNE J.D., BETANCOURT T., BRANNON-PEPPAS L., Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 1615–1626 (2008).

CALLISTER, W. D. JR., *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales*, Tomo II, Ed. Reverté, Barcelona, pp. 685 (1996).

CALVO, F. A., GÓMEZ-ESPÍN, M., DÍAZ-GONZÁLEZ, J. A., CANTALAPIEDRA, R., MARCOS, P., ALVARADO, A., GARCÍA-ALFONSO, P., HERRANZ, R., ÁLVAREZ, E., Intraoperative presacral electron boost following preoperative chemoradiation in T3-4 Nx rectal cancer: initial local effects and clinical outcome analysis, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 51(5), 1264 (2001).

CARABALLO I., ÁLVAREZ-FUENTES J., MELGOZA M.L., MILLÁN M., HOLGADO M.A., RABASCO A.M., FERNÁNDEZ-ARÉVALO M. Design of controlled release inert matrices of naltrexone hydrochloride based on percolation concepts, *J.Pharm. Biomed. Anal.* 18, 1-2, 281 (1998).

CHAMBERLIN A.R., CHEUNG A.P.K., LIM P. Methotrexate. En: *Analytical Profiles of Drug Substances*, Vol.5 (Ed.: K. Florey). Academic Press, Inc., pp. 283-306, Londrés, (1976).

CHAMPETIER, G., MONNERIE, L., *Introduction a la Chimie Macromoleculaire*, Mason et Cie, París, pp. 76 (1969).

CHARI, R. V. J.; JACKEL, K. A.; BOURRET, L. A.; DERR, S. M.; TADAYONI, B. M.; MATTOCKS, K. M.; SHAH, S. A.; LIU, C.N.; BLATTLER, W. A.; GOLDMACHER, V. S. Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs, *Cancer Res.* 5, 4079 (1995).

CHARLES, S. W., POPPLEWELL, J., Ferromagnetic liquids. En: *Ferromagnetic Materials* (Vol. 2), Ed.: Wohlfart, E. P., North-Holland Publishing Company, pp. 509-559 (1980).

IX. Bibliografia

CHAUDHURY, M. K., GOOD, R. J., Retarded van der Waals force theory and stability of thick films in systems of three condensed phases, *J. Colloid Interface Sci.*, 94, 29 (1983).

CHIBOWSKI, E., J. Solid surface free energy components determination by the thin-layer wicking technique, *Adhesion Sci. Technol.* 6, 1069 (1992).

CHIBOWSKI, E., HOLYSZ, L., Use of the Washburn equation for surface free energy determination, *Langmuir* 8, 710 (1992).

CHIBOWSKI, E., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., Theory and practice of thin-layer wicking, *Langmuir* 9, 330 (1993).

CHIBOWSKI, E., KERKEB, M. L., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., Effect of inorganic ions on changes in the energetic heterogeneity of the cholesterol surface, *Langmuir* 9, 2493 (1993).

CHOW, A. H. L., HO, S. S. S., TONG, H. H. Y., MA, H. H. M., *Int. J. Pharm.* 172 (1998) 113.

CHO K., WANG X., NIE S., CHEN Z.G., SHIN D.M., Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clin. Cancer Res.* 141310–1316 (2008).

CHRISTENSON, H. K., HORN, R. G., Forces between solid surfaces in a binary mixture of non-polar liquids, *Chemical Scripta* 25, 37 (1985).

CHRISTENSON, H. K., Non-DLVO forces between surfaces--Solvation, hydration and capillary effects, *J. Disp. Sci. Technol.* 9, 171 (1988).

CHUA-ANUSORN, W., MACEY, D. J., WEBB, J., DE LA MOTTE-HALL, P., ST. PIERRE, T. G., Effects of prolonged iron loading in the rat using both parenteral and dietary routes, *Biometals* 12, 103 (1999).

CONTE, P. F., SERTOLI, M. R., BRUZZONE, M., Cisplatin, methotrexate and 5-fluorouracil combination chemotherapy for advanced ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.* 20, 290 (1985).

COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L., Inflamación y Reparación. En: "Patología Estructural y Funcional", 5ª Ed., Ed.: Schoen, F. J., Interamericana McGraw-Hill, Nueva Cork, pp. 57 (1995).

COUVREUR P. Smart nanomedicines: from where are we coming and where are we going?, XXI Simposio ADRITELF, Cagliari 2009.

COUVREUR P., VAUTHIER C., Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease." Pharm. Res. 23, 7 (2006).

CRAIG, D. Q. M., "Dispersions as Pharmaceutical Dosage Forms". En: "Technological Applications of Dispersions", Ed.: Williams, R. A., Marcel Dekker, New York, pp. 457-497 (1994).

CUETO, A., TARDÓN, A., DELGADO, M., Epidemiología del Cáncer. En: "*Medicina Preventiva y Salud Pública*", 10ª Ed., Ed.: Piedrola Gil, G., Masson (2001).

CURRERI, A. R., ANSFIELD, F. J., McIVER, F. A., WAISMAN, H. A., HEIDELBERGER, C., Clinical studies with 5-fluorouracil. Cancer Res. 18, 478 (1958).

DANIELS T.R., DELGADO T., HELGUERA G., PENICHET M.L., The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells, Clin. Immunol. 121 917159–176 (2006).

DAVIS, ME; CHEN, Z; SHIN, DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. Nat. Rev. Drug Discov., 7, 771-782 (2008).

DE VERDIERE A.C., DUBERNET C., NEMATI F., SOMA E., APPEL M., FERTE J., BERNARD S., PUISIEUX F., COUVREUR P., Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action. British J. Cancer, 76(2), 198 (1997).

DEBYE, P., van der Waals' cohesion forces. Physik 22, 302 (1921).

IX. Bibliografía

DELLIAN M., HELMLINGER G., YUAN F., JAIN R.K., Fluorescence ratio imaging of interstitial pH in solid tumours: effect of glucose on spatial and temporal gradients, *Br. J. Cancer* 74:1206–1215 (1996).

DEPARTAMENTO TÉCNICO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS, Catálogo del Medicamento, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (2008).

DERJAGUIN, B. V., A theory of the heterocoagulation, interaction and adhesion of dissimilar particles in solutions of electrolytes. *Dis. Faraday Soc.* 18, 85 (1954).

DOMÉNECH J., MARTÍNEZ J., PLÁ J.M. *Biofarmacia y farmacocinética*, Vol. I, Ed. Síntesis, Madrid, España, 1998.

DUKHIN, S. S., Development of Notions as to the Mechanism of Electrokinetic Phenomena and the Structure of the Colloid Micelle. En: *Surface and Colloid Science*, Vol. VII, Ed.: Matijević, E., Wiley, Nueva York, pp. 1-47 (1974).

DUKHIN, S. S., DERJAGUIN, B. V., Equilibrium Double Layer and Electrokinetic Phenomena. En: *Surface and Colloid Science*, Vol. VII, Ed.: Matijević, E., Wiley, Nueva York, pp. 49-272 (1974).

DURÁN, J.D.G., ARIAS, J.L., GALLARDO, V., DELGADO, A. V. Magnetic colloids as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97, 2948-2983.

DURÁN, J. D. G., DELGADO, A. V., CHIBOWSKI, E., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., Surface free energy components of monodisperse zinc sulfide. *Mater. Chem. Phys.* 38, 42 (1994).

DURÁN, J. D. G., GUINDO, M. C., DELGADO, A. V., Electrophoretic properties of colloidal dispersions of monodisperse zinc sulphide: effects of potential-determining ions and surface oxidation. *J. Colloid Interface Sci.* 173, 436 (1995).

DURÁN, J. D. G., ARIAS, J. L., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., Study of the magnetorheological response of aqueous magnetite suspensions stabilized by acrylic acid polymers. *J. Pharm. Sci.*, DOI: 10.1002/jps.21249 (2008).

FAWAZ, F., GUYOT, M., LAGUENY, A. M., DEVISSAGUET, Ciproflexan-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: preparation and characterization. *J. Pharm.* 154, 191 (1997).

FIDLER, I. J., BARNES, Z., FOGLER, W. E., KIRSH, R., BUGELSKI, P., POSTE, G., Involvement of macrophages in the eradication of established metastases following intravenous injection of liposomes containing macrophage activators. *Cancer Res.* 42, 496 (1982).

FONTANA G., PITARRESI G., TOMARCHIO V., CARLISI B., SAN-BIAGIO P.L., Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 19, 1009 (1998).

FORASTIERE, A. A., NATALE, R. B., TAKASUGI, B. J., GOREN, M. P., VOGEL, W. C., A phase I–II trial of carboplatin and 5-Fluorouracil combination chemotherapy in advanced carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.* 5, 190 (1987).

FOWKES, F. M., Additivity of intermolecular forces at interfaces I. Determination of the contribution to surface and interfacial tensions of dispersion forces in various liquids. *J. Phys. Chem.* 67, 2538 (1963).

FOWKES, F. M., MOSTAFA, M. A., Acid-base interactions in polymer adsorption, I. *E. C. Prod. Res. Div.* 17, 3 (1978).

GOLDBERG, J. A., KERR, D. J., BLACKIE, R., WHATELY, T. L., PETTIT, I., KATO, T., MCARDLE, Mitomycin C-loaded microcapsules in the treatment of colorectal liver metastases: pharmacokinetics of regionally administered particulate chemotherapy. *C. S., Cancer* 67, 952 (1991).

GOOD, R. J., GIRIFALCO, L. A., A theory for estimation of surface and interfacial energies III. Estimation of surface energies of solids from contact angle data, *J. Phys. Chem.* 64, 561 (1960).

GOOD, R. J., Estimation of surface energies from contact angles, *J. Colloid Interface Sci.* 59, 3 (1977).

IX. Bibliografia

GOOD, R. J., "Contact Angle, Wetting and Adhesion: A Critical Review". En: "Contact Angle, Wettability and Adhesion", Ed.: Mittal, K. L., Utrecht, Holanda (1993).

GOODWIN, S., PETERSON, C., HOH, C., BITTNER, C., Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy, J. Magn. Mater. 194, 132 (1999).

GOSK S., MOOS T., GOTTSTEIN C., BENDAS G., VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo, Biochim. Biophys. Acta 1778854–863 (2008).

GRADISHAR W.J., TJULANDIN S., DAVIDSON N., SHAW H., DESAI N., BHAR P., HAWKINS M., O'SHAUGHNESSY J., Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer, J. Clin. Oncol. 23 7794–7803 (2005).

GRATTARD, N., PERNIN, M., MARTY, B., ROUDAUT, G., CHAMPION, D., LE MESTE, M., Study of release kinetics of small and high molecular weight substances dispersed into spray-dried ethylcellulose microspheres. J. Control. Rel. 84, 125 (2002).

GULATI, M., GROVER, M., SINGH, S., SINGH, M., Lipophilic drug derivatives in liposomes. Int. J. Pharm. 165, 129 (1998).

GUO X, SZOKA F. C. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery. Acc Chem Res 36:335–341 (2003).

GUPTA, P. K., GUPTA, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials 26, 3995 (2005).

GUPTA, P. K., HUNG, C. T., PERRIER, D. G., Albumin microspheres, I: release characteristics of adriamycin. Int. J. Pharm. 33, 137 (1986).

GUPTA, P. K., HUNG, C. T., Albumin microspheres. III. Synthesis and characterization of microspheres containing adriamycin and magnetite. Int. J. Pharm. 43, 167 (1988).

GUPTA, P. K., HUNG, C. T., Magnetically controlled targeted micro-carrier systems. *Life Sci.* 44, 175 (1989).

GUPTA, P. K., HUNG, C. T., Albumin microspheres. V. Evaluation of parameters controlling the efficacy of magnetic microspheres in the targeted delivery of adriamycin in rats, *J. Microencapsulation* 7(1), 85 (1990).

GUPTA, P. K., HUNG, C. T., Magnetically Controlled Targeted Chemotherapy". En: "Microspheres and Regional Cancer Therapy, Eds.: Willmott, N., Daly, J., CRC Press, Boca Raton, FL, pp.71-116 (1994).

HALBREICH A., ROGER J., PONS J. N., GELDWERTH D., DA SILVA M. F., ROUDIER M., BACRI J. C., Biomedical applications of maghemite ferrofluid. *Biochimie* 80:379Y390 (1998).

HALEY B., FRENKEL E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment, *Urol. Oncol.* 26 (1) 57–64 (2008).

HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., GOODMAN-GILMAN, A., *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (Goodman & Gilman)*, 10^a Ed., McGraw-Hill Interamericana (2003).

HARIVARDHAN L., Drug delivery to tumors: recent strategies. *J. P.P.* 57,1231-1242 (2005).

HARRIS, M. R., GHEBRE-SELLASIE, I., Aqueous Polymeric Coating for Modified Release Pellets. Ed.: McGinity, J., *Aqueous Polymeric Coating for Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 63 (1989).

HATAKEYAMA H., AKITA H., ISHIDA E., HASHIMOTO K., KOBAYASHI H., AOKI T., YASUDA J., OBATA K., KIKUCHI H., ISHIDA T., KIWADA H., HARASHIMA H., Tumor targeting of doxorubicin by anti-MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes, *Int. J. Pharm.* (1–2) 194–200 (2007).

HENRY, D. C., The cataphoresis of suspended particles. Part I. The equation of cataphoresis, *Proc. Roy. Soc.* 133 A, 106 (1931).

IX. Bibliografía

HELDIN C.H., RUBIN K., PIETRAS K., OSTMAN A., High interstitial fluid pressure an obstacle in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* 4 806–813 (2004).

HERGT R, DUTZ S, MÜLLER R, ZEISBERGER M. Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J Phys Cond Matter* 18:S2919–S2934 (2006).

HILGER, W. ANDRÁS, R. HERGT, R. HIERGEIST, H. SCHUBERT, ANDW. A. KAISER. Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: in vitro and in vivo studies in human cadavers and mice. *Radiology* 218:570Y575 (2001).

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 Matter* 18:S2951–S2958 (2006).

HOBBS S.K., MONSKY W.L., YUAN F., ROBERTS W.G., GRIFFITH L., TORCHILIN V.P., JAIN R.K., Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (8) 4607–4612(1998)

HORN, R. G., ISRAELACHVILI, J., Direct measurement of structural forces between two surfaces in a nonpolar liquid. *J. Chem. Phys.* 75, 1400 (1981).

HSU, M. J., JULIANO, R. L., Uptake and binding of liposomal 2',3'-Dideoxycytidine by RAW 264.7 cells: A three-step process, *Biophysics* 720, 411 (1982).

HUNG, C. T., MCLEOD, A. D., GUPTA, P. K., Formulation and Characterization of Magnetic Polyglutaraldehyde Nanoparticles as Carriers for Poly-L-Lysine-Methotrexate, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 16, 509 (1990).

HUNTER, R. J., *Zeta Potencial in Colloid Science*, Academic Press, Nueva York (1981).

HUNTER, R. J., *Foundations of Colloid Science*, Vol. I, Oxford University Press, Oxford (1987).

HURST H.C., Update on HER-2 as a target for cancer therapy: the ERBB2 promoter and its exploitation for cancer treatment, *Breast Cancer Res.* 3395–398 (2001).

IANNONE, A., MAGIN, R. L., WALCZACK, T., FEDERICO, M., SWARTZ, H. M., TOMASI, A., VANNINI, V., Blood clearance of dextran magnetite particles determined by a noninvasive in vivo ESR method. *Magn. Reson. Med.* 22, 435 (1991).

IBRAHIM, A., COUVREUR, P., ROLAND, M., SPEISER, P., New magnetic drug carrier. *J. Pharm. Pharmacol.* 35, 59 (1983).

ILLUM, L., DAVIS, S. S., The targeting of drugs parenterally using microspheres. *J. Parent. Sci. Technol.* 36, 242 (1982).

ISRAELACHVILI, J., *Intermolecular and Surface Forces*, 2^o Ed., Academic Press, London (1991).

IYER A.K., KHALED G., FANG J., MAEDA H., Exploiting the enhance permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery today* 11, 17-18 (2006).

JAIN, RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *J. Control. Release*, 74, 7-25 (2001).

JANCZUK, B., CHIBOWSKI, E., BIALOPIOTROWICZ, T., Interpretation of the contact angle in quartz/organic liquid film-water system. *Mater. Chem. Phys.* 15, 489 (1987).

JANCZUK, B., CHIBOWSKI, E., BIALOPIOTROWICZ, T., GONZÁLEZ-CABALLERO, F. Surface free energy of celestite and its flotation activity. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 35, 41 (1989).

JANCZUK, B., CHIBOWSKI, E., GUINDO, M. C., WÓJCIK, W., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., Surface free energy of some lead compounds compared to galena, *Mater. Chem. Phys.* 37, 64 (1993).

KALLAY, N., TORBIC, Z., GOLIC, M., MATIJEVIC, E., Determination of the isoelectric points of several metals by an adhesion method. *J. Phys. Chem.* 95, 7028 (1991).

IX. Bibliografia

KATO, T., NEMOTO, R., MORI, H., UNNO, K., GOTO, A., HARADA, M., HOMMA, M., Magnetic control of ferromagnetic mitomycin C microcapsules in the artery and urinary bladder, *Proc. Jpn. Acad.* 55, 470 (1979).

KATO, T., NEMOTO, R., MORI, H., TAKAHASHI, M., HARADA, M., Arterial chemoembolization with mitomycin C microcapsules in the treatment of primary or secondary carcinoma of the kidney, liver, bone and intrapelvic organ *Cancer* 48, 674 (1981).

KATO, T., Encapsulated Drugs in Targeted Cancer Therapy. En: *Controlled Drug Delivery*, Vol. 2, Ed.: Bruck, S. D., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 189-192 (1982).

KATO, T., NEMOTO, R., MORI, H., ABE, R., UNNO, K., GOTO, A., MUROTA, H., HARADA, M., HOMMA, M., Magnetic microcapsules for targeted delivery of anticancer drugs. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 10, 199 (1984).

KATO, T., SATO, K., SASAKI, R., KAKINUMA, H., MORIYAMA, M., Targeted cancer chemotherapy with arterial microcapsule chemoembolization: review of 1013 patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 37, 289 (1996).

KEAWCHAOON L, YOKSAN R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 84, 163-171 (2011).

KEESOM, W. H., *Physik* 22(129) 643 (1921).

KIRPOTIN D.B., DRUMMOND D.C., SHAO Y., SHALABY M.R., HONG K., NIELSEN U.B., MARKS J.D., BENZ C.C., PARK J.W., Antibody targeting of long circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models, *Cancer Res.* 66 (13) 6732–6740(2006).

KIWADA, H., SATO, J., YAMADA, S., KATO, Y. Feasibility of magnetic liposomes as a targeting device for drugs, *Chem. Pharm. Bull.* 34, 4253 (1986).

KONG G., ANYARAMBHATLA G., PETROS W. P., BRAUN R. D., COLVIN O. M., NEEDHAM D., DEWHIRST M. W.. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human

tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res.* 60:6950Y6957 (2000).

KOST, J., NOECKER, R., KUNICA, E., LANGER, R., Magnetically controlled release systems: effect of polymer composition, *J. Biomed. Mater. Res.* 19(8), 935 (1985).

KRASNICI S., WERNER A., EICHHORN M.E., SCHMITT-SODY M., PAHERNIK S.A., SAUER B., SCHULZE B., TEIFEL M., MICHAELIS U., NAUJOKS K., DELLIAN M., Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels, *Int. J. Cancer* 105 (4) 561–567 (2003).

KUBASKA S., SAHANI D. V., SAINI S., HAHN P. F., HALPERN E. Dual contrast enhanced magnetic resonance imaging of the liver with superparamagnetic iron oxide followed by gadolinium for lesion detection and characterisation. *Clin. Radiol.* 56:410Y415 (2001).

LANDAU, L. D., LIFSHITZ, E. M., *Fluid Mechanics*, Pergamon Press, Oxford (1959).

LASKOWSKI, J. S., PUGH, R. J., *Dispersions Stability and Dispersing Agents*. En: *Colloid Chemistry in Mineral Processing*, Elsevier, London (1992).

LAVAN D. A., MCGUIRE T., LANGER R. Smallscale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnol* 21:1184–1191 (2003).

LEE, B.S. Y COL. Polycefin, a new prototype of a multifunctional nanoconjugate based on poly (beta-L-malic acid) for drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 17, 317–326 (2006).

LEHMANN, K., *Chemistry and Application Properties of Polymetacrylate Coating Systems*. En: *Aqueous Polymeric Coating for Pharmaceutical Dosage Forms*”, Marcel Dekker, Nueva York, p.153 (1980).

LENAERTS, V., COUVREUR, P., CHRISTIAENS-LEYH, D., JOIRIS, E., ROLAND, M., ROLLMAN, B., SPEISER, P., In vivo uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer endothelial and parenchymal cells, *Biomaterials* 5, 65 (1984).

IX. Bibliografía

LEPORI, R. L. Vadenmecum índice farmacológico desarrollado, pp.708, 2003.

LEWIS, D. A., ALPAR, H. O., Therapeutic possibilities of drugs encapsulated in erythrocytes, *Int. J. Pharm.* 22, 137 (1984).

LI Y, BHUIYAN M, MOHAMMAD RM, SARKAR F. H, Induction of apoptosis in breast cancer cells by TPA^α Oncogene, Dec 3;17(22):2915-20 (1998).

LIFSHITZ, E. M., Van der Waals forces. *Zh. Eksp. Teo. Fiz.* 29, 94 (1955).

LIN C. P., KELLY M. W., SIBAYAN S. A., LATINA M. A., ANDERSON R. R. Selective cell killing by microparticle absorption of pulsed laser radiation. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 5:963Y968 (1999).

LINUMA H., MARUYAMA K., OKINAGA K., SASAKI K., SEKINE T., ISHIDA O., OGIWARA N., JOHKURA K., YONEMURA Y., Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer, *Int. J. Cancer.* 99 (1),130–137(2002).

LIU, C. N.; TADAYONI, B. M.; BOURRET, L. A.; MATTOCKS, K. M.; DERR, S. M.; WIDDISON, W. C.; KEDERSHA, N. L.; ARINIELLO, P. D.; GOLDMACHER, V. S.; LAMBERT, J. M.; BLATTLER, W. A.; CHARI, R. V. J. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 8618. (1996).

LLOVET M.I., EGEA M.A., VALERO J., ALSINA M.A., GARCÍA M.L., CHAUVET A., Methotrexate-loaded nanoparticles: Analysis of drug content and study of the matrix structure. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, 1761 (1995).

LONDON, F. Z., Zur Theorie und Systematik der Molekularkräfte. *Physik* 63, 245 (1930).

LÓPEZ GARCÍA, J. J., MOYA, A. A., HORNO, J. J., DELGADO, A. V., GÓNZALEZ-CABALLERO, F., A network model of the electrical double layer around a colloid particle, *J. Colloid Interface Sci.* 183, 124 (1996).

LOPES DE MENEZES D.E., PILARSKI L.M., ALLEN T.M., In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma, *Cancer Res.* 58 (15) 3320–3330 (1998).

LOSA C., CALVO P., CASTRO E., VILA-JATO J.L., ALONSO M.J., Improvement of ocular penetration of amikacin sulphate by association to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 548 (1991).

LÜBBE A., ALEXIOU C., BERGEMANN C., Clinical applications of magnetic drug targeting, *J. Surg. Res.* 95,200 (2001).

LÜBBE, A., BERGEMANN, C., BROCK, J., MCCLURE, D., Physiological aspects in magnetic drug-targeting. *J. Magn. Mater.* 194, 149 (1999).

LURJE G., LENZ H.J., EGFR signaling and drug discovery, *Oncology* 77 400–410 (2009).

LYKLEMA, J., Water at interfaces: A colloid-chemical approach, *J. Colloid Interface Sci.*, 58, 242 (1977).

LYKLEMA, J., Structure of the Solid/Liquid Interface and the Electrical Double Layer. En: "Solid/Liquid Dispersions", Ed.: Tadros, T. F., Academic Press, London, pp. 63-90 (1987).

LYKLEMA, J., Fundamentals of Interface and Colloid Science (Vol. II): Solid/Liquid Interfaces, Academic Press, Londres (1995).

LYKLEMA, J., MINOR, M., On surface conduction and its role in electrokinetics, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 140, 33 (1998).

MAEDA, H. Y COL. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J. Control. Release* 74, 47–61(2001).

MAEDA, H., FANG, J., INUTSUKA, T., KITAMOTO, Y., Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int. Immunopharmacol.* 3, 319 (2003).

IX. Bibliografía

MAEDA H., BHARATE G.Y., DARUWALLA J., Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 409–419 (2009).

MANGELSDORF, C. S., WHITE, L. R., Effects of stern-layer conductance on electrokinetic transport properties of colloidal particle, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 86, 2859 (1990).

MANGELSDORF, C. S., WHITE, L. R., The dynamic double layer Part 1 Theory of a mobile Stern layer *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 94, 2441 (1998a).

MANGELSDORF, C. S., WHITE, L. R. The dynamic double layer: Part 2 Effects of Stern-layer conduction on the high-frequency electrokinetic transport properties, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 94, 2583 (1998b).

MARTINAC, A., FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J., VOINOVICH, D., PERISSUTTI, B., FRANCESCHINIS, Spray-dried chitosan-ethyl cellulose microsphere: Bioadhesive and swelling properties, *E., Int. J. Pharm.* 291, 69 (2005).

MASSART R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans Magn;* 17:1247-8 (1981).

MATIJEVIĆ, E. En: *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*, Ed.: Delgado, A. V., Marcel Dekker, Nueva York, p. 199-218 (2002).

MATSUMURA Y. Y COL. Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposomes, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann Oncol.:* 15 (3); 517-525 (2004).

McCARRON, P.A., WOOLFSON, A.D., KEATING, S.M. Sustained release of 5-fluorouracil from polymeric nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (2000) 1451-1459.

McGINITY, J. W., CAMERON, C. G., CUFF, G.W., *Drug Development and Industrial Pharmacy* 9, 57 Pages 1393-1411 (1983).

MERCOUROFF, W., *Propiétés Magnétiques des Solides et Propiétés Similaires*. En: *Aspects Modernes de la Physique des Solides*, Masson & Cie, París, pp. 75 (1969).

MIELE E., SPINELLI G., MIELE E., TOMAO F., TOMAO S., Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer, *Int. J. Nanomedicine* 499–105 (2009).

MINKO T., Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56491–509 (2004).

MITRA, S; GAUR, U; GOSH, PC; MAITRA, AN. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Release*, 74, 317-323 (2001).

MORALES M.E., GALLARDO LARA V., CALPENA A.C., DOMÉNECH J., RUIZ M.A. Comparative study of morphine difusión from sustained release polymeric suspensions. *J. Control. Release* 95, 75-81(2004).

MORIMOTO, Y., SUGIBAYASHI, K., OKUMURA, M., KATO, Y., Biomedical application of magnetic fluids. I Magnetic idance of ferrocolloid-entrapped albumin microsphere for site specific drug delivery *in vivo*, *J. Pharm. Dyn.* 3, 264 (1980).

MORIMOTO, Y., AKIMOTO, M., YOTSUMOTO, Y., Dispersion state of protein-stabilized magnetic emulsions, *Chem. Pharm. Bull.* 30(8), 3024 (1982).

MORIMOTO, Y., AKIMOTO, M., Use of magnetic emulsion as a novel drug carrier for chemotherapeutic agents, *Biomaterials* 4, 49 (1983).

MORRIS, R. M., POORE, G. A., HOWARD, D. P., SEFRANKA, J. A., Selective Targeting of Magnetic Albumin Microspheres Containing Vindesine Sulphate: Total Remision in Yoshida Sarcoma- Bearing Rats. En: *Microspheres and Drug Therapy: Pharmaceutical, Inmunological and Medical aspects*, Eds.: Davis, S. S., Illum, L., McVie, J. G., Tomlinson, E., Elsevier, New York, pp. 439 (1984).

MORRISON, F. A., Electrophoresis of a particle of arbitrary shape, *J. Colloid Interface Sci.* 34, 210 (1970).

MOSBACH, K., SCHRODER, U., Preparation and application of magnetic polymers for targeting of drugs, *FEBS Lett.* 102, 112 (1979).

IX. Bibliografía

MUELLER A., BONDURANT B., O'BRIEN D. F. Visible-light stimulated destabilization of PEG-liposomes. *Macromolecules* 33:4799Y4804 (2000).

MÜLLER, R. H., LHERM, C., HERBORT, J., BLUNK, T., COUVREUR, P., Determination of adsorption enthalpy by microcalorimetry. *Int. J.Pharm.* 84, 1 (1992).

NAGDA C, CHOTAI N, PATEL S, NAGDA D, PATEL U, SONI T. Chitosan microspheres of aceclofenac: in vitro and in vivo evaluation. *Pharm. Dev. Technol.* 15, 442-451 (2010).

NAUMOV G.N., AKSLEN L.A., FOLKMAN J., Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch, *Cell Cycle* 5 1779–1787 (2006).

NEEDHAM D., ANYARAMBHATLA G., KONG G., DEWHIRS M. W. "A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model". *Cancer Res.* 60:1197Y1201 (2000).

NEUMANN, A., GOOD, R. J., Thermodynamics of contact angles, *J. Colloid Interface Sci.* 38, 341 (1972).

NEUMANN, A., OMENYI, S. N., VAN OSS, C. Negative Hamaker coefficients I. Particle engulfment or rejection at solidification fronts, *J., Colloid Polymer Sci.* 257, 413 (1979).

NINHAN, B. W., PARSEGIAN, V. A., Van der Waals forces. Special characteristics in lipid-water systems and a general method of calculation based on the Lifshitz theory, *J. Biophys.* 10, 646 (1970).

NORDTVEIT, R. J.,VÅRUM, K. M., SMIDSRØD, O. Degradation of fully water-soluble, partially *N*-acetylated chitosans with lysozyme. *Carbohydr. Polym.* 23, 253-260 (1994).

O'BRIEN, R. W., WHITE, L. R., Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 274,1607 (1978).

OHSHIMA, H., Interfacial Electrokinetic Phenomena. En: *Electrical Phenomena at Interfaces*, 2^o Ed., Eds.: Oshima, H., Furusawa, K., Marcel Dekker, Nueva York, pp. 19-55 (1998).

OKON, E., POULIQUEN, D., OKON, P., KOVALEVA, Z. V., STEPANOVA, T. P., LAVIT, S. G., KUDRYAVTSEV, B. N., JALLET, P., Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab. Invest.* 71(6), 895 (1994).

OLSEN, E. D., *Modern Optical Methods of Analysis*, McGraw Hill, Nueva York (1975).

OVADIA, H., PATERSON, P. Y., HALE, J. R., Magnetic microspheres as drug carriers: Factors influencing localization at different anatomical sites in the rats. *Isr. J. Med. Sci.* 19, 631 (1983).

OVERBEEK, J. T. G., *Theorie der. Elektrophorese. Kolloid-Beih* *Kolloid Beih.* 54, 287 (1943).

OVERBEEK, J. H. G., *Electrochemistry of the double layer. Adv. Colloid Interface Sci.* 3, 97 (1950).

OVERBEEK, J. Th. G., *Electrokinetic Phenomena. En: "Colloid Science", Vol. I, Ed.: Kruyt, H. R., Elsevier, Amsterdam (1952).*

PAGE, M. E., PINTO-ALPHANDARY, H., CHACHATY, E., ANDREMONT, A., COUVREUR, P., *S.T.P. Pharma Sciences* 6(4), 298 (1996).

PANKHURST Q.A., CONNOLLY J., JONES S.K., DOBSON J., "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine", *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36R167–R181 (2003).

PANOFSKI, W. K. H., PHILLIPS, M., "Classical Electricity and Magnetism". Addison-Wesley, Reading (1975).

PAPADIMITRIOU, S., BIKIARIS, D., AVGOUSTAKIS, K., KARAVAS, E., & GEORGARAKIS, M. Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole. *Carbohydr. Polym.* 73, 44-54 (2008).

PARSEGIAN, V. A., NINHAN, B. W., Van der Waals forces in many-layered structures: Generalizations of the lifshitz result for two semi-infinite media. *Nature* 224, 1197 (1969).

IX. Bibliografía

PASHLEY, R. M., Interparticulate Forces. En: Colloid Chemistry in Mineral Processing, Ed.: Laskowski, J. S., Ralston, J., Elsevier, London (1992).

PERRIN D.D., DEMPSEY B. Buffers for pH and metal ion control. Chapman and Hall Ltd., London, 1974.

PETROV, O., FURÓ, I., SCHULEIT, M., DOMANIG, R., PLUNKETT, M., DAICIC, Pore size distributions of biodegradable polymer microparticles in aqueous environments measured by NMR cryoporometry. J., Int. J. Pharm. 309, 157 (2006).

PLAZA, R. C., ZURITA, L., DURÁN, J. D. G., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., DELGADO, A. V. Surface thermodynamics of hematite/yttrium oxide core-shell colloidal particles. Langmuir 14, 6850 (1998).

PRAT, G., Reumatología 10(1), 14 (1994)

PIETERS B.R., WILLIAMS R.A., WEBB C., Magnetic Carrier Technology. En: "Colloid and Surface Engineering: Applications in the process industries", Ed.: Williams R.A., Butterworth-Heinemann, Oxford, pp.248-286 (1994).

PITSILLIDES C. M., JOE E. K., WIE X., ANDERSON R. R., LIN C. P. Selective cell targeting with light-adsorbing microparticles and nanoparticles. Biophys. J. 84:4023Y4032 (2003).

PITT, C. G. The controlled parenteral delivery of polypeptides and proteins. Int. J. Pharm. 59, 173-196 (1990).

POSTE, G., KIRSH, R., Site-specific (targeted) drug delivery in cancer chemotherapy. Biotechnology 1, 869 (1983).

POULIQUEN, D., CHOULY, C., Magnetic Microcarriers for Medical Applications". En: "The MML Series (Vol 2): Medical & Biotechnology Applications, Ed.: Arshady R., Citus Books, Londres, pp. 343- 382 (1999).

QUIRANTES, A., BEN-TALEB, A., DELGADO, A., Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 119, 73 (1993).

QUIRANTES, A., PLAZA, R., DELGADO, A., Stability of dispersions of colloidal hematite/yttrium oxide core-shell particles. *J. Colloid. Interface Sci.* 189, 236 (1997).

RADWAN, M. A., In vitro evaluation of polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles as a controlled drug delivery system of theophylline. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21(20), 2371 (1995).

RANNEY, D. F., Magnetically controlled devices and biomodulation. En: *Drug delivery devices: fundamentals and applications*. Ed.: Tyle, P., Marcel Dekker, New York, pp. 325-343 (1988).

REDDY, L.H. Drug delivery to tumors: recent strategies. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 1231-1242, (2005).

REKHI, G., JAMBHERKAR, S., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, 61 (1995).

REMSEN L. G., MCCORMICK C. I., ROMAN-GOLDSTEIN S., NILAVER G., WEISSLEDER R., BOGDANOV A., HELLSTROM I., KROLL R. A., NEUWELT E. A. MR of carcinoma-specific monoclonal antibody conjugated to monocrySTALLINE iron oxide nanoparticles: the potential for noninvasive diagnosis". *Am. J. Neuroradiol.* 17:411Y418 (1996).

ROUX E., FRANCIS M., WINNIK F. M, LEROUX J. C. "Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs. *Int. J. Pharm.* 242:25Y36 (2002).

RUDGE S., KURTZ T.L., VASSEY C.R., CATTERALL L.G., Williamson D.L., *Biomaterials* 21, 1411 (2000).

RUIZ, M. A., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., VERA, P., *Il Farmaco* 49, 147 (1994).

RUSSEL, W. B., SAVILLE, D. A., SCHOLWATER, W. R., *Colloidal Dispersions*, Cambridge University Press, Cambridge (1989).

SAFARIK, I., SAFARIKOVA M. Magnetic nanoparticles and biosciences. *Mon. Chem.* 133: 737–759 (2002).

IX. Bibliografia

SAKO, M., YOKOGAWA, S., SAKAMOTO, K., ADACHI, S., HIROTA, S., OKADA, S., MURAO, S., Invest. Radiol. 17, 573 (1982).

SAKO, M., HIROTA, S., Jpn. J. Cancer Chemother. 13(4), 1618 (1986).

SAMOKHIN, B. P., DOMOGATSKY, S. P., Zh. Vses. Khim. Ova. 32, 527 (1987).

SAREMI S, ATYABI F, AKHLAGHI SP, OSTAD SN, DINARVAND R. Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: preparation, in vitro and ex vivo evaluation. Int J Nanomedicine 6 (2011) 119-128.

SASLAWSKI, O., WEINGARTEN, C., BENOIT, J. P., COUVREUR, P., Life Sci. 42, 1521 (1988).

SATCHI-FAINARO, R. Y COL. Polymer therapeutics for cancer: current status and future challenges. Adv. Polym. Sci. 193, 1–65 (2006).

SENGER, D.R. Y COL. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219, 983–985 (1983).

SENYEI, A. E., REICH, S. D., GONCZY, C., WIDDER, K. J., In vivo kinetics of magnetically targeted low-dose doxorubicin. J. Pharm. Sci. 70, 389 (1981).

SENYEI, A., WIDDER, K. J., CZERLINSKI, G. Magnetic guidance of drug-carrying microspheres. J. Appl. Phys. 49, 3578 (1978).

SERVICE RF. Nanotechnology takes aim at cancer. Science 310:1132–1134 (2005).

SHETH, P. B., THOSSOUIN, J., Drug Develop. Indust. Pharm. 10, 313 (1994).

SHIN J., SHUM P., THOMPSON D. H. Acid-triggered release via dePEGylation of DOPE liposomes containing acid-labile vinyl ether PEG-lipids. J. Control. Release 91:187Y200 (2003).

SINHA, V. R., SINGLA, A. K., WADHAWAN, S., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., BANSAL, K., & DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.*, 274, 1-33, (2004).

SHINKAI M., LE B., HONDA H., YOSHIKAWA K., SHIMIZU K., SAGA S., WAKABAYASHI T., YOSHIDA J., KOBAYASHI T. Targeting hyperthermia for renal cell carcinoma using human MN antigen-specific magnetoliposomes. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 1138Y1145 (2001).

SHINKAI M., YANASE M., SUZUKI M., HONDA H., WAKABAYASHI T., YOSHIDA J., KOBAYASHI T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. *J. Magn. Mater.* 194:176Y184 (1999).

SIKORA, K., ADVANI, S., KOROLCHOUK, V., MAGRATH, I., LEVY, L., PINEDO, H., SCHWARTSMANN, G., TATTERSALL, M., YAN S., *Annals of Oncology* 10, 385 (1999).

SILVERSTEIN, S. C., MICHL, J., SUNG, S. S. J. En: *Transport of Macromolecules by Cellular Systems*. Ed.: Silverstein, S. C., Dahlem Konferenzen, Berlín, 245-264, (1978).

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., *Infrared Spectrometry*. En: "Spectrometry Identification of Organic Compounds", 6^o Ed., John Wiley & Sons Inc., New York, pp.71 – 144 (1998).

SIMOES S., MOREIRA J. N., FONSECA C., DUZGUNES N., PEDROSO DE LIMA M. C. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56:947Y965 (2004).

SKINNER, S. FRYDMAN G.M., O' BRIEN P.E. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res.* 50, 2411–2417 (1990).

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A.: *Principios de Análisis Instrumental*, 5^o Ed., McGraw Hill, Madrid (2001).

SLEPUSHKIN V. A., SIMOENS S., DAZIN P., NEWMAN M. S., GUO L. S., PEDROSO DE LIMA M. C., DUZGUNES N. Sterically stabilized pH-sensitive liposomes.

IX. Bibliografía

Intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo. *J. Biol. Chem.* 272:2382Y2388 (1997).

SOLOWAY, M. S., TIDWELL, M., *P. Am. Assoc. Canc. Res.* 18, 2 (1977).

SONG, M., LI, N., SUN, S., TIEDT, L. R., LIEBENBERG, W., DEVILLIERS, M. M., *II Farmaco* 60, 261 (2005).

SONVICO F., MORNET S., VASSEUR S., DUBERNET C., JAILLARD D., DEGROUARD J., HOEBEKE J., DUGUET E., COLOMBO P., COUVREUR P. Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential BSpecific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments. *Bioconjug. Chem.* 16:1181Y1188 (2005).

SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R., RUDZINSKI, W. E., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Rel.* 70, 1 (2001).

STEIN, M., HAMACHER, E. , *Int. J. Pharm.* 80, R11 (1992).

STERUERNAGEL, C. R., *Aqueous polymeric coating for pharmaceutical dosage forms*, Marcel Dekker Inc., Nueva York (1989).

STOLNIK S., ILLUM L., DAVIS S.S., Long circulating microparticulate drug carriers *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16, 195(1995).

STUBBS M., MCSHEEHY P.M., GRIFFITHS J.R., Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study, *Adv. Enzyme Regul.* 39 13–30 (1999).

SULLIVAN, C. O., BIRKINSHAW, C. In vitro degradation of insulin-loaded poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* 25, 4375 (2004).

TARJAT, P., MORALES, M., VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S., GONZÁLEZ-CARREÑO, T., SERNA, C. J., *J. Phys. D: Appl. Phys* 36, 182 (2003).

TENTORI L., GRAZIANI G., Chemopotention by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol. Res.* 52, 25 – 33 (2005).

TEO, P. M. L., LEUNG, T. W. T., YU, A. T. C., A retrospective study of the use of cisplatin-5-fluorouracil neoadjuvant chemotherapy in cervical-node-positive nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Oral Oncol.* 31b, 373 (1995).

THANOO, B. C., SUNNY, M. C., & JAYAKRISHNAN, A. (1992). Cross-linked chitosan microspheres: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. *J. Pharm. Pharmacol.*, 44, 283-286.

TRICKLER, W. J.; KHURANA, J.; NAGVEKAR, A. A.; DASH, A. K. Chitosan and glyceryl monooleate nanostructures containing gemcitabine: potential delivery system for pancreatic cancer treatment. *AAPS PharmSciTech.* 11 (2010) 392-401.

TOMLINSON, E., Microsphere delivery systems for drug targeting and controlled release. *Technol. Prod. Manuf.* 4, 49 (1983).

TORCHILIN V.P., Drug targeting, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (Suppl 2) S81–S91(2000)

TURNER, R. D., RAND, R. W., BENTSON, J. R., MOSSO, J. A., Ferromagnetic silicone necrosis of hypernephromas by selective vascular occlusion to the tumor: a new technique. *J. Urol.* 113, 455 (1975).

UR-REHMAN T., TAVELIN S., GRÖBNER G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.* 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.017.

VAN FURTH, R., *Mononuclear Phagocytes*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1970).

VAN OSS, C. F., GILLAM, C. F., NEUMAN, A. W., *Phagocytic Engulfment and Cell Adhesiveness*, Marcel Dekker, New York (1975).

VAN OLPHEN, H., *An introduction to clay colloid chemistry : for clay technologists, geologists, and soil scientists.* Clay Colloid Chemistry, Wiley, Nueva York (1977).

VAN OSS, C. J., GOOD, R. J., CHAUDHURY, M. K., Solubility of protein. *J. Colloid Interface Sci.* 111, 378 (1986).

IX. Bibliografía

VAN OSS, C. J., GOOD, R. J., CHAUDHURY, M. K., Determination of the hydrophobic interaction energy: Application to separation processes. *Sep. Sci. Technol.* 22, 1 (1987a).

VAN OSS, C. J., CHAUDHURY, M. K., GOOD, R. J., Monopolar surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 28, 35 (1987b).

VAN OSS, C. J., CHAUDHURY, M. K., GOOD, R. J., Interfacial Lifshitz - van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem. Rev.* 88, 927 (1988a).

VAN OSS, C. J., GOOD, R. J., CHAUDHURY, M. K., Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Langmuir* 4, 884 (1988b).

VAN OSS, C. J., GOOD, R. J., Surface tension and the solubility of polymers and biopolymers: the role of polar and apolar interfacial free energies. *J. Macromol. Sci. Chem.* A26, 1183 (1989).

VAN OSS, C. Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *J., Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 78, 1 (1993).

VAN OSS, C. J., *Interfacial Forces in Aqueous Media*, Marcel Dekker Inc., Nueva York (1994).

VANDERHOFF, J. W., EL-AASER, M. S., UGELSTAD, J., Polymer Emulsification Process. United States Patent 4,177,177 (1979).

VANDERHOFF, J. W., EL-AASER, M. S., Theory of Colloids. En: *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Vol. I. Eds.: Lieberman, H. A., Rieger, M. M., Banker, G. S., Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 93 (1988).

Vasir, J.K., Reddy, M.K. & Labhasetward. (2005) Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. *Current Nanoscience.* 1: 47-64.

VERA, P., TALEB, A. B., SALCEDO, J., GALLARDO, V., Adsorption of hydrolysable cations at the aquacoat/water interface. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 92, 169 (1994).

VERA, P., GALLARDO, V., SALCEDO, J., DELGADO, A. V., Colloidal stability of a pharmaceutical latex: experimental determinations and theoretical predictions *J. Colloid Interface Sci.* 177, 553 (1996).

VISSER., J., On Hamaker constants: A comparison between Hamaker constants and Lifshitz-van der Waals constants. *J. Adv. Colloid Interface Sci.* 3, 331 (1972).

WAISMAN, H. A., *J. Lab. Clin. Med.* 50, 961 (1957).

WAGNER E. Programmed drug delivery: Nanosystems for tumor targeting. *Exp Opin Biol Therapy* 7:587–593 (2007).

WIDDER, K. J., SENYEI, A. E., SCARPELLI, D. G., Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 158, 141 (1978).

WIDDER, K. J., FLOURET, G., SENYEI, A., Magnetic microspheres synthesis of a novel parenteral drug carrier. *J. Pharm. Sci.* 68, 79 (1979).

WIDDER, K. J., MORRIS, R. M., POORE, G. A., HOWARD, D. P., SENYEI, A. E., Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19, 135 (1983).

WIDDERS, K. J., SENYEI, A. E., RANNEY, D. F., Magnetically responsive microspheres and other carriers for the biophysical targeting of antitumor agents. *Adv. Pharmacol. Chemother.* 16, 213 (1979).

WIERSEMA, P. H., LOEB, A. L., OVERBEEK, J. T. G., Calculation of the electrophoretic mobility of a spherical. Colloid Particle. *J. Colloid Interface Sci.* 22, 78 (1966).

IX. Bibliografia

WU, P. C., HUANG, Y. B., CHANG, J. I., TSAI, M. J., TSAI, Y. H., Preparation and evaluation of sustained release microspheres of potassium chloride prepared with ethylcellulose. *Int. J. Pharm.* 260, 115 (2003).

YAHARA T., KOGA T., YOSHIDA S., NAKAGAWA S., DEGUCHI H., SHIROUZU K., Relationship between microvessel density and thermographic hot areas in breast cancer, *Surg. Today* 33:243–248 (2003).

YANASE M., SHINKAI M., HONDA H., WAKABAYASHI T., YOSHIDA J., KOBAYASHI T. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. *Jpn. J. Cancer Res.* 89:775Y782 (1998).

YATVIN M. B., KREUTZ W., HORWITZ B. A., SHINITZKY M. pHsensitive liposomes: possible clinical implications. *Science* 210:1253Y1255 (1980).

YATVIN M. B., WEINSTEIN J. N., DENNIS W. H., BLUMENTHAL R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* 202:1290Y1293 (1978).

ZHANG, DY; SHEN, XZ; WANG, JY; DONG, L; ZHENG, YL; WU, LL. Preparation of chitosan-polyaspartic acid-5-fluorouracil nanoparticles and its anti-carcinoma effect on tumor growth in nude mice. *World J. Gastroenterol.* 2008, 14, 3554-3562.

ZUKOSKI IV, C. F., SAVILLE, D. A., The interpretation of electrokinetic measurements using a dynamic model of the stern layer. I. The dynamic model. *J. Colloid Interface Sci.*, 114, 32 (1986).