



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

**“DISEÑO DE NANOMEDICINAS  
MAGNÉTICAS COMO NUEVA  
HERRAMIENTA ANTITUMORAL”**

**Tesis Doctoral**

*Beatriz Pérez-Artacho Santos*

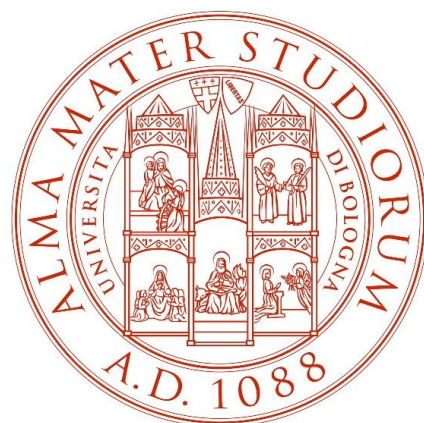
**Granada, Septiembre de 2012**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Beatriz Pérez Artacho Santos  
D.L.: GR 354-2013  
ISBN: 978-84-9028-345-5



*Con la collaborazione della:*

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI BOLOGNA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZA  
DEI METALLI,  
ELETTROCHIMICA E  
TECNICHE CHIMICHE**





D. José Luis Arias Mediano, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada, Dña. M<sup>a</sup> Adolfina Ruiz Martínez, Catedrática 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 nanomedicinas magnéticas como nueva herramienta antitumoral”**

ha sido realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica bajo nuestra dirección, por la Licenciada de Grado Dña. Beatriz Pérez-Artacho Santos, y constituye su *Tesis Doctoral*.

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

Granada, 2 de Julio de 2012.

Fdo.: José Luis Arias Mediano.

Fdo.: M<sup>a</sup>Adolfina Ruiz Martínez

La doctoranda,

Fdo.: Visitación Gallardo Lara.

Beatriz Pérez-Artacho Santos



*Detrás de cada logo hay un nuevo desafío*  
*(Teresa de Calcuta)*

*Proverò, sbaglierò, imparerò, ma di sicuro... NON MI ARRENDERÒ*





*En memoria de mis abuelos:*

*Dr. Juan Pérez Artacho,*

*Profesor que fue de la Facultad de Medicina de esta Universidad.*

*Julia Lanzas Jiménez.*

*Francisco Javier Santos Nieto.*



## *Agradecimientos*

Hace ya tres años que empezó mi aventura con una promesa, una promesa incumplida por mi parte; dedicar tan solo un año al departamento de Tecnología Farmacéutica.

Durante ese año viví momentos inolvidables, aprendí muchas cosas, conocí personas muy válidas... pero ante todo descubrí que quería seguir adelante, que quería seguir luchando, que necesitaba más; entonces decidí romper esa promesa, continuar trabajando codo con codo con ellos para hacer la Tesis Doctoral.

Muchas veces me arrepentí de esa decisión, muchas veces estuve a punto de tirar la toalla, dejar la Tesis y hacer otra cosa con mi vida, hay días en que ves todo negro, piensas que esto no te lleva a nada, que no sirve de nada... pero cuando ves el final, cuando ves un gran montón de folios escrito y te das cuenta de que eso lo has hecho tú, que es tu trabajo, que es tu esfuerzo, entonces, te das cuenta de que todos esos malos momentos, esas lagrimas derramadas, esos momentos de desesperación, de rabia, de impotencia, merecieron la pena.

Durante este tiempo ha habido personas que han sido y son puntos importantes de este trabajo:

A mi tutor el Dr. José Luis Arias Mediano, aún recuerdo esas clases presenciales de la asignatura virtual en la que no estaba apuntada pero a la que me animabas a ir para ver “lo que hacemos en el grupo de investigación y si te gusta, hablamos” aquellos pequeños ratoncitos y tu ilusión al hablar del proyecto me animo a probar. Gracias por tantos consejos, por presionarme cuando “me perdía”, por poner tu “mente cósmica” a mi disposición, por tantas horas de trabajo, por tu ayuda, por escucharme y animarme en

los momentos difíciles, por tus terremotos y tus “frases del día”....y una interminable lista de cosas.... ¡Gracias!

A mis tutoras la Dras. M<sup>a</sup> Adolfina Ruiz Martínez y Visitación Gallardo Lara por acogerme sin dudar en esta gran familia que es el grupo de investigación, por haberme ayudado siempre que lo necesitaba, por haber sabido restar importancia a los agobios y hacerme ver que todo tenía solución.

Al profeseore Adamo Fini che durante 3 mesi mi ha accettato come una di loro nel Dipartimento di Scienza dei Metalli, Elettrochimiche e Tecniche Chimiche. Grazie per il suo tempo, il suo amore per la tecnica, perchè mi ha insegnato tecniche nuove e mi ha dato l’opportunità di aiutarlo con le esercitazioni pratiche di laboratorio della Tecnica 1, e soprattutto voglio ringraziarlo per avermi dato la sua disponibilità ad essere parte del tribunale della lettura della mia Tesi Dottorale. Finalmente vorrei ringraziare gli altri membri del dipartimento, specialmente la Dssa. Cristina Cavaglari per tutti i suoi consigli, e Luca e Rino che erano sempre pronti per rispondere a tutti i miei dubbi, e a riparare le machine quando non funzionavano.

A Lola que ha compartido mis agobios escribiendo ambas nuestras Tesis, a M<sup>a</sup> José que siempre estaba dispuesta a ayudarnos con cualquier cosa que nos hiciera falta, a Hermi por ayudarme a desconectar con sus PDFs, y al resto de mis compañeros del grupo de investigación por su ayuda desinteresada y por tener siempre que lo necesitaba una sonrisa en la cara y buenos consejos. ¡Sin vosotros no habría sido posible!

A mis padres que me dieron la posibilidad de estudiar y me han apoyado durante esta etapa animándome en todo momento a luchar por lo que quería. A ellos y mis hermanos: Gabriel, Pablo y Cristina, que a pesar de nuestras peleillas han estado ahí dándome fuerzas para seguir adelante, que me han sacado una sonrisa en los momentos

difíciles, que han aguantado cambios de humor y enfados, mis días buenos y mis días malos, por todo esto y por mucho más GRACIAS ¡Os quiero!

A Eli que ha estado disponible a cualquier hora del día durante estos 3 años para escucharme reír, llorar, gritar, desesperarme... lo que hiciera falta, por todas esas horas interminables de teléfono, whatsapp, por preocuparte día a día por mí, por estar ahí. ¡Gracias de corazón!

A Max, que le encanta hacerme rabiar pero que no cesa hasta hacerme entrar en razón, que no ha dudado en echarme la bronca cuando me “despistaba”, que ha aguantado mis rollos galénicos. ¡Gracias Nanu!

A mi amigo Casto que con su música me ha ayudado a sobrellevar las largas tardes del último año y medio. Como dice él en una de sus canciones, ante cada adversidad, contratiempo o simplemente en tu día a día: “Intenta ser feliz con lo que sucedió, aprende del momento, mima tu corazón... y como todo puede, puede que sea mejor”. Momentos duros durante estos años de trabajo hay muchos, no siempre salen bien los experimentos, las pruebas, pero entonces, aparece una frase, una canción, algo que te saca una sonrisa y te anima a seguir adelante. ¡Gracias por tu música! Y gracias por unirme a 3 locuelas más que aún sin apenas conocernos han estado al pie del cañón animándome cada día de estos últimos meses. ¡Gracias cotorritas!

A todos aquellos que, aún sin ser nombrados, habéis seguido los pequeños pasitos que he ido dando estos años y me habéis animado a seguir adelante, que me habéis dado la fuerza necesaria para levantarme si caía y seguir luchando. ¡Gracias!



<b>CAPÍTULO 1: Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Introducción.....	3
1.2 Estrategias de transporte pasivo de fármacos .....	6
1.2.1 La teoría del efecto de permeabilidad y retención aumentadas .....	8
1.2.2 Factores que afectan al efecto de permeabilidad y retención aumentadas .....	9
1.3. Estrategias de transporte activo de fármacos.....	12
1.3.1 Estrategias basadas en interacciones ligando receptor .....	13
a) Transporte mediado por anticuerpos monoclonales .....	14
b) Transporte mediado por péptidos .....	15
c) Transporte mediado por aptámeros.....	17
d) Transporte mediado por receptores de ácido fólico y derivados .....	18
e) Transporte mediado por receptores de transferrina .....	20
f) Transporte mediado por glicoproteínas superficiales.....	21
g) Transporte mediado por el factor de crecimiento epitelial .....	21
1.3.2 Estrategias basadas en el diseño de coloides sensibles a diferentes estímulos .....	22
a) Control mediante cambios de pH.....	23
b) Control mediante cambios de temperatura .....	25
c) Control mediante gradientes magnéticos.....	28
d) Control mediante la luz.....	30
e) Control mediante ultrasonidos .....	30
f) Control mediante enzimas .....	33
1.4 Transportadores de fármacos a células tumorales resistentes .....	33
1.4.1 Uso de coloides magnéticos para el transporte de fármacos .....	38
1.5 Cáncer y antineoplásicos .....	47
1.5.1 Tipos de cáncer .....	49
1.5.2 Antineoplásicos.....	51
1.5.3 Clorhidrato de gemcitabina.....	55



<b>CAPÍTULO 2: Contribución y objetivos.....</b>	<b>59</b>
2.1 Objetivos.....	61
2.2 Contribución del trabajo propuesto .....	64
2.3 Metodología y plan de trabajo .....	66
<b>CAPÍTULO 3: Formulación y caracterización de nanopartículas</b>	<b>69</b>
3.1 Materiales .....	71
3.1.1 Poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA).....	71
3.1.2 Maghemita ( $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ).....	81
3.1.3 Nanopartículas compuestas ( $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /PLGA).....	84
3.2 Estructura y composición química .....	88
3.2.1 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.....	88
3.2.2 Difractometría de rayos X .....	93
3.3 Análisis térmico.....	97
3.3.1 Calorimetría de barrido diferencial (DSC) .....	98
3.3.2 Termogravimetría (TGA) .....	101
3.3.3 Termogramas DSC y TGA de nuestros productos .....	103
<b>CAPÍTULO 4: Propiedades eléctricas superficiales .....</b>	<b>109</b>
4.1. Propiedades eléctricas superficiales .....	111
4.1.1 Descripción de la doble capa eléctrica.....	112
4.1.2 Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta .....	120
4.2 Electroforesis: Teoría elemental.....	122
4.2.1 Electroforesis: Tratamientos más elaborados .....	126
4.2.3 Metodología experimental .....	128
4.3 Estudio del efecto del pH y la fuerza iónica sobre las propiedades eléctricas superficiales.....	129
4.4 Mecanismo de formación del recubrimiento de polímero poli(D,L-lactida-co-glicolida) sobre los núcleos magnéticos de maghemita.....	133

**CAPÍTULO 5: Propiedades termodinámicas superficiales..... 135**

5.1. Interacciones superficiales.....	137
5.2 Interacciones dispersivas .....	138
5.3 Interacciones No-DLVO.....	140
5.4 Interacciones de Van Oss .....	142
5.5 Metodología experimental.....	147
5.6 Componentes de la energía libre superficial .....	152
5.7 Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba.....	153

**CAPÍTULO 6: Propiedades magnéticas..... 157**

6.1 Propiedades magnéticas.....	159
6.2 Ciclo de histéresis.....	163
6.3 Prueba <i>in vitro</i> .....	168
6.4 Prueba de concepto: Guiado magnético <i>in vivo</i> .....	170

**CAPÍTULO 7: Capacidad de vehiculización de fármacos ..... 175**

7.1 Generalidades .....	177
7.2 Espectrofotometría UV-Vis de las disoluciones de fármaco.....	178
7.2.1 Absorbancia óptica de las disoluciones .....	178
7.2.2 Factores experimentales condicionantes.....	182
7.2.3 Validación del método espectrofotométrico .....	186
7.2.4 Determinación de la incorporación de fármaco en las nanopartículas. Método espectrofotométrico .....	191
7.3 Incorporación superficial del fármaco .....	192
7.3.1 Determinación espectrofotométrica.....	193
7.4 Incorporación en matriz del fármaco .....	196
7.5 Liberación de fármaco .....	199

**CAPÍTULO 8: Conclusiones ..... 211**

**CAPÍTULO 9: Bibliografía ..... 219**

**CAPÍTULO 10: Resume Tesi Dottorale..... 257**

# **Capítulo 1:**

## **Introducción**



## 1.1 INTRODUCCIÓN

Como es sabido, la actividad farmacológica de cualquier principio activo depende, ante todo, de la naturaleza de su interacción con el tejido u órgano diana. Para que el efecto farmacológico se produzca, es necesario, en primer lugar, que el fármaco llegue en cantidad suficiente a la región diana. Una adecuada formulación de la sustancia activa podría contribuir a su eficaz acumulación en el lugar de acción con una despreciable circulación sistémica. Por este motivo, la preparación de medicamentos es un campo fundamental y experimental dentro de las ciencias farmacéuticas, que se nutre de las contribuciones de la Ingeniería y Ciencia de los Materiales, Fisicoquímica, Ciencia de los Polímeros y Bioquímica, entre otras áreas de conocimiento.

Cuando un medicamento es administrado a un paciente, el fármaco contenido en él, debe atravesar una serie de barreras biológicas hasta llegar a la circulación sistémica y hacerse efectivo en el lugar de acción.

Los sistemas de liberación modificada de fármacos mejoran la farmacoterapia convencional al permitir controlar la duración del efecto farmacológico, gracias a estas formas, el fármaco llega en mayor cantidad y velocidad a la circulación sistémica pero seguimos teniendo una biodistribución sistémica incontrolada. Esta, es la responsable de la aparición de efectos adversos en numerosos tejidos sanos; sin contar con que, la concentración final alcanzada por el fármaco en la región diana puede ser tan baja que el efecto terapéutico finalmente conseguido sería muy pobre o prácticamente nulo [Arias, 2008].

Teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta el momento, podemos afirmar que la farmacoterapia actual, si bien es eficaz en el tratamiento de numerosos problemas de salud no está exenta de limitaciones relacionadas con su seguridad y eficacia. En concreto, la actividad de los fármacos se puede encontrar condicionada por [Allen y Cullis 2004; Arias, 2008, 2011; Durán y cols., 2008]:

- Pobre selectividad por los órganos y tejidos diana.
- El carácter hidrofóbico de muchos fármacos promueve su precipitación en medios acuosos.
- La extensa biodistribución y extravasación de algunos principios activos puede provocar daños en tejidos sanos, consecuencia de una acción inespecífica en estos.
- Una rápida degradación *in vivo* hace que sea necesario administrar altas dosis para lograr un efecto terapéutico adecuado, que incrementa la incidencia de reacciones adversas.
- Susceptibilidad de producir resistencias en determinados grupos de células (por ej., células tumorales).
- Propiedades fisicoquímicas desfavorables (por ej., excesiva hidrofilia) que pueden limitar la llegada del principio activo en tejidos diana localizados en zonas muy internas del organismo.

- Características fisiológicas especiales del tejido u órgano diana que pueden condicionar una correcta llegada, extravasación desde la circulación sistémica y distribución homogénea del principio activo. Por ejemplo, en el caso del tejido tumoral: una elevada presión hidrostática y la existencia de un tejido linfático afuncional.

Para solventar todos estos problemas, y así mejorar la calidad de vida de los pacientes, desde los años 80 numerosas investigaciones se han centrado en el desarrollo de sistemas coloidales para el transporte de fármacos [Arias 2011; Reddy 2005]. Se pretende con esto lograr la acumulación masiva y específica de la dosis de fármacos en el lugar de acción, junto con una minimización de los problemas de estabilidad y seguridad asociados a su uso [Couvreur y Vauthier, 2006]. Estas investigaciones desarrollan coloides basados principalmente en sistemas vesiculares (liposomas y niosomas) o polímeros, para conseguir el transporte eficaz de cualquier antitumoral a la zona diana [Arias, 2011; Cho y cols., 2008]. Aunque esta asociación no siempre resulta suficiente para dirigir el fármaco específicamente a zonas más allá del sistema retículo-endotelial (SER) [Couvreur y Vauthier, 2006; Reddy, 2005], por lo que se están desarrollando nuevos sistemas transportadores de fármacos mediante estrategias de transporte pasivo y activo [Arias, 2011].



## **1.2 ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE PASIVO DE FÁRMACOS**

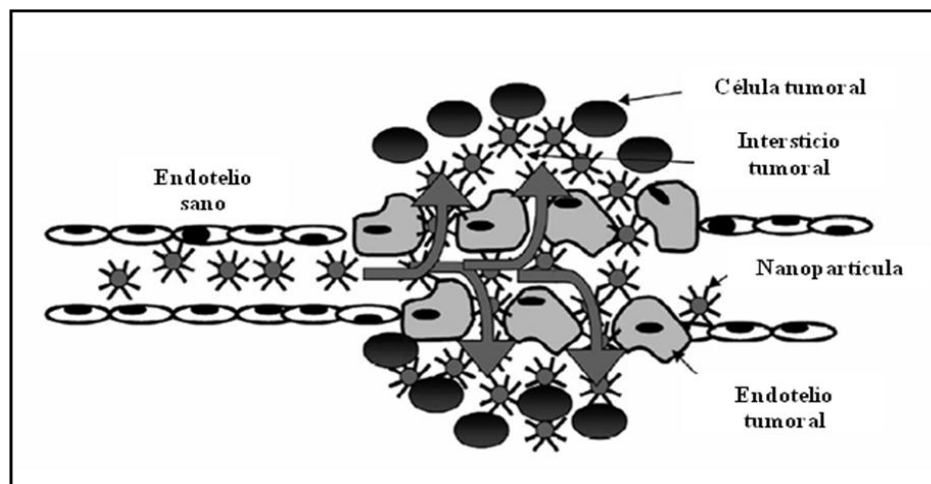
La administración de un sistema coloidal provoca una intensa interacción con el sistema retículo-endotelial (SRE) dando lugar a la retirada de este de la circulación sanguínea. Según su tamaño y características superficiales esta será a mayor o menor velocidad. Los órganos del SRE son desfavorables para los antitumorales llegando incluso a provocar reacciones de citotoxicidad severa [Moghimi y cols., 2001]. En cualquier caso, el perfil de seguridad de un fármaco vehiculizado en un coloide suele ser mucho mayor que el correspondiente a su administración en solución intravenosa [Blagoeva y cols., 1992]. La corta vida media de los coloides ( $t_{1/2} \approx 5$  min), hace el acceso a tumores localizados en zonas alejadas del organismo realmente difícil, es por esto, que estos sistemas para el tratamiento del cáncer quedan restringidos a tumores localizados en el sistema retículo-endotelial (SER) [Brigger y cols., 2002].

Investigaciones recientes se basan en el desarrollo de estrategias novedosas para el diseño de nanosistemas transportadores de fármacos, estos posibilitan a las moléculas antitumorales alcanzar localizaciones cancerosas más específicas [Arias 2011], entre las que encontramos el transporte pasivo, basado en las peculiaridades del intersticio tumoral: *i*) un sistema de drenaje linfático afuncional, lo que origina una mayor retención de líquidos en el espacio intersticial; y, *ii*) la mayor permeabilidad vascular de estos tejidos en comparación con los tejidos sanos [Gu y cols., 2007]

Con el fin de lograr la acumulación específica en el tumor, podemos controlar el destino biológico de los sistemas coloidales ajustando su tamaño, que debe ser lo suficientemente grande para que no haya extravasación en capilares sanos, pero lo suficientemente pequeño para que salga del SRE, permitiendo así la llegada del coloide al tejido tumoral. Y por otro lado ajustando características superficiales ya que cualquier transportador de principio activo debe tener una superficie lo más hidrófila posible para retrasar el reconocimiento por el SRE mediante procesos de opsonización [Maeda y cols., 2009; Mitra y cols., 2001] (adsorción superficial de opsoninas, un tipo de proteínas plasmáticas) con la consecuente captura por los macrófagos. Esto se consigue por dos medios [Cho y cols., 2008; Couvreur y Vauthier, 2006; Patil y cols., 2009a]:

- recubriendo la superficie del coloide hidrófobo con un polímero hidrófilo, principalmente polietilenglicol (PEG).
- con un sistema transportador constituido por copolímeros con dominios hidrófilos e hidrófobos.

Los sistemas transportadores que poseen ambas propiedades (tamaño nanométrico e hidrofilia), presentan un elevado valor de  $t_{1/2}$ , presentando un proceso de extravasación selectivo o específico en zonas del organismo alteradas por una inflamación, una infección o un fenómeno de crecimiento tumoral, lo que nos permite dirigir el fármaco directamente a los tumores localizados fuera de las regiones del SRE, es lo que conocemos como efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) basado en la mayor permeabilidad de los capilares sanguíneos que irrigan el tumor debida al crecimiento acelerado y defectuoso (figura 1) [Cho y cols., 2008; Decuzzi y cols., 2009; Maeda y cols., 2009; Moghimi y cols., 2001; Rapoport, 2007].



**Figura 1.** Extravasación selectiva de los nanosistemas transportadores de fármaco a través de los defectos existentes en la microvasculatura tumoral. El coloide sólo abandona la circulación sanguínea cuando alcanza esta zona capilar alterada.

### 1.2.1 LA TEORÍA DEL EFECTO DE PERMEABILIDAD Y RETENCIÓN AUMENTADAS

Cuando las células tumorales se multiplican, se agrupan alcanzando un tamaño de 2-3 mm, en este momento se produce lo que conocemos como angiogénesis, es decir la producción de nueva vasculatura en la zona tumoral, con el objetivo de satisfacer la mayor demanda de oxígeno y nutrientes del tumor en crecimiento [Byrne y cols., 2008]. Este proceso tiene como resultado una neovasculatura muy diferente a la de los tejidos sanos, sus capilares presentan canales de fuga de tamaños entre 100 nm y 2  $\mu$ m según el tumor [Maeda y cols., 2009; Betancourt y cols., 2007; Heldin y cols., 2004] y un drenaje linfático deficiente [Bellop y cols., 2003; Skinner y cols., 1990].

Los defectos en la anatomía y las anomalías funcionales provocan la mayor permeabilidad de los componentes del plasma (macromoléculas, nanopartículas y partículas lipídicas) hacia el tejido tumoral. Además el lento retorno venoso y el pobre aclaramiento linfático implican que las macromoléculas quedan retenidas en el tumor mientras la extravasación en el intersticio sigue produciéndose. Pudiéndose alcanzar concentraciones locales de fármacos muy superiores, por ejemplo de 10-50 veces más que en un tejido normal en uno o dos días.

Este mecanismo y el efecto EPR se está usando recientemente con conjugados poliméricos, micelas o liposomas con fármaco anticanceroso [Lee y cols., 2006].

### **1.2.2 FACTORES QUE AFECTAN AL EFECTO DE PERMEABILIDAD Y RETENCIÓN AUMENTADAS** [Iyer y cols., 2006]

- Factores Anatómicos:
  - Extensa angiogénesis y alta densidad vascular
  - Falta de capa de músculo liso y bajo flujo sanguíneo que provoca una dilatación pasiva que activa la angiotensina II, generando un estado de hipertensión y mayor fuga
  - Defectos de la arquitectura vascular, produce más difusión
  - Aclaración linfática escasa, dando una mayor retención de macromoléculas, fármacos y partículas lipídicas en el espacio intersticial
  - Lento retorno venoso que provoca una mayor acumulación de macromoléculas

- Factores que favorecen la generación del efecto EPR:
  - Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
  - Bradiquininas y prostaglandinas
  - Óxido nítrico (NO) y peróxido nítrico
  - Metaloproteinasas de la matriz

Podemos afirmar por tanto que los sistemas transportadores de fármacos con una superficie recubierta de cadenas hidrófilas presentarán una marcada acumulación en la zona tumoral. Estas cadenas se disponen por adsorción física o conjugación química en la superficie de las partículas y son capaces de repeler las opsoninas retrasando la opsonización [Cho y cols., 2008; Decuzzi y cols., 2009].

Investigaciones recientes ponen de manifiesto que se consigue prolongar significativamente la permanencia en el organismo, incluso hasta 48 h, de las nanopartículas lipídicas mediante la incorporación de polímeros hidrófilos en su superficie [Moghimi y Szebeni, 2003; Park, 2002].

La incorporación de restos de cadenas de PEG-2000 en la superficie de nanopartículas sólidas lipídicas cargadas con doxorrubicina (diámetro  $\approx$  100 nm) permite incrementar notablemente la vida media ( $t_{1/2}$ ) del antitumoral en comparación con este fármaco administrado libre y con respecto a su vehiculización en nanopartículas que carecen de PEG-2000 en su superficie [Zara y cols., 2002]. El incremento de la vida media ( $t_{1/2}$ ) también puede lograrse mediante el uso de fosfolípidos sintéticos (conjugados con gangliósidos) [Huwyler y cols., 2008]. Los liposomas que presentan cadenas de PEG en su superficie tienen un aclaramiento plasmático significativamente inferior a los convencionales (0.1 L/h frente a 22 L/h), una mayor área bajo la curva (AUC), casi 100 veces más y, debido a su escasa

interacción con tejidos sanos tras su administración sistémica, un volumen de distribución 50 veces menor (de 200L a 4.5L) [Allen, 1994]. Esta estrategia de transporte de fármacos ha permitido incluso optimizar claramente la biodistribución y las propiedades farmacocinéticas de la doxorubicina en pacientes con gliomas [Hau y cols., 2004].

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

### **1.3 ESTRATEGIAS DE TRANPORTE ACTIVO DE FÁRMACOS**

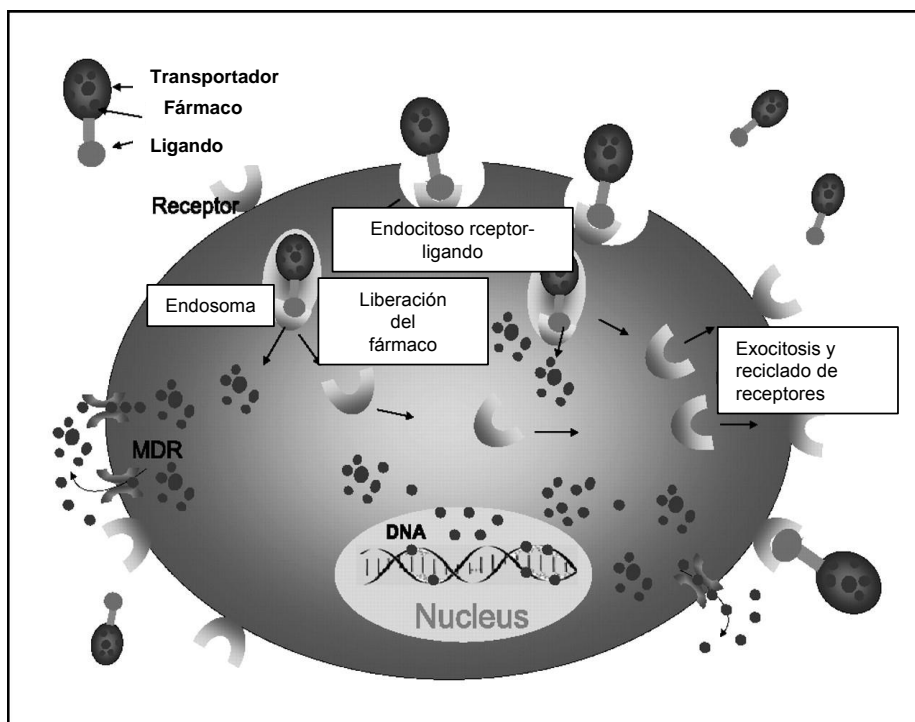
A pesar de que el transporte pasivo contribuye a una mayor localización de los fármacos en el lugar de acción, hay situaciones que requieren otro tipo de estrategias para el tratamiento del tumor. Es por esto que se han desarrollado estrategias para lograr que los sistemas transportadores convencionales se concentren únicamente en la región, diana, es lo que conocemos como transporte activo que se basa en:

- La selección de ligandos específicos que son incorporados en la superficie de los nanotransportadores para ser captados por los receptores de las células tumorales. Se eligen ligandos que se expresan en las células o vasculatura tumoral y no en las células sanas. Los nanotransportadores permanecen durante más tiempo por la circulación sanguínea lo que nos permite un transporte más eficaz hacia el tumor que mediante el efecto EPR, pudiendo aumentar su captación por endocitosis, aumentando el efecto terapéutico [Kirpotin y cols., 2006; Iinuma y cols., 2002; López de Menezes y cols., 1998].
- Diseño de nanopartículas de diferente naturaleza con capacidad para responder a estímulos externos aplicados en el lugar de acción exclusivamente.

En ambos casos, el nanosistema transportador logrará concentrarse totalmente en la región deseada y sólo allí liberará el fármaco antitumoral [Cho y cols., 2008; Couvreur y Vauthier, 2006; Önyüksel y cols., 2009; Reddy, 2005].

### 1.3.1 ESTRATEGIAS BASADAS EN INTERACCIONES LIGANDO-RECEPTOR

Este tipo de nanotransportadores cuentan con biomoléculas en su superficie que pretenden la unión de las nanopartículas a la célula para posteriormente introducirse en su interior, consiguiendo de esta manera una liberación selectiva del fármaco en la región deseada. [Arias, 2011]. La unión específica del sistema a la célula diana se consigue mediante reconocimiento molecular (unión ligando-receptor, interacción antígeno-anticuerpo) (figura 2) [Brigger y cols., 2002; Decuzzi y cols., 2009].



**Figura 2.** Esquema de la internalización de nanopartículas conjugadas con ligandos o anticuerpos tumorales específicos a través de receptores de la superficie celular



### a) Transporte mediado por anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son moléculas diseñadas para una interacción y unión específica con antígenos y receptores de las células cancerosas [Imai y Takaoka, 2006]. Estos pueden ser usados como vehículos específicos de agentes citotóxicos [Adams y cols., 2001; Chari y cols., 1995], dado que al unirse a las células tumorales el conjugado resultante es introducido en la célula por endocitosis mediada por ligandos, con la posterior liberación del fármaco que recupera su actividad original.

Un ejemplo característico de esta técnica son los inmunoliposomas, sistemas de liposomas conjugados con anticuerpos monoclonales por unión química de estos con grupos polares del coloide como restos fosfolipídicos [Maruyama y cols., 1995; Sapra y Allen, 2003]. Estudios recientes proponen la síntesis de inmunoliposomas específicos del factor de crecimiento epidérmico-2 (HER-2) que está presente en la superficie de muchas líneas de células tumorales. El uso de estos liposomas a nivel superficial permite el transporte eficaz de fármacos antitumorales mejorando la eficacia terapéutica en diferentes tipos de cáncer con los tratamientos control (fármaco en solución y liposomas con cadenas de PEG en su superficie) [Gao y cols., 2009; Park y cols., 2001, 2002].

Otro tipo de anticuerpo monoclonal ensayado es el 8D3, específico de los receptores de transferrina que algunas células tumorales presentan en su superficie, y que se encuentra en gran cantidad a nivel de la barrera hematoencefálica (gen 83-14, específico de los receptores de insulina humana). Los liposomas diseñados con este tipo de anticuerpo han sido utilizados para el transporte de plásmido de ADN capaz de silenciar la expresión del gen oncogénico que codifica la síntesis del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR). En el estudio realizado se logró obtener un incremento de la tasa de supervivencia de ratones con glioma avanzado  $\approx 90\%$ , en comparación con los grupos controles [Zhang y cols., 2003].

Además se ha propuesto la síntesis de nanoplataformas poliméricas con moléculas de anticuerpos monoclonales en su superficie como medio de transporte activo de fármacos. Recientemente se han sintetizado nanopartículas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) con citoqueratina en su superficie para el transporte de cistina en el tratamiento del cáncer de mama invasivo y metastásico [Kos y cols., 2009]. Esta es un anticuerpo monoclonal específico de las células epiteliales de cáncer de mama que evita la formación de plasmina implicada en el crecimiento de la masa tumoral. La cistina es un inhibidor de las proteasas extracelulares que neutraliza el exceso de la actividad proteolítica característica de las células de cáncer de mama.

### **b) Transporte mediado por péptidos**

La existencia de la secuencia RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) en algunos péptidos es un sistema de reconocimiento importante para la adhesión celular, permitiendo que estas biomoléculas tengan una alta afinidad para la unión a las integrinas que se encuentran sobreexpresadas en los vasos tumorales [Sun y cols., 2008], de forma que la unión de estas a un sistema transportador de fármacos incrementa la acumulación específica de este en los vasos que irrigan la zona tumoral. [Schiffelers y cols., 2003].

La integrina presente en la superficie celular será la que determinará el péptido a usar. Estudios recientes demuestran que una modificación superficial de albúmina con péptidos CREKA y Lyp-1 permite obtener una mejora de la actividad anticancerosa del paclitaxel en ratones con tumores inducidos en la línea celular MDA-MB-435 [Karmali y cols., 2009], otros estudios proponen diseñar liposomas con cadenas de PEG y la secuencia peptídica PR<sub>b</sub> a nivel superficial para transportar 5-fluorouracilo, esta secuencia facilita la acumulación selectiva del coloide en las células de cáncer de colon dado que imita el dominio de adhesión de la fibronectina que se une a la integrina  $\alpha 5\beta 1$

expresada por estas células, al producirse la interacción se da una endocitosis de la partícula y con ella un aumento de la acción citotóxica del principio activo [Garg y cols., 2009]. Los estudios de diseño de nanopartículas de ácido poliglútamico modificadas con H2009.1, una biomolécula que presenta gran afinidad por los receptores de integrinas  $\alpha\beta6$ , esto permite transportar específicamente la doxorubicina a las células cancerosas que presentan este tipo de receptor en su superficie [Guan y cols., 2008], de forma que minimizan las reacciones adversas de su administración.

Esta estrategia de transporte activo ofrece grandes posibilidades por lo que han sido aplicados en terapia génica contra el cáncer, donde numerosos estudios han demostrado que el uso de sistemas modificados con macromoléculas peptídicas de forma superficial, conlleva un aumento de la eficiencia del proceso de transfección de genes, oligonucleótidos o porciones de ARN y ADN a células tumorales [Taratula y cols., 2009; Veiseh y cols., 2009].

Un ejemplo de la aplicación en terapia génica puede ser un estudio que demuestra la transfección del gen mutante RAF en células de nucleosoma (m21), con su vehiculización en liposomas poliméricos catiónicos modificados superficialmente con péptidos específicos de los receptores de integrinas  $\alpha\beta6$ , que presentan estas células cancerosas a nivel superficial. Esto logra una inhibición de los procesos de angiogénesis que incrementan el aporte de nutrientes a la masa tumoral [Önyüksel y cols., 2009].

### c) Transporte mediado por aptámeros

Los aptámeros son secuencias de ácidos nucleicos, de pequeño tamaño y sintetizados químicamente de forma muy sencilla, capaces de unirse selectivamente a determinados antígenos que se localizan en la superficie de las células tumorales [Saéz y cols., 2010].

Pueden ser usados como agentes antitumorales por si mismos o acoplados a nanosistemas transportadores de fármacos para aumentar su especificidad por células cancerosas [Levy-Nissenbaum y cols., 2008].

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

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

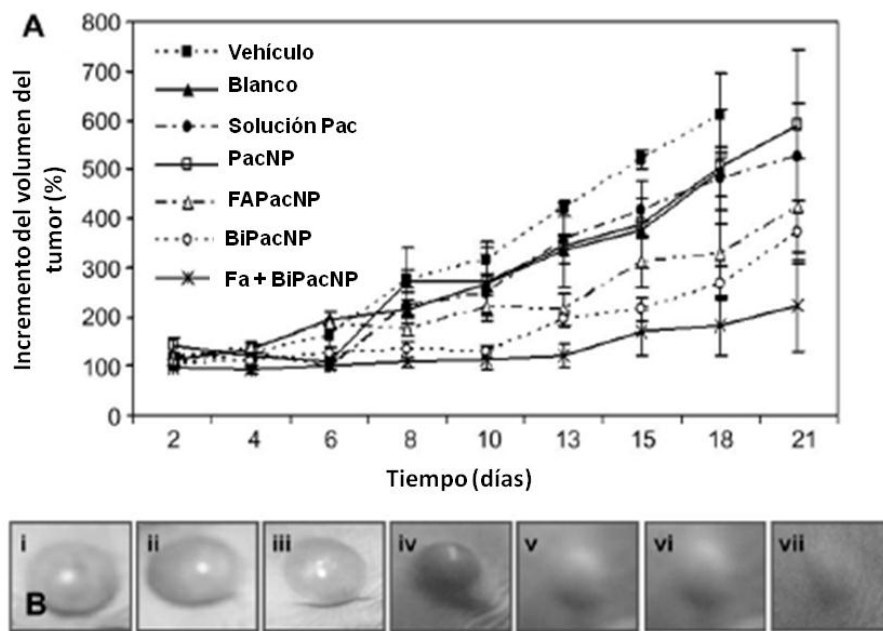
El ácido fólico participa en la biosíntesis de las bases nucleótidas, por lo que es importante en la formación de nuevas células. Existen dos tipos de receptores de membrana para el ácido fólico (FR- $\alpha$  y FR- $\beta$ ) que en tejidos normales es muy baja pero es un tipo de receptor muy abundante en las células cancerígenas, sobre todo en tumor de ovarios y endometrio, debido a la necesidad incrementada de ácido fólico para la síntesis de nuevas células. La interacción entre las moléculas de ácido fólico y su receptor correspondiente conlleva a un proceso de endocitosis que implica una acumulación citosólica de esta molécula [Lu y Low, 2002].

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 cols., 2008]. Otros estudios muestran como los liposomas recubiertos de moléculas de folato aumentan la captación de los fármacos quimioterápicos en diferentes células tumorales, de forma que aumenta su citotoxicidad [Esmaeili y cols., 2008; Gabizon y cols., 2004; Kim y cols., 2005; Pan y Lee, 2005; Shmeeda y cols., 2006], o estudios que manifiestan la eficacia de esta estrategia ante fenómenos de resistencia desarrollados por las células cancerosas [Goren y cols., 2000].

Por último, estas estrategias se han diseñado también para aumentar la eficacia de la fototerapia y la eficiencia de las formulaciones específicas para el diagnóstico del cáncer [Lai y Lee, 2009; Low y Kularatne, 2009; Pan y Feng, 2009].

Se han utilizado en el diseño de nanopartículas de poli(etilenimina) para la terapia génica de gliomas [Liang y cols., 2009] y en el diseño de nanopartículas de poli(alquiloacrilato) con moléculas de folato en superficie para la mejora de actividad antitumoral de los agentes quimioterápicos en el tratamiento de gliomas [Stella y cols., 2000]. Para el transporte de paclitaxel se han diseñado: *i*) nanopartículas

de poli( $\epsilon$ -caprolactona) modificadas superficialmente con moléculas de folato y cadenas de metoxi-PEG [Park y cols., 2005]; *ii*) nanopartículas de poli(D,L-lactida) (PLA) que presentan en su superficie cadenas de PEG y ácido fólico (o biotina). Permitiendo una mayor acumulación *in vivo* en la masa tumoral (figura 3) [Patil y cols., 2009].



**Figura 3.** Eficacia antitumoral de nanopartículas de PLA cargadas con paclitaxel (Pac) y modificadas superficialmente con PEG y ácido fólico (FA), y/o con PEG y biotina (BI). Se trataron ratones NCR-UN con tumor subcutáneo inducido con células MCF-7 con una solución de Pac, las nanopartículas sin fármaco (blanco), agua bidestilada (vehículo), nanopartículas con fármaco (PacNP), nanopartículas con fármaco y modificadas con PEG y ácido fólico (FA Pac NP), nanopartículas con fármaco modificadas con PEG y biotina (BiPacNP), y nanopartículas cargadas con fármacos y modificadas con PEG, ácido fólico y biotina (FA + BiPac NP). En todos los casos la dosis de paclitaxel administrada es 20 mg/kg. (A) Evolución del volumen del tumor en función del tiempo (media  $\pm$  desviación estándar,  $n = 6$ ). (B) Fotografía de la masa tumoral de un ratón de cada grupo de tratamiento: *i*) vehículo, *ii*) blanco, *iii*) solución Pac, *iv*) PacNP, *v*) FAPacNP, *vi*) BiPacNP, y *vii*) FA + BiPacNP. Reproducido de Patil y cols., 2009a.

Copyright Elsevier (2009).

### e) Transporte mediado por receptores de transferrina

La expresión de los receptores de transferrina en células tumorales puede llegar a ser 100 veces mayor que en células sanas [Daniels y cols., 2006; Minko, 2004], esto convierte a estos receptores en una posibilidad para el tratamiento del cáncer administrando nanopartículas modificadas superficialmente en el interior de la región diana [Derycke y cols., 2004] o incorporando anticuerpos monoclonales específicos de estos receptores en la superficie [Hwang y cols., 2008]. La transferrina ha demostrado una actividad muy prometedora ante un tipo de mecanismo de resistencia a fármacos desarrollado por muchas células cancerosas y que está relacionado con la glicoproteína-P [Lemieux y Page, 1994]. Estudios recientes estudian la transferrina unida a sistemas coloidales transportadores de fármacos mejorando la biodistribución del fármaco transportado y logrando así una mayor acumulación de este en el tumor y una liberación controlada [Sahoo y cols., 2004].

Un reciente estudio *in vitro* ha demostrado que la conjugación de transferrina con nanopartículas de PLGA cargadas con paclitaxel, produce una captación tres veces mayor de este fármaco por células de cáncer de próstata humano (PC3) comparado con nanopartículas poliméricas sin esta modificación superficial. Una simple inyección intratumoral de nanopartículas (dosis de paclitaxel: 24 mg/Kg) en animales con tumores subcutáneos inducidos con esta línea celular permite la completa regresión del tumor.

Este tipo de nanopartículas han demostrado ser eficaces en el tratamiento de tumores cerebrales ya que atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica mediante transcitosis [Pardridge, 2002], frente a una determinada línea celular (MCF-7) en el cáncer de mama [Sahoo y cols., 2004; Sahoo y Labhasetwar, 2005] e incluso han aportado una mejora de la fototerapia antitumoral y el diagnóstico del cáncer mediante resonancia magnética de imagen [Li y cols., 2009].

**f) Transporte basado en las Glicoproteínas Superficiales Celulares**

Las lecitinas son proteínas capaces de reconocer y unirse a fracciones hidrocarbónicas de glicoproteínas expresadas en la superficie celular. Estas glicoproteínas son expresadas por las células tumorales en mayor medida que las células sanas. Debido a la especificidad de la interacción entre las lecitinas y determinados carbohidratos pueden ser incorporadas en las nanopartículas, de esta manera serán reconocidas directamente por los carbohidratos de la superficie tisular. Esta estrategia se ha usado tradicionalmente para el tratamiento de cáncer de colon [Acharya y cols., 2009].

**g) Transporte basado en el Factor de Crecimiento Epitelial (EGFR)**

La activación de este receptor (familia de receptores de la tirosina-quinasa) implica la estimulación del crecimiento y progresión del tumor, proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis. Es un factor que se expresa en numerosos tumores por lo que cabe esperar el estudio de este como diana en estrategias para el tratamiento de estos tumores (ej. cáncer colorectal, de pulmón, carcinoma de las células escamosas de la cabeza y cuello, cáncer de ovario, riñón, páncreas y próstata).



### **1.3.2 ESTRATEGIAS BASADAS EN EL DISEÑO DE COLOIDES SENSIBLES A DIFERENTES ESTÍMULOS**

En los últimos tiempos ha aumentado el interés por explotar determinadas señales físicas como pH, temperatura, fuerza iónica, luz o metabolitos, para el desarrollo de sistemas transportadores de fármacos [Hurst, 2001]. Estos tienen un diseño normalmente polimérico o liposomal que trata de sensibilizarlos frente a pequeñas modificaciones en su entorno, provocando cambios muy rápidos en su estructura y propiedades físicas que son reversibles, por lo que el material vuelve a su estado inicial en cuanto desaparece el estímulo. Podemos encontrar estímulos generados en el interior del organismo (cambios de pH o temperatura en determinadas zonas) o estímulos externos (gradientes magnéticos, luz, campos eléctricos, etc.).

En esta estrategia la interacción del sistema transportador con el estímulo debe producirse solamente en la región diana, de modo que el fármaco se libere únicamente en dicha zona y así conseguir la acumulación selectiva de este y una menor biodistribución, con la consecuente reducción de las reacciones adversas. Además podemos modular la duración e intensidad de la acción farmacológica [Arias 2011; Bawa y cols., 2009; Rapoport, 2007; Ulbrich y Šubr, 2004].

### a) Control del proceso de liberación de fármaco mediante cambios en el pH

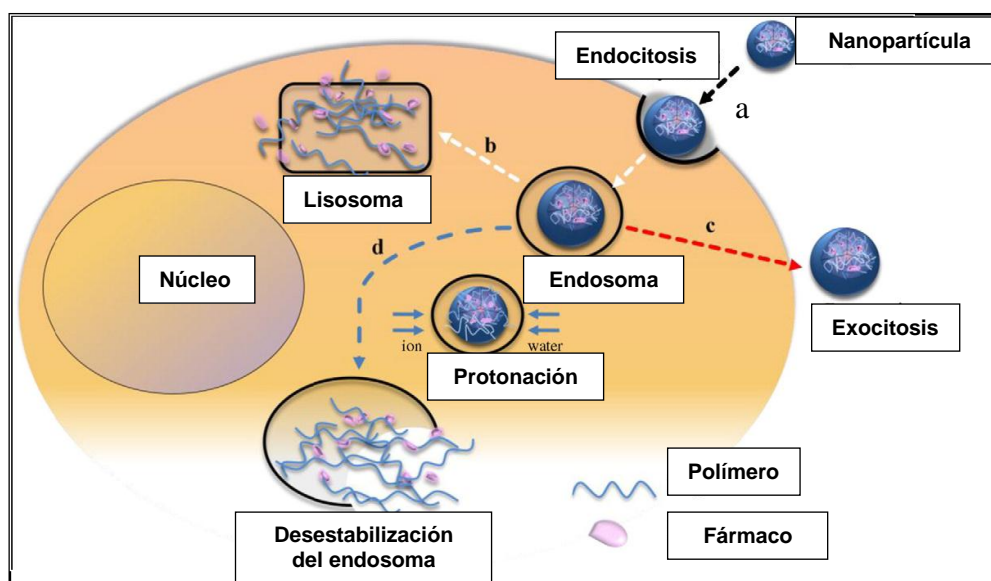
Esta estrategia basada en el uso de materiales extremadamente sensibles a pequeños cambios de pH con respecto al sanguíneo, es una de las estrategias más prometedoras para el transporte de fármacos.

En un organismo sano, el pH extracelular de tejidos y sangre se mantiene en torno a 7.4, mientras que en el tejido tumoral está en torno a 6.6. Estas variaciones de pH se deben a alteraciones de flujo sanguíneo, por la escasa organización vascular de la zona tumoral dando descenso de la presión sanguínea e hipoxia local y a alteraciones metabólicas que provocan acumulación de metabolitos ácidos. El sistema transportador en esta situación, encuentra un entorno ácido al que es muy sensible y se descompone liberando el principio activo vehiculizado. Cabe esperar que este tipo de nanopartículas se distribuyan extensamente por el organismo y que sólo cuando alcancen la región de pH al que son sensibles, se destruyan, controlándose así la liberación de la dosis de fármaco vehiculizado [Hilgenbrink y Low, 2005; Jeong y cols., 2003; Lo y cols., 2005].

Como alternativa dentro de esta misma estrategia podemos utilizar sistemas transportadores sensibles a pH entre 4.5 y 5.0 que tras su internalización en la célula tumoral por endocitosis se degradan por el pH ácido y la acción de enzimas hidrolíticas como la catepsina B [Bawa y cols., 2009; Jain, 2001; Rapoport, 2007; Stubbs y cols., 2000].

Los materiales poliméricos que, generalmente, son sensibles a pH ácido contienen grupos carboxílicos o sulfónicos, mientras que los sensibles a pHs básicos contienen en su estructura química sales de amonio. En ambos casos, los grupos químicos son capaces de captar o ceder protones ante cambios de pH, generando cambios conformacionales en la estructura de la nanopartícula que afectan a su solubilidad o provocan el hinchamiento y posterior destrucción de esta. Los materiales

de tipo iónico más ampliamente investigados en el diseño de sistemas transportadores sensibles al pH son polímeros del ácido metacrílico, del metacrilato de dietilaminaetil, del ácido acrílico y del metacrilato de (dimetilamina) etilo (figura 4) [Bawa y cols., 2009; Han y cols., 2003; Na y cols., 2003; Rapoport, 2007].



**Figura 4.** Representación esquemática de la liberación de fármaco basada en el pH ácido del entorno (d).

Un estudio reciente usa la polivinilpirrolidona y el anhídrido dimetilmaleico para desarrollar un sistema transportador del agente antitumoral adriamicina. Al unir ambas estructuras conseguimos un sistema muy sensible a ligeros descensos en los valores de de pH (de 7.4 a 6.6). Se ha descrito que la utilización de este coloide permite un notable incremento de la actividad antitumoral de la molécula en ratones con sarcoma 180, en comparación con la administración del fármaco en solución [Kamada y cols., 2004].

Por otro lado, el uso de partículas de poli(L-histidina) modificadas con cadenas de PEG y restos de ácido fólico permite el transporte específico de doxorubicina *in vivo*. Es decir, esta formulación permite solventar los fenómenos de resistencia a fármacos típicos de la línea celular A2780/DOX(R) y los problemas de toxicidad asociados al tratamiento con doxorubicina. En este trabajo se demostró que las nanopartículas se unen a las células tumorales a través de receptores de folato desencadenando procesos de endocitosis y degradación liposomal liberando así el fármaco transportado [Kim y cols., 2008a].

Por último, hay estudios que demuestran que los sistemas liposomales sensibles a variaciones de pH permiten un mejor transporte de fármacos a la zona diana al compararse con liposomas convencionales o liposomas de liberación prolongada [Cho y cols., 2008; Karanth y Murthy, 2007; Kim y cols., 2008b]. Estas formulaciones (tamaño de partícula  $\approx 150\text{nm}$ ) pueden modificarse superficialmente con anticuerpos monoclonales de factor de crecimiento epidérmico y utilizarse para la vehiculización de gemcitabina en el tratamiento de tumores inducidos por células A549 BALB/c-nu/un [Kim y cols., 2009].

### **b) Control de los procesos de liberación de fármacos mediante cambios en la temperatura**

El uso de la hipertermia local para el transporte tumor-específico fue propuesto desde 1978 por Yatvin [Yatvin y cols., 1978]. Hay determinados coloides termosensibles, generalmente polímeros o hidrogeles con grupos hidrófobos, que sufren un proceso de desestabilización/destrucción ante ligeros cambios de temperatura. Estos coloides presentan una temperatura crítica de disolución que determina la liberación del fármaco transportado.

Destaca la poli(N-isopropilacrilamida) por ser el polímero más estudiado para este tipo de nanosistemas transportadores, ya que su temperatura crítica de disolución está muy próxima a la fisiológica, pudiendo incluso ajustarse a  $\approx 42^{\circ}\text{C}$  con la incorporación de N,N-dimetilacrilamida. Otros polímeros termosensibles son: la poli(N-(I)-1-hidroximetil-propilmetacrilamida), la poli(2-carboxi-isopropilacrilamida), la poli(N-acril-N'-alquilpiperacina), o la poli(N,N'-dietilacrilamida) [Bawa y cols., 2009; Rapoport, 2007].

En el tratamiento del cáncer la hipertermia es una técnica bastante interesante que ha demostrado cierta toxicidad per se sobre las células cancerosas [Dewhirst y cols., 1997] y permite aumentar la permeabilidad de la masa tumoral, facilitando de esta manera, la absorción de biomacromoléculas y coloides [Gaber y cols., 1996; Hauck y cols., 1997]. La principal limitación de la hipertermia es la focalización de su acción exclusivamente a nivel de la masa tumoral sobre todo si se desconoce su ubicación [Kong y Dewhirst, 1999]. La hipertermia implica el calentamiento de la masa tumoral provocando un aumento del tamaño de poro en el endotelio microvascular que irriga la zona y un aumento del flujo sanguíneo a la misma, lo que permite que el sistema transportador extravase selectivamente en esa zona. A  $42^{\circ}\text{C}$  vemos el mayor efecto de esta estrategia: el tamaño de poro entre las células endoteliales que componen la pared de estos vasos sanguíneos pasa de aproximadamente 7 a 20 nm a más de 400 nm. La hipertermia trata de conseguir simultáneamente el aumento de la permeabilidad de la microvasculatura tumoral y la inducción del agente quimioterápico por destrucción del coloide [Kong y cols., 2001]. Para ello, es muy importante definir la temperatura a utilizar y el tiempo de calentamiento.

Para el uso de esta estrategia los sistemas transportadores deben tener una temperatura crítica de disolución en torno a  $42^{\circ}\text{C}$ . Se ha logrado el diseño de liposomas capaces de alterar la estructura de su membrana lipídica ante un ligero incremento de la temperatura, permitiendo la liberación del principio activo vehiculizado de forma

controlada y selectiva [Kong y cols., 2000; Needham y Dewhirst, 2001]. La utilización de liposomas termosensibles estabilizados estéricamente con cadenas de PEG provoca una mayor acumulación de principio activo en la zona tumoral, liberando más del 60% de la dosis vehiculizada si se calienta la zona diana a 42°C durante 30 minutos [Gaber y cols., 1996]. Además, para aumentar la termosensibilidad de los liposomas pueden introducirse polímeros termosensibles en su estructura como la poli(N-isopropilacrilamida) [Kono, 2001; Purushotham y Ramanujan, 2009; Shen y cols., 2008].

Los coloides magnéticos presentan importantes aplicaciones en hipertermia ya que su capacidad de respuesta a campos magnéticos facilita su acumulación en la región diana. Como ejemplo: nanopartículas magnéticas constituidas por un núcleo de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) recubiertas por dextrano-g-poli(N-isopropilacrilamida-N,N'-dimetilacrilamida) consiguen la liberación selectiva de doxorubicina en el tumor, el calentamiento del material provoca la degradación del polímero y la liberación del agente antitumoral [Zhang y Misra, 2007]. Los geles magnéticos de poli(N-isopropilacrilamida) permiten la acumulación específica y la liberación controlada de fármaco mediante hipertermia [Ang y cols., 2007]. Se han formulado también magnetoliposomas (magnetosomas) termosensibles para el transporte de metotrexato. La membrana lipídica de estos sistemas está constituida por 1,2 dipalmitol-glicero-3-fosfolina y colesterol, se sintetizan por el método de evaporación con inversión de fases. Se consiguió la liberación de más del 80% del fármaco vehiculizado cuando se alcanzaban temperaturas de 41°C y una mayor acumulación de metotrexato en el musculo esquelético de ratones al aplicar un gradiente eléctrico y calentar a 41°C [Zhu y cols., 2009].

Por último, los óxidos de hierro superparamagnéticos pueden por si mismos inducir la muerte de las células tumorales al generar calor en el interior del intersticio tumoral [Chan y cols., 1993; Kallumadil y cols., 2009; Tashjian y cols., 2008], esto se produce al estar bajo un campo magnético alterno de gran frecuencia ( $\approx 1$  MHz) donde los rápidos cambios de orientación del momento magnético del nanomaterial provocan un fenómeno de calentamiento, que es consecuencia de la pérdida de histéresis magnética de las nanopartículas [Gupta y Gupta, 2005; Huber, 2005; Ito y cols., 2005; Laurent y cols., 2008]. Los experimentos indican específicamente que la temperatura del espacio intersticial tumoral aumenta hasta  $\approx 41-45^{\circ}\text{C}$ , provocando daños irreversibles en las células cancerosas, lo que induce su destrucción [Glöckl y cols., 2006; Hergt y cols., 2006; Huber, 2005; Tanaka y cols., 2005]. Para terminar, el aumento de temperatura provocara la liberación del fármaco en la región tumoral por desorganización de la estructura de la nanopartícula [Steinkea y cols., 2007].

### c) Transporte de fármaco mediante la utilización de gradientes magnéticos

La capacidad de respuesta a campos magnéticos dota a los coloides magnéticos de especificidad a la hora de transportar a los agentes quimioterápicos a su lugar de acción. Por tanto, gracias al uso de un campo magnético podemos lograr el transporte del fármaco y la concentración de este en la región diana durante el tiempo necesario para que todo el fármaco sea liberado [Ciofani y cols., 2009].

Es fácil pensar que para formular estos sistemas sea necesario simplemente un óxido de hierro como la magnetita o la maghemita, pero estos materiales presentan una capacidad de incorporación de principio activo muy limitada y una liberación muy rápida de estos [Arias, 2008; Arias y cols., 2001; Durán y cols., 2008]. Sin embargo, los polímeros biodegradables y los liposomas presentan una notable capacidad para el transporte de fármacos (gran vehiculización, junto con una liberación lenta y controlable

de fármaco gracias a su biodegradación). Por esto, las investigaciones se centran en el desarrollo de nanoplataformas compuestas por un núcleo magnético, que facilita el acumulo del sistema transportador en la región diana como respuesta al gradiente magnético aplicado, y un recubrimiento biodegradable de origen polimérico o liposomal [p. ej., liposoma, chitosán, poli(D,L-lactida-*co*-glicolida), poli( $\epsilon$ -caprolactona) o poli(alquilecianoacrilato)] que mejora la biodegradabilidad y biocompatibilidad de la nanoplataforma, y permite el transporte de principios activos [Durán y cols., 2008; Závıšová y cols., 2009].

La principal limitación de este método, consiste en asegurar la correcta intensidad del campo magnético para controlar así la permanencia del coloide en el lugar de acción y activar la liberación del fármaco.

Para solventar este problema, se ha propuesto la implantación de pequeños imanes en el interior o las proximidades del lugar diana mediante cirugía menor [Arias, 2011; Fernández-Pacheco y cols., 2007]. El uso de estos implantes magnéticos combinados con un gradiente magnético externo podría acrecentar aún más si cabe la acumulación de las nanoplataformas magnéticas en la zona tumoral [Fernández-Pacheco y cols., 2007; Rosengart y cols., 2005; Yellen y cols., 2005]. Se han propuesto modificaciones de la superficie de la nanopartícula con ligandos específicos de receptores presentes en células tumorales [Lin y cols., 2009] o modificaciones para aumentar la selectividad de las nanopartículas por la microvasculatura tumoral [Reddy y cols., 2006; Tietze y cols., 2009; Zhang y cols., 2007] como solución a la problemática anteriormente expuesta.



### **d) Control del proceso de liberación mediante la luz**

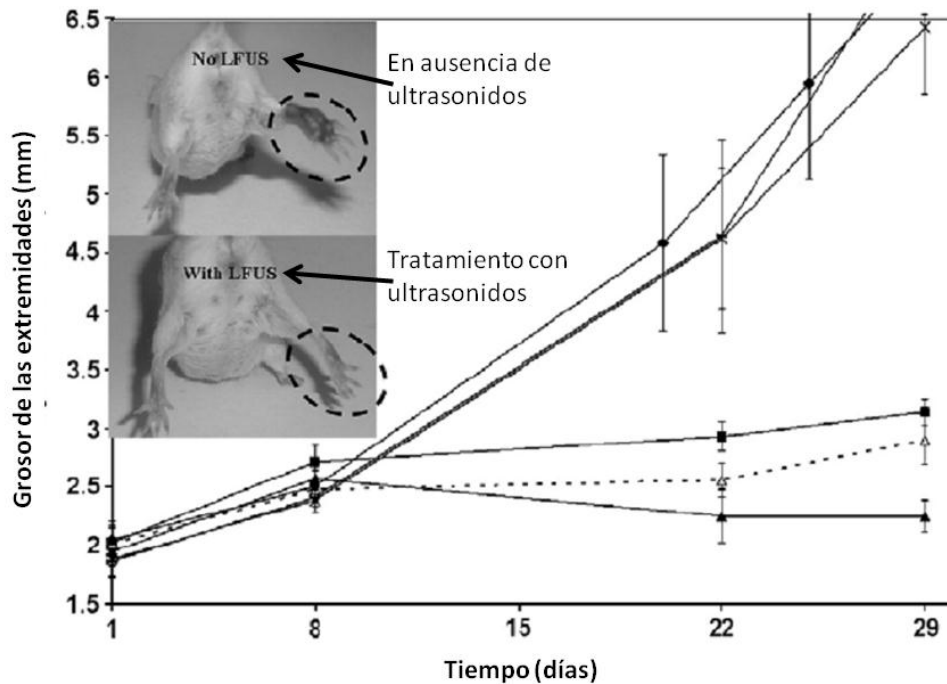
Aún no se ha demostrado la eficacia de este tipo de materiales para el transporte específico de fármacos, sin embargo son realmente interesantes por su seguridad, bajo coste y fácil manipulación. Son necesarias más investigaciones para demostrar su eficacia como sistemas capaces de degradarse ante un estímulo luminoso que puede además ser administrado en cantidades definidas y de forma precisa [Bawa y cols., 2009; Bisby y cols., 2000; Rapoport, 2007; Shum y cols., 2001].

### **e) Control mediante ultrasonidos**

Basada en exponer la zona tumoral a ultrasonidos, así conseguimos localizar el coloide en la región y liberar totalmente la dosis de fármaco en el espacio intersticial del tumor [Rapoport y cols., 2004]. Es una estrategia no invasiva dado que los ultrasonidos tienen una adecuada capacidad de penetración corporal. Podemos localizar la acción controlando distintos parámetros (frecuencia, potencia, tiempo de aplicación). Al aplicar los ultrasonidos en la región tumoral conseguimos un aumento de la permeabilidad de los capilares sanguíneos que irrigan la zona tumoral, generamos energía térmica y logramos la alteración de las membranas celulares. [Bawa y cols., 2009].

El sistema transportador llega al tumor gracias al efecto de EPR característico de la masa cancerosa (transporte pasivo) y cuando alcanza esa zona, el coloide es captado por las células tumorales gracias a la alteración por los ultrasonidos de la permeabilidad de la membrana celular. Además, la nanopartícula también se degrada bajo la acción de éstos, liberando el principio activo [Gao y cols., 2004].

En un estudio recientemente publicado se investigó la utilización de liposomas cargados con cisplatino y modificados superficialmente con cadenas de PEG, en combinación con ultrasonidos de baja frecuencia ( $\approx 20$  kHz). Se usó para el tratamiento de ratones con tumores inducidos en la cavidad intraperitoneal con células de linfoma C26. Las nanopartículas se administraron en el lugar diana y, una hora después, se sumergió la zona tumoral en un dispositivo lleno de agua con una sonda de ultrasonidos. Para los mismos ratones con el tumor en una extremidad posterior, tras 24 h se sumergía el tumor en un baño a  $24^{\circ}\text{C}$  y se aplicaba ultrasonidos a baja frecuencia. En ambos casos, los ultrasonidos tenían una intensidad de  $5.0 \text{ W/cm}^2$  y se aplicaban de 60 a 120 segundos de forma continuada, según las características de la piel. Así, se observó que  $\approx 70\%$  de la cantidad de cisplatino vehiculizada por los liposomas se acumulaba selectivamente en el tumor gracias a la acción de los ultrasonidos, a diferencia de la casi nula ( $< 3\%$ ) acumulación de fármaco obtenida en ausencia de estímulo. A consecuencia de esto, se obtuvieron mejores resultados terapéuticos en el grupo de ratones tratados con ultrasonidos con una regresión del tumor en un menor periodo de tiempo (figura 5). Como conclusión los ultrasonidos a baja frecuencia están especialmente indicados en el tratamiento de tumores superficiales (p. ej., piel, cabeza, cuello y cánceres ginecológicos) mientras que los ultrasonidos de elevada frecuencia son más adecuados en el caso de tumores localizados en estructuras más internas del organismo [Schröder y cols., 2009].



**Figura 5.** Actividad antitumoral (grosor de la extremidad en mm: media  $\pm$  desviación estándar) de diferentes tratamientos en ratones BALB/c con tumor subcutáneo C26: *i*) grupo control (imagen superior izquierda de la figura, ♦); *ii*) grupo placebo: solución salina + ultrasonidos de baja frecuencia ( $5.9 \text{ W/cm}^2$ , 60 segundos, -); *iii*) grupo tratado con cisplatino vehiculizado en liposomas y sin aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia (×); *iv*) grupo tratado con cisplatino vehiculizado y con aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia (imagen inferior izquierda de la figura, ▲); *v*) grupo tratado con una solución de cisplatino y sin la administración de ultrasonidos de baja frecuencia (-Δ-); *vi*) grupo tratado con una solución de cisplatino + ultrasonidos de baja frecuencia (■). Imágenes insertadas: extremidad posterior de un ratón tratado con liposomas cargados con cisplatino sin (arriba) y con (abajo) la utilización de ultrasonidos de baja frecuencia. Tras 29 días, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.006$ ) entre la actividad antitumoral lograda en los ratones pertenecientes al grupo *iv*) y los alcanzados en el resto de grupos de tratamiento. Reproducido de Schroeder y cols., 2009. Copyright Elsevier (2009).

**f) Control del proceso de liberación de fármaco mediante la utilización de enzimas**

Una de las principales aplicaciones de esta estrategia es el transporte activo de fármacos antitumorales en el cáncer de colon [Bawa y cols., 2009]. Se basa en la capacidad de las enzimas presentes en la zona tumoral para liberar el fármaco vehiculizado. Si el coloide es degradable por las enzimas se producirá una liberación específica del fármaco en la zona diana. [Meers, 2001].

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

## **1.4 TRANSPORTE DE FÁRMACOS A CÉLULAS TUMORALES RESISTENTES**

El principal obstáculo para la eficacia de los agentes quimioterápicos es el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las células cancerosas a pesar del uso de dosis elevadas. La quimioterapia solo será eficaz si conseguimos una estrategia de tratamiento capaz de sobreponerse a los mecanismos de resistencia celular y fisiológica de la zona tumoral, sin olvidar los problemas farmacocinéticos de muchos fármacos antitumorales.

La zona tumoral se caracteriza por un flujo sanguíneo irregular y una presión hidrostática muy alta lo que dificulta la difusión de los agentes quimioterápicos en el espacio intersticial. Por otro lado, el intersticio tumoral presenta un entorno ligeramente ácido dificultando así la actividad de fármacos básicos que se encontrarían ionizados impidiendo su extravasación desde la circulación sanguínea.

Podemos decir que el fenotipo celular de resistencia a fármacos antitumorales es el resultado sinérgico de la combinación de diferentes mecanismos como: inhibición de los fenómenos de apoptosis celular, aumento de los mecanismos de expulsión de fármaco desde el espacio intracelular, reducción de la absorción celular o un aumento de los mecanismos de reparación del ADN y desintoxicación celular. [Brigger y cols., 2002; Gottesman y cols., 2002; Jabr-Milane y cols., 2008].

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

El interés biomédico por los sistemas coloidales comenzó en la segunda mitad del siglo pasado, momento en el que se empezó a postular su utilización *in vitro* e *in vivo* con fines de diagnóstico y tratamiento de enfermedades. [Couvreur y Vauthier, 2006].

Con respecto a su aplicación con fines de diagnóstico, los sistemas coloidales se han utilizado *in vitro* en la sensibilización celular, la separación de células, la inmovilización de enzimas y en el desarrollo de inmunoensayos. *In vivo*, los coloides logran incrementar la especificidad de los agentes de contraste en resolución magnética de imagen (MRI) e incluso pueden actuar como agentes de contraste per se. Otras aplicaciones de gran interés biomédico son la purificación de medios biológicos y de aguas residuales, y la ingeniería de tejidos [Sun y cols., 2008, Shubayev y cols., 2009].

En terapéutica, los sistemas coloidales demuestran una enorme capacidad para acumular específicamente el principio activo en el lugar de acción, asegurando una mínima distribución de este por el resto del organismo [Arias y cols., 2008c; Couvreur y Vauthier, 2006; Reddy, 2005].

Los sistemas transportadores coloidales se utilizan para liberar el fármaco en un área específica del cuerpo (direccionalidad) y para retardar y prolongar su liberación (liberación modificada) exclusivamente en el lugar de acción. De forma general los sistemas coloidales transportadores de fármacos están compuestos por suspensiones acuosas de partículas de tamaño nanométrico biodegradables que contienen principios activos incorporados superficialmente (adsorbidos) o en el interior de la matriz (absorbidos) y generalmente estos sistemas son administrados por vía parenteral.

Todo esto supone una serie de ventajas sobre la terapéutica tradicional, ya que la asociación de fármacos (independientemente del grupo terapéutico al que pertenezcan) con sistemas transportadores coloidales permite:

- La acumulación específica del fármaco en la región diana.
- El aumento del tiempo de exposición célula diana/fármaco antitumoral.
- La mejora del perfil farmacocinético del principio activo.
- La protección del fármaco en el interior del sistema transportador frente a procesos de degradación *in vitro* (en condiciones de almacenamiento) e *in vivo* (contra los sistemas enzimáticos a los que es susceptible).

De esta manera, la utilización de coloides en farmacoterapia debe suponer una mejora significativa de la eficacia y una reducción de la toxicidad asociada al uso de principios activos.

Las características que tiene que cumplir un coloide para poder ser utilizado como un sistema transportador de fármacos son [Arias y cols., 2001; Craig, 1994]:

1. Debe garantizar que el fármaco vehiculizado se acumule selectivamente en el lugar de acción, generándose concentraciones residuales muy pequeñas a nivel sistémico.
2. Debe ser capaz de transportar una cantidad apropiada de fármaco, de lo contrario, la cantidad de material necesaria puede ser demasiado grande como para ser administrada al paciente.

3. El fármaco tiene que liberarse desde el sistema transportador a una velocidad adecuada y de forma exclusiva en el lugar de acción.
4. Versatilidad para el transporte de principios activos de muy diversos grupos terapéuticos y con gran variabilidad en sus propiedades fisicoquímicas.
5. Deben tener un tamaño pequeño, preferiblemente inferior a 100 nm, para asegurar una correcta llegada al lugar de acción.
6. Incrementarán la sensibilidad de las células cancerosas o microorganismos resistentes a la farmacoterapia.
7. Debe ser estable *in vitro* (en el almacenamiento) y en su tránsito al lugar requerido *in vivo*.
8. No debe presentar problemas de pérdida o cesión durante su almacenamiento o antes de llegar al lugar de acción.
9. Debe presentar una toxicidad e inmunogenicidad mínimas, además de ser biodegradable y biocompatible.
10. El sistema debe ser relativamente simple de producir a gran escala o a nivel industrial.
11. Los materiales necesarios para su formulación deben estar aprobados por la administración sanitaria.



Como hemos indicado, un aspecto crucial para su uso en farmacoterapia es el tamaño y la forma de las partículas que constituyen el coloide. De forma general, el tamaño puede ser de 1 a 100  $\mu\text{m}$  (micropartículas) o inferior a 1  $\mu\text{m}$  (nanopartículas). Si bien, cuanto menor sea éste, mejor o más extensa será su llegada al tejido diana. Una morfología esférica contribuirá también a esta extensa distribución [Decuzzi y cols., 2009]. Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto que, independientemente de la vía de administración, el destino biológico de cualquier coloide una vez que alcanza la circulación sistémica depende de su geometría (forma y tamaño) y de sus características superficiales (carga eléctrica e hidrofilia/hidrofobia) [Craig, 1994; Decuzzi y cols., 2009; Reddy, 2005]. En cuanto al efecto del tamaño de partícula sobre el destino biológico del coloide, se sabe que las partículas con un diámetro mayor de 7  $\mu\text{m}$  se acumularán en los pulmones, ya que éstos contienen la primera red de capilares que las partículas se encuentran en su camino al tejido diana. Por lo tanto, las partículas más grandes quedarán atrapadas en estos capilares sanguíneos antes de llegar al lugar de acción [Craig, 1994].

### **1.4.1 USO DE COLOIDES MAGNÉTICOS PARA EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS**

Cada vez son más las moléculas y estrategias propuestas para mejorar el transporte y liberación controlada de principio activo [Arias, 2011; Arruebo y cols., 2007; Fischer y Chan, 2007; Lynch y Dawson, 2008; Grainger, 2009] destacando, por sus grandes posibilidades, los transportadores magnéticos coloidales. La tecnología de transportadores magnéticos se originó en los años 40 para su aplicación en la purificación de aguas residuales. En poco tiempo se propusieron numerosas aplicaciones biomédicas.

En concreto, los coloides magnéticos presentan interesantes utilidades en terapia celular (separación y etiquetado celular), tratamiento de tumores mediante hipertermia, diseño de biosensores, agentes de contraste en resonancia magnética de imagen, inmovilización enzimática, separación magnética de biomoléculas, ingeniería tisular, y, particularmente, en el transporte de fármacos [Gupta y Gupta, 2005; Laurent y cols., 2008; Pankhurst y cols., 2003; Tarjat y cols., 2003].

Este tipo de nanopartículas está constituido por un núcleo magnético (principalmente de óxido de hierro) englobado en una matriz orgánica (p. ej., polímero, polisacárido o almidón) o inorgánicas (p. ej., sílice). Sus características pueden modificarse con un procedimiento de síntesis adecuado, para así controlar su geometría, capacidad de humectación (hidrofilia/hidrofobia), carga eléctrica superficial, composición química, unión a receptores específicos de la región diana, capacidad para absorber/adsorber fármaco, cinética de liberación del mismo, biodegradación y eliminación, estabilidad en almacenamiento e *in vivo*, y capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados.

El uso de nanopartículas magnéticas y campos magnéticos permite dirigir el fármaco a un lugar específico. Para ello el fármaco es vehiculizado en la nanopartícula magnética para a continuación ser administrado por vía parenteral. De forma simultánea, se aplica un campo magnético selectivamente sobre el lugar de acción. Cuando el coloide magnético alcanza la zona de influencia del campo, es atraído (retenido) por éste. Así se logra acumular toda la dosis de fármaco administrada en el lugar de acción y controlar su liberación [Durán y cols., 2008]. El mecanismo por el que se produce la liberación del principio activo desde, el coloide magnético puede ser muy variado y complejo. Generalmente, este mecanismo incluye los siguientes procesos [Alexiou y cols., 2000; Häfeli, 2004; Neuberger y cols., 2005]:

- Difusión a través de la matriz que lo contiene.
- Liberación por degradación enzimática del material que lo engloba.
- Liberación por destrucción del coloide ante condiciones fisicoquímicas adversas (p. ej.: pH, temperatura...).
- Liberación activada por la exposición de un campo electromagnético alterno que provoca alteraciones en la matriz donde va vehiculizado.

No cualquier tipo de coloide puede ser utilizado para el transporte de fármacos. Las características que debe tener un transportador magnético de fármaco son [Arias y cols., 2001; Arias y cols., 2007a; Häfeli, 2004; Lübbe y cols., 1996a; Lübbe y cols., 1996b; Müller y cols., 1996; Pankhurst y cols., 2003]:

1. Pequeño tamaño (inferior a 500 nm), para asegurar una extensa distribución a nivel capilar y la perfusión uniforme al lugar de acción.
2. Una respuesta magnética adecuada *in vivo* a los campos magnéticos aplicados.
3. Capacidad para transportar una amplia variedad de agentes terapéuticos, en cuantía suficiente para permitir un transporte adecuado de cantidades biológicamente activas, sin hacer que el organismo se cargue demasiado de material magnetizable.
4. Velocidad de liberación del fármaco controlable (o predecible) en el lugar deseado.

5. Los componentes utilizados en su formulación deben asegurar una máxima biocompatibilidad y una mínima antigenicidad.
6. Biodegradabilidad, con una eliminación total y una toxicidad mínima de los productos de degradación que se generen.

La utilización de este tipo de coloides asegurará de esta manera la total concentración de la dosis de fármaco vehiculizada en la región deseada. Por este motivo, se logrará un efecto farmacológico óptimo y, al mismo tiempo, una casi despreciable biodistribución del fármaco en el organismo [Durán y cols., 2008]. Las posibilidades de estos coloides son tan importantes en el transporte de biomacromoléculas, que incluso se encuentra en investigación su aplicación en terapia génica [Scherer y cols., 2002].

Sin embargo, debe realizarse un perfecto diseño del coloide magnético para asegurar su llegada al lugar de acción. Diversas investigaciones han puesto de manifiesto la importancia que las propiedades fisicoquímicas tienen sobre el destino biológico del sistema magnético coloidal. En concreto, son factores cruciales:

1. La geometría de la partícula coloidal. Un tamaño inferior a 200 nm y una morfología esférica asegurarán una extensa biodistribución y, por lo tanto, la total llegada del coloide magnético al lugar de acción.
2. La superficie de la partícula coloidal debe ser hidrófila. Sólo así se logrará retrasar el reconocimiento del coloide por el sistema retículo endotelial. Hecho que conlleva la eliminación del sistema coloidal del organismo.

3. La carga eléctrica superficial de la partícula coloidal debe ser lo más pequeña posible. Así se logra minimizar la retirada de las partículas de la circulación sistémica por el hígado.

En referencia a los mecanismos físicos que determinan el transporte del coloide en la circulación sanguínea por efecto de un campo magnético aplicado; queda bastante claro que debe existir un balance entre las fuerzas ejercidas sobre el coloide por el flujo sanguíneo y el gradiente de campo magnético aplicado. El movimiento de las partículas magnéticas coloidales *in vitro* está determinado por la relación entre la fuerza ( $\vec{F}$ ), el gradiente del campo magnético ( $\nabla\vec{B}$ ) y la imanación de las partículas ( $\vec{M}$ ), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\vec{F} = \vec{M} \cdot \nabla \vec{B} \quad (1)$$

Cuanto mayor sea la imanación de saturación ( $M_s$ ) de las partículas coloidales, menor será el campo magnético precisado para la retención del transportador magnético, y mayor será la eficacia del guiado magnético. A pesar de que el comportamiento de las partículas magnéticas en los líquidos viene dado por ecuaciones ferrohodinámicas [Charles, 2003; Charles y Popplewell, 1980], diversos factores biológicos pueden afectar a las características farmacodinámicas del transportador *in vivo*. En particular, y como ya hemos comentado, el reconocimiento de las partículas por las células del sistema fagocítico mononuclear generalmente provoca la localización no específica del coloide en el hígado y en otros órganos relacionados con este sistema.

Para el transporte magnéticamente controlado de fármacos el coloide magnético puede ser retenido en el órgano o tejido diana si las fuerzas magnéticas contrarrestan las

velocidades de flujo lineal de la sangre en el tejido vascular ( $> 10$  cm/s en las arterias,  $> 0.05$  cm/s en los capilares) [Gupta y Hung, 1994]. Se ha sugerido que a velocidades de flujo sanguíneo entre  $0.05$  y  $0.1$  cm/s, un campo magnético aplicado de  $0.8$  T es suficiente para permitir la localización deseada del 100% de un transportador magnético que contenga un 20% de magnetita [Senyei y cols., 1978].

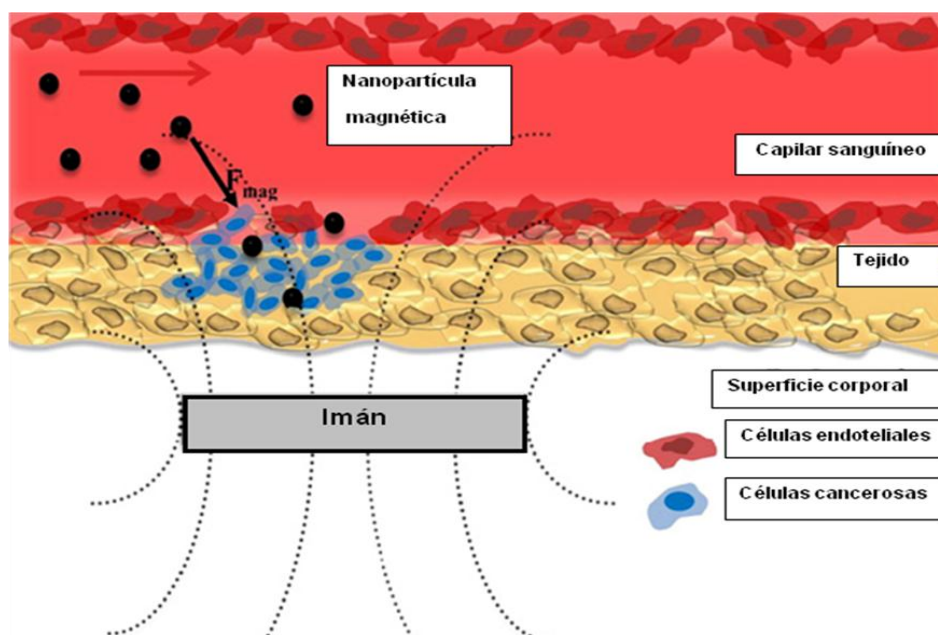
Por otro lado, y como ya se ha indicado, la velocidad con la que el fármaco es liberado de la partícula magnética coloidal puede controlarse magnéticamente. Se ha demostrado que la velocidad de liberación de un principio activo puede incrementarse más de 30 veces mediante sistemas poliméricos que contienen nanopartículas magnéticas expuestas a un campo electromagnético alterno. El mecanismo puede implicar el desplazamiento de las cadenas poliméricas con [Kost y cols., 1985], o sin [Saslowski y cols., 1988] la entrada de agua, la cual puede provocar una mayor disolución del fármaco.

Otra forma de incrementar la respuesta magnética es aumentar el contenido magnético del coloide. Sin embargo, esta aproximación está limitada por la reducción proporcional en contenido de fármaco [Gupta y Hung, 1988].

La evaluación experimental de la distribución tisular de este tipo de transportadores ha sido fundamentalmente documentada mediante la utilización de microcápsulas de albúmina que contienen en torno a un 20% de partículas de magnetita [Gupta y Hung, 1994]. Por ejemplo, comparado con una disolución de adriamicina de administración intravenosa, se ha demostrado que la administración intrarterial de un 1% de la dosis normal de este fármaco mediante microcápsulas magnéticas de albúmina en presencia de un campo magnético de  $0.8$  T logra la misma concentración de fármaco en el lugar diana [Widder y cols., 1978]. A excepción de los polímeros bioadhesivos y de las microcápsulas de etilcelulosa, todos los experimentos realizados con campos magnéticos inferiores a  $0.4$  T han demostrado el papel decisivo que tienen sobre las

propiedades farmacocinéticas del coloide el tamaño de partícula, el tipo de campo magnético aplicado y la profundidad y permeabilidad de la región diana [Gupta y Hung, 1990].

Se ha demostrado que se puede lograr un incremento de entre 8 y 25 veces en la concentración de fármaco en el tejido diana con un tercio de la dosis convencional administrada. Sin embargo, el uso de transportadores magnéticos está restringido por la necesidad de un campo magnético con intensidad de campo apropiada, gradientes de campo constantes con la geometría adecuada, y por las dificultades propias del acceso al lugar diana [Gupta y Hung, 1989; Gupta y Hung, 1990].



**Figura 6.** Representación esquemática de transporte activo direccional de las nanopartículas magnéticas

El uso de campos magnéticos alternos genera el efecto de hipertermia y además conseguir la liberación controlada del principio activo vehiculizado [Guo y Szoka, 2003; LaVan y cols., 2003]. La aplicación de campos magnéticos externos junto con el

coloide magnético provocan el calentamiento específico de la masa tumoral hasta unos 42°C, temperatura que si es mantenida durante 30 minutos provocará la muerte de las células tumorales [Glöckl y cols., 2006; Hergt y cols., 2006; Hilger y cols., 2006; Moroz y cols., 2002; Pankhurst y cols., 2003]. Por otro lado, este calentamiento destruirá los núcleos magnéticos permitiendo la liberación del fármaco [Liburdy y cols., 1986; Steinke y cols., 2007; Wagner, 2007].

Si bien algunos estudios apuntan la posibilidad de administrar los coloides magnéticos por vía intratumoral [Brigger y cols., 2002; Fernández-Pacheco y cols., 2007], la mayoría de los trabajos científicos investigan la vía de administración intravenosa. Por esta vía las nanopartículas magnéticas entran en contacto rápidamente con fluidos fisiológicos de pH básico (7.4) y con una fuerza iónica relativamente alta (130-150 meq/L). Bajo estas condiciones fisiológicas, las nanopartículas se agregan para ser termodinámicamente estables, agregación que se verá favorecida si el coloide presenta una magnetización remanente tras la retirada del campo magnético aplicado. Esta estabilidad *in vivo* puede comprometer la llegada de las nanopartículas al lugar de acción, por lo que el sistema transportador debe reunir las siguientes características [Durán y cols., 2008]: *i*) densidad de carga eléctrica superficial suficiente que asegure una repulsión electrostática entre las partículas que evite su agregación; *ii*) hidrofilia (mojabilidad), para asegurar la distribución de las nanopartículas en el plasma de forma individualizada y que no aparezcan agregados hidrófobos; y, *iii*) superficie modificada con cadenas poliméricas hidrófilas que retrasan/minimizan los fenómenos de floculación y de opsonización previos a la fagocitosis por macrófagos, donde las cadenas de polímero (por norma general PEG) protegen por impedimento estérico de la nanopartícula magnética o electro-estérico si la cadena está cargada. Actualmente, la introducción en clínica de los coloides magnéticos como sistemas transportadores de fármacos está limitada por [Dobson, 2006; Durán y cols., 2008; Lübke y cols., 1996a]:



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

## **2.1. CÁNCER Y ANTINEOPLÁSICOS**

Nuestro organismo está constituido por un conjunto de células que se dividen periódicamente para reemplazar células viejas o muertas manteniendo así el correcto funcionamiento de nuestros órganos. Este proceso de división está regulado por mecanismos de control que indican a la célula cuando comenzar a dividirse y cuando no.

El cáncer se caracteriza por un cambio en estos mecanismos de diferenciación y proliferación celular, dando lugar a una proliferación excesiva de las células que con el tiempo da lugar a un tumor o nódulo. Si las células que forman este tumor no son capaces de invadir y destruir otros órganos hablamos de tumores benignos, pero si estas sufren nuevas alteraciones y comienzan a invadir tejidos y órganos, trasladarse y proliferar en otras partes del organismo, dando las llamadas metástasis, hablamos de tumor maligno, conocido comúnmente como cáncer.

Las características de las células de un tumor maligno son:

- 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.
- 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).

- 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 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.

Existen una serie de alteraciones benignas y /o premalignas de las células:

- 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.

### 2.1.1 TIPOS DE CÁNCER

Los tipos de cáncer más comunes son los siguientes:

#### a) **Carcinoma**

Tumor maligno que se origina en la capa de células epiteliales que recubre los órganos. Aproximadamente el 80% de los tumores cancerosos son carcinomas. Dentro de estos encontramos gran variedad de nombres puesto que las células que lo componen tienen características diferentes, podemos destacar:

- Carcinoma de células basales: el cáncer de piel más común. Originado en la capa de células basales de la epidermis. Por lo general, en áreas expuestas al sol, especialmente la cabeza y el cuello, crece lentamente y es poco probable que se propague a partes distantes del cuerpo.
- Melanoma: tumor maligno que se origina en los melanocitos. Es casi siempre curable en sus primeras etapas. Sin embargo, es probable que se propague a otras partes del cuerpo.

#### b) **Sarcoma**

Tumor maligno originado en los tejidos conectivos (cartílago, grasa, músculo o hueso), según la célula originaria reciben distinto nombre, siendo los más conocidos:

- Osteosarcoma: deriva del hueso.
- Liposarcoma: deriva de la grasa.
- Condrosarcoma: deriva del cartílago.
- Angiosarcoma: deriva de los vasos sanguíneos.

### c) Leucemia

Cáncer de la sangre. Supone un notable descenso en los niveles de glóbulos blancos, en estas no existe tumoración, se afectan la sangre y la médula ósea. La leucemia se puede clasificar en función del tipo de célula alterada en:

- Leucemia mieloide
- Leucemia linfoide

Asimismo, según el estado de maduración de las células leucémicas, podemos encontrar:

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

### d) Linfoma

Cáncer del sistema linfático. Los dos tipos principales de linfomas son la enfermedad de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin.

## 2.2 ANTINEOPLÁSICOS

El objetivo último de la terapia anticancerosa es la eliminación completa de toda célula cancerosa, mediante métodos quirúrgicos, radioterapéuticos y farmacológicos. Si esta extirpación completa es posible se habla de curación o tratamiento radical, pero si la neoplasia no está localizada, existen metástasis o no es posible la erradicación por motivos diversos, el objetivo de la terapia es paliativo: reducir el tamaño o el número de células, aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia con una calidad de vida aceptable. La farmacología anticancerosa constituye un método terapéutico muy útil que coadyuva, junto con la cirugía y la radioterapia, a mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Se dispone de diversas formas de administración de la quimioterapia:

- Quimioterapia de inducción: en una situación de enfermedad avanzada, el objetivo es conseguir su remisión, con una intención curativa o meramente paliativa. La eficacia se valorará en términos de respuesta objetiva.
- Quimioterapia adyuvante: se realiza después de efectuar un tratamiento locorregional quirúrgico o radiológico. Su objetivo es eliminar la enfermedad residual micrometastásica y su eficiencia se valora en términos de prolongación de la supervivencia o del intervalo libre de enfermedad.
- Quimioterapia neoadyuvante: se emplea como tratamiento primario del tumor en estadio clínico locorregional antes de cirugía, en asociación o no con radioterapia concomitante. Su eficacia se valora en términos de remisiones completas patológicas y en la prolongación de la supervivencia.

- Quimioterapia regional: se realiza por vía intraarterial, intraperitoneal o intratecal, para aumentar la exposición del fármaco en un lugar determinado.

Las células presentes en un tumor no son homogéneas aunque se hayan originado de un mismo grupo clonal; por el contrario, en el transcurso de la proliferación y del crecimiento, las células desarrollan características distintas de carácter bioquímico, morfológico e inmunológico, probablemente por cambios mutagénicos. Esta heterogeneidad celular se traducirá, entre otras consecuencias, en diferencias de sensibilidad a la acción de los fármacos antineoplásicos, desde una sensibilidad elevada hasta una resistencia total.

Además las células tumorales presentan diferencias en cuanto a la fase del ciclo celular en que se encuentran; mientras unas están en fases de elevado crecimiento o proliferación otras pueden estar en fase de reposo. Generalmente muchas neoplasias se diagnostican en etapas de crecimiento desacelerado, debido a problemas de vascularización, competencia entre células para conseguir elementos nutritivos, problemas de espacio, etc. Puesto que muchos de los antitumorales son más eficaces frente a células de división rápida, podría decirse que en principio gran parte de la población celular tumoral puede ser resistente al agente antineoplásico. En estas circunstancias, una reducción inicial del número de células (por métodos quirúrgicos, radioterapia y acción de fármacos que actúen con independencia de la fase del ciclo celular) puede modificar el equilibrio intratumoral y estimular a las células que se dividían lentamente para que lo hagan con más rapidez, convirtiéndose en células más sensibles a los fármacos que actúan en las fases de crecimiento rápido.

Por otro lado cuando un tumor se encuentra sometido a la presión selectiva de un tratamiento farmacológico, las células sensibles son destruidas pero la subpoblación de mutantes que se ha hecho resistente sobrevive y prolifera, por tanto con el tiempo la destrucción celular provocada por el fármaco disminuye ya que se van seleccionando las variantes resistentes.

De todo esto deducimos que el tratamiento farmacológico de un tumor rara vez va a responder a un único agente si se quiere que su acción permanezca un tiempo prolongado. Será necesaria la acción conjunta de varios fármacos, unas veces podrá hacerse al mismo tiempo pero a menudo se hará en fases o de forma sucesiva según las modificaciones bioquímicas y cinéticas que sufran las células tumorales.

La eficacia de la terapia anticancerosa basada en un tratamiento plurifarmacológico será mayor cuanto mejor se cumplan los siguientes requisitos:

- los fármacos han de ser activos frente a más de uno de los tipos de células que forman una población tumoral
- han de actuar por mecanismos bioquímicos diferentes o en fases celulares distintas
- han de poseer toxicidad orgánica diferente o manifestarse con un secuencia temporal distinta
- basta que sus actividades respectivas se sumen, pero es preferible que presenten sinergia o potenciación.

Para que un fármaco antineoplásico actúe es condición indispensable que pueda acceder en concentración suficiente a todas las células sensibles a él. Es por esto que nuestro estudio podría aportar una solución a este problema al centrarse en el estudio de



un sistema transportador para el fármaco antitumoral elegido, con todas las ventajas expuestas anteriormente en este capítulo.

Podemos clasificar los fármacos antitumorales en diversos grupos [Flórez 2008]:

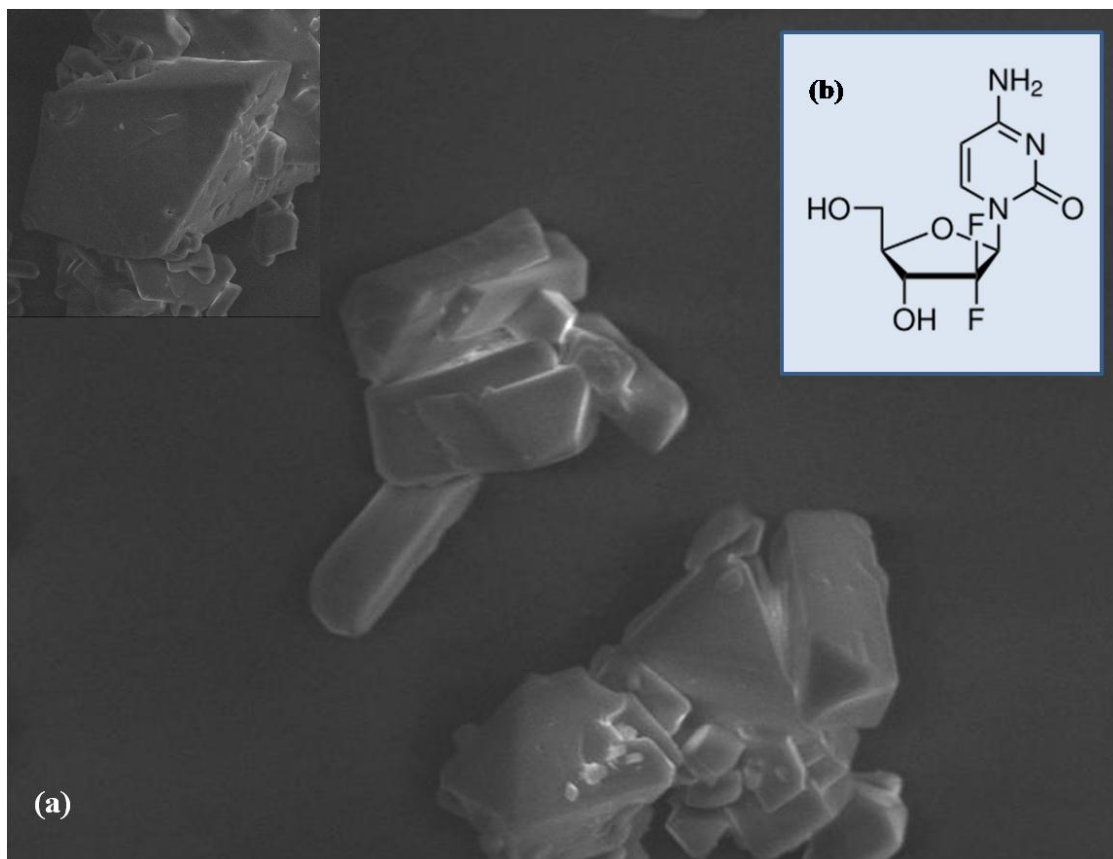
- Antimetabolitos: Antagonistas del folato (metotrexato), análogos pirimidínicos (gemcitabina), análogos púricos (6-mercaptopurina).
- Antibióticos: actinomicina D, antraciclinas (doxorubicina y daunorrubicina), bleomicina, mitomicina C.
- Agentes alquilantes: mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida, estramustina, melfalán), nitrosoureas (carmustina, lomustina).
- Inhibidores de los microtúbulos: Alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina), taxanos (paclitaxel o taxol).
- Hormonas esteroideas y sus antagonistas
- Otros: cisplatino y carboplatino, etopósido y tenipósido, procarbazona, L-asparaginasa.

Como podemos ver en la clasificación anterior, existen numerosos tipos de fármacos antitumorales, en nuestro caso el fármaco elegido durante nuestro estudio pertenece a la familia de los antimetabolitos, el clorhidrato de gemcitabina.

### **3.1 CLORHIDRATO DE GEMCITABINA**

Los fármacos antimetabolitos actúan en la fase de síntesis del ciclo celular interfiriendo en la síntesis de ADN y ARN. Por norma general, son análogos estructurales de los metabolitos que intervienen en los procesos de crecimiento y división, por ello pueden incorporarse a las moléculas de ADN y ARN, y desde allí transmitir falsos mensajes. En ocasiones, inhiben enzimas específicas necesarias para la síntesis de compuestos esenciales. Generalmente obtienen su mayor eficacia cuando la proliferación celular es rápida. [Florez, 2008].

El clorhidrato de gemcitabina (o 2', 2'- difluorodesoxitocidina) es un antimetabolito análogo de la pirimidina, es hidrófilo por lo que no puede atravesar las membranas por difusión pasiva [Cass, 1995], esto implica que son necesarios sistemas de transporte especializados entre los que podemos encontrar sistemas dependientes de la concentración de sodio (tipo CNT) o independientes de esta, también llamados equilibradores (tipo ENT) [Burke y cols., 1998; Fang y cols., 1996; Griffit y Jarvis, 1996; Hammond y cols., 1999]. Diversos estudios demuestran que el clorhidrato de gemcitabina puede ser transportado por diferentes proteínas, salvo los transportadores selectivos de purina del tipo CNT [Mackey y col., 1999; Ritzel y cols., 2001]. Además el clorhidrato de gemcitabina inhibe el transporte de uridina por ambos sistemas transportadores: dependiente de la concentración de sodio y equilibrador, es por esto que la presencia y actividad de los nucleósidos se considera determinante en la citotoxicidad y eficacia clínica de este fármaco [Bergeman y cols., 2002; Burke y cols., 1998].



**Figura 7.** Microfotografía electrónica de barrido (SEM) del clorhidrato de gemcitabina (a).  
Fórmula química del clorhidrato de gemcitabina (b)

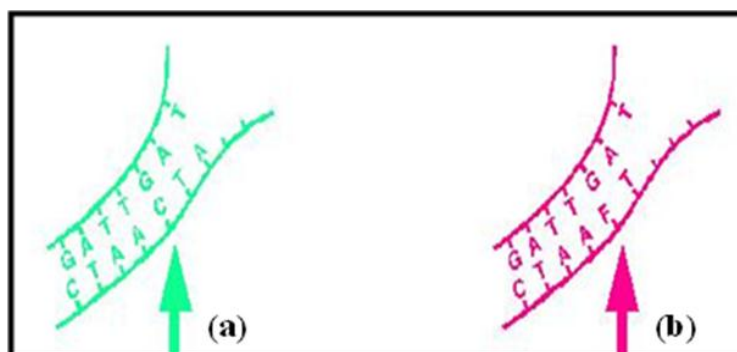
El clorhidrato de gemcitabina es un prefármaco cuyo mecanismo de acción se basa en una fosforilación intracelular a su trifosfato activo [Sloat y cols., 2011]. Una vez cruza las membranas plasmáticas el clorhidrato de gemcitabina es fosforilado por la deoxicitidina quinasa (dCK) a monofosfato, este primer paso es limitante para la fosforilación de metabolitos activos y esencial para la activación de la gemcitabina [Bergeman y cols., 2002]. Tras esta primera etapa el clorhidrato de gemcitabina es fosforilado por quinasas menos específicas hasta el 2,2-difluoro-desoxicitidina trifosfato (dFdCTP) que es su metabolito más importante [Heineman y cols., 1988; Hodge y cols., 2011; Huang y cols., 1991].

Se ha demostrado que la acumulación de dFdCTP en un tumor sólido depende de la dosis y el tiempo de exposición, aumentando así la sensibilidad al clorhidrato de gemcitabina [Bergeman y cols., 2002]. Otro factor importante para la sensibilidad a este fármaco, es la retención de dFdCTP aunque la acumulación inicial sea limitada. Tanto *in vivo* como *in vitro* Ruiz van Haperen asoció el incremento de sensibilidad a una mayor retención de dFdCTP [Ruiz van Haperen y cols., 1994; 1996].

En contraste con la rápida eliminación del araCTP (metabolito activo de la citarabina) la eliminación del dFdCTP es bifásica y bastante lenta, llegando a tener en algunos sistemas una vida media de hasta 24 horas [Bergeman y cols., 2002; Ruiz van Haperen y cols., 1994;], esto se debe a una autopotenciación de la gemcitabina, concretamente inhibiendo la dCMP-deaminasa lo que evita su degradación y la inhibición de la CTP sintetasa y ribonucleótido reductasa que disminuyen la concentración de dCTP haciendo que se active la dCK y aumente la síntesis de dFdCTP.

Por otro lado, el dFdCTP ha sido identificado como un inhibidor de la ribonucleótido reductasa (RNR) provocando una disminución de las reservas de desoxirribonucleotidos [Lawrence y cols., 1997; Shewach y Lawrence, 1996; Smid y cols., 2001]. Predomina la disminución de la reserva de dGTP y dATP siendo la más moderada la disminución de dCTP [Smid y cols., 2001]. El agotamiento de dCTP da una menor inhibición de los dCK y por tanto aumenta la fosforilación e incorporación del clorhidrato de gemcitabina en el ADN [Bergeman y cols., 2002].

El dFdCTP se incorpora a los sitios C durante la elongación de la cadena de ADN catalizada por la ADN polimerasa  $\alpha$  y  $\epsilon$  (figura 8), al incorporarse esta se hace más lenta aunque da tiempo a que se una, al menos, una secuencia de nucleótidos provocando una “terminación enmascarada de la cadena de ADN” que impide el reconocimiento y corte por parte de la exonucleasa, es decir, impide la reparación del ADN [Peters y cols., 2000; Van Moorsel y cols., 1999].



**Figura 8.** Incorporación de d-Citidina Tri-fosfato [Nucleosido normal] (a)  
Incorporación de Gemcitabina Tri-fosfato [di-fluor, desoxi-CTP]

Este fármaco ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de tumores sólidos (pulmón, colón, cáncer de ovarios) y ha sido aprobado su uso para el tratamiento de tumores pancreáticos, vejiga y mama. [Arias y cols., 2009; Hertel y cols. 1990; Plunkett y cols., 1995; Reddy y Couvreur, 2008].

A pesar de ser realmente eficaz, al ser administrado por vía intravenosa puede ser deaminado rápidamente convirtiéndose en (2',2'-difluoro-2'-desoxiuridina), metabolito inactivo que presenta una semivida media plasmática muy corta, entre 8-17 minutos, que implica la necesidad de usar dosis muy altas llevándonos a un mayor número de efectos secundarios. [Bouffard y cols., 1993; Matsuda y Sasaki, 2004; Reddy y Couvreur, 2008; Starniolo y cols., 1997].

Presenta toxicidad leve con efectos transitorios y no acumulativos entre los que encontramos: gripe, fatiga, fiebre, ligeras molestias gastrointestinales (nauseas, vómitos y diarrea), edema periférico, proteinuria, reacciones cutáneas. Ha habido algunos casos de síndrome urémico hemolítico y disfunción cardíaca pero por norma general los efectos secundarios son raros o no son causa para suspender el tratamiento. También se han dado casos de mielosupresión que se solventan reduciendo la dosis de fármaco. [Flower y Van Le, 2003; Tonato y cols., 1995].

## **Capítulo 2:**

# **Contribución y objetivos**



## 2.1 OBJETIVOS.

La presente *Tesis Doctoral* se engloba dentro de la línea de investigación *Aplicaciones Biomédicas de los Fluidos Magnetorreológicos* del grupo de investigación *Farmacia Práctica* (CTS-205, Junta de Andalucía). Su objetivo principal es el diseño de un nanosistema transportador eficaz que posibilite la liberación específica de fármacos antineoplásicos en la región tumoral. Con ese fin se ha realizado un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas magnéticas compuestas de un núcleo magnético de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y un recubrimiento polimérico de poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA). La capacidad de vehiculización de fármacos (transporte y liberación controlada en la región diana) se ha ejemplificado utilizando la molécula antitumoral clorhidrato de gemcitabina.

La eficacia del recubrimiento y las ventajas relativas a la capacidad de las partículas para transportar un principio activo se determinarán mediante el análisis comparativo de la estructura y la composición química de los tres tipos de nanomateriales [maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) y nanopartículas de maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA)], así como la caracterización de las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales de estos.

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



Una parte esencial de la investigación es la determinación de la capacidad de vehiculización de fármacos que tienen las nanopartículas de maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida) formuladas. Para ello, se investigarán dos métodos convencionales de incorporación de fármacos en este tipo de nanosistemas: adsorción superficial y absorción en matriz utilizando técnicas cuantitativas (espectrofotometría UV-visible). Otro objetivo básico ha sido el análisis *in vitro* del proceso de liberación del antitumoral gemcitabina clorhidrato desde las nanopartículas, determinando espectrofotométricamente la cantidad liberada y los factores que condicionan este proceso, concretamente, el tipo de vehiculización en las nanopartículas.

Concretamente, para lograr este objetivo principal, los pasos a seguir serán:

1. Síntesis de las nanopartículas compuestas por un núcleo magnético (maghemita) y un recubrimiento polimérico [poli(D,L-lactida-co-glicolida)] mediante una modificación del método de emulsión con evaporación de disolvente utilizado en la formulación de partículas de PLGA [Holgado y cols., 2008].
2. Caracterización de su geometría (forma y tamaño) y composición y estructura química. De esta manera, pretendemos demostrar la correcta formación de las partículas magnéticas coloidales mixtas.
3. Estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de materiales [maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) y nanopartículas de maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA)] mediante electroforesis. Uso de modelos teóricos para evaluar el potencial eléctrico superficial de las nanopartículas y control del mismo en función de las características del medio de dispersión (pH y fuerza iónica).

4. Análisis comparativo de las propiedades termodinámicas superficiales de los tres tipos de materiales coloidales, 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. Análisis de los mecanismos fisicoquímicos implicados en la formación de los coloides magnéticos mixtos maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida).
6. Caracterización de las propiedades magnéticas de las nanopartículas de maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida).
7. Prueba de concepto *in vivo* del efecto que un gradiente magnético aplicado puede ejercer en la biodistribución de las nanopartículas maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida).
8. Determinación de la capacidad de vehiculización del fármaco antitumoral clorhidrato de gemcitabina por las nanopartículas maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) mediante métodos espectrofotométricos. Estudio de los principales factores que condicionan este proceso (procedimiento de incorporación y cantidad de fármaco utilizada), para así identificar las condiciones óptimas de vehiculización.
9. Evaluación de la liberación de fármaco desde las nanopartículas maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida). Análisis del efecto del método de incorporación (absorción/adsorción) sobre la liberación y estudio cinético del mismo.

## **2.2 CONTRIBUCIÓN DEL TRABAJO**

### **PROPUESTO.**

Dentro del campo de la investigación y del desarrollo de los transportadores coloidales de fármacos anticancerígenos, la aportación principal de esta Tesis Doctoral se centra en el diseño de un sistema de liberación modificada de estos fármacos constituido por maghemita y poli(D,L-lactida-co-glicolida). Para ello, proponemos la formulación de un sistema magnético transportador de fármacos que esté constituido por un núcleo magnético (responsable de dotar de capacidad de respuesta al sistema ante gradientes magnéticos aplicados) y un recubrimiento polimérico biodegradable de poli(D,L-lactida-co-glicolida), capaz de transportar el fármaco en su matriz o en su superficie y de controlar la velocidad de liberación de éste en el lugar deseado.

Cabe esperar que el uso de este tipo de transportador permita reducir las reacciones adversas consecuentes de la distribución a nivel sistémico y de la baja especificidad del principio activo. Así mismo, se necesitarán dosis netamente inferiores para conseguir la misma acción terapéutica. Por último, el carácter superparamagnético de los núcleos de maghemita permite la utilidad *in vivo* del coloide como agente inductor de hipertermia y como agente de contraste en imagen por resonancia magnética.

Este es un campo de investigación bastante extenso y en constante desarrollo, por lo que centraremos nuestro trabajo en aspectos muy concretos del mismo. Pensamos que nuestra investigación podría contribuir en los siguientes aspectos:

- Síntesis y estudio morfológico de las partículas magnéticas mixtas. El procedimiento de formulación utilizado se aplica por primera vez, que sepamos, en el diseño de un sistema mixto maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida). Determinación de la estructura y composición química del coloide magnético mixto.
- Utilización de métodos de análisis fisicoquímico de superficies muy sensibles a las transformaciones experimentadas por los núcleos magnéticos al quedar recubiertos por el polímero biodegradable. La información obtenida puede ser especialmente útil en la identificación de los mecanismos de formación de las nanopartículas magnéticas compuestas.
- Análisis térmico de los tres tipos de materiales [maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) y nanopartículas de maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA)] y el fármaco (clorhidrato de gemcitabina) para comprobar la estabilidad de nuestro sistema a altas temperaturas.
- Investigación de la capacidad de respuesta de las nanopartículas de maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) a campos magnéticos aplicados: de forma cuantitativa mediante la determinación de su ciclo de histéresis, y de forma cualitativa mediante la observación de suspensiones acuosas de la nanoplataforma.
- Desarrollo de una prueba de concepto sobre las posibilidades reales de este tipo de estrategia de transporte de fármacos al tejido canceroso diana. Siendo esta una contribución original e importante, ya que este tipo de estudio no está muy extendido en el desarrollo de estos nanomateriales.

- Análisis de la capacidad de este nanosistema mixto como sistema transportador de fármacos, estudiando la versatilidad del mismo con el fármaco antitumoral clorhidrato de gemcitabina.

### **2.3 METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.**

El presente trabajo de investigación se desarrollará en las siguientes etapas:

1. Síntesis de partículas compuestas por un recubrimiento polimérico biocompatible [poli(D,L-lactida-*co*-glicolida)] y un núcleo magnético (maghemita). El procedimiento seguido consiste en definitiva en la preparación de las partículas mediante una modificación del método de emulsión con evaporación de disolvente.
2. Caracterización exhaustiva de la composición y estructura química del sistema transportador magnético mixto obtenido.
3. Análisis térmico de los tres tipos de materiales [maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) y nanopartículas de maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA)] y el fármaco (clorhidrato de gemcitabina).
4. Evaluación de la eficacia del recubrimiento. Dadas las diferencias en cuanto a la carga superficial (y, especialmente, debido a la dependencia de esta con el pH y la fuerza iónica) entre la maghemita y la poli(D,L-lactida-*co*-glicolida), la determinación del potencial zeta de los tres tipos de partículas en función del pH y de la fuerza iónica debe ser un buen procedimiento para

evaluar 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: este debe cambiar de los núcleos a las partículas mixtas, dado que la maghemita es un material hidrófilo y la poli(D,L-lactida-co-glicolida) tiene un carácter hidrófobo.

5. Evaluación de la capacidad de vehiculización del fármaco. Se realizará un estudio de la absorbancia óptica de disoluciones de clorhidrato de gemcitabina con objeto de encontrar las condiciones óptimas de trabajo y determinar el coeficiente de absorción molar mediante la obtención de la curva de calibrado. Además, se realizará una validación del método espectrofotométrico utilizado, lo que permitirá determinar espectrofotométricamente la capacidad de incorporación (en superficie y en matriz) de fármaco en las partículas compuestas.
6. Ensayos de liberación *in vitro*. Se determinará la cantidad de clorhidrato de gemcitabina liberada y el proceso de liberación por parte de las partículas compuestas. Se analizará el efecto de los factores que presumiblemente afectarán a la liberación *in vivo*: características del medio de liberación, tipo de vehiculización de fármaco (adsorbido o absorbido) y cantidad de fármaco incorporada.
7. Análisis de la influencia que la aplicación de un campo magnético externo en la región diana tiene sobre la biodistribución *in vivo* de este sistema transportador en ratones DBA/2 a los que se les ha inducido un tumor sólido, tras inoculación subcutánea de células cancerosas L1210.



## **Capítulo 3:**

# **Formulación y caracterización de nanopartículas**





## 3.1 MATERIALES

### 3.1.1 POLI(D,L-LACTIDA-CO-GLICOLIDA) (PLGA)

La poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) es un copolímero tipo poliéster alifático lineal aprobado por la “Food and Drug Administration” (FDA) para el diseño de sistemas transportadores como sistema terapéutico por su excepcional biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Se sintetiza mediante un proceso de copolimerización al azar de los anillos abiertos de los dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-diones) del ácido glicólico y ácido láctico. Durante este proceso de copolimerización las unidades monoméricas de glicolida y lactida se unen mediante enlaces éster. En función de la proporción de poli(D,L-lactida) (PLA) y poli(glicolida) (PGA) que forma parte del copolímero, tenemos diferentes tipos de PLGA. Por ejemplo: PLGA 60:40 está constituido por 60% de PLA y 40% de PGA.

El grado de cristalinidad del copolímero de PLGA depende del tipo y de la proporción molar de los componentes de su cadena, [Jalil y Nixon, 1990] si el contenido de PGA es inferior al 70% el copolímero presenta una estructura amorfa y posee una temperatura de transición vítrea entre 40 y 60 °C. El PLGA se disuelve en una amplia gama de disolventes comunes, p. ej.: disolventes de cloro, tetrahidrofurano, acetona o etilacetato.

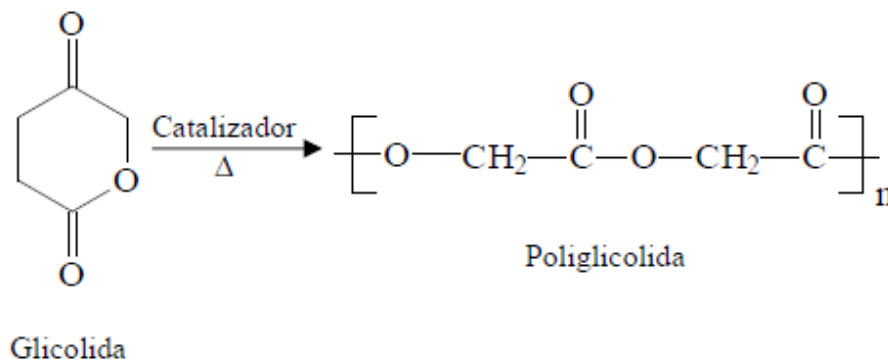
El PLGA se degrada fácilmente en medio acuoso por rotura de los enlaces éster de su estructura química [Cohen y cols., 1994]. Las cadenas sufren una degradación masiva mientras en la matriz se produce a un ritmo uniforme. Se han descrito tres fases bien definidas dentro del proceso de degradación [Jain, 2000]:

- escisión al azar de las cadenas poliméricas, donde el peso molecular disminuye significativamente sin que se produzca una pérdida de masa importante ni la formación de monómeros solubles.
- fase media donde ocurre la disminución del peso molecular del polímero junto con la rápida pérdida de masa y la formación de monómeros solubles.
- formación de monómeros solubles a partir de fragmentos oligoméricos solubles, gracias a lo que ocurre la completa solubilización del polímero.

Como hemos comentado previamente, el PLGA es ampliamente utilizado en el desarrollo de coloides poliméricos biodegradables como sistemas transportadores de fármacos de muy variada naturaleza por su gran capacidad para transportar cantidades altas de principio activo, junto con una liberación controlada de estos.

Con respecto a cada uno de los componentes del PLGA, la poliglicolida (o polímero del ácido glicólico, PGA) fue dada a conocer por Bischoff y Walden en 1893. Dichos autores describieron que la reacción de polimerización de la glicolida es un proceso reversible. Esta reacción fue estudiada posteriormente por Carothers en 1932 aunque no fue comercializada hasta 1967, cuando fue utilizada como sutura quirúrgica reabsorbible. Recientemente se ha propuesto su utilización en ingeniería de tejidos óseos.

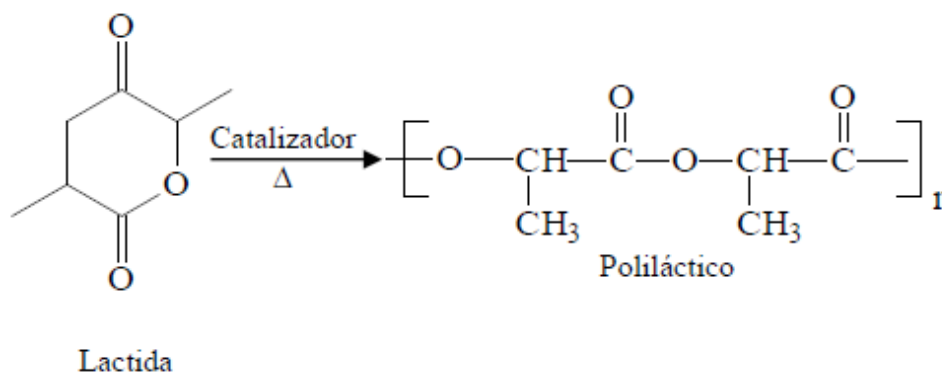
De forma general (figura 9), la síntesis de este polímero implica una reacción de polimerización mediante apertura del anillo del dímero cíclico del ácido glicólico. Los catalizadores más utilizados para ello, son los típicos de una polimerización catiónica: ácidos de Lewis o sales de estaño. Si, por el contrario, la formulación del polímero implica un proceso de catálisis ácida, el polímero resultante se caracterizará por un peso molecular bajo y, a menudo, por unas propiedades mecánicas pobres.



**Figura 9.** Síntesis de poliglicolida

La poliglicolida es un poliéster alifático lineal que se caracteriza por ser un material termoplástico rígido de elevada cristalinidad (46–50%). Su temperatura de transición vítrea es de 36°C y su temperatura de fusión de 225°C. Debido a su elevada cristalinidad la PGA es insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos, con la excepción de los altamente fluorados como el hexafluoroisopropanol. El principal producto de degradación de este polímero es el ácido glicólico, un metabolito natural. Por esta razón, es un polímero con una elevada biodegradabilidad y biocompatibilidad, hecho que ha motivado su utilización en el diseño de sistemas transportadores de fármacos y proteínas.

En cuanto a la poli(D,L-lactida) [o polímero del ácido poli(D,L-láctico), PLA], es también un compuesto biodegradable y biocompatible que se obtiene mediante polimerización por apertura del anillo del dímero cíclico del ácido láctico (figura 10).



**Figura 10.** Síntesis del poliláctico

Durante nuestra investigación el procedimiento de síntesis usado para las nanopartículas con PLGA se fundamenta en el método de emulsión con evaporación de disolvente [Holgado y cols., 2008]. Este método se basa en la disolución de 250 mg de PLGA a temperatura ambiente en 10 mL de etilacetato, la solución resultante se añade a una fase acuosa de alcohol polivinílico (PVA) al 0.3% (p/v) bajo agitación mecánica durante 30 minutos. Pasado este tiempo la dispersión resultante fue sometida a agitación magnética (1500 rpm) durante el tiempo suficiente para asegurar la completa evaporación del disolvente orgánico. Con el objetivo de minimizar el tamaño de partícula, se ensayaron diferentes velocidades de agitación durante los primeros 30 minutos de la síntesis: 8000, 19500 y 26000 rpm.

La suspensión blanquecina de nanopartículas poliméricas obtenida fue sometida a un procedimiento de limpieza consistente en dos ciclos de centrifugación a 8000 rpm (centrífuga de alta velocidad Centrikon T-124, Kontron, Francia) y redispersión en agua ultrapura, hasta que la conductividad del sobrenadante obtenido fue inferior a 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . El sedimento obtenido se redispersó mediante ultrasonidos en agua bidestilada y se almacenó en un frasco de cristal para su posterior utilización. Cuando el polímero iba a ser utilizado en estado sólido, se desecó a 40°C en una estufa de desecación.

Se utilizaron dos metodologías diferentes para definir la geometría de los materiales formulados. En primer lugar, el tamaño y la forma se dedujeron a partir de fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) obtenidas utilizando un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 950 (Alemania) y un microscopio electrónico de transmisión STEM Philips CM20 (Holanda), respectivamente.

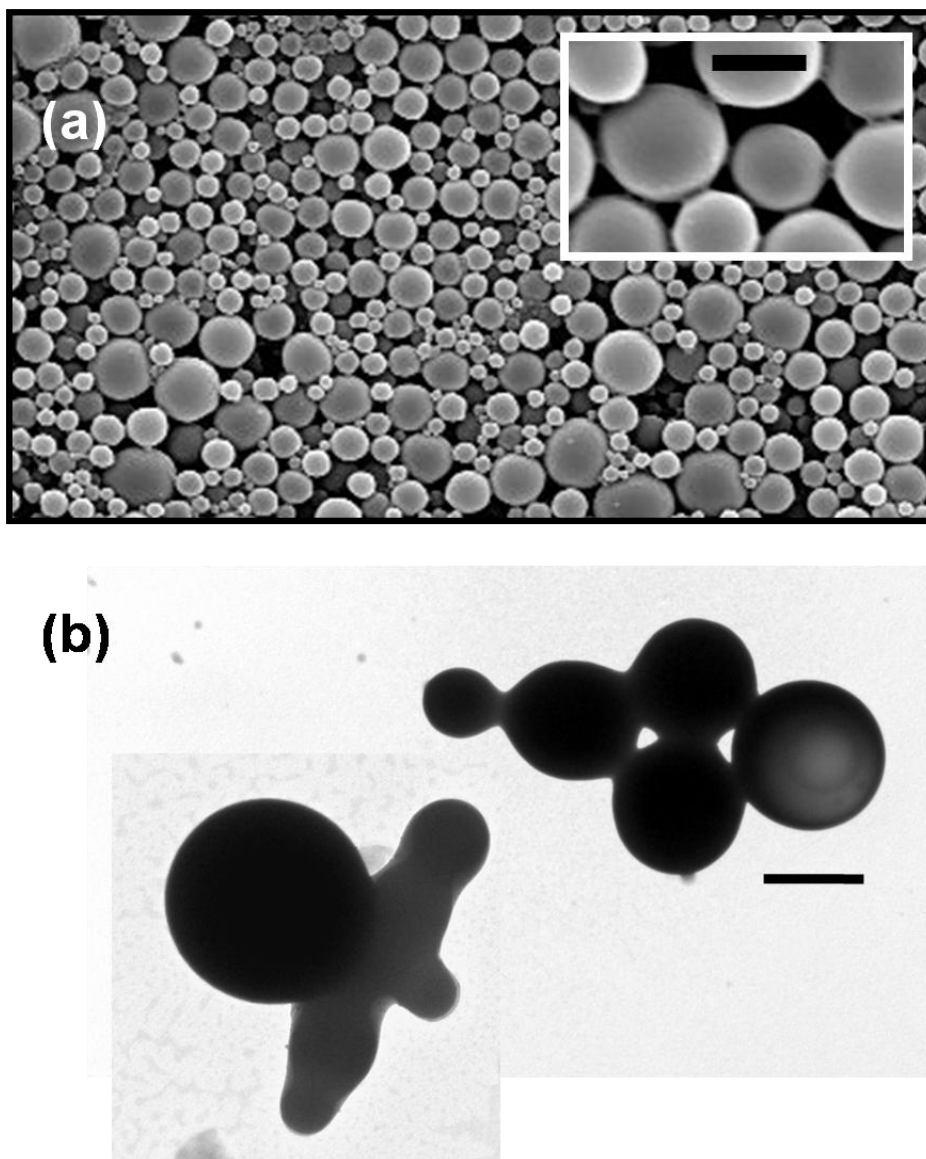
En la síntesis de la poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA), debemos intentar conseguir un tamaño lo más pequeño y homogéneo posible, para así asegurar la mejor biodistribución posible del coloide tras su administración.

Uno de los parámetros más determinantes para alcanzar este es la velocidad de agitación durante la síntesis. En nuestro caso, ensayamos la influencia de las velocidades 8000, 19500 y 26000 rpm sobre la geometría de las partículas. En todos los casos, la morfología de las partículas poliméricas es esférica. El tamaño de partícula y su homogeneidad sí se ven condicionadas seriamente por la velocidad de agitación. En concreto, como muestran la tabla 1, la velocidad que permite obtener un menor tamaño y el mayor grado de homogeneidad posible es 19500 rpm. Es por ello que, la velocidad de agitación utilizada en la síntesis de las partículas de PLGA fue siempre 19500 rpm.

<b>Tipo de Partícula</b>	<b>Velocidad de agitación (rpm)</b>	<b>Tamaño medio (nm)</b>
PLGA	8.000 rpm	800 ± 1000
PLGA	19.500 rpm	600 ± 400
PLGA	26.000 rpm	1200 ± 1240
COMPUESTAS	19.500 rpm	5000 ± 3400

**Tabla 1.** Tamaño medio de partículas de PLGA en función de la velocidad de agitación

Las figuras 11a y 11b recogen un detalle de este tipo de población.



**Figura 11.** Microfotografía electrónica de barrido de alta resolución (FeSEM) de las partículas poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) (a) (figura insertada: detalle de la muestra). Longitud de barra: 500 nm. Microfotografía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de las partículas de poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) (b). Longitud de barra: 500 nm.



Se utilizó la técnica de espectroscopía de correlación de fotones (PCS) [Malvern 4700 analyzer, Malvern Instruments, Inglaterra] para confirmar los resultados obtenidos de tamaño. En esta técnica se investiga la difusión de los materiales en solución o en suspensión lo que permite determinar el coeficiente de difusión, dando información sobre el tamaño de las partículas, la conformación de las cadenas macromoleculares y las interacciones entre los componentes de la solución o suspensión. Es una técnica no invasiva que requiere sólo una pequeña cantidad de muestra (0,1% p/v). La determinación es independiente de factores externos, salvo la viscosidad y la temperatura del medio y, como hace que las orientaciones de las partículas sean aleatorias, minimiza cualquier posible efecto de su forma.

En un experimento PCS la luz dispersada es recogida y analizada en el tiempo. Los materiales dispersores tienen un índice de refracción diferente al del medio que se mantiene estable durante la medida. Estas sustancias pueden ser partículas sólidas p. ej., óxidos de metales, residuos minerales y partículas de látex y partículas suaves p. ej., vesículas y micelas en suspensión, o cadenas macromoleculares p. ej., polímeros sintéticos y biomateriales en solución. Las partículas analizadas mediante la técnica PCS se caracterizan por su movimiento. Este movimiento surge a partir del movimiento térmico aleatorio de las moléculas del medio y está libre de fuerzas externas, como turbulencias o la fuerza gravitacional.

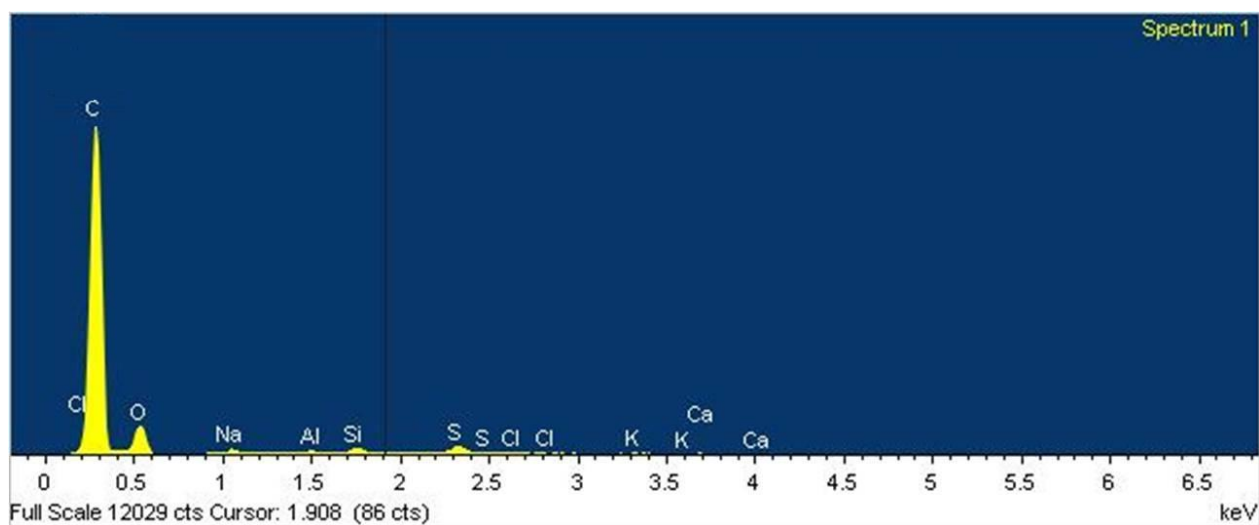
La dispersión de la luz que incide sobre la muestra puede ocurrir a partir de partículas individuales (dispersión simple), o en una solución o suspensión concentrada (dispersión múltiple). Las fluctuaciones en la intensidad de la dispersión de la luz incidente con un determinado ángulo de dispersión son consecuencia de los cambios en el tiempo de la fase y la polarización de la luz dispersada por cada partícula con movimiento browniano. La posición de las partículas en la dispersión determina en todo momento la magnitud de la interferencia constructiva o destructiva de la luz dispersada en un punto fijo en el espacio. Como el coeficiente de difusión de las partículas está

determinado por su tamaño la información sobre este viene dada por la tasa de fluctuación de la luz dispersada. Por norma general, el límite inferior de tamaño está determinado por las fluctuaciones en la dispersión de las partículas detectables en comparación con el ruido experimental. La fluctuación medida de esta dispersión debe ser mayor que el ruido experimental debido a las alteraciones del medio ambiente, las fluctuaciones en la temperatura y el ruido electrónico inherente. En cuanto al límite superior, este se determina principalmente por el límite de sedimentación. Algo muy importante para poder medir tamaños mediante esta técnica es que las partículas deben ser estables en suspensión.

Por último se realizó un microanálisis mediante espectrometría por dispersión de energías de rayos X (SEM – EDXS) en el Dipartimento di Scienza dei Metalli, Electrochimica e Tecniche Chimiche de la Universidad de Bolonia. Este tipo de análisis identifica la distribución cuantitativa y cualitativa de elementos químicos que se encuentran presentes en la muestra, mostrando gráficas e imágenes relacionadas con esa distribución [Poblete y cols., 2001].

Esta técnica está basada en el hecho de que al irradiar una muestra con un haz de electrones, el bombardeo electrónico provoca la expulsión de algunos electrones presentes en el interior de los átomos, creándose en estos vacantes electrónicas que son ocupadas por electrones de otras capas atómicas, produciéndose así un desprendimiento en forma de onda electromagnética, dando una radiación de RX específica y característica para cada elemento. El análisis de este espectro permite identificar los elementos que constituyen el material siendo la sonda EDX un detector de estado sólido que permite la detección de la radiación proveniente de los elementos químicos que forman el material.

En la figura 12 podemos observar el espectro EDX de la poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) donde predominan el C (84%) y el O (15,30%) componentes de este polímero biodegradable, además presenta trazas de algunos contaminantes como Ca. K y Cl en cantidad inferior al 1%.



**Figura 12.** Espectro EDX de la poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA)

### 3.1.2. MAGHEMITA ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )

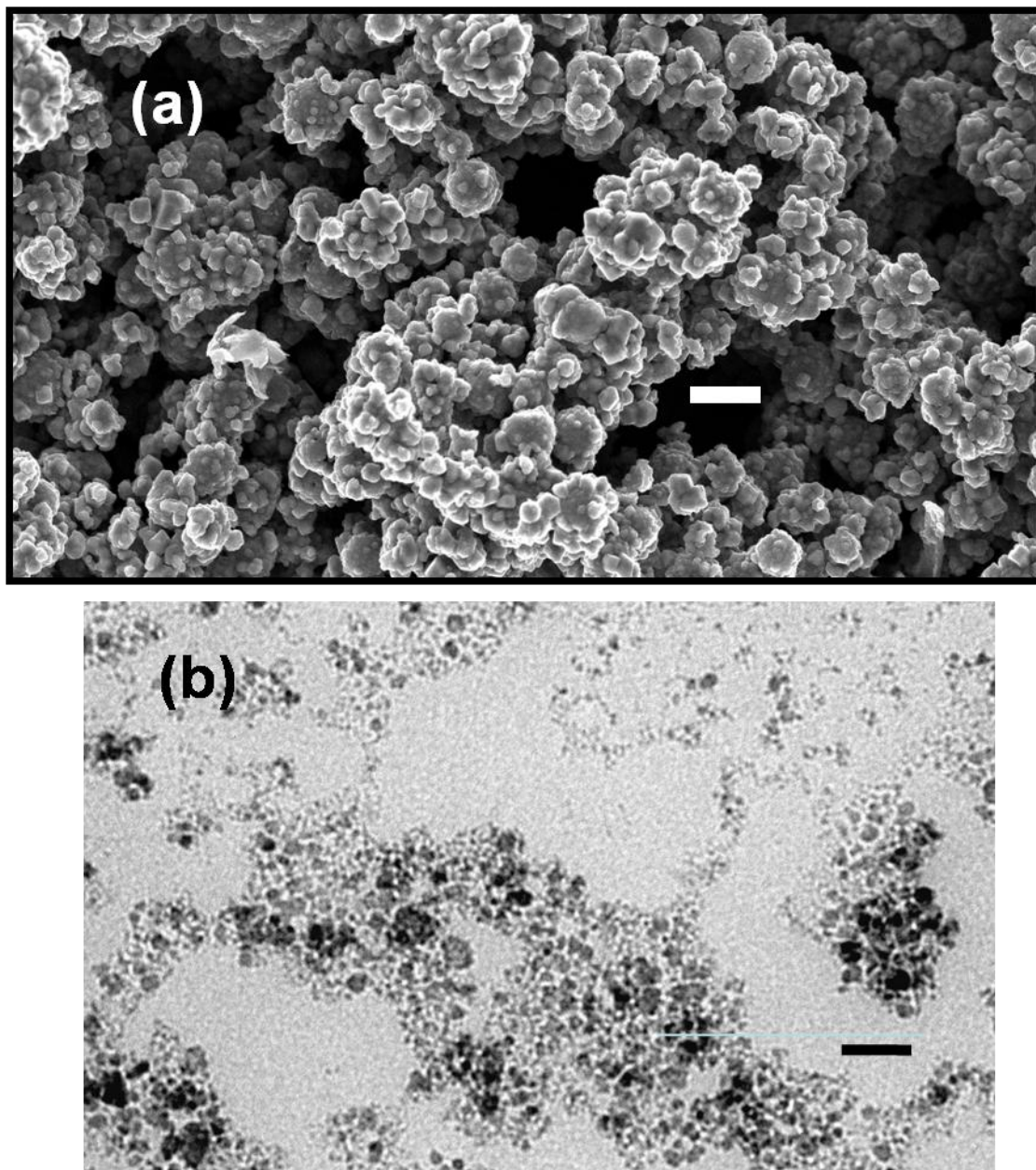
El término maghemita surge por primera vez en 1927 en la mina de la Montaña de Hierro (California), su nombre alude a un compuesto intermedio entre la magnetita y la hematita. En concreto, forma parte de la familia de los óxidos de hierro y posee la misma estructura que la magnetita. En nuestro caso, la metodología de preparación que describiremos en el siguiente apartado permite obtener nanopartículas superparamagnéticas de maghemita, las cuáles se caracterizarán por un gran paramagnetismo que posibilita su utilización en un gran número de aplicaciones biomédicas. En concreto, los núcleos de óxido de hierro superparamagnéticos se clasifican en función de su tamaño en dos grandes grupos [Durán y cols., 2008]:

- a) Óxidos de hierro superparamagnéticos (SPIOs): Tienen un tamaño de partícula de más de 50 nm. *In vivo*, son captados específicamente por el sistema fagocítico mononuclear (SFM). Como agentes de contraste, sus dianas clínicas en resonancia magnética de imagen son los tumores de hígado y las metástasis.
  
- b) Óxidos de hierro superparamagnéticos ultra pequeños (USPIO): Tienen un tamaño de partícula inferior a 50 nm. De forma general, están constituidos por un núcleo de óxido de hierro con un tamaño cristalino inferior a 10 nm. Gracias a su pequeño tamaño y a su carácter hidrófilo, estas partículas evitan una rápida captación por el SFM a nivel de hígado y bazo. Por esta razón, presentan una extensa circulación sistémica, una vez que acceden al plasma, de ahí su enorme potencial como agentes de contraste o como sistemas transportadores de fármacos.

Para la síntesis de las nanopartículas de maghemita nos basamos en el método de síntesis y oxidación de nanopartículas de magnetita [Bee y cols., 1995] basado en la preparación de 40 mL de una solución de tricloruro de hierro ( $\text{FeCl}_3$ ) 1 M y 10 mL de una solución 2 M de cloruro de hierro ( $\text{FeCl}_2$ ) en ácido clorhídrico 2 M. Prepararemos una solución acuosa de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) 0,7 M a la que bajo agitación mecánica (700 rpm) se añaden 4 mL por minuto de la solución de  $\text{FeCl}_3$  y 1 mL de  $\text{FeCl}_2$ , hasta un total de 40 mL y 10 mL, respectivamente.

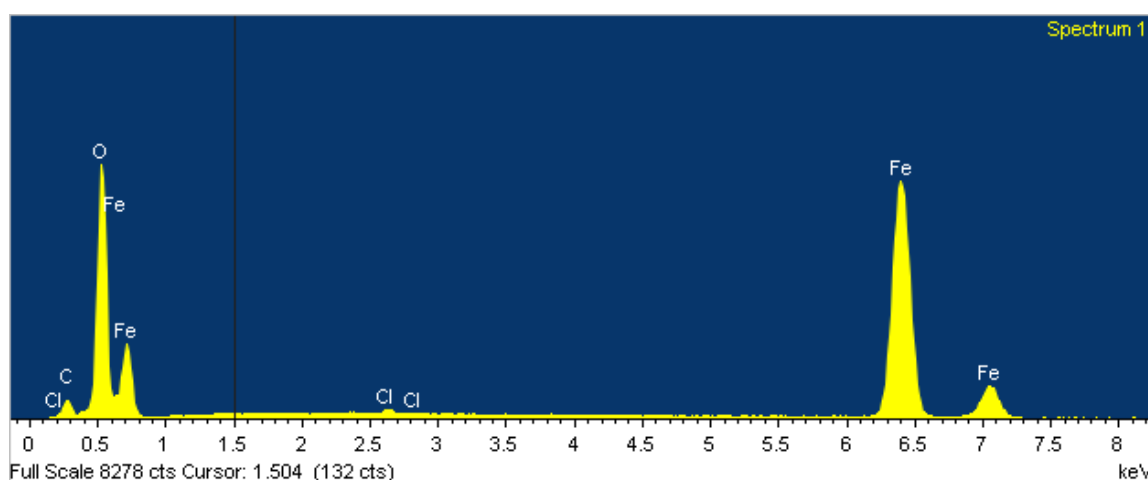
De forma instantánea se produce la precipitación de los núcleos de magnetita, los cuáles son sometidos a un proceso de decantación magnética, eliminando el disolvente. A continuación se añaden 500 mL de una solución de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 2 M, dejando transcurrir 12 horas. Finalmente, la oxidación de los núcleos de magnetita se realiza tras la cuidadosa retirada del  $\text{HClO}_4$ : se añaden 600 mL de nitrato férrico [ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ], redispersando los núcleos de magnetita y se calienta la dispersión a  $90^\circ\text{C}$ . Esta temperatura se mantiene durante 30 minutos para asegurar la completa transformación de la magnetita en maghemita. Por último, los núcleos de maghemita se retiran de la dispersión y se conservan en agua bidestilada, o secos tras un proceso de desecación a  $60^\circ\text{C}$ .

La metodología de síntesis de las nanopartículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) basada en una reacción de oxidación sobre partículas de magnetita ultra pequeñas condujo a la obtención de partículas de morfología cúbica irregular y con un tamaño  $7\pm 2$  nm (figuras 13a y 13b), lo que en principio las convierte en superparamagnéticas.



**Figura 13.** Microfotografía electrónica de barrido de alta resolución (FeSEM) de las partículas maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (a) (figura insertada: detalle de la muestra). Longitud de barra: 1  $\mu\text{m}$ . Microfotografía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de las partículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (b). Longitud de barra: 200 nm.

En la figura 14 podemos observar el espectro EDX de las partículas de maghemita donde predominan el Fe (49,41%) y el O (33,45%) componentes de este óxido, además presenta trazas de algunos contaminantes como C y Cl en cantidad inferior al 1%.



**Figura 14.** Espectro EDX de la maghemita

#### 3.1.3. NANOPARTÍCULAS COMPUESTAS ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA)

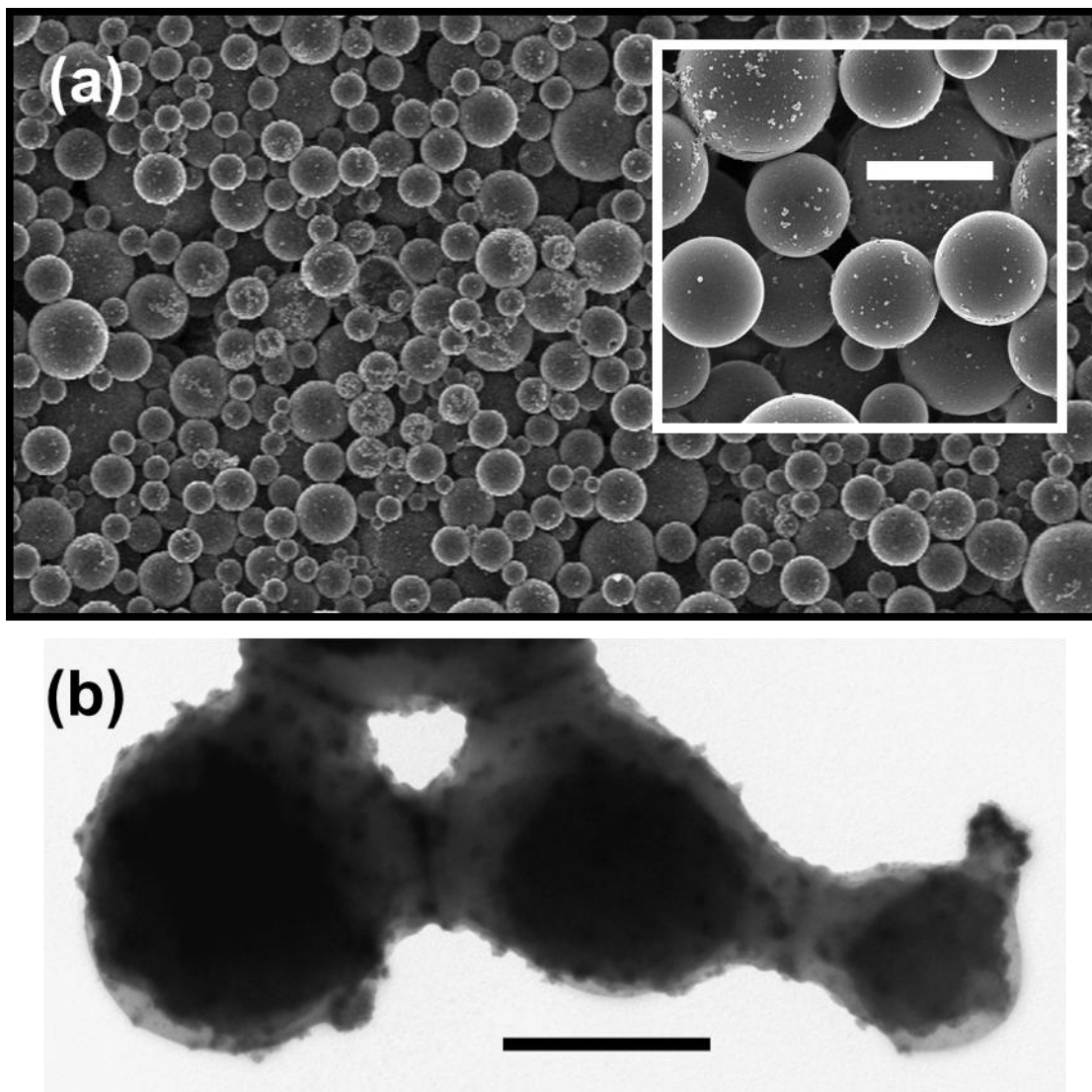
El procedimiento seguido para la síntesis de las partículas compuestas de maghemita y poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA) está basado en el método de emulsión con evaporación de disolvente anteriormente descrito para la síntesis de las nanopartículas poliméricas puras [Holgado y cols., 2008]. De forma resumida, el método consiste en la disolución de 250 mg de PLGA a temperatura ambiente en 10 mL de etilacetato. La solución resultante es añadida tras agitación mecánica (19500 rpm) a una fase acuosa de PVA al 0.3% (p/v) que contiene núcleos de maghemita. Se continúa

la agitación durante 30 minutos y, posteriormente se disminuye esta velocidad a 1500 rpm hasta la completa evaporación del disolvente orgánico.

Finalmente, la suspensión obtenida de nanopartículas magnéticas compuestas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA) es sometida a un procedimiento de limpieza mediante repetidos ciclos de decantación magnética y redispersión en agua ultrapura, hasta lograr un sobrenadante completamente transparente y con una conductividad inferior a 10  $\mu$ S/cm.

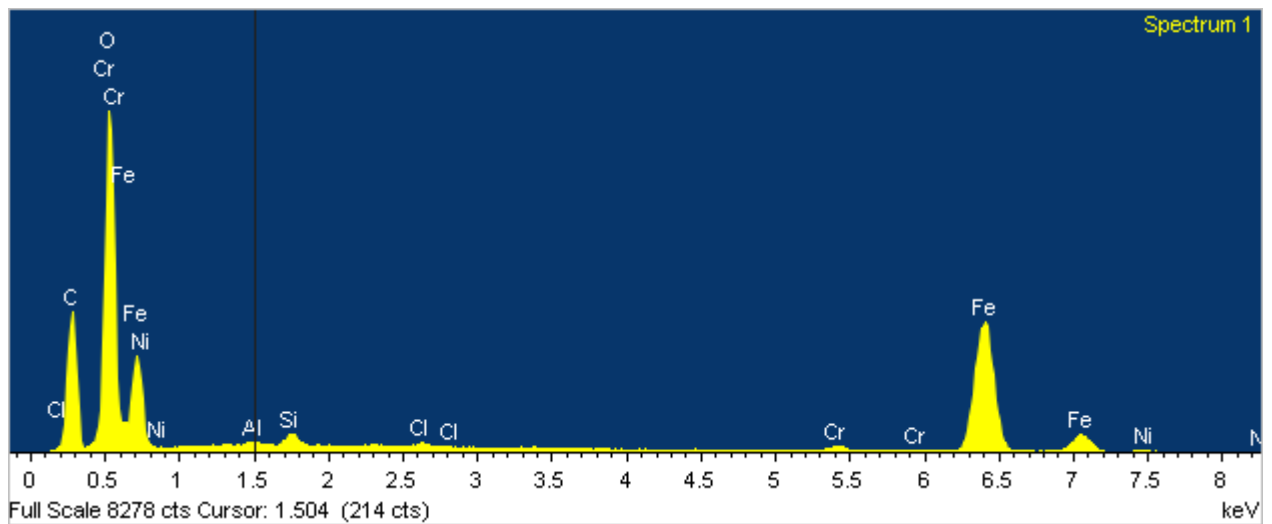
Las partículas magnéticas mixtas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA) obtenidas utilizando las condiciones óptimas de síntesis de PLGA tienen una morfología esférica y un tamaño en torno a  $5.1 \pm 3.4$   $\mu$ m bastante heterogéneo (figuras 15a y 15b). En el detalle de la figura 15a parece apreciarse que la mayoría de los núcleos magnéticos se encuentran embebidos dentro de la matriz del PLGA. Aunque como podemos observar en la figura 15b, parece que algunos de estos también se encuentran en la superficie de la matriz.





**Figura 15.** Microfotografía electrónica de barrido de alta resolución (FeSEM) de las partículas compuestas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  (a) (figura insertada: detalle de la muestra). Longitud de barra: 200 nm. Microfotografía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de las partículas compuestas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  (b). Longitud de barra: 150 nm.

Como podemos observar en el microanálisis por dispersión de rayos X (figura 16) de nuestro sistema transportador compuesto, la composición se ve modificada por la presencia de este que contiene C (40%) y O (49%) por lo que el porcentaje de Fe se ve disminuido (9%), la aparición de los picos característicos de ambos materiales es una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento. Además aparecen trazas de algunos elementos contaminantes como aluminio, cromo o níquel.



**Figura 16.** Espectro EDX de las partículas compuestas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA.

## **3.2 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA**

### **3.2.1. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER**

El objetivo que pretendemos con el análisis de las nanopartículas con el infrarrojos es dotar a nuestro estudio de una nueva prueba de la eficacia de la metodología de síntesis de nanopartículas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA. Las nanopartículas compuestas deben tener un espectro de infrarrojos en el que aparezcan las bandas características de la PLGA, junto con la banda propia de la  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. De esta manera quedará demostrado que las partículas magnéticas compuestas están constituidas por  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y PLGA. Para la preparación de las muestras, tomamos una pequeña cantidad del material (1 mg) y la mezclamos con 100 mg de bromuro potásico pulverizado y seco. Realizamos la mezcla en un mortero de ágata y la prensamos a 15000 kPa para obtener un disco transparente. Como consecuencia de esta manipulación, es de esperar la aparición en el espectro de una banda debida a la humedad ( $\approx 1639 \text{ cm}^{-1}$ ).

Para la obtención del interferograma se utiliza un espectrómetro de infrarrojos con una resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$  (Nicolet 20 SXB, EE.UU). La técnica implica la división de la radiación que contiene todas las longitudes de onda (en nuestro caso:  $2000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ ) en dos rayos. 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. El paso de radiación a través de una muestra expone al compuesto a una banda amplia de energías. La transformación

de Fourier en sucesivos puntos a lo largo de esta variación da lugar a un espectro de infrarrojos completo [Silverstein y Webster, 1998].

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

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

La radiación infrarroja se encuentra localizada en el espectro electromagnético entre la zona del visible y la zona del microondas. Una molécula orgánica absorbe y convierte la radiación infrarroja entre 4000  $\text{cm}^{-1}$  y 400  $\text{cm}^{-1}$  en energía de vibración molecular. Esta absorción es cuantificable y el espectro aparece en forma de bandas porque un cambio simple de energía vibracional es acompañado por diversos cambios de energía rotacional. Las posiciones de las bandas en el espectro de infrarrojos se suelen presentar en función del número de onda ( $\kappa$ ). La intensidad de las bandas pueden expresarse como transmitancia ( $T$ ) o absorbancia ( $A$ ). Hay dos tipos de vibraciones moleculares: la vibración de elongación y la vibración de flexión. En el infrarrojo sólo podemos observar las vibraciones que provoca un cambio rítmico en el momento dipolar de la molécula. En general, los grupos funcionales que tienen un dipolo intenso dan absorciones fuertes en el infrarrojo [Silverstein y Webster, 1998].

La utilización del espectro de infrarrojos (IR) por si solo sirve para confirmar cualitativamente la formación de las nanopartículas compuestas, sin embargo, en combinación con otras técnicas (espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear) permite determinar la estructura molecular de una sustancia. La frecuencia o longitud de onda de absorción depende de las masas relativas de los átomos, las constantes de fuerza de los enlaces, la geometría de los átomos y el entorno. Una molécula simple puede generar un espectro extremadamente complejo, característico de la molécula entera (excepto los enantiómeros). No se puede 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 hay determinados grupos de átomos que dan bandas de igual o similar frecuencia independientemente de la estructura del resto de la molécula. Estas bandas características permiten obtener información estructural mediante simple inspección y referencia a tablas de absorción característica de grupos funcionales. Las conclusiones finales deberán confirmarse mediante el examen de otras zonas del espectro, cuando sea posible. [Silverstein y Webster, 1998].

En la figura 17 se recoge el espectro de de infrarrojos de nuestros tres tipos de materiales ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA). Su análisis constituye una prueba de la eficacia del recubrimiento, dado que permite la identificación de los grupos funcionales del polímero en las partículas compuestas [Pérez-Artacho y cols., 2012]. Además, también se observa la existencia del pico característico de los óxidos de hierro en el espectro de las partículas mixtas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA. En concreto, las bandas observadas son:

**A:** Banda que corresponde a la vibración de alargamiento del enlace C=O de un éster alifático saturado, aparece a 1748 cm<sup>-1</sup>.

**B:** Grupo de tres bandas entre 1450 y 1375  $\text{cm}^{-1}$ . Aparece una banda a 1451  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración molecular de flexión asimétrica del enlace C-H del  $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{AS}} \text{CH}_3$ ), a 1384  $\text{cm}^{-1}$  la banda de la vibración molecular de flexión asimétrica del enlace C-H del  $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$ ) y, por último, una banda de vibración de alargamiento del O-H del grupo carboxilo a 1423  $\text{cm}^{-1}$ .

**C:** Banda perteneciente a la vibración de alargamiento del enlace C-O del grupo carboxilo (1269  $\text{cm}^{-1}$ ).

**D:** Banda correspondiente a la vibración de alargamiento del C-O del grupo alcohol (1165  $\text{cm}^{-1}$ ).

**E:** Dos bandas asimétricas acopladas (1130 y 1084  $\text{cm}^{-1}$ ) correspondientes a la vibración de alargamiento del C-O del grupo éster y a un éster de alcohol primario, respectivamente.

**F:** A 855  $\text{cm}^{-1}$  aparece una banda media característica de un alcano.

**G:** Banda perteneciente a la vibración de oscilación del  $\text{CH}_2$  ( $\rho\text{CH}_2$ ), se observa a 730  $\text{cm}^{-1}$  y es propia de una cadena larga de  $\text{CH}_2$ .

**H:** Única banda ausente en el espectro de las partículas poliméricas. Aparece a 592  $\text{cm}^{-1}$  y es una banda ancha y débil característica de los óxidos de hierro [Lyon, 1967].

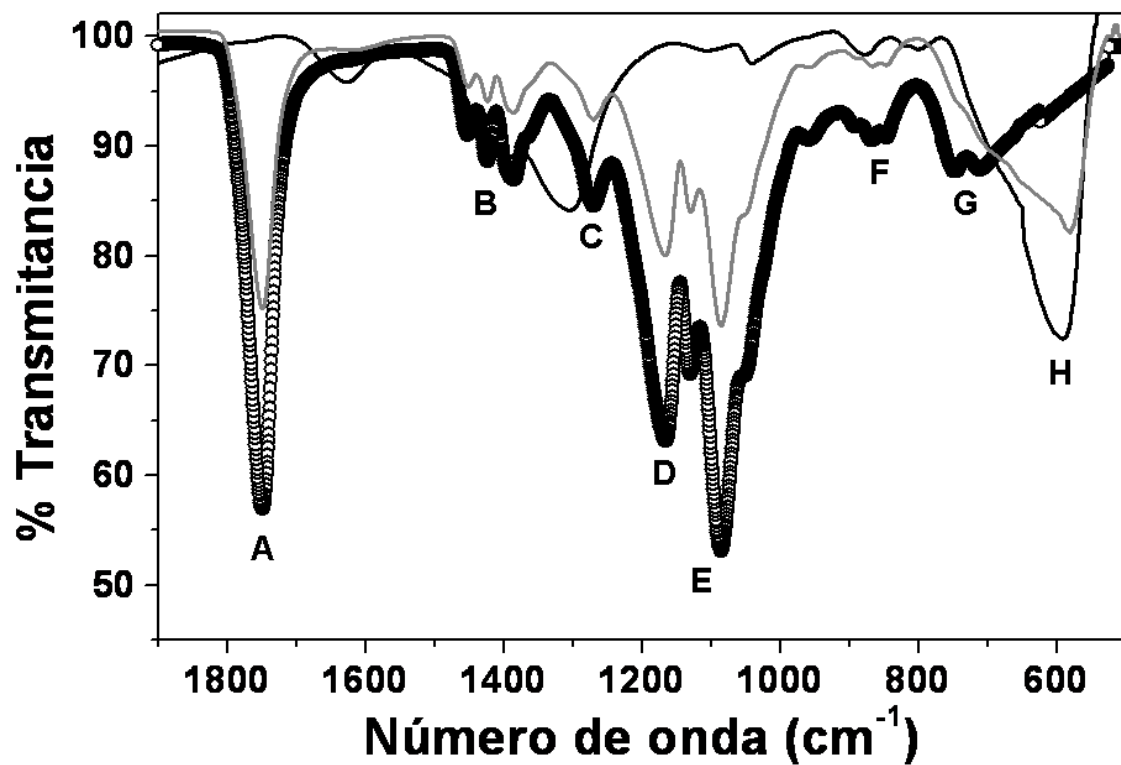


Figura 17. Espectro de infrarrojos de las partículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (línea negra), poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA) (—○—), y compuestas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA (línea gris).

### 3.2.2. DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X

En nuestro trabajo, usamos la difracción de rayos X para comparar cualitativamente los tres tipos de coloides sintetizados [Billmeyer, 1975; Suryanarayanan, 1995]. Nuestro objetivo es confirmar que el difractograma de rayos X de las partículas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA recoge las peculiaridades de los dos tipos de materiales que las componen, lo que sería una prueba evidente de la eficacia del método de formulación desarrollado. Por otro lado, pretendemos comprobar que la estructura cristalina de los núcleos de maghemita no sufre alteración alguna al ser englobada en la matriz de poli(D,L-lactida-co-glicolida). Esto es muy importante ya que una alteración de este tipo podría llegar a condicionar las propiedades magnéticas del coloide compuesto.

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas con energía fotónica entre 100 eV y 100 keV. Si bien, en difracción de rayos X se usan sólo radiaciones de onda (hasta 0.1 Å). Ya que su longitud de onda ( $\lambda$ ) es similar al tamaño de los átomos, estas radiaciones son ideales para ver la disposición de los átomos y moléculas en muchos materiales. Los rayos X penetran profundamente en la materia, dándonos por tanto importante información sobre su estructura. Los rayos X se generan cuando un haz de electrones acelerados bombardea un campo de alta tensión fijo o estacionario. El haz de electrones choca contra los átomos del material emitiendo un espectro continuo de rayos X. Los átomos altamente energéticos por ionización expulsan electrones a la capa inferior y cuando ésta se llena emite un fotón que informa de las características del material objeto de estudio. Puede decirse, por lo tanto, que la difracción es el fenómeno de dispersión de rayos X en el que participan todos los átomos del material irradiado.

Si bien se utilizan tubos de rayos X en su producción, actualmente la fuente preferida es la radiación sincrotrón emitida por electrones o positrones que viajan a la velocidad de la luz.



Como hemos comentado, los rayos X interactúan con los electrones de los átomos del material. Cuando el fotón generado choca con los rayos X, algunos se desvían generando una [Als-Nielsen y Mcmorrow, 2001; Bowen y Tanner, 1998; Drenth, 1994]:

- Dispersión elástica: donde la longitud de onda de los rayos X dispersados no cambia, por lo que no pierden energía. Estos son los que se miden en difracción ya que dan información sobre la distribución de los electrones en los materiales.
- Dispersión inelástica: los rayos X transfieren parte de la energía a los electrones, por lo que la longitud de onda cambia.

En una muestra cristalina la difracción produce un campo de rayos difractados compuesto por interferencias que existen en la muestra y caracterizado por la distribución de la interferencia frente al haz de electrones y por la intensidad de las interferencias, que a su vez depende del instrumento de medición, de la estructura del material difractante, de la absorción frente al haz de electrones y del grado de perfección de la red cristalina.

La difracción de rayos X de muestras de polvo es el método más usado para la caracterización de materiales. En este caso, la muestra generalmente es un polvo formado por finos granos de material cristalino, sólidos policristalinos o partículas en suspensión en líquidos. En un polvo los dominios cristalinos están orientados al azar, por lo que el patrón bidimensional da una serie de anillos concéntricos de dispersión de los picos correspondientes a las diferencias de espaciamiento de la red cristalina. La posición, intensidad, ancho y forma de los picos se usa para determinar la estructura. Esta fase de identificación es la más importante ya que las propiedades del material dependen de la estructura.

Los difractogramas de rayos X de los tres tipos de materiales ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA) se realizaron mediante el método de Debye-Scherrer, gracias a la colaboración del profesor Dr. José Daniel Martín Ramos del Departamento de Mineralogía y Petrología de la Universidad de Granada. El dispositivo empleado fue un difractómetro Philips PW1710 (Holanda), utilizando una longitud de onda de 1.5405 Å (Cu-K<sub>α</sub>). La masa utilizada en el análisis fue la misma para todos los materiales ( $\approx$  0.5 g). Como podemos observar en la figura 18 todos los picos característicos de los dos materiales que componen las partículas mixtas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y PLGA) aparecen en el difractograma de estas. Incluso, puede decirse que la estructura cristalina de los núcleos de óxido de hierro permanece inalterada tras inclusión en el interior de la matriz polimérica. Además, los difractogramas del PLGA y la  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> coinciden con los existentes en la bibliografía, lo que permite identificar estas muestras como tales materiales [Depeyrot y cols., 2002; Geng y cols., 2008]. La mayor intensidad de los picos correspondientes a la  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en la muestra de partículas mixtas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA puede deberse a la contribución del PLGA a este difractograma. La existencia de picos característicos de la maghemita nos indica que las partículas coloidales compuestas aún conservan la estructura cristalina del núcleo magnético.

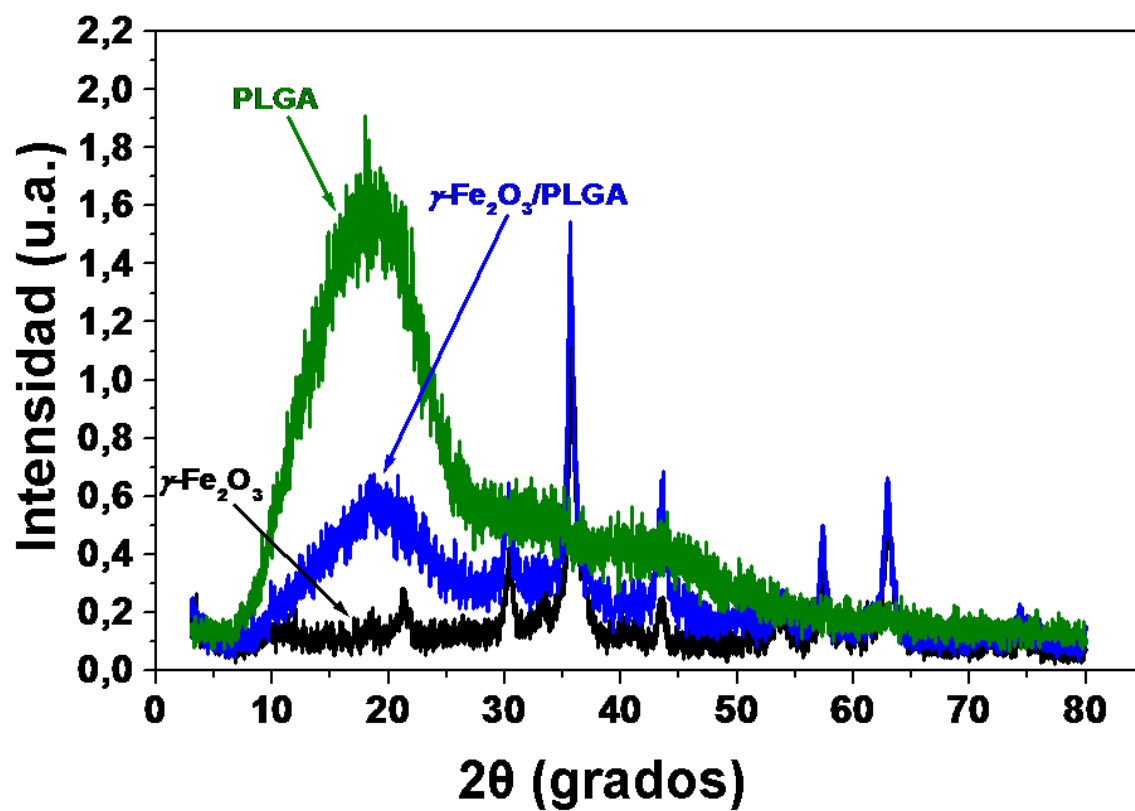


Figura 18. Difractograma de rayos X de las partículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA), y compuestas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA.

### 3.3 ANÁLISIS TÉRMICO

El análisis térmico consiste en el registro de todas las variaciones que se dan en una muestra sólida a variaciones controladas de temperatura. Estas medidas pueden dar información sobre el punto de fusión, capacidad térmica, calor de reacción o calor de fusión y otras transiciones de fase, variaciones reológicas o por último, podemos registrar pérdidas de peso por deshidratación o desolvatación.

En química el estudio del estado sólido de los fármacos comprende: *i*) determinación de las propiedades físicas de polimorfos y solvatos, *ii*) transformaciones físicas entre polimorfos y solvatos, *iii*) reacciones químicas en estado sólido y *iv*) reacciones sólido-sólido que se dan en las preparaciones farmacéuticas [Byrn y cols., 1999, 1994]. Todo esto demuestra que la comprensión de la estructura molecular del estado sólido puede llevarnos a un mejor diseño y control de las preparaciones farmacéuticas, es por esto que la caracterización del estado sólido junto con el estudio de las propiedades fisicoquímicas es imprescindible en la industria farmacéutica [Huang y Tong, 2004; Vippagunta y cols., 2001]. El conocimiento del estado sólido es la primera prioridad ante el diseño de una forma de dosificación ya que estas características influyen en su seguridad y eficacia [Allen, 2008; Aulton, 2002; DiFeo, 2003; Zhou y cols, 2009]. El análisis térmico es complementario a otras técnicas analíticas como la espectroscopía o cromatografía.

Dentro de las técnicas de análisis térmico podemos encontrar [Budrugaec y Miu, 2011]:

- **DSC:** Calorimetría de barrido diferencial
- **TGA:** Análisis termogravimétrico
- **TMA:** Análisis termomecánico
- **HSM:** Termomicroscopía
- **DTA:** Análisis térmico diferencial

### 3.3.1 CALORÍMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL (DSC)

El principio de la DSC convencional es simple: un material se calienta, enfría o sufre transiciones isotérmicas que se analizan en función del tiempo y la temperatura comparándolos con un estándar de referencia [Ford y Timmins, 1989]. A consecuencia del calentamiento pueden darse dos situaciones:

- No se produce ningún tipo de cambios, lo que implica que la muestra y el patrón están a la misma temperatura.
- Se producen cambios, esto indica que la muestra usa la energía aportada y la temperatura permanece constante en el recipiente. Observamos entonces una diferencia de temperatura entre la muestra y el patrón.

La calorimetría de barrido diferencial o DSC se usa para medir el flujo de calor en el interior y exterior de la muestra para determinar la temperatura del fenómeno térmico durante una variación controlada de la temperatura.

La variación de temperatura puede medirse por dos técnicas:

- DSC por flujo de calor: el aparato (DTA) mide la diferencia de temperatura y mediante calibración, esta temperatura es convertida en un flujo de calor ( $dq/dt$ ). En cada caso si la calibración es constante, el área del pico es convertida en energía (Julios) variando el factor térmico con la temperatura.
- DSC por capacidad de compensación: el aparato (DSC) monitoriza la velocidad de calentamiento de 2 fuentes de calor separadas e individualizadas. Un sistema controla la diferencia de temperatura entre la muestra y el patrón. Si se detecta cualquier diferencia, la velocidad de calentamiento individual se corrige de forma que la temperatura se mantenga igual en ambos recipientes. Es decir, cuando se produce un proceso endotérmico o exotérmico el instrumento libera energía de compensación para mantener la misma temperatura en ambos casos.

Concretando, en la medida por flujo de calor es esencial la medida de la temperatura mientras que en la medida por capacidad de compensación es esencial la medida de la energía.

Podemos distinguir entre:

- Transiciones de primer orden: fusión, cristalización, sublimación, evaporación. Para estas la integración de la curva da información de la energía implicada en el cambio de fase.
- Transiciones de segundo orden: para las que la señal da información sobre el cambio de calor específico. Por ejemplo, cambios de forma de cristales poliméricos (polimerización).

En función de la capacidad de perder o emitir energía en forma de calor diferenciamos entre procesos: *i*) endotérmicos: fusión, evaporación, sublimación o desolvatación necesitan energía para mantener el equilibrio en el horno; *ii*) procesos exotérmicos: cristalización o degradación que consumen energía para mantener el equilibrio, es decir, liberan energía. Otros procesos como los cambios de fase o la descomposición pueden ser tanto endotérmicos como exotérmicos.

Este tipo de técnicas puede usarse para estudiar procesos de calentamiento, enfriamiento e isotérmicos. Actualmente disponemos de aparatos con hornos de pequeño diámetro (<1 cm de diámetro) que llegan a alcanzar hasta 2000°C utilizando lámparas de infrarrojo para calentar el material [Buanz y cols., 2011].

La DSC es una técnica analítica útil en el control de la pureza de los productos de cristalización, para los análisis farmacéuticos y en el control de calidad de productos farmacéuticos (pureza, solvatos e hidratos, contenido en humedad, estabilidad y compatibilidad con excipientes).

#### ❖ Termogramas DSC

Nos dan información sobre el comportamiento de un compuesto en particular cuando es sometido a una variación térmica.

En un termograma los eventos térmicos quedan registrados como picos endotérmicos y exotérmicos, de los cuales podemos obtener información cualitativa y cuantitativa. Podemos registrar fenómenos como: punto de fusión, punto de ebullición, presencia de solvatos, formación de cristales líquidos, transiciones vítreas, transiciones polimórficas. Además podemos determinar variaciones de entalpía ( $\Delta H$ ) asociadas a una transición y que son función del área del pico y del peso de la muestra analizada.

Los picos obtenidos con esta técnica tienen una forma general: el ordenador acoplado al aparato de la DSC nos da el flujo de calor ( $dH/dt$ ) en la ordenada y en función del instrumento los picos de la misma naturaleza serán representados todos en la misma dirección (hacia arriba o hacia abajo).

#### 3.3.2 TERMOGRAVIMETRÍA (TGA)

El análisis termogravimétrico asociado al DSC sirve para diferenciar una transición de una degradación o desolvatación. La asociación de estas dos técnicas permite individuar los eventos térmicos asociados a una variación de peso a consecuencia de una deshidratación o a la liberación de productos gaseosos consecuencia de una descomposición, de esta forma podemos asociar los picos presentes en el termograma de la DSC a un evento concreto.

En termogravimetría el cambio en la masa de la muestra puede determinarse en función de la temperatura o el tiempo. El instrumento utilizado es básicamente una termobalanza que pesa la muestra constantemente durante el análisis, tanto el patrón como la muestra están conectados con una microbalanza que se mantiene a temperatura constante. El instrumento es capaz de registrar la pérdida o ganancia de masa en función de la temperatura y el peso que registra la balanza.

En muchos instrumentos podemos obtener también la curva de DTG que es la velocidad a la que se observa el cambio en la masa. Esta curva corresponde con un punto de inflexión de la curva de la TGA en la cual la masa se pierde o se gana de forma muy rápida. El área bajo la curva de esta es proporcional al cambio de masa, mientras la altura del pico nos proporciona la velocidad de cambio de masa. La ventaja de esta DTG es que permite la localización exacta del final de un proceso de desolvatación si la descomposición sigue a la desolvatación gracias al punto mínimo de la curva.



Con el fin de controlar la estabilidad del sistema, se debe establecer una línea de base en el punto de sensibilidad mayor para todas las velocidades de calentamiento en el intervalo de la temperatura de análisis. La temperatura en los distintos puntos depende de la velocidad de calentamiento, la cantidad de material, el tipo de recipiente y el flujo de gas.

Esta técnica tiene un gran número de aplicaciones farmacéuticas, es útil para determinar las pérdidas en materiales húmedos y formas de dosificación por desecación, para determinar el solvente y los solvatos atrapados en un compuesto sólido.

#### ❖ Termogramas TGA

Las curvas analíticas obtenidas por en esta técnica también son llamadas termogramas, son isotermas de absorción o liberación de agua en condiciones de humedad relativa controlada construidas gravimétricamente o volumétricamente.

Los métodos gravimétricos requieren: *i*) una muestra seca, *ii*) una muestra a temperatura constante, *iii*) humedad relativa constante y *iv*) alcanzar y medir la medida del equilibrio del peso del vapor acuoso absorbido.

La medida gravimétrica de la humedad absorbida puede calcularse de forma continua o discontinua, en la medida continua la muestra está en condiciones de temperatura y humedad relativa controladas.

Por el contrario, los métodos volumétricos requieren: *i*) una muestra seca, *ii*) una muestra a temperatura constante y *iii*) la medida de la presión de vapor.

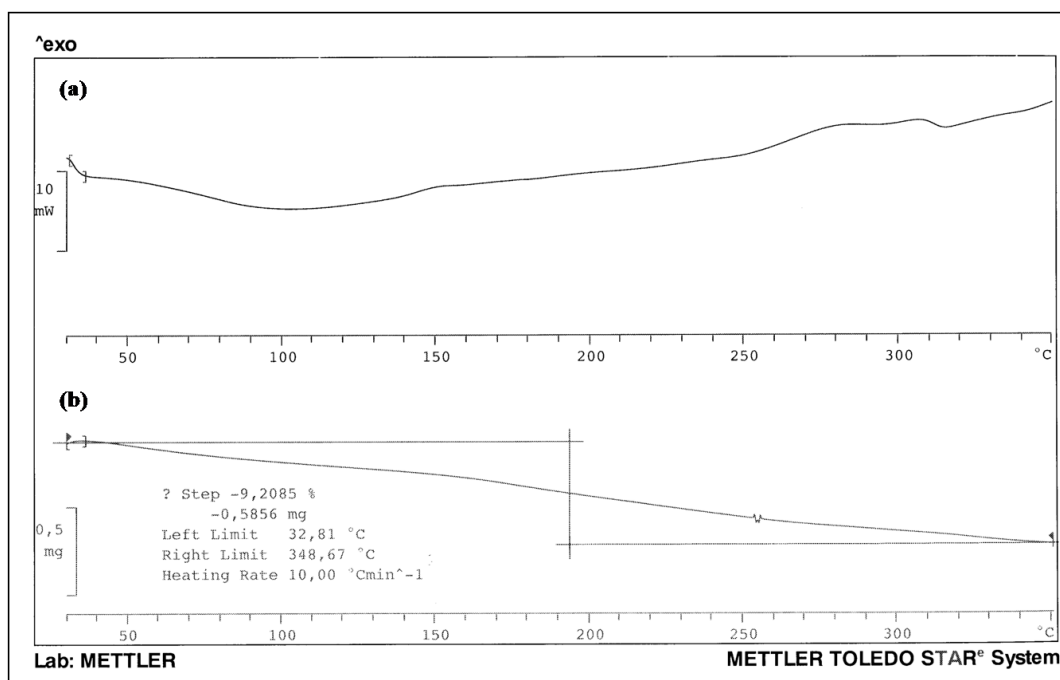
Se asume que las pérdidas de peso atribuidas al agua pueden distinguirse de las debidas a otras causas mostradas por la curva DSC. La curva de la TGA suele expresar la pérdida de la masa inicial en porcentaje, por lo que para determinar la cantidad de agua en la sustancia, hay que calcular la masa de cada componente y evaluar el número de moles de agua en la sustancia, tal y como se observa en la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{moles H}_2\text{O}}{\text{moles sustancia}} = \frac{(\text{g H}_2\text{O perdida}) / (18\text{g/mol})}{(\text{g muestra} - \text{g H}_2\text{O perdida}) / \text{PM sustancia}} \quad (2)$$

La estequiometría determinada por la TGA puede usarse junto a la entalpía de deshidratación establecida con la DSC para definir el grado de interacción agua-sustancia.

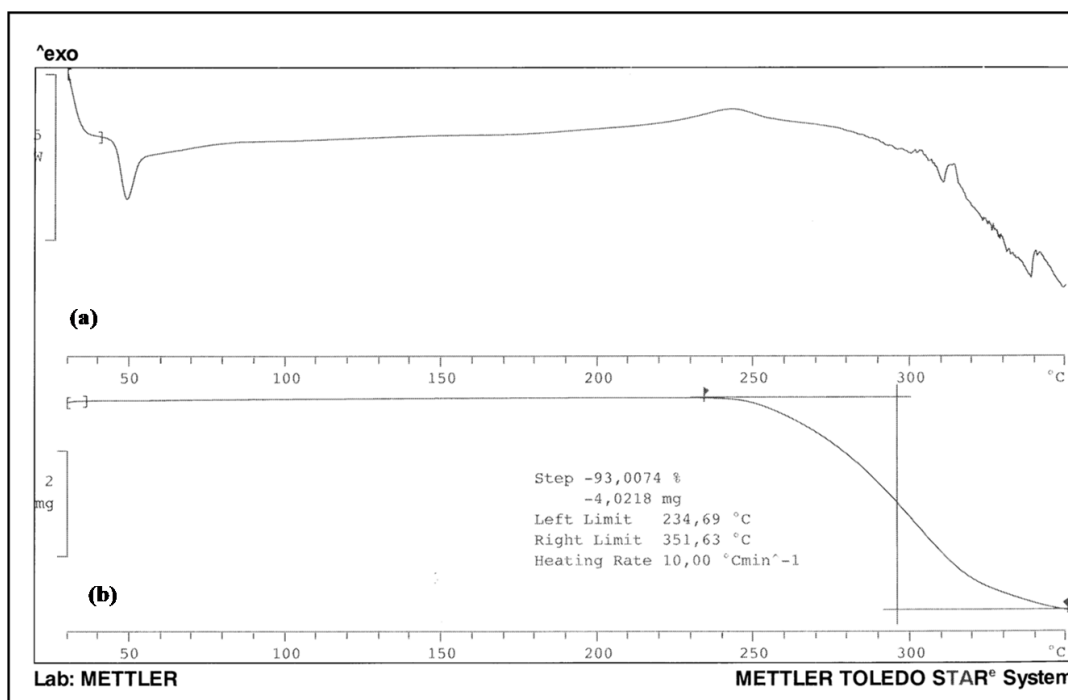
#### 3.3.3 TERMOGRAMAS DSC Y TGA DE NUESTROS PRODUCTOS:

El termograma de la maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (figura 19) presenta una línea de base muy irregular con un perfil termogravimétrico que indica una pérdida de peso que comienza a los 40°C y que alcanzados los 350°C en nuestro análisis no ha finalizado aún. Esta pérdida de peso es de aproximadamente un 9% probablemente por la transformación de la maghemita en un óxido inferior.



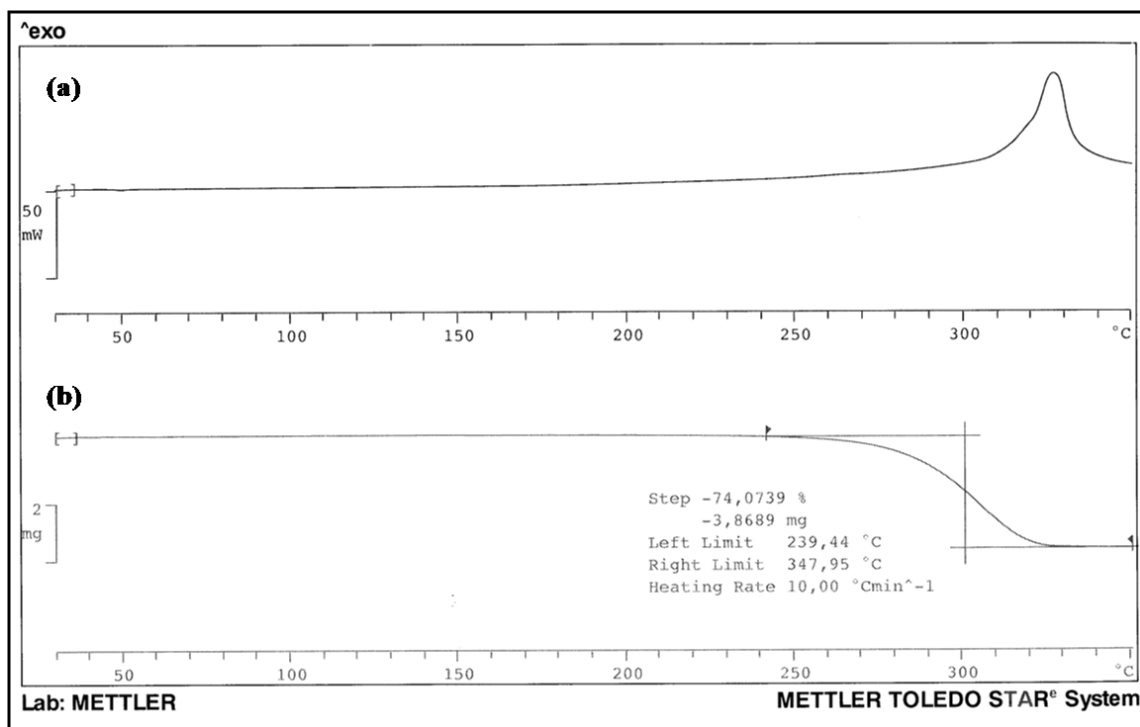
**Figura 19.** Termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (a).  
Termograma obtenido por termogravimetría (TGA) de la  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (b).

Como podemos observar (figura 20), el polímero no presenta particularidades importantes en su termograma. Aparece una endoterma, creemos que de fusión, a los 50°C tras la que presenta un perfil bastante estable al calentamiento hasta los 200°C. Alcanzada esta temperatura el perfil tiende a modificarse indicándonos la descomposición del polímero. Esto queda confirmado por el perfil termogravimétrico que señala una pérdida de peso de casi el 100% entre 250 y 350 °C debida a su combustión.



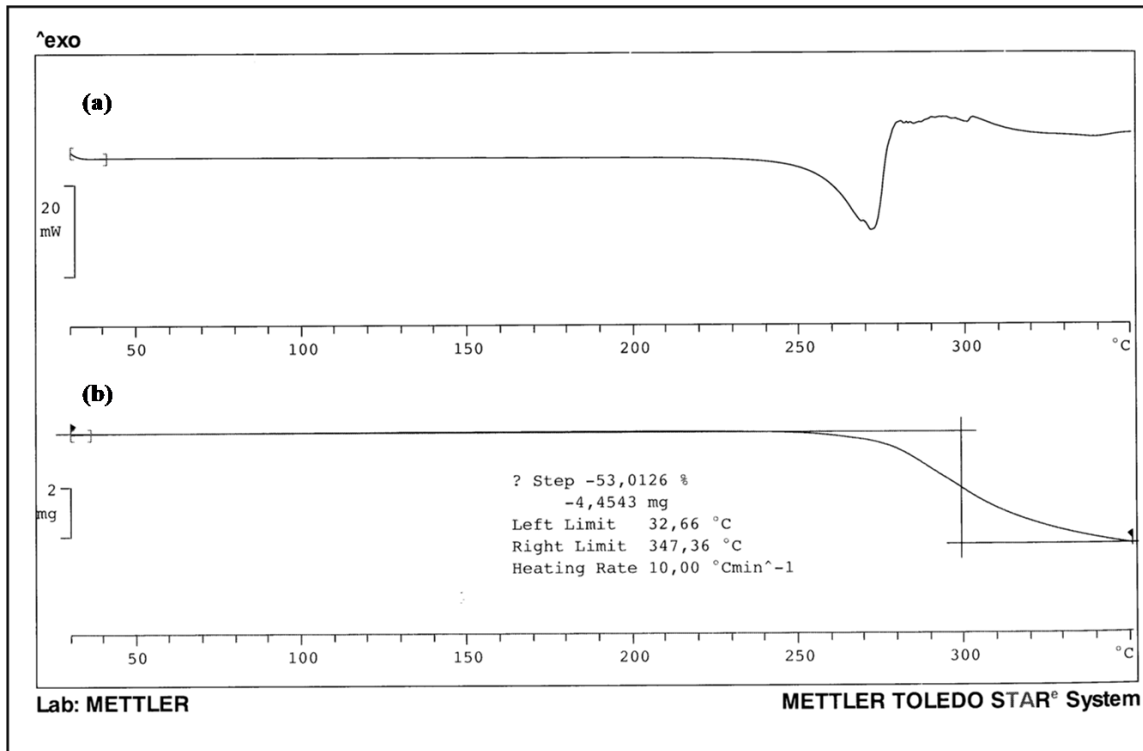
**Figura 20.** Termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) del PLGA (a).  
Termograma obtenido por termogravimetría (TGA) del PLGA (b).

Como podemos observar en el termograma de nuestras partículas compuestas (figura 21) aparece una exoterma alrededor de los 330°C, mientras que la línea base del termograma es bastante regular, esto pone de manifiesto como la asociación del polímero con el óxido produce una estabilización del sistema. La exoterma presenta un perfil muy redondeado, donde confluyen el calor de descomposición del polímero y del núcleo magnético, podemos plantear la hipótesis de que la maghemita actúa como oxidante cuando está unida al polímero, generando una exoterma que no está presente en el termograma de los compuestos puros, pero además actúa como estabilizante ya que la pérdida de peso por calentamiento es menor ( $\approx 74\%$ )



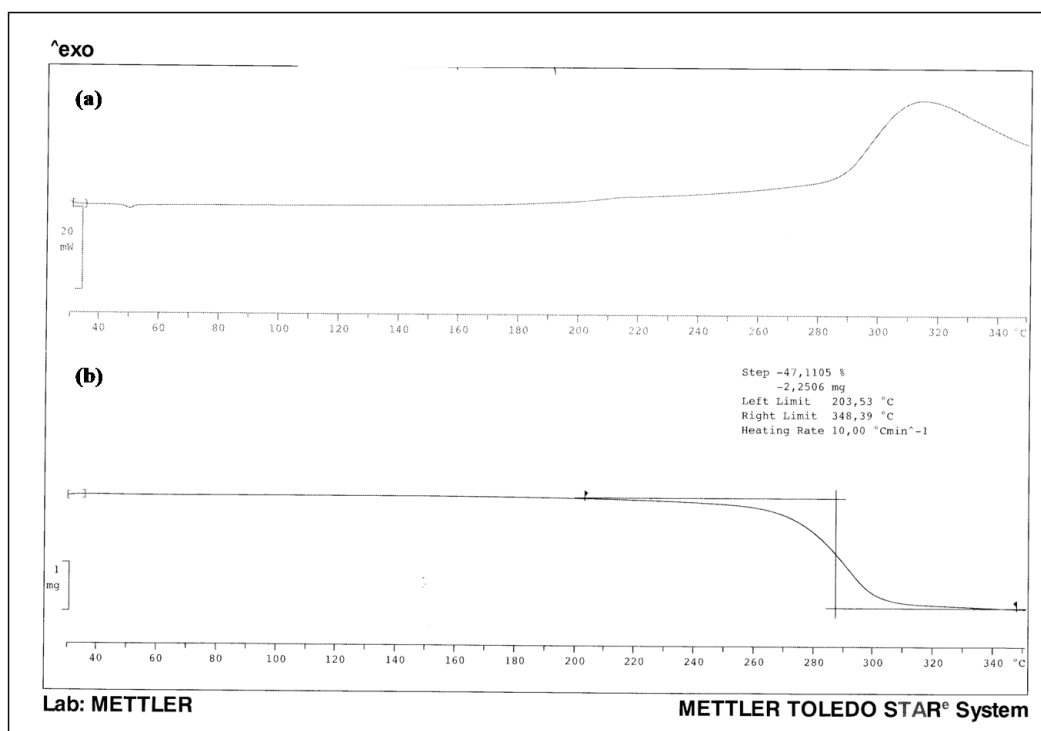
**Figura 21.** Termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de las partículas compuestas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA (a). Termograma obtenido por termogravimetría (TGA) de las partículas compuestas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA (b).

En el termograma del fármaco objeto de nuestra investigación (figura 22) podemos observar que este presenta una buena estabilidad térmica con un punto de fusión cercano a 225°C. Sin embargo presenta una endoterma irregular de fusión muy amplia (de unos 40°C) y asimétrica que señala una descomposición confirmada posteriormente por el perfil termogravimétrico que indica una pérdida de peso entre los 250 y 350 °C del 50%.



**Figura 22.** Termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) del antitumoral gemcitabina clorhidrato (a). Termograma obtenido por termogravimetría (TGA) del antitumoral gemcitabina clorhidrato (b).

Por último, realizamos el análisis DSC y TGA a nuestro sistema transportador conteniendo el antitumoral gemcitabina clorhidrato (figura 23). El termograma se asemeja bastante al del sistema transportador sin el fármaco, aunque en este caso la exoterma es más amplia y redondeada indicándonos que a los calores de descomposición del polímero y el núcleo magnético se suma el del fármaco. Sin embargo como podemos observar la pérdida de peso en este caso es algo menor ( $\approx 47\%$ )



**Figura 23.** Termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) del sistema transportador constituido por  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA y el antitumoral gemcitabina clorhidrato (a). Termograma obtenido por termogravimetría (TGA) del sistema transportador constituido por  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA y el antitumoral gemcitabina clorhidrato (b).

Dado que nuestro sistema no alcanzará temperaturas tan altas durante los procesos tecnológicos a los que será sometido normalmente, podemos afirmar su notable estabilidad térmica, destacando además, que podrá ser esterilizado con calor sin sufrir descomposición.

# **Capítulo 4:**

## **Propiedades eléctricas superficiales**





## **4.1 PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES**

Consideremos una partícula sólida esférica de 1 cm de diámetro. Su superficie  $S$  y su volumen  $V$  son  $3.14 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$  y  $5.24 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3$ , respectivamente, y la relación superficie/volumen es  $S/V \approx 600 \text{ m}^{-1}$ . Sin embargo, la división de la partícula en  $N$  partículas esféricas de radio 100 nm tal que su volumen total sea igual al de la esfera original provocará que la superficie sea de  $15.7 \text{ m}^2$  y la relación  $S/V \approx 3 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$ . Este sencillo ejemplo explica que la principal contribución a las propiedades de un sistema, formado mediante la dispersión de esas  $N$  partículas en 1 L de agua, vendrá dada por las superficies e interfases de las partículas. En particular, el estado eléctrico de la superficie de las partículas puede ser determinante si cada una de ellas tiene un potencial superficial de 100 mV (en torno al orden de magnitud típico de las partículas coloidales en medio acuoso), la fuerza electrostática repulsiva entre dos de estas partículas dispersas en agua y localizadas a una distancia entre superficies de 10 nm es  $F^{EL} \approx 2.12 \cdot 10^{-12} \text{ N}$ . Esta fuerza tiene que compararse con la fuerza de otras interacciones que deben o pueden existir entre ellas. Así, su atracción gravitatoria a la misma distancia será  $F^G \approx 6.3 \cdot 10^{-15} \text{ N}$ , si su densidad es  $10^3 \text{ kg/m}^3$ ; y la atracción de van der Waals  $F^{LW} \approx 8 \cdot 10^{-13} \text{ N}$ , utilizando los valores típicos de la constante de Hamaker [Hunter, 1993]. 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, a veces única, de estas propiedades eléctricas, ya que pueden

determinarse experimentalmente. Como describiremos, la electroforesis (como los demás fenómenos electrocinéticos) constituye una poderosa técnica para obtener información directa sobre el estado eléctrico de la interfase [Delgado, 2002]. Es nuestro objetivo en este trabajo de investigación realizar una extensa caracterización electrocinética de los tres tipos de nanopartículas formuladas: maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) y compuestas magnéticas ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA). Dada la sensibilidad de la electroforesis a las características de la interfase, esta técnica puede ser muy útil como método de evaluación de la calidad y eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos. Esto es posible dado que el comportamiento eléctrico superficial de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y del PLGA son claramente diferentes, como veremos.

### 4.1.1 DESCRIPCIÓN DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA

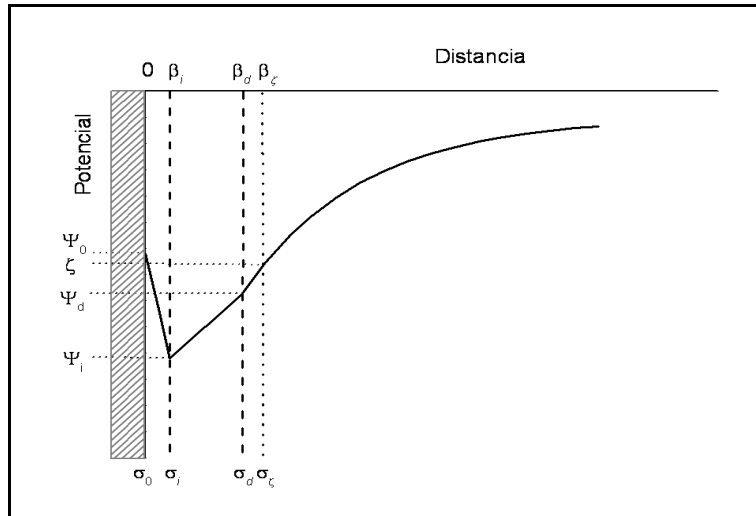
Admitiremos como un hecho experimental que la mayoría de los sólidos adquieren una carga eléctrica superficial cuando se dispersan en un disolvente polar, en particular, en una disolución de electrolito. Los orígenes de esta carga son diversos y, generalmente, comprenden algunos de los siguientes procesos [Hunter, 1981, 1987; Lyklema, 1987, 1995; van Olphen, 1977]: adsorción/desorción de iones de la red, disociación o ionización de grupos superficiales o sustitución isomórfica.

Cualquiera que sea el mecanismo, 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  $\sigma_0$ . En su proximidad inmediata,

podrían localizarse los iones capaces de sufrir adsorción específica: la distancia al sólido será del orden de un radio iónico, dado que se puede suponer que han perdido su capa de hidratación, al menos en la dirección de la superficie del sólido. Llamemos  $\sigma_i$  a la carga superficial en un determinado plano de átomos, localizados a una distancia  $\beta_i$  desde el sólido (figura 24). Si aceptamos que la interfase tiene una geometría plana, y que  $x$  es la distancia externa normal a ésta, podemos decir que la región entre  $x = 0$  y  $x = \beta_i$  está libre de carga, y podemos identificar un condensador cuyas placas son la superficie y el plano  $\beta_i$ . Si  $C_i$  es su capacidad específica (por unidad de área):

$$\psi_0 - \psi_i = \frac{\sigma_0}{C_i} \quad (3)$$

donde  $\psi_0$  es el potencial en la superficie del sólido. Los iones responsables de  $\psi_i$  no sólo desarrollarán interacciones electrostáticas con la superficie, 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. Hay una amplia variedad de situaciones, desde la formación de uniones químicas (covalentes) a interacciones más débiles como la atracción de van der Waals, los enlaces por puentes de hidrógeno, las fuerzas hidrófobas-hidrófilas, etc. [Lyklema, 1987]. Debido a la ausencia habitual de información sobre la parte más interna de la atmósfera iónica, el tratamiento a menudo no está exento de hipótesis y suposiciones más o menos realistas.



**Figura 24.** 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  $\sigma_d$ , localizada en  $x = \beta_d$ , de acuerdo con la expresión:

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

para una interfase plana, o:

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

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

Debido a la electroneutralidad:

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

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

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

donde el primer término corresponde a la fuerza electrostática sobre los iones  $i$  (carga  $ez_i$ , concentración  $n_i$ ) y el segundo es la fuerza termodinámica. La

integración de la ecuación 7 bajo la condición  $n_i = n_i^0(\infty)$  para  $\psi = 0$ , da lugar a la distribución de Boltzmann:

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

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

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

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

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

- Una interfase plana con potencial bajo. Donde:

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

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

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

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

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

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

donde  $y$  es el potencial adimensional:

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

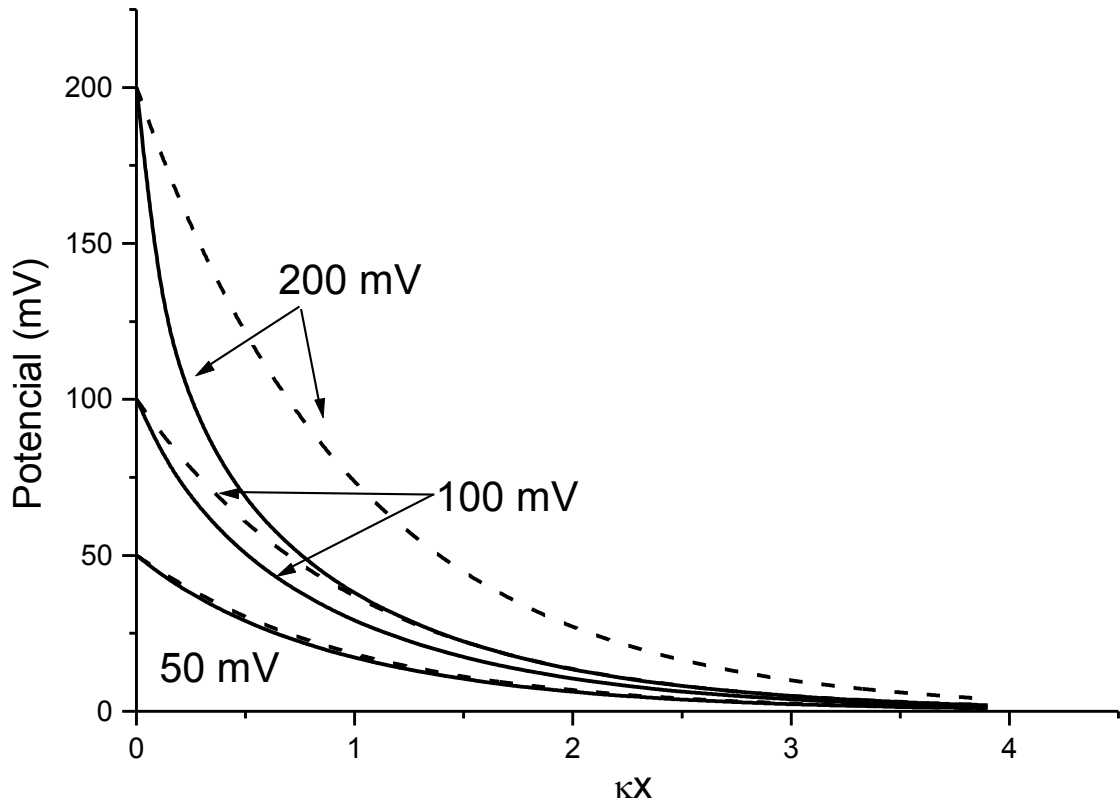
y puede darse una expresión similar para  $y_d$ .

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

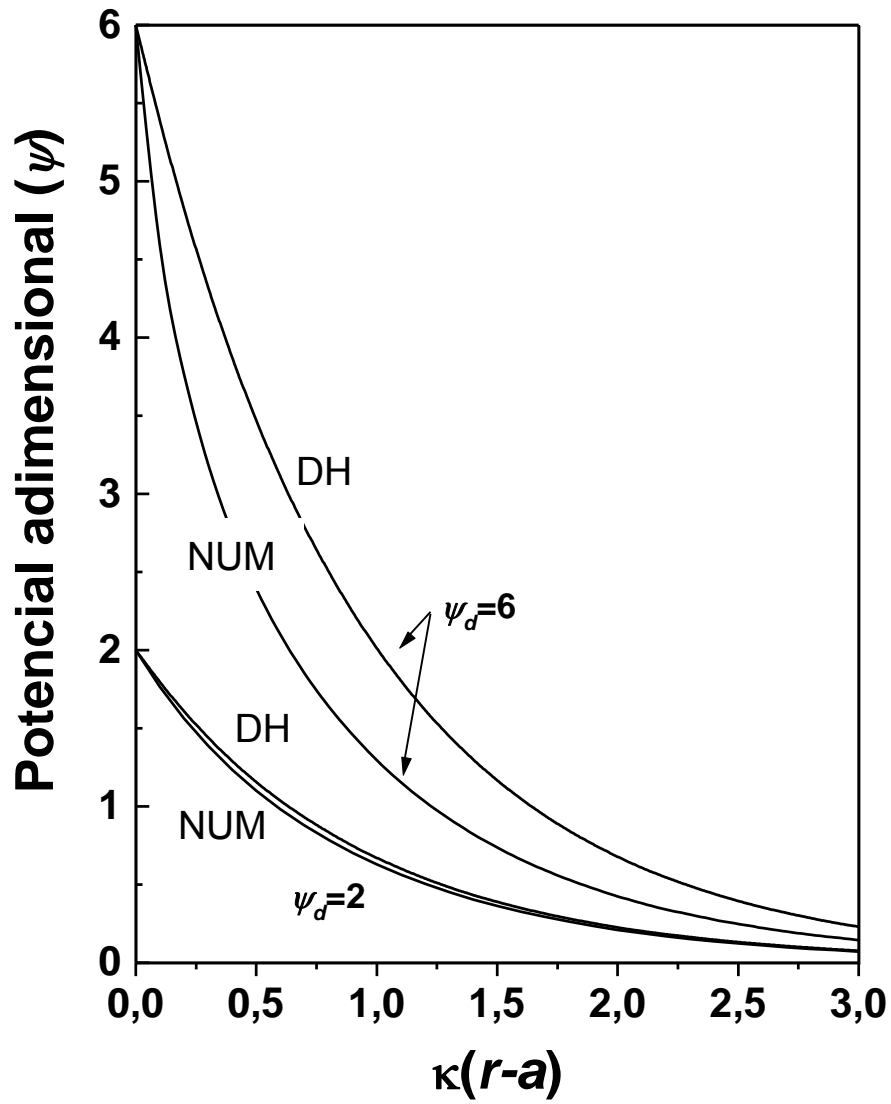
$$\psi(r) = \psi_d \left( \frac{a}{r} \right) e^{-\kappa(r-a)} \quad (14)$$

mientras que deben aplicarse soluciones numéricas o expresiones analíticas aproximadas en otros casos. Esto se ilustra en la figura 25, donde se comparan las ecuaciones 10 y 12 para la interfase plana; y en la figura 26, donde la solución aproximada (ecuación 12), se representa junto a resultados numéricos [López-García y cols., 1996; Russel y cols., 1989].





**Figura 25.** Distribución del potencial en una interfase plana para electrolitos monovalentes calculado mediante la fórmula aproximada de Debye-Hückel (ecuación 10, ---) y el cálculo completo (ecuación 12, -) para los valores de  $\psi_d$  indicados.



**Figura 26.** Potencial adimensional ( $\psi$ ) en torno a una partícula esférica en función de la distancia reducida a la superficie para electrolitos monovalentes. *DH*: aproximación de Debye-Hückel; *NUM*: cálculo totalmente numérico.

### 4.1.2 FENÓMENOS ELECTROKINÉTICOS. POTENCIAL ZETA.

Supongamos que se aplica un campo eléctrico paralelamente a la interfase sólido/disolución de la figura 25, 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 un aproximación; ya que los iones pueden ser móviles dando una movilidad próxima al núcleo de la disolución); lo mismo se admitirá con respecto al líquido. Sin embargo, la fuerza eléctrica actuará sobre los iones arrastrando líquido en su movimiento, produciendo un movimiento relativo entre el sólido y el líquido en el cual se fundamenta el fenómeno electrocinético.

El potencial zeta ( $\zeta$ ) es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de líquido incorporado a la partícula dispersa. Este se mide en milivoltios y puede darse por diferentes mecanismos. Principalmente por disociación de grupos iónicos en la superficie de la partícula o por absorción de los iones de la solución en la superficie. El valor de potencial zeta es importante ya que aporta información sobre la estabilidad de las suspensiones. Por ejemplo, partículas muy pequeñas con un potencial elevado son más estables ya que los fenómenos de agregación se encuentran impedidos. Por el contrario, si el valor de potencial zeta es bajo, la estabilidad del sistema disperso se verá comprometida por la existencia de fuerzas de atracción de elevada magnitud.

Una de las teorías más ampliamente utilizadas en la determinación del potencial zeta de un sistema disperso es la de Smoluchowski (1903) la cual es válida para partículas dispersas en distintos medios y a diferentes concentraciones. Sin embargo, un análisis teórico demuestra que esta teoría es válida solo para una capa muy delgada en la que la longitud de Debye ( $1/\kappa$ ) es mucho menor al radio de la partícula  $a$ . Este modelo de "doble capa fina" ofrece enormes simplificaciones para la teoría de la electroforesis y para otras muchas teorías eléctricas y electroacústicas. Es un modelo válido para la mayoría de los sistemas acuosos ya que la longitud de Debye suele ser de unos pocos nanómetros en el agua. El modelo no puede aplicarse a coloides en una solución con una fuerza iónica próxima a la del agua pura. Sin embargo, el problema matemático es mucho más complejo y hasta la aparición de los ordenadores sólo estaban disponibles teorías aproximadas (válidas para valores de potencial zeta bajos). Los primeros tratamientos numéricos del problema (válidos para valores arbitrarios de radio, potencial zeta o concentraciones iónicas) fueron elaborados por Wiersema y cols. (1966) y O'Brien y White (1978).

Todas estas teorías predicen que la movilidad electroforética y el potencial zeta tienen el mismo signo. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la principal contribución al potencial zeta puede deberse al dipolo que el agua forma en la interfase sólido-líquido, lo que no está incluido en las teorías tradicionales. Esta nueva aportación sugiere que movilidad electroforética y potencial zeta pueden ser en realidad de signo contrario [Knecht y cols., 2008].

## **4.2 ELECTROFORESIS: TEORÍA ELEMENTAL**

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

Sea una partícula esférica de radio  $a$  en presencia de un campo eléctrico que, lejos de la partícula, es  $\vec{E}_\infty$ . Se considera que la partícula no es conductora y tiene una permisividad eléctrica mucho menor que la del medio de dispersión. Por el momento, también aceptaremos que la concentración de electrolito es muy baja y que  $a$  es también muy pequeño, por lo que se da la siguiente desigualdad entre el grosor de la doble capa (ecuación 15) y el radio:

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

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

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

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

$$\vec{F}_S + \vec{F}_E = 0 \quad (16)$$

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

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

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

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

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

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

o la movilidad electroforética ( $u_e$ ):

$$u_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} \zeta \quad (20)$$

lo que se conoce como fórmula de Hückel.

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

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

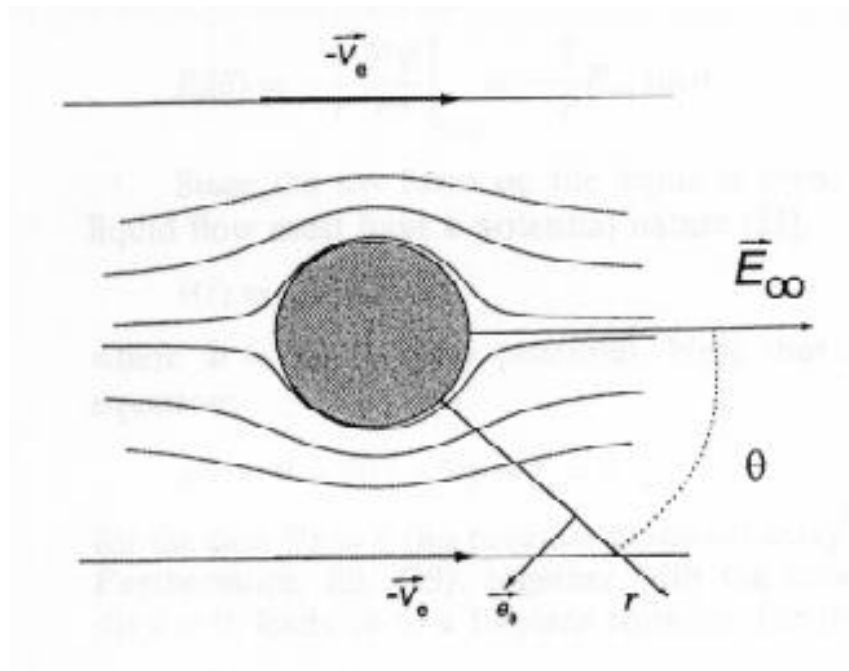
En este caso, los iones de la doble capa apantallan la carga superficial en una distancia corta, lo que significa que, como hemos descrito antes, se pierde la electroneutralidad en esta región. El campo provocará, por lo tanto, movimientos del líquido cargado que afectarán al propio movimiento de la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

Para ello se ha de suponer que el potencial  $\zeta$  no es muy elevado, lo que permite admitir que la doble capa no se deforma por acción del campo aplicado. Por ello, la distribución de potencial eléctrico es la simple superposición del potencial debido al campo más el inducido en la interfase (figura 27). Específicamente [Ohshima, 1998; Panofski y Phillips, 1975]:

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

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

$$\mu_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta \quad (23)$$



**Figura 27.** Flujo de líquido en torno a una partícula esférica cargada negativamente.

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

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



### 4.2.1. ELECTROFORESIS: TRATAMIENTOS MÁS ELABORADOS

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

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{\eta} \zeta f(\kappa a) \quad (24)$$

donde:

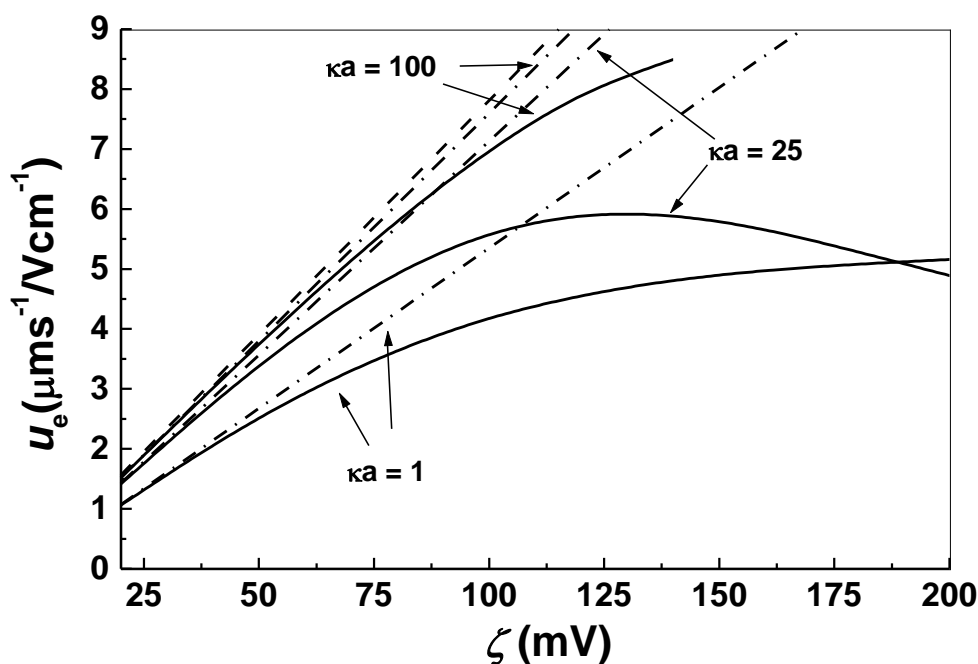
$$f(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - 5 \frac{(\kappa a)^3}{48} + \dots \quad (25)$$

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

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

1974]. El problema matemático es mucho más complejo y hasta la aparición de los ordenadores sólo estaban disponibles teorías aproximadas (bajo  $\zeta$ , gran  $\kappa a$ ). Los primeros tratamientos numéricos del problema, válidos para valores arbitrarios del radio, el potencial zeta o las concentraciones iónicas, aparecieron a partir de la década de los sesenta [O'Brien y White, 1978; Wiersema y cols., 1966].

Como no es relevante describir estos tratamientos, simplemente mostraremos algunos resultados en la figura 28. La validez de la fórmula de Smoluchowski para valores elevados  $\kappa a$  y valores bajos a moderados de  $\zeta$  es claramente apreciable. También es evidente que el tratamiento de Henry es válido para  $\zeta$  bajo, independientemente del grosor de la doble capa.



**Figura 28.** Movilidad electroforética frente a potencial zeta ( $\zeta$ ) para partículas esféricas de radio  $a = 100$  nm y para  $\kappa a = 1, 25$  y  $100$  en disoluciones de KCl. Línea discontinua (---): ecuación de Smoluchowski; líneas discontinuas – punteadas (---): fórmula de Henry; líneas continuas (–): teoría de O'Brien y White.

### 4.2.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La determinación de las movilidades electroforéticas de las distintas suspensiones de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) y nanopartículas compuestas ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ) se llevó a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra), 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  $\leq 5\%$ , y la temperatura se mantiene constante (hasta  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ) utilizando un módulo Peltier.

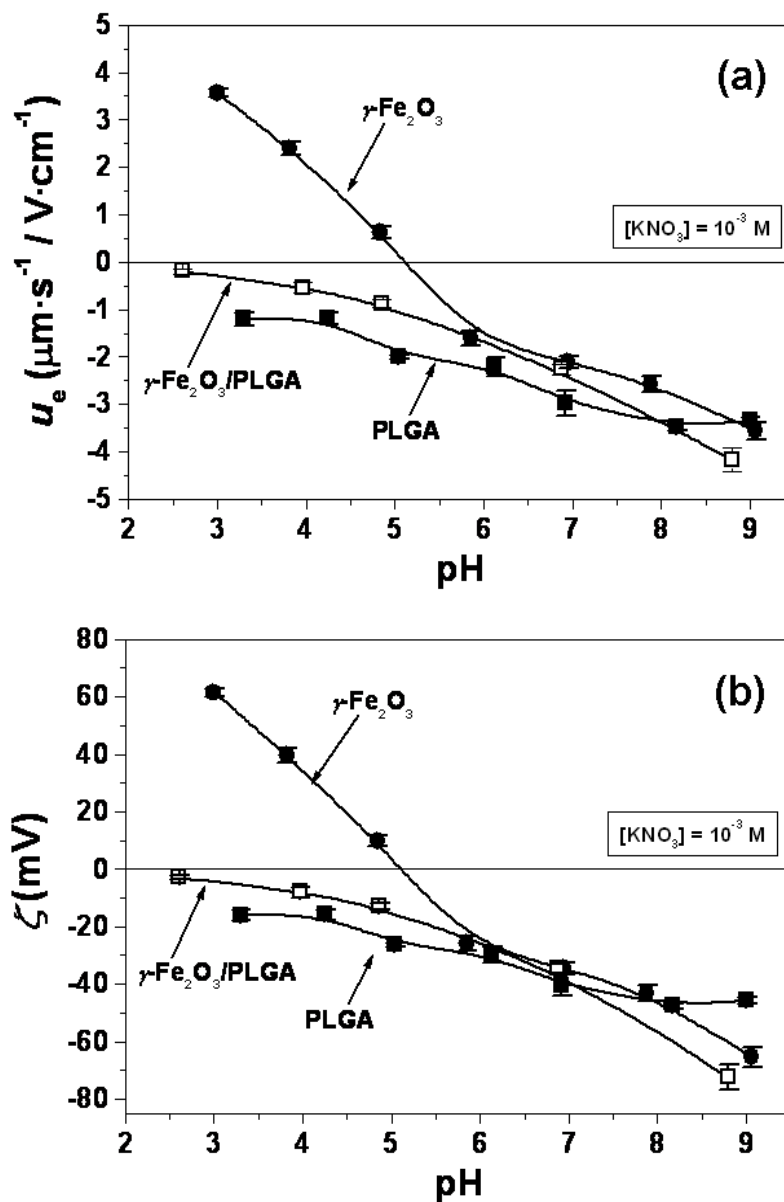
Las suspensiones estudiadas contenían una concentración de nanopartículas en torno al 0.1% (p/v). Antes de preparar la suspensión se fijaba la concentración de electrolito desecada con  $\text{KNO}_3$  entre  $10^{-5}$  y  $10^{-1}$  M. En su caso, además se ajustaba el pH con KOH o  $\text{HNO}_3$ . Debido a la laboriosidad del ajuste de ciertos pH, la preparación de las suspensiones se realizó cuando éstos eran estables, ya que, en caso contrario las nanopartículas habrían estado demasiado tiempo en contacto con el medio de dispersión antes de medir, con el consiguiente riesgo para la estabilidad de sus propiedades eléctricas superficiales (fenómenos de oxidación y de degradación) [Plaza y cols., 2002].

Las medidas se realizaron a  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 24 horas después, comprobando y reajustando, si procedía, previamente el pH. Los datos presentados son el promedio de 12 determinaciones, cambiando la muestra cada tres. La teoría de O'Brien y White (1978) se utilizó para convertir los valores de  $u_e$  en potencial  $\zeta$ .

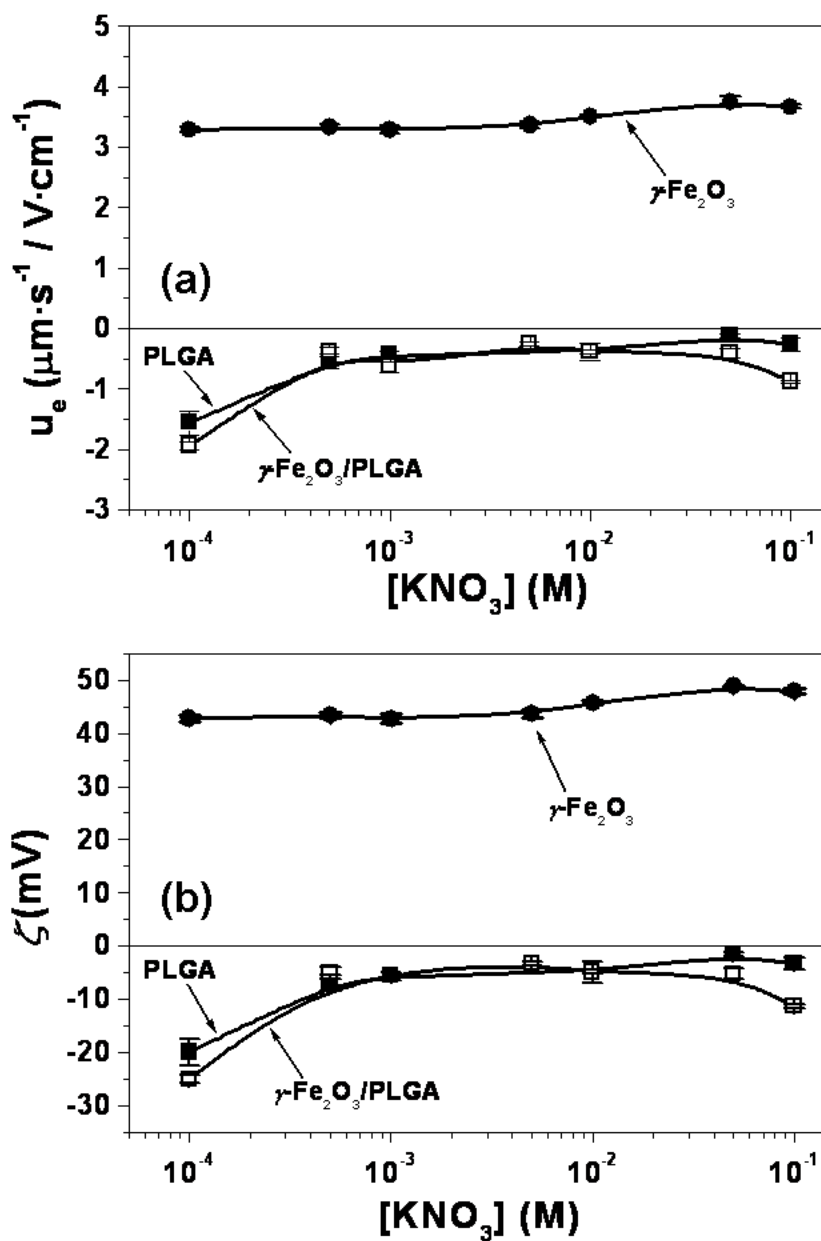
### **4.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL pH Y LA FUERZA IONICA SOBRE LAS PROPIEDADES ELECTRICAS SUPERFICIALES.**

Comenzamos determinando el efecto del pH sobre la movilidad electroforética ( $u_e$ ) de las nanopartículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA. La figura 29 muestra los valores de  $u_e$  en función del pH, en presencia de KNO<sub>3</sub> 10<sup>-3</sup> M. La  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> presenta una carga superficial neta positiva hasta un valor de pH≈5, correspondiente al punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero [Plaza y cols., 2002]. Sin embargo, el PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA presentan carga superficial neta negativa en todo el intervalo de pHs estudiado y solo se intuye la existencia de un pH de potencial zeta cero por debajo del pH=5. Es muy interesante comprobar en esta figura como el recubrimiento polimérico oculta eficientemente el núcleo magnético haciendo que la superficie de las partículas mixtas sea indistinguible electrocinéticamente de la del polímero puro.

Para confirmar los resultados, determinamos la movilidad electroforética de los tres tipos de partículas en función de la concentración molar de KNO<sub>3</sub> al pH natural de las dispersiones acuosas (pH=5). Como podemos observar en la figura 30, las partículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> presentan una carga superficial neta positiva en todo el intervalo de concentraciones molares de KNO<sub>3</sub>. Parece que la fuerza iónica del medio no condiciona el valor de movilidad electroforética, ya que los valores se mantienen prácticamente constantes en todo el intervalo. No ocurre lo mismo en el caso del PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA, pues la carga eléctrica superficial negativa decrece dramáticamente al aumentar la fuerza iónica de la dispersión. De nuevo, la similitud entre la electrocinética del polímero puro y de las partículas mixtas y la diferencia respecto a la maghemita se observan perfectamente.



**Figura 29.** Movilidad electroforética ( $u_e$ ) (a) y potencial zeta ( $\zeta$ ) (b) de las partículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\bullet$ ), poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA,  $\blacksquare$ ) y compuestas maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ,  $\square$ ) en función del pH, en presencia de  $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M.



**Figura 30.** Movilidad electroforética ( $u_e$ ) (a) y potencial zeta ( $\zeta$ ) (b) de las partículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ●), poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA, ■) y compuestas maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ , □) en función de la concentración de  $\text{KNO}_3$  a pH natural (pH = 5).

Los resultados representados en la figura 29 también nos sirven para estimar, a expensas de realizar un estudio exhaustivo, los fenómenos de sedimentación y redispersión de las suspensiones acuosas de las partículas mixtas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA). Según las características eléctricas observadas en función del pH, podemos decir que a valores ácidos el potencial zeta en valor absoluto, será bajo por lo que su carga superficial también será baja. Por esto, las repulsiones electrostáticas entre las partículas en suspensión serán despreciables, formándose un agregado voluminoso (flóculos), por atracciones de van der Waals, que retrasará la aparición de un sedimento final. Este sedimento formado tendrá una estructura abierta y albergará en su interior porciones de medio de dispersión, provocando que la distancia entre las partículas sea grande y por la débil atracción existente entre éstas, la suspensión será fácilmente redispersable por simple agitación.

Por otro lado, a pH básico, el potencial zeta en valor absoluto es alto por lo que la carga superficial también lo es, generando repulsiones electrostáticas fuertes. Esto provocará que las partículas sedimenten como entidades individuales compactándose en el fondo de la probeta, formando un sedimento difícil de redispersar ya que las atracciones entre las partículas serán elevadas.

Por lo que podemos afirmar que el control del pH de la suspensión acuosa de partículas mixtas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA parece, en un principio, una herramienta útil para la mejora de la estabilidad coloidal del sistema. Algo similar, aunque quizás en menor medida puede apreciarse con respecto a la fuerza iónica en el control de la estabilidad de las suspensiones (figura 30). Concentraciones de KNO<sub>3</sub> por encima de 10<sup>-3</sup>M aseguran valores de potencial zeta muy bajos.

#### **4.4 MECANISMO DE FORMACIÓN DEL RECUBRIMIENTO DE POLÍMERO POLI(D,L-LACTIDA-CO-GLICOLIDA) SOBRE LOS NÚCLEOS MAGNETICOS DE MAGHEMITA**

La información ya descrita sobre las características superficiales de los materiales permite argumentar el mecanismo por el que la capa de polímero se forma sobre la superficie de la maghemita. Primero, podemos hablar de una interacción electrostática de tipo atractivo entre las partículas de maghemita cargadas positivamente (figura 29). Las condiciones ácidas de la reacción de síntesis determinan una carga superficial positiva en los núcleos magnéticos, mientras que el material polimérico queda cargado negativamente. Esta atracción provocará la concentración del polímero en las inmediaciones de la superficie de la maghemita.

Por otro lado podemos justificar la formación de la capa de polímero mediante un mecanismo termodinámico utilizando la ecuación de Dupré. Para ello usaremos los datos mencionados previamente, por los cuales podemos calcular la energía libre de interacción entre la maghemita (M) y el polímero (P) en medio acuoso (A),  $AG_{MAP}$  :

$$AG_{MAP} = \gamma_{MP} - \gamma_{MA} - \gamma_{PA} \quad (26)$$

donde las energías libres interfaciales se obtienen para cada par de interfases involucradas. El resultado de este cálculo es  $-19.76 \text{ mJ/m}^2$ . Esto significa que las interacciones ácido-base y de van der Waals entre la maghemita y el polímero son netamente atractivas. Es decir, termodinámicamente es más favorable para el polímero permanecer en contacto con la maghemita antes que estar aislado en el medio de dispersión acuoso [Arias y cols., 2001].





# **Capítulo 5:**

## **Propiedades termodinámicas superficiales**



## 5.1 INTERACCIONES SUPERFICIALES

La principal interacción que existe entre las partículas coloidales cargadas en un medio acuoso es la interacción electrostática, además de esta, existen otras interacciones entre las partículas presentes en el medio de dispersión y que pueden alcanzar valores significativos. Consideramos las más importantes las interacciones electrodinámicas o de Lifshitz-van der Waals (LW) y las interacciones dispersivas o interacciones no-dispersivas (fuerzas de solvatación, estructurales y de hidratación):

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

En este apartado, nuestro objetivo es la 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. Para ello, utilizamos un modelo termodinámico que incluye las interacciones de van der Waals y ácido-base entre las partículas, o entre ellas y el medio de dispersión. El modelo permite caracterizar el sólido mediante tres componentes de su energía libre superficial:  $\gamma_S^{LW}$  (Lifshitz-van der Waals, representativa de las interacciones no polares o dispersivas de la interfase),  $\gamma_S^+$

(aceptor de electrones o ácido de Lewis) y  $\gamma_s^-$  (donante de electrones o base de Lewis). Estas dos últimas 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. Veremos así la importancia de las contribuciones no electrostáticas al balance total de la energía de interacción entre las partículas del sistema analizado. Para llevar a cabo estos cálculos utilizaremos datos experimentales de los ángulos de contacto formados por líquidos seleccionados con nuestros tres tipos de sistemas: núcleo magnético (maghemita,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), recubrimiento polimérico [poli(D,L-lactida-co-glicolida), PLGA] y partículas compuestas magnéticas ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA). Pretendemos también realizar un análisis comparativo de la energía libre superficial de estos tres tipos de materiales puros.

### 5.2 INTERACCIONES DISPERSIVAS

Van der Waals fue el primer autor que sugirió que en los líquidos y gases no ideales existen entre átomos y moléculas una interacción de naturaleza diferente de la electrostática, a la que posteriormente se denominó interacción de van der Waals. Estas son relativamente débiles comparadas con los enlaces químicos normales pero son importantes en campos como la nanotecnología, ciencia de polímeros o ciencia de superficies. Además, definen el carácter químico de compuestos orgánicos y la solubilidad de las sustancias orgánicas en medios polares y apolares.

En general, un potencial intermolecular tiene un componente repulsivo que evita el colapso de las moléculas debido a que al acercarse las entidades unas a otras las repulsiones dominan y además tiene un componente atractivo en el que pueden considerarse tres contribuciones distintas:

- la interacción entre dipolos permanentes o fuerzas de orientación o interacción de Keesom [Keesom, 1921].
- la interacción entre dipolos permanentes y dipolos inducidos en otros átomos o moléculas, fuerzas de inducción de Debye [Debye, 1921].
- interacciones producidas entre dipolos instantáneos originados por fluctuaciones de carga eléctrica y dipolos inducidos [London, 1930]. Es la única atracción experimentada por átomos no polares, pero opera entre cualquier par de moléculas, sin importar su simetría.

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. Usando el planteamiento de Lifshitz (1955), se ha demostrado 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. Por eso, todas ellas se pueden agrupar dentro del conjunto de interacciones electrodinámicas, denominadas genéricamente interacciones Lifshitz-van der Waals ( $LW$ ). Aunque estas interacciones son débiles en comparación con las electrostáticas (EL) responsables del enlace iónico o del covalente, afectan de forma considerable a diversos fenómenos relacionados con los sistemas coloidales, tales como la adhesión, la adsorción, la agregación de partículas en suspensión o la estructuración de macromoléculas condensadas, como polímeros o proteínas [Israelachvili, 1991]. Concretando, las características esenciales de estas interacciones son:

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

Matemáticamente podemos obtener 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 ( $\gamma^{LW}$ ) a la componente de la tensión superficial o energía libre superficial asociada a estas interacciones.

### **5.3 INTERACCIONES NO-DLVO**

Hay fenómenos relacionados con la estabilidad coloidal que no pueden explicarse sólo por 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], ni por qué las dispersiones de sílice no coagulan en el punto isoelectrico (o pH de potencial zeta cero) en el seno de disoluciones salinas concentradas [Allen y Matijević, 1969]. O más recientemente, la no coagulación en el punto isoelectrico de suspensiones de ZnS [Durán y cols., 1995] o de látex de etilcelulosa [Vera y cols., 1995] en el seno de disoluciones salinas concentradas. Por ello, ha sido necesario introducir las fuerzas no-DLVO (con un alcance de pocos nanómetros), entre las que se incluyen: repulsión “hidrófila”, atracción “hidrófoba”, enlaces de hidrógeno, enlaces  $\pi$  o presión osmótica en suspensiones muy

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

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

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



## 5.4 TEORIA DE VAN OSS

Para poder predecir el valor que adquieren las interacciones ya descritas en este apartado [Lifshitz-van der Waals (*LW*) y ácido-base (*AB*)] es necesario hacer previamente una caracterización termodinámica de la superficie. Para ello, consideraremos el proceso reversible de acercar dos sistemas físicos del mismo material, *I*, hasta formar una fase continua donde entran en contacto superficies iguales unitarias [Good, 1993]. Se denomina energía libre de cohesión ( $\Delta G_{C,1}$ ) a la variación de energía libre que tiene lugar en el proceso, y trabajo de cohesión al opuesto de esta magnitud. A partir de ello podremos definir la tensión superficial (o energía libre superficial) del material *I* ( $\gamma_1$ ) de la forma:

$$\Delta G_{C,1} = -W_{C,1} = 2\gamma_1 \quad (27)$$

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, *I* y *2*, se habla de adhesión, siendo  $\Delta G_{A,12}$  la energía libre de adhesión y  $W_{A,12}$  el trabajo de adhesión. En este caso, se destruyen las interfases *I*-vacío y *2*-vacío, pero se crea la interfase *I*-*2*. Se define entonces la tensión interfacial ( $\gamma_{12}$ ) mediante la ecuación de Dupré [Adamson, 1982].

$$\Delta G_{123} = -W_{A,12} = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad (28)$$

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

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

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

La energía libre interfacial está relacionada con las fuerzas de interacción que las superficies de las fases  $1$  y  $2$  ejercen entre sí (cohesión) o con la otra fase (adhesión), con lo que la ecuación de Dupré queda de la forma:

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

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 alcance de las interacciones de origen no electrostático en la interfase.

Las investigaciones más recientes acerca de la tensión superficial y sus componentes, han sido realizadas por van Oss (1993, 1994). La ecuación que 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 ( $AB$ ). En su extensión a la energía libre de la interfase  $1/2$ :

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

El siguiente paso es postular una regla de combinación para calcular la contribución del carácter ácido y básico a las energías libres de adhesión a través de la interfase o a la energía interna de cohesión de una fase. La ecuación 31 se puede hacer extensiva a la energía libre de la interfase  $I/2$ :

$$\gamma_1 = \gamma_{12}^{LW} + \gamma_{12}^{AB} \quad (32)$$

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

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

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

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

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

$$\gamma_{12}^{AB} = 2\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} \quad (35)$$

Sustituyendo la ecuación 35 en la ecuación 31:

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

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

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

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

Es usual hacer una clasificación de 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 apolares si se anulan ambas componentes.

Si una sustancia es monopolar no existe el término  $\gamma_i^{AB}$ , y la tensión superficial total ( $\gamma_i$ ) 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 y Mostafa, 1978; Hamaker, 1937; Visser, 1972] siempre que la componente apolar del líquido ( $\gamma_2^{LW}$ ) cumpla:  $\gamma_1^{LW} < \gamma_2^{LW} < \gamma_3^{LW}$  [van Oss, 1994].

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

El aspecto fundamental a resaltar por su significación en la determinación de la energía total de interacción entre dos partículas coloidales, es que el conocimiento de  $\gamma_i^{LW}$  y  $\gamma_i^\pm$  para las fases implicadas permite calcular dicha energía. En efecto, la energía libre de interacción (por unidad de superficie) entre dos partículas de material  $I$  inmersas en la fase 2 será:

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

Nótese que un valor positivo de  $\Delta G_{121}$  implicaría una repulsión neta entre las superficies (*presión de hidratación* o interacción *hidrófila*). Teniendo en cuenta que  $\Delta G_{121}^{LW}$  es siempre negativo, el carácter atractivo o repulsivo de la interacción, representado por el valor de  $\Delta G_{121}$ , dependerá de la contribución ácido-base  $\Delta G_{121}^{AB}$ . En medio acuoso, la componente  $AB$  de la energía de cohesión del agua, debido a sus enlaces por puentes de hidrógeno, es  $102 \text{ mJ/m}^2$ , 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 [van Oss, 1994] ( $\gamma = \gamma^{LW}$ ;  $\gamma^{AB} = 0$ , usualmente  $\gamma^+ = 0$  y  $\gamma^- \neq 0$ ), 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 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, según la cual, dichas interacciones tienen su origen en intercambios  $AB$  (ácido-base de Lewis) entre la superficie de las partículas dispersas y el medio de dispersión (agua, generalmente). 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.

### **5.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

La tensión superficial de un líquido y la tensión interfacial entre dos líquidos son dos magnitudes a las que se puede tener acceso experimental de forma directa. Sin embargo, en el caso de los sólidos, es necesario recurrir a medidas de otras magnitudes para poder obtener a partir de ellas los valores de las tensiones superficiales. Junto con la técnica de penetración de líquidos en capa fina, la técnica de medida de ángulos de contacto es la más importante y habitual en la determinación de los valores de las tensiones superficiales en un sólido. Ambas han sido descritas con detalle en trabajos anteriores [Arias y cols., 2001; Durán y cols., 1994, 1995]. Nos centraremos en una breve descripción de la técnica de medida de ángulos de contacto, ya que es la que hemos utilizado 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 ( $\theta$ ) 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 de las características mencionadas sobre la que se deposita una gota de líquido puro, el ángulo de contacto de equilibrio es una magnitud única que cumple la ecuación de Young:

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

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

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

donde  $\gamma_S$  es la tensión superficial del sólido y  $\pi_e$  es la presión superficial, definida por:

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

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

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

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

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

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

Midiendo los ángulos de contacto formados por tres líquidos diferentes, de los que se conocen las componentes de su tensión superficial, se puede establecer un sistema de tres ecuaciones como la ecuación 19, a partir del cual se calcularán los valores de las componentes del sólido. Por lo general, se suelen utilizar dos líquidos polares y uno apolar.

El análisis termodinámico superficial se ha efectuado en las nanopartículas de PLGA,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y compuestas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA), utilizando los líquidos  $\alpha$ -bromonaftaleno, agua y formamida. En la aplicación del modelo de van Oss, se



utilizaron los datos bibliográficos recogidos en la Tabla 2, donde se especifican los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba utilizados [van Oss, 1994].

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

**Tabla 2.** Componentes de la tensión superficial de los líquidos utilizados en la medida del ángulo de contacto en  $\text{mJ/m}^2$  y a  $20^\circ\text{C}$ .

La medida de los ángulos de contacto se ha realizado mediante un telegoniómetro Ramé-Hart 100-0.7-00 (EE.UU), que permite observar las gotas de líquido depositadas sobre un sólido. Este aparato dispone de un conjunto de tornillos micrométricos que permiten los desplazamientos verticales y horizontales del sustrato, así como de un limbo graduado para la medida del ángulo con una precisión de  $\pm 1^\circ$ . El uso de una microjeringa (Wilson, EE.UU) permite controlar el volumen de la gota depositada entre 2 y 4  $\mu\text{L}$ . La superficie del sólido a estudiar se obtuvo por compresión del material seco en una prensa hidráulica (Spepac, Inglaterra) a una presión fijada de 148 MPa durante 5 minutos. Los comprimidos obtenidos presentaron un radio de 1.3 cm.

Los ángulos de contacto de los líquidos seleccionados se determinaron sobre capas delgadas de los tres tipos de materiales depositadas sobre portaobjetos de microscopio. Estas superficies lisas se obtuvieron tras la adición de manera uniforme de

una suspensión acuosa ( $\approx 10\%$ , p/v) de cada tipo de coloide sobre la superficie limpia y seca de una placa de vidrio. Los valores de ángulo de contacto (en grados) obtenidos con los líquidos seleccionados son el promedio de 16 determinaciones realizadas a  $25.0 \pm 0.5$  °C, midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas.

	AGUA	FORMAMIDA	$\alpha$ -BROMONAFTALENO
MAGHEMITA	$32 \pm 2$	$18 \pm 2$	$13 \pm 2$
PLGA	$65 \pm 2$	$24 \pm 2$	$21 \pm 2$
COMPUESTAS	$61 \pm 2$	$23 \pm 2$	$20 \pm 2$

**Tabla 3.** Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones en comprimidos con los tres tipos de materiales.

## 5.6 COMPONENTES DE LA ENERGÍA LIBRE SUPERFICIAL

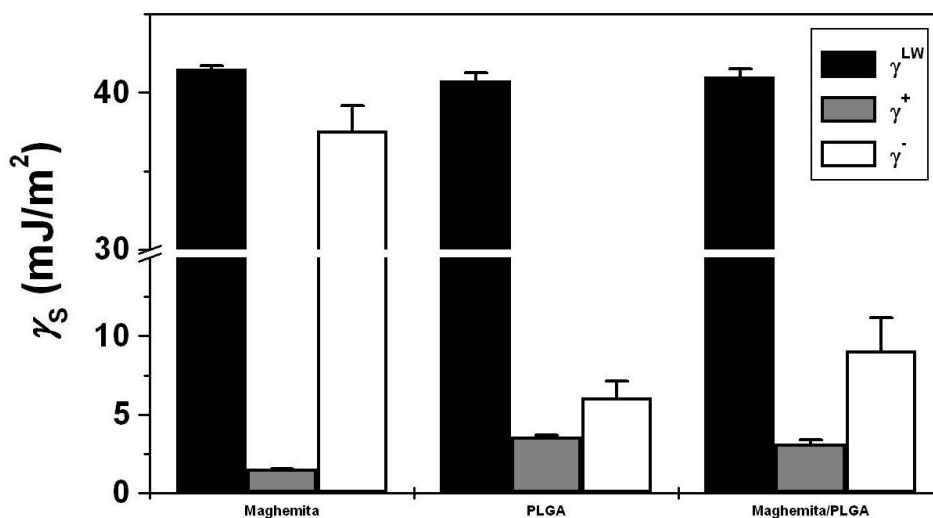
La evaluación de las componentes  $\gamma_s$  de la energía libre superficial es la que aporta una información física veraz sobre la termodinámica superficial de maghemita, PLGA y partículas compuestas.

Para la maghemita la componente Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_s^{LW}$ ) es  $41.49 \pm 0.23$  mJ/m<sup>2</sup>, la componente electrón-aceptor ( $\gamma_s^+$ ) es  $1.03 \pm 0.07$  mJ/m<sup>2</sup>, y la contribución electrón-donante ( $\gamma_s^-$ ) es  $39.41 \pm 1.82$  mJ/m<sup>2</sup>.

Para el PLGA la componente Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_s^{LW}$ ) es  $40.78 \pm 0.52$  mJ/m<sup>2</sup>, la componente electrón-aceptor ( $\gamma_s^+$ ) es  $3.59 \pm 0.11$  mJ/m<sup>2</sup>, y la contribución electrón-donante ( $\gamma_s^-$ ) es  $6.04 \pm 1.07$  mJ/m<sup>2</sup>.

Para las partículas compuestas la componente Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_s^{LW}$ ) es  $41.01 \pm 0.51$  mJ/m<sup>2</sup>, la componente electrón-aceptor ( $\gamma_s^+$ ) es  $3.15 \pm 0.22$  mJ/m<sup>2</sup>, y la contribución electrón-donante ( $\gamma_s^-$ ) es  $9.05 \pm 2.14$  mJ/m<sup>2</sup>.

Con estos resultados, reflejados en la figura 31, observamos que nuestras partículas son esencialmente materiales electrón-donantes por lo que pueden tener interacciones ácido-base con fases de cualquier polaridad ( $\gamma^+$ ,  $\gamma^-$ , o ambas, diferentes de cero) pero las fuerzas *AB* no contribuyen a su energía libre de cohesión.



**Figura 31.** Valores de los componentes de la energía libre superficial de los tres tipos de partículas: maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA), y compuestas maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA).

## 5.7 ANÁLISIS DE LA NATURALEZA HIDRÓFILA/HIDRÓFOBA

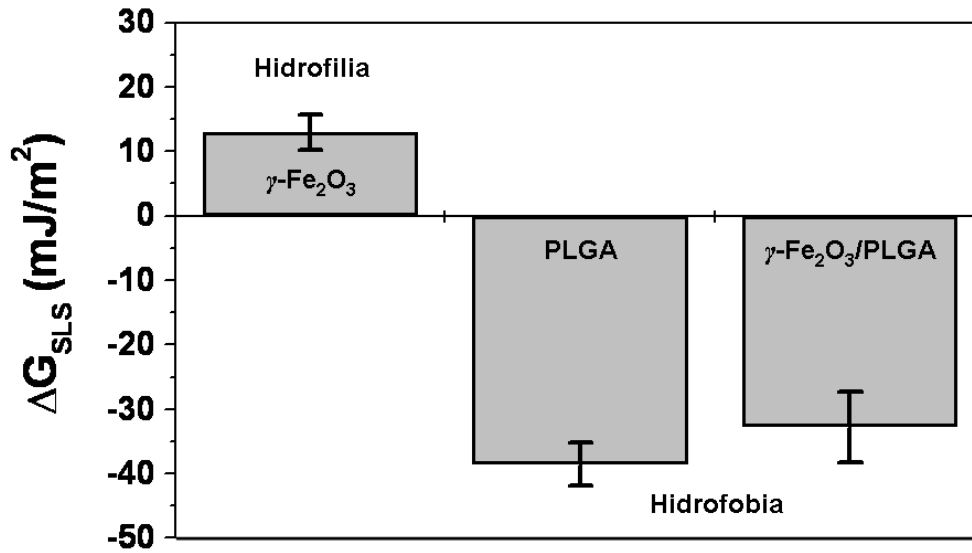
Como ya hemos mencionado, una caracterización termodinámica exhaustiva, es fundamental ya que las interacciones implicadas en la determinación de la energía libre superficial de los sólidos se manifiestan de diferentes formas como; agregación de partículas en suspensión o la adhesión a diferentes sustratos. Lo que buscamos es que los métodos empleados junto con su base teórica, permitan especificar la componente  $LW$  de la energía de interacción entre las partículas dispersas y cuantificar las contribuciones no-DLVO a la energía total ya 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):

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

Haciendo uso de la ecuación 44, pueden obtenerse los valores de  $\Delta G_{121}^{LW}$  de cada componente:  $\Delta G_{121}^{LW}$  (mJ/m<sup>2</sup>) para la maghemita es de  $12,98 \pm 2,71$  mJ/m<sup>2</sup>, para el polímero es de  $-38,59 \pm 3,33$  mJ/m<sup>2</sup> y para las partículas compuestas es de  $-32,76 \pm 5,44$  mJ/m<sup>2</sup>.

Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de este material polimérico. De acuerdo con van Oss (1994), puede utilizarse el siguiente criterio para determinar cuándo un material puede considerarse hidrófilo o hidrófobo. Si  $\Delta G_{121}^{TOT}$  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  $\Delta G_{121}^{TOT}$ . En nuestro caso, las partículas compuestas presentan un valor de  $\Delta G_{121}^{TOT} = -24,4 \pm 3,7$  mJ/m<sup>2</sup>, indicativo de su carácter hidrófobo (figura 32).



**Figura 32.** Valores de  $\Delta G_{SLS}$  (mJ/m<sup>2</sup>) y carácter hidrófobo/hidrófilo de los tres tipos de partículas: maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA), y compuestas maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ).



# **Capítulo 6:**

## **Propiedades magnéticas**

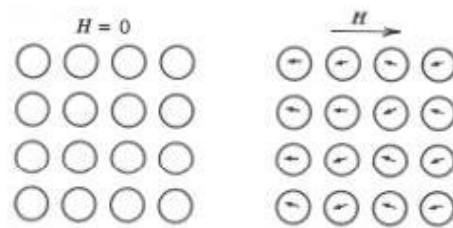




## 6.1 PROPIEDADES MAGNÉTICAS

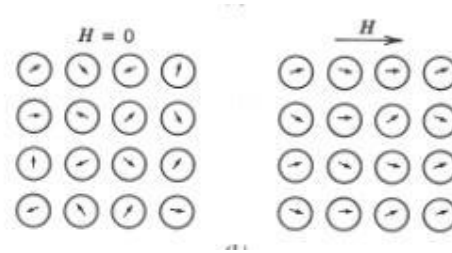
Existen distintos tipos de magnetismo originados por el movimiento de los electrones de un material [Callister, 1996]. Cuando los electrones se mueven por un hilo conductor, se genera un campo magnético alrededor del hilo. Las propiedades magnéticas macroscópicas de los materiales son consecuencia de los momentos magnéticos asociados con sus electrones individuales. Cada electrón en un átomo tiene un momento magnético que se origina a partir del movimiento orbital del propio electrón alrededor del núcleo, y a partir de la rotación (spin) del electrón a lo largo del eje de rotación. De forma general, todos los materiales poseen al menos un tipo de magnetismo, dependiendo su comportamiento de la respuesta del electrón y de los dipolos magnéticos atómicos cuando se aplica un campo magnético externo. Los principales tipos de magnetismo son:

- **Diamagnetismo:** forma muy débil de magnetismo que ocurre tan sólo mientras se aplica un campo magnético externo, produciéndose así un cambio en el movimiento orbital de los electrones del material. La magnitud del momento magnético inducido es extremadamente pequeña y en dirección opuesta al campo magnético ( $H$ ) aplicado (figura 33). La permeabilidad relativa es algo menor que la unidad y la susceptibilidad magnética es negativa. El diamagnetismo se encuentra en todos los materiales pero sólo puede observarse cuando otros tipos de magnetismo están totalmente ausentes. Esta forma de magnetismo no tiene interés práctico.



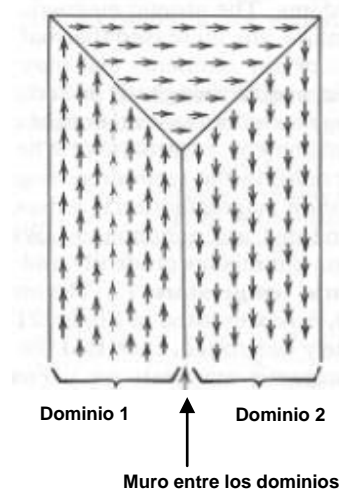
**Figura 33.** Esquema de los dipolos en un material diamagnético.

- **Paramagnetismo:** se debe a los electrones no apareados del material. A cada átomo se le asocia un momento magnético neto causado por el giro de los electrones. Cuando se aplica un campo magnético los dipolos se alinean con él, dando como resultado una magnetización positiva. Sin embargo, como los dipolos no interactúan entre sí, para alinearlos necesitamos campos magnéticos extremadamente grandes. Una vez que desaparece el gradiente magnético, la magnetización se pierde. Para algunos materiales sólidos cada átomo posee un momento dipolar permanente que en ausencia de un campo magnético externo se orienta al azar, de forma que una zona determinada del material no posee magnetización macroscópica neta. Esos dipolos atómicos rotan libremente dando paramagnetismo cuando se alinean de forma preferente con un campo magnético. Al alinearse estos dipolos con el campo magnético aplicado generan una permeabilidad relativa mayor que la unidad y una susceptibilidad magnética positiva (figura 34). Dentro de esta propiedad destaca el superparamagnetismo. Esta propiedad es consecuencia de un cambio cualitativo en la estructura de los materiales magnéticos nanométricos, que pasa de estar constituida por numerosos dominios magnéticos, a estar formada por un único dominio magnético o monodominio, lo que determina una reducción muy importante de la barrera de anisotropía magnética, provocando la desaparición de la histéresis (no hay campo coercitivo ni remanencia) [Álvarez Paneque y cols., 2008].



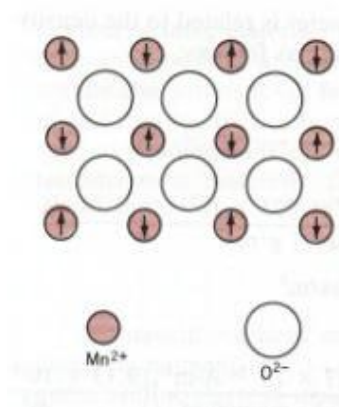
**Figura 34.** Esquema de los dipolos magnéticos en un material paramagnético

- **Ferromagnetismo:** Consiste en una fuerte interacción entre los momentos dipolares atómicos vecinos. Esta situación los mantiene alineados incluso cuando se suprime el campo magnético externo (figura 35). Que esto ocurra o no depende de la intensidad de los dipolos atómicos y de la separación entre los átomos del material. Se dice que existen átomos que podrían ser ferromagnéticos en una clase de material pero no en otra, porque su espaciamiento es diferente. Podemos disminuir la efectividad del acoplamiento entre átomos vecinos que causa el ferromagnetismo al aumentar la temperatura de una sustancia. La temperatura Curie es aquella a la cual un material ferromagnético se transforma en paramagnético.



**Figura 35.** Esquema de los dominios magnéticos en un material ferromagnético.

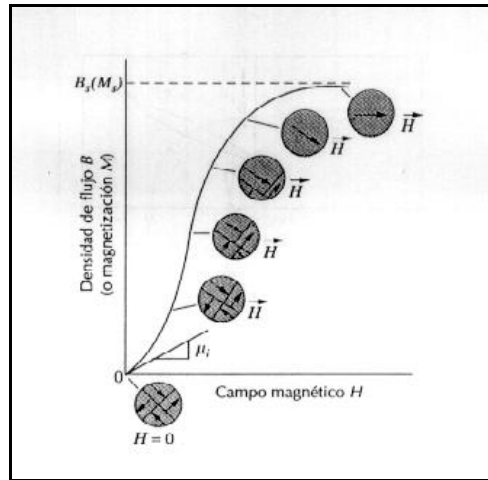
- **Antiferromagnetismo:** En este caso, la presencia de un campo magnético hace que los momentos magnéticos producidos en dipolos vecinos se alineen con el campo magnético en direcciones opuestas. Esto produce una magnetización nula (figura 36).



**Figura 36.** Orientación de los dominios magnéticos en un material antiferromagnético.

## 6.2 CICLO DE HISTÉRESIS

Cualquier material ferromagnético o ferrimagnético a temperatura inferior a la de Curie está formado por pequeñas regiones tridimensionales en las que todos los momentos magnéticos están alineados en la misma dirección [Callister, 1996]. Estas regiones se denominan dominios y cada uno está magnetizado hasta la saturación. Los dominios adyacentes están separados por paredes de dominio, a través de las cuales la dirección de imanación cambia gradualmente. La densidad de flujo ( $B$ ) y la intensidad del campo magnético ( $H$ ) no son proporcionales en el caso de los materiales ferromagnéticos. Si el material está inicialmente no imanado, entonces  $B$  varía en función de  $H$  según se muestra en la figura 36. La curva empieza en el origen, y a medida que aumenta  $H$ , la inducción  $B$  empieza a crecer lentamente y después más rápidamente hasta que al final alcanza un nivel determinado y se hace independiente de  $H$ . Este valor máximo de  $B$  es la densidad de flujo de saturación ( $B_s$ ) y la imanación correspondiente es la imanación de saturación ( $M_s$ ). Según la ecuación  $B = \mu \cdot H$ , la permeabilidad ( $\mu$ ) es la pendiente de la curva  $B$  frente a  $H$ , y se puede apreciar en la figura 37 que cambia con  $H$ . En algunas ocasiones, la pendiente de  $B$  frente a  $H$  (a  $H = 0$ ) se especifica como una propiedad del material, denominada permeabilidad inicial ( $\mu_i$ ), tal como se indica en la figura 37.

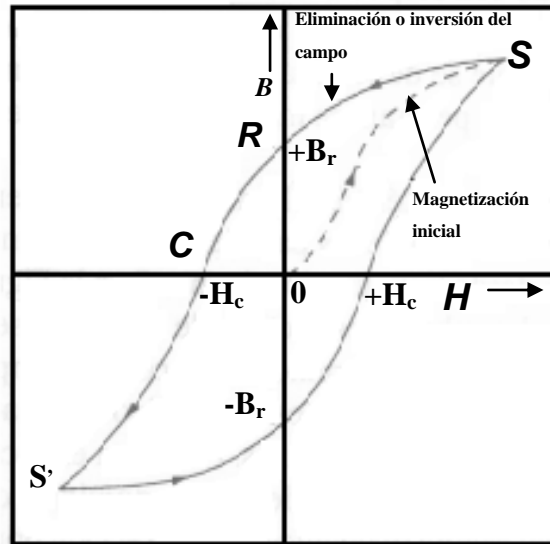


**Figura 37.** Comportamiento de  $B$  frente a  $H$  de un material ferromagnético que estaba inicialmente desmagnetizado. Se representan las configuraciones de los dominios durante varios estadios de la imanación.

A medida que se aplica el campo  $H$ , los dominios cambian de forma y tamaño debido al movimiento de los límites de dominio. Las estructuras típicas de los dominios están representadas de forma esquemática en varios puntos de la curva de la figura 37. Inicialmente, los momentos de los dominios constituyentes están orientados al azar, de tal manera que no existe un campo de momento neto  $B$  (o  $M$ ). A medida que se aplica el campo externo, los dominios que están orientados en direcciones favorables al campo aplicado (o casi alineado con él) crecen a expensas de aquellos que no están favorablemente orientados. Este proceso continúa al aumentar la intensidad del campo hasta que la muestra macroscópica se convierte en un solo dominio, el cual está casi completamente alineado con el campo. La saturación se alcanza cuando este dominio gira y se orienta con el campo  $H$ .

A partir de la saturación, punto S de la figura 38, 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,  $B_r$ . En este momento, el material permanece imanado en ausencia de un campo externo  $H$ .



**Figura 38.** 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; 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 38), el proceso mediante el cual 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, la 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  $B_r$ .

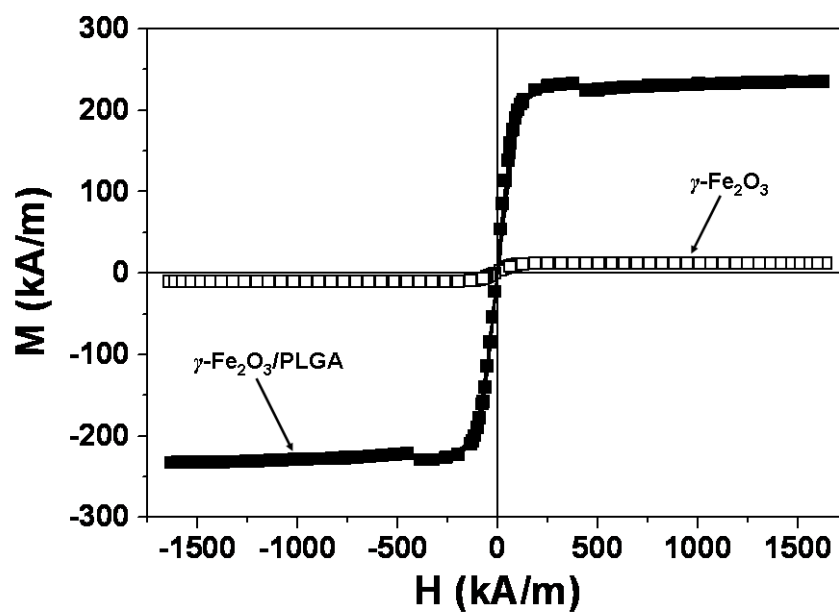
Para reducir a cero el campo  $B$  dentro de la muestra (punto C de la figura 38), se debe aplicar un campo  $H$  de magnitud a  $-H_c$  en la dirección opuesta a la del campo original.  $H_c$  se denomina coercitividad, o bien, algunas veces fuerza coercitiva. Al continuar aplicando el campo en la dirección contraria a la del campo original, tal como 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 8 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.

Las propiedades magnéticas de las partículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y las compuestas ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ) quedan muy bien definidas mediante la determinación del ciclo de histéresis de estos materiales a  $25.0\pm 0.5^\circ\text{C}$ . Estas determinaciones se realizaron utilizando un equipo magnetómetro-susceptibilímetro Manics DSM-8 (Paris).

La figura 39 contiene los ciclos de histéresis magnética de las nanopartículas de maghemita y partículas compuestas magnéticas. En el caso de la maghemita no observamos ciclo de histéresis como cabía esperar dado el carácter superparamagnético de esta. De las porciones lineales de las curvas podemos estimar una susceptibilidad inicial de  $\chi_i = 0.12\pm 0.02$  para nanomaghemita y  $\chi_i = 2.51\pm 0.11$  para las partículas mixtas magnéticas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ . El aumento de la magnetización de saturación ocurre cuando los núcleos magnéticos quedan englobados dentro de la poli(D,L-lactida-co-glicolida) siendo la susceptibilidad magnética en este caso,  $9\pm 2$  kA/m para

nanomaghemita y  $206 \pm 12$  kA/m para las partículas compuestas magnéticas. Las propiedades magnéticas de nanopartículas de maghemita ya quedaron descritas en literatura [Chatterjee y cols., 2003].

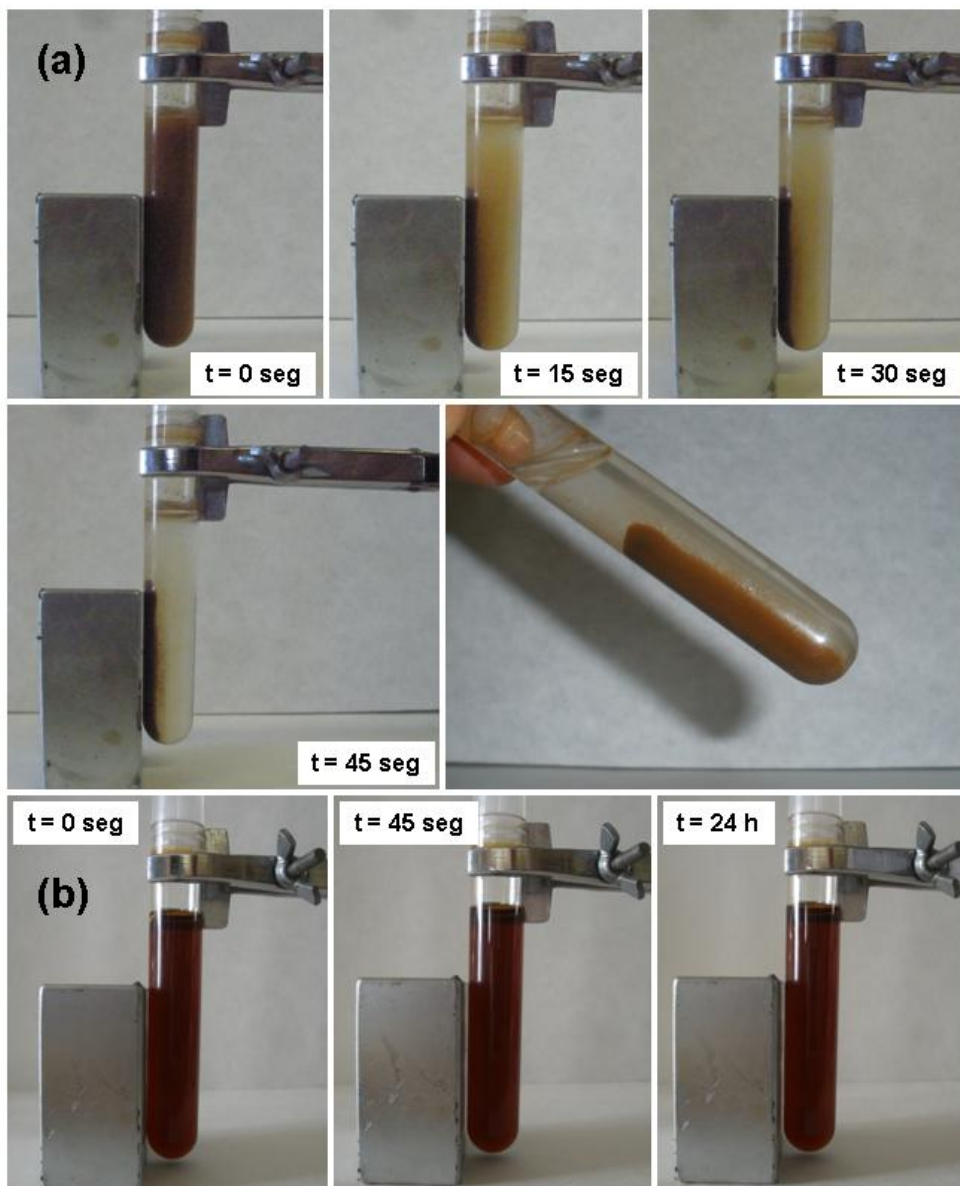
Por lo tanto, podemos concluir, que la gran magnetización de las partículas magnéticas mixtas las hace ideales en el diseño de sistemas coloidales transportadores de fármacos. Esto es gracias a su gran capacidad para responder a campos magnéticos aplicados, con los que se puede guiar el coloide de forma específica a la región diana (p. ej., una masa tumoral).



**Figura 39.** Ciclo de histéresis de las partículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (□) y de las partículas mixtas maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ) (■).

### **6.3. PRUEBA IN VITRO**

La capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados de las partículas de [maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), y maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ )] fue analizada cualitativamente mediante visualización del efecto que ejerce un imán permanente de 400 mT sobre una suspensión acuosa de estas partículas coloidales. Brevemente, se prepararon sendas suspensiones acuosas de los dos tipos de coloides con una concentración del 1% (p/v). A una temperatura de  $25.0\pm 0.5^\circ\text{C}$ , se puso en contacto la suspensión de [maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), y la de maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ )] con un gradiente magnético de 400 mT, observándose el comportamiento de las partículas magnéticas en estas condiciones. Como puede apreciarse en la figura 40, las nanopartículas magnéticas compuestas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  son atraídas muy rápidamente por el imán, lo que confirma las excelentes propiedades magnéticas del nanosistema diseñado. El sobrenadante queda completamente transparente en menos de 1 minuto. Sin embargo, esto no se observa en el caso de la dispersión acuosa de maghemita pura que mantiene su aspecto homogéneo incluso tras 24 horas de exposición al gradiente magnético externo, lo que pone de manifiesto que dichas partículas son superparamagnéticas.



**Figura 40.** Sedimentación magnética en función del tiempo de las partículas compuestas maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA) (a) y de las partículas de maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (b), en respuesta a un imán permanente de  $\approx 400$  mT.

## **6.4. PRUEBA DE CONCEPTO: GUIADO** **MAGNÉTICO *IN VIVO***

Con este método queremos investigar las posibilidades que ofrecen las nanopartículas compuestas en el guiado magnético de fármacos hasta el lugar de acción. Concretamente estudiamos la presencia del hierro que forma parte de las nanopartículas compuestas, en el tejido tumoral. Este estudio se hace basándose en la reacción química que se produce entre los núcleos de maghemita y el ferrocianuro potásico cuyo resultado es un precipitado azul verdoso de ferrocianuro férrico o azul de Prusia. Por esta reacción se tiñen las nanopartículas atraídas hacia la masa tumoral por el gradiente magnético aplicado permitiéndonos visualizar de manera eficaz su acumulación [Gang y cols., 2007].

Los experimentos *in vivo* se realizaron en el Departamento *Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie* de la Facultad de Farmacia de la Universidad Paris-Sud XI (Francia), gracias a la colaboración de la unidad *UMR CNRS 8612* dirigida por el Prof. Patrick Couvreur. Durante este estudio se respetaron las normativas francesas y europeas de cuidado y trabajo con animales de experimentación. Se utilizaron ratones DBA/2 con una edad  $\approx 5$  semanas y un peso  $\approx 17$  gramos. El mantenimiento de los roedores se realizó con comida estándar para ratón y agua *ad libitum*.

Mediante inyección se desarrollo el tumor subcutáneo L1210 en el costado lateral derecho superior de cada ratón con células de leucemia L1210 ( $\approx 10^6$  células/inyección) incorporadas en Matrigel™ (BD Biosciences, USA), una mezcla gelatinosa de naturaleza proteica, enriquecida al 30% con factores de crecimiento reducido, que reproduce el entorno extracelular precisado por las células tumorales para el desarrollo de un tumor sólido. Cinco días después de la inyección, tras pasar un

tiempo suficiente para que los animales exhibieran un tumor palpable en el lugar de inoculación (volumen: 50 - 100 cm<sup>3</sup>), se asignaron aleatoriamente los ratones a cada uno de los siguientes grupos ( $n= 6$ , para cada grupo): no tratados (grupo *control negativo*), tratados con nanocompuestos maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida) sin utilizar un gradiente magnético externo (grupo *no-GME*) y tratados con nanocompuestos maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida) guiados magnéticamente (aplicando un gradiente magnético externo de 1.1 Tesla sobre la masa tumoral durante 2 horas tras la administración intravenosa, grupo *GME*). Salvo el grupo *control*, el resto de ratones recibieron el tratamiento indicado anteriormente por vía intravenosa (en forma de bolo unidosis con una concentración de dextrosa del 5%, p/v) seis días después de la inoculación del tumor. Finalizado el tratamiento se sacrificaron los ratones y los tumores fueron aislados mediante cirugía. Durante las siguientes 12 horas, las masas tumorales fueron conservadas a  $4.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en una solución Finefix (Milestone, Italia) para, posteriormente, ser sometidos a ciclos consecutivos de lavado con etanol y tolueno y por último fijados en parafina durante 24 horas. Una vez realizado esto, se prepararon cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$  de grosor de las masas tumorales (dispositivo microtomo Accu-Cut<sup>®</sup> SRM<sup>™</sup> 200) para observación mediante microscopía óptica. Las muestras se fijaron con parafina en un portaobjetos y se conservaron en un horno de convección a  $56.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Finalmente, se eliminó la parafina de las muestras mediante ciclos consecutivos de lavado con tolueno y etanol, y lavado final con agua bidestilada.

Como dijimos anteriormente, la acumulación de las nanopartículas compuestas ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ) en el tejido tumoral fue evaluada cualitativamente en términos de contenido en hierro mediante la técnica de tinción histológica azul de Prusia [Gang y col., 2007]. Esta metodología basada en el tratamiento de los cortes histológicos con soluciones aciduladas de ferrocianuro potásico; en estas condiciones, los iones  $\text{Fe}^{+3}$  presentes en la masa tumoral reaccionan con el ferrocianuro, generando una pigmentación azul verdosa de ferrocianuro férrico o azul de Prusia. Hidratamos las

muestras con agua bidestilada para, posteriormente, ser sumergidas durante 20 minutos en una solución acuosa a partes iguales de ácido clorhídrico (20%, v/v) y ferrocianuro potásico (10%, p/v). Pasados los 20 minutos, los cortes histológicos fueron lavados con abundante agua bidestilada y teñidos durante 5 minutos con rojo nuclear sólido (*nuclear fast red*, Merck, Alemania). La tinción de los cortes histológicos acabo con el lavado de las muestras con agua bidestilada, alcohol absoluto y xileno, para finalizar con el montaje de las muestras en un portaobjetos y su posterior observación mediante microscopía óptica (magnificación: 40X). Para el control positivo de hierro, la muestra se preparo sometiendo los cortes histológicos de la masa tumoral de un ratón no tratado a una suspensión acuosa de maghemita (0.15%, p/v). A continuación, se lavó la muestra con agua bidestilada antes de someterla al test de tinción descrito. Los resultados representativos de esta *prueba de concepto* se recogen en la figura 41.

### FOTO

**Figura 41.** Test de tinción azul de Prusia de los tumores obtenidos de ratones no tratados (grupo *control negativo*), y tratados con nanocompuestos  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ : *i*) sin utilizar un gradiente magnético externo (grupo *no-GME*), y *ii*) aplicando un gradiente magnético de 1.1 Tesla sobre la masa tumoral durante 2 horas tras la administración intravenosa de la formulación (grupo *GME*). Las imágenes confirman una significativamente mayor acumulación de hierro (señalada por la tinción azul de Prusia) en el tejido tumoral del grupo *GME*, en comparación con el grupo *no-GME*.

Como podemos observar en la figura 41, los ratones tratados con la formulación desarrollada pero sin aplicar gradiente magnético apenas presentan contenido en hierro y por tanto, tampoco nanosistemas, todo esto queda indicado por una tinción azul de Prusia muy débil. Sin embargo en las muestras de masa tumoral tratadas con nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  que han sido guiadas al tejido diana con un gradiente magnético aplicado, en este caso la tinción azul de Prusia es más que evidente. Dados los resultados consideramos que la prueba de concepto sobre el guiado magnético de los nanocompuestos hasta el lugar de acción es satisfactoria, es por esto, que podemos aventurar que la vehiculización del agente quimioterápico en nuestro sistema transportador de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  logrará una mejora considerable en la acumulación selectiva de la dosis de este. Así, podría estimarse una importante mejora de la actividad antitumoral del fármaco cuando sea administrado incluido en estos nanocompuestos sensibles a campos magnéticos aplicados.





# **Capítulo 7:**

## **Capacidad de vehiculización de fármacos**



## 7.1. GENERALIDADES

Para que un fármaco actúe es imprescindible que llegue en cantidad suficiente a las células sensibles a él. En el caso de fármacos antitumorales pretendemos asegurar la máxima acumulación del principio activo en el lugar diana para así aumentar su eficacia terapéutica. A esto hay que sumarle que las nuevas estrategias farmacoterapéuticas buscan minimizar los fenómenos de toxicidad derivados de estos tratamientos y el desarrollo de resistencias frente a estos de las células diana [Flórez, 2008]. Por todo esto, uno de los campos que está siendo más estudiado como vemos en el capítulo 1, es el uso de coloides como sistemas transportadores de fármacos al tejido u órgano diana. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el uso sistemas transportadores basados en nanopartículas, incrementan la captación del principio activo por la célula diana, aumentando por consiguiente la eficacia del fármaco y minimizando las reacciones adversas derivadas de su uso. [Arias, 2008, 2011; Arias y cols., 2009; González-Rodríguez y cols., 2003; Yong y cols., 2005].

En este capítulo, nuestro objetivo es conseguir la aplicación del coloide magnético para el transporte del fármaco antitumoral clorhidrato de gemcitabina investigando la vehiculización de este. Para ello realizaremos en primer lugar la valoración del principio, activo utilizando el método espectrofotométrico se determinara la longitud de onda de máxima absorbancia y coeficiente de absortividad molar construyéndose la recta de regresión para así comprobar que es un método lineal, preciso y exacto. Estos datos nos servirán posteriormente para determinar la capacidad de vehiculización del principio activo sobre las preparaciones coloidales elaboradas. Realizaremos un estudio cuantitativo, mediante espectrofotometría UV-Vis, de la adsorción superficial del fármaco y por último la caracterización *in vitro* del proceso de liberación de los fármacos desde las nanopartículas, así como la estimación de sus cinéticas correspondientes.

Según lo expuesto en el capítulo 1, puede esperarse que el uso de nanopartículas biodegradables constituidas por un núcleo magnético (maghemita) y un recubrimiento polimérico [poli(D,L-lactida-*co*-glicolida)] permita el transporte controlado de dosis de fármaco vehiculado hasta el tejido u órgano diana. En este caso, podríamos sumar a los beneficios ya comentados sobre el uso de este tipo de nanotransportadores, [Durán y cols., 2008; Pouliquen y Chouly, 1999; Senyei y cols., 1978], los derivados de la mejora de su perfil farmacocinético (rápida metabolización: semivida plasmática tras administración intravenosa de 8-17 minutos) [Arias y cols., 2009], pudiéndose incluso llegar a vencer los fenómenos de resistencia que las células cancerosas lograran desarrollar [Durán y cols., 2008].

## **7.2 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS DE LAS DISOLUCIONES DE FÁRMACO**

### **7.2.1 ABSORBANCIA ÓPTICA DE LAS DISOLUCIONES**

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

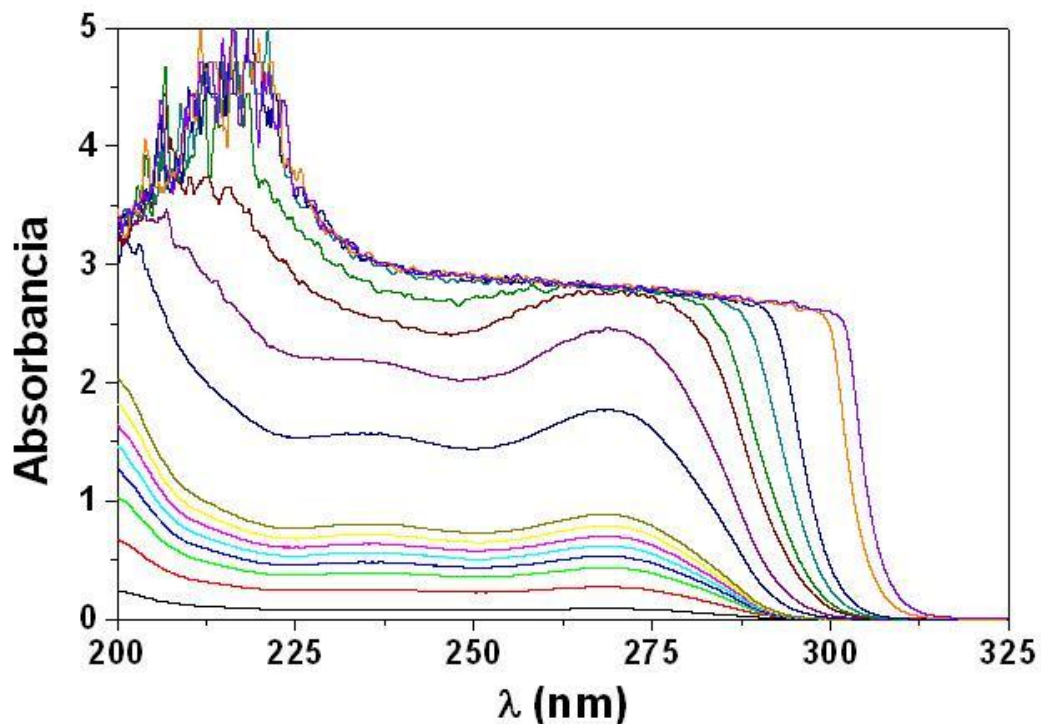
En el análisis espectrofotométrico, lo primero es establecer las condiciones de trabajo y preparación de la curva de calibrado que nos relaciona la absorbancia con la concentración del fármaco a estudiar. Normalmente, realizamos las medidas de absorción a la longitud de onda correspondiente al pico de máxima absorbancia ya que el cambio en la absorbancia por unidad de concentración es mayor en este pico obteniendo una mayor sensibilidad. Además, bajo estas circunstancias se puede esperar un mejor cumplimiento de la ley de Beer, y las medidas son menos sensibles a las incertidumbres que surgen de las limitaciones del instrumento [Skoog y cols., 2001].

Por otro lado, dado que la metodología de síntesis de nuestros coloides determina las condiciones de trabajo (el fármaco se encontrará disuelto en un medio acuoso diseñado para la precipitación del polímero en forma de nanopartículas), es realmente importante clarificar las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de fármaco. Este estudio se realizó prestando especial atención a su concentración, a la temperatura y al pH de las disoluciones utilizadas. Debido a la fotosensibilidad del fármaco [Florey, 1973 a, b], por cautela siempre se procedió con diligencia en la preparación y manipulación de las soluciones de esta molécula activa, conservando siempre las disoluciones preparadas en recipientes cubiertos con papel de aluminio.

Se investigaron las condiciones óptimas de conservación durante 24 horas según la concentración molar de fármaco (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-3}$ ), la temperatura (4 y 25°C) y el pH de las disoluciones (pH natural = 5.2, pH = 7.4 ajustado con un tampón NaOH- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). A pesar de no observar alteraciones macroscópicas de las disoluciones de fármaco pasadas 24h conservamos las disoluciones siempre a 4°C hasta ser utilizadas para ralentizar posibles procesos de degradación. Definidas las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de gemcitabina clorhidrato, en primer lugar se determinó la longitud de onda de máxima absorbancia y se calculó el coeficiente de absortividad molar de este agente anticanceroso, información de suma

utilidad en los estudios de vehiculización en las nanoplataformas diseñadas. En segundo lugar, transcurridas 24 horas desde su preparación, se determinó el espectro de absorción UV-Vis de cada una de las disoluciones de gemcitabina clorhidrato (en el intervalo de concentración  $10^{-5}$  -  $10^{-2}$  M), realizando un barrido de longitudes de onda desde 500 a 200 nm, con intervalos de 0.2 nm. Se utilizó como blanco en la calibración previa del aparato agua bidestilada para eliminar las posibles interferencias en el espectro del fármaco generadas por el medio de disolución.

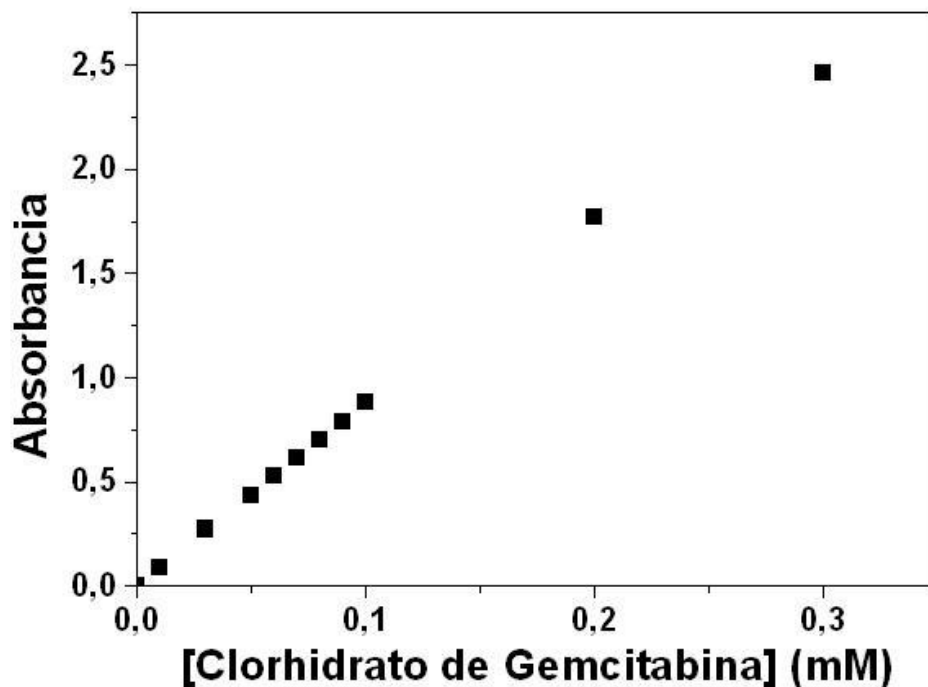
La figura 42 muestra los resultados de este estudio, donde solo observamos señal por debajo de 325nm, en esta gráfica podemos ver como la absorbancia de la muestra aumenta al aumentar la concentración de fármaco en el medio. Podemos apreciar dos máximos en el espectro, aunque solo el correspondiente a 269nm presenta una longitud de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones, siendo esta la longitud de onda que usaremos en nuestras determinaciones. Por otro lado, vemos como a partir de concentraciones superiores a  $10^{-4}$  M ambos picos tienden a fusionarse provocando una disminución de la longitud de onda de máxima absorbancia a la vez que la concentración aumenta por encima de  $10^{-4}$  M. Esto determina la imposibilidad de realizar una estimación fiable a elevadas concentraciones, mediante espectrofotometría UV-Vis, de la cantidad de fármaco presente en disolución, ya que el rango de concentraciones posibles para un valor de absorbancia determinado es muy variable. Esta desviación manifiesta de la ley de Beer podría justificarse por el hecho de que, aunque normalmente el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a  $10^{-2}$  M, el clorhidrato de gemcitabina pertenece al grupo de moléculas orgánicas para las que se han descrito excepciones a este comportamiento.



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

La determinación del coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y concentración mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue  $\epsilon = 8330 \pm 130 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $r = 0.998$ ). En la figura 43 se muestran los datos y la recta de ajuste. Es destacable cómo los valores de absorbancia a diferentes concentraciones obtenidos a 269 nm cumplen la ley de Beer.





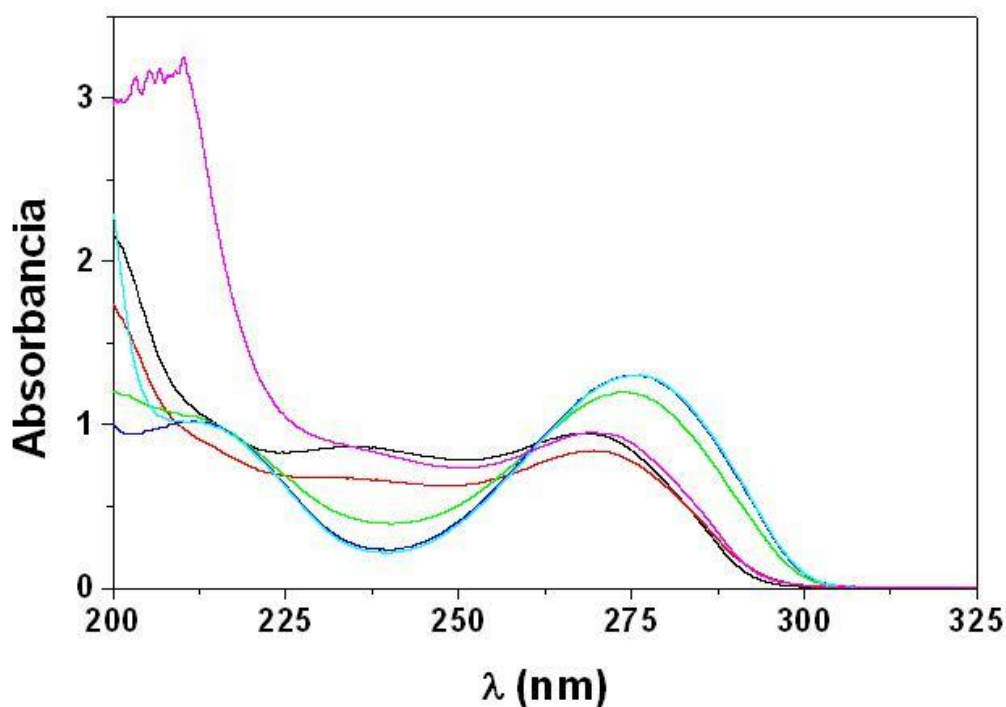
**Figura 43.** Determinación del coeficiente de absorptividad molar de las disoluciones de clorhidrato de gemcitabina a la longitud de onda de máxima absorción (269 nm).

### 7.2.2. FACTORES EXPERIMENTALES CONDICIONANTES

Una vez determinadas las condiciones óptimas de preparación y conservación de las disoluciones acuosas de nuestro fármaco, el siguiente paso es establecer hasta que punto influyen en sus propiedades espectrofotométricas la exposición a diferentes condiciones de pH.

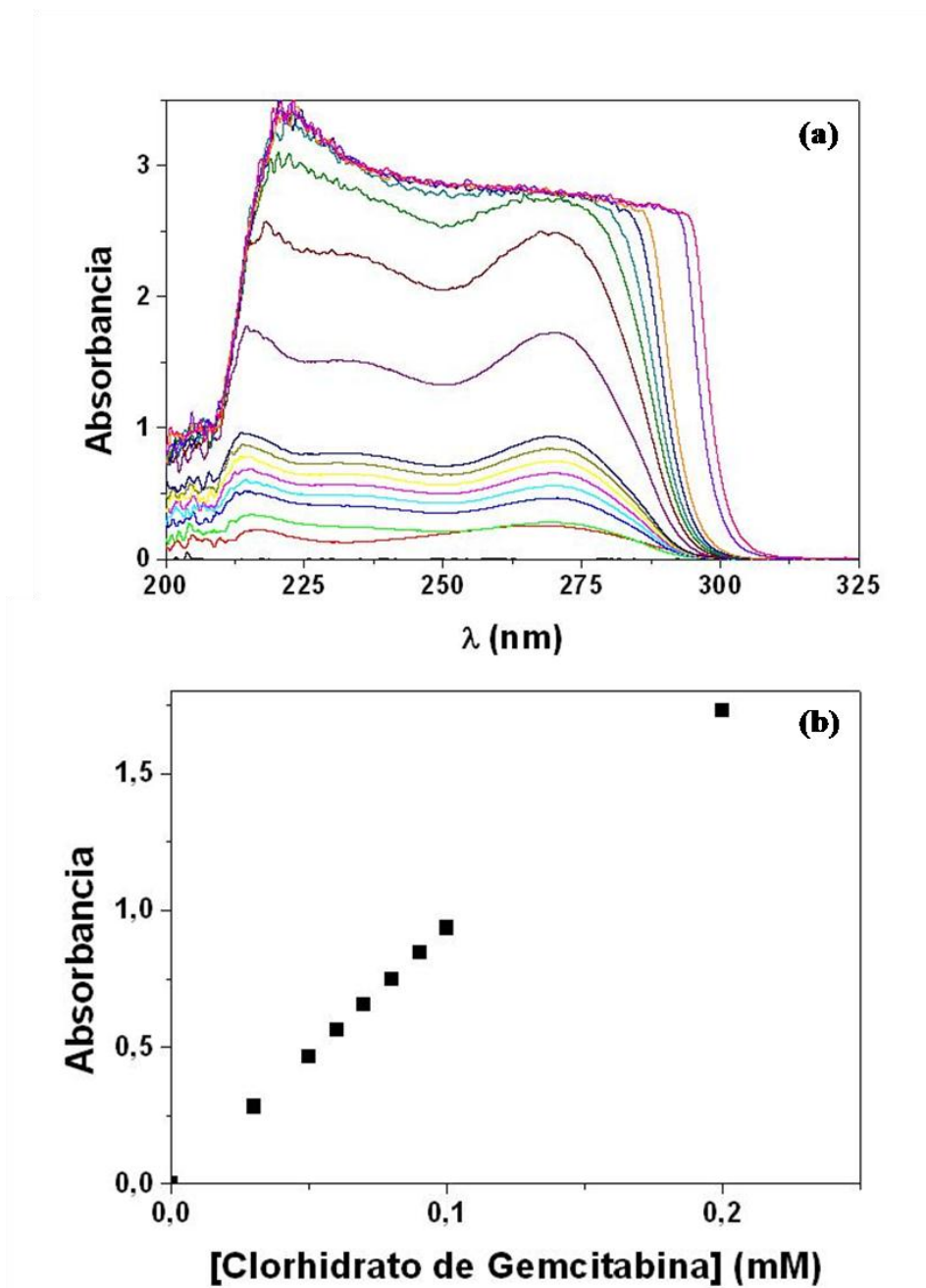
Para ello se prepararon disoluciones a pH natural (5.6) y pH 7.4 (tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) utilizando un intervalo de concentraciones de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-1</sup> M, concretamente se

prepararon disoluciones a  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$  M. El espectro UV-Vis se obtuvo tras 24 horas de conservación de las disoluciones a 4 °C, protegidas de la luz con papel de aluminio (figura 44). Los valores de absorbancia óptica a 269 nm decrecen claramente cuando el fármaco queda expuesto a un pH 7.4 a concentraciones inferiores a  $10^{-3}$  M lo cual es lógico si se tiene en cuenta que bajo estas condiciones se favorece la transformación (degradación) del agente quimioterápico.



**Figura 44.** Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones de gemcitabina clorhidrato ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$  M) preparadas utilizando agua bidestilada (pH natural 5.6) o tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4).

Estos cambios en la absorbancia UV-Vis a pH 7.4 nos hacen intuir que el coeficiente de absorptividad molar calculado a pH 5.6 no será válido en estas condiciones de medida. Por lo que dado que las medidas espectrofotométricas que realizaremos para caracterizar la liberación *in vitro* de este fármaco desde las nanoplataformas sintetizadas se realizarán a pH 7.4, preparamos una nueva curva de calibrado con una batería de disoluciones acuosas de gemcitabina a dicho pH. En la figura 45a podemos ver dos máximos por debajo de 600 nm. El primero de ellos ( $\lambda = 269$  nm) será el que utilicemos en las medidas espectrofotométricas de la liberación de fármaco. Por encima de  $3 \cdot 10^{-4}$  M, los máximos tienden a fusionarse en uno (hecho que ocurre a  $5 \cdot 10^{-4}$  M) por lo que no se pueden realizar medidas a estas concentraciones ya que para un único valor de absorbancia, el rango de concentraciones posibles es muy variable. El coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) fue calculado mediante el ajuste de datos de absorbancia y concentración con el método de los mínimos cuadrados (figura 45b). Obteniendo unos valores de  $\epsilon = 8648 \pm 175 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $r = 0.998$ ).



**Figura 45.** (a) Espectro de absorbancia UV-Vis de disoluciones de clorhidrato de gemcitabina preparadas utilizando un tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4). Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son:  $10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $9 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $7 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M. (b) Determinación del coeficiente de absorptividad molar de las disoluciones de clorhidrato de gemcitabina a pH  $7.4 \pm 0.1$  (269 nm).

### 7.2.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Previo al análisis de la cantidad de fármaco vehiculizado o liberado por los coloides el método espectrofotométrico UV-Vis debe ser validado para verificar su exactitud, precisión y linealidad. Para lo que preparamos replicas de disoluciones acuosas a concentraciones de fármaco entre  $10^{-5}$  M y  $7 \cdot 10^{-4}$  M y a pH 7.4 (utilizado en los ensayos de liberación *in vitro*).

La tabla 4 recoge los valores de absorbancia de las disoluciones acuosas de gemcitabina a pH natural. Mostramos los valores medios de absorbancia, desviaciones estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.) para cada concentración. Las mínimas diferencias entre los valores de los coeficientes de variación (<5% en todos los casos) indican la precisión del método. El ajuste lineal de la relación absorbancia (A) – concentración molar (C) [ $A = (0.02 \pm 0.01) + (8331.4 \pm 133) \cdot C$ ] es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.8%.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
$10^{-5}$	$0.086 \pm 0.002$	2.32
$3 \cdot 10^{-5}$	$0.254 \pm 0.001$	0.39
$5 \cdot 10^{-5}$	$0.419 \pm 0.007$	1.67
$6 \cdot 10^{-5}$	$0.506 \pm 0.004$	0.79
$7 \cdot 10^{-5}$	$0.601 \pm 0.013$	2.16
$8 \cdot 10^{-5}$	$0.692 \pm 0.015$	2.17
$9 \cdot 10^{-5}$	$0.783 \pm 0.015$	1.92
$10^{-4}$	$0.871 \pm 0.015$	1.72
$2 \cdot 10^{-4}$	$1.741 \pm 0.035$	2.01
$3 \cdot 10^{-4}$	$2.464 \pm 0.015$	0.61
$4 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.868 \pm 0.019$	2.19
$5 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.862 \pm 0.026$	3.02
$7 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.869 \pm 0.021$	2.42

**Tabla 4.** Absorbancia (media  $\pm$  D.E.) de las soluciones de clorhidrato de gemcitabina para cada una de las concentraciones indicadas. Las concentraciones por encima de  $3 \cdot 10^{-4}$  M fueron adecuadamente diluidas hasta  $10^{-4}$  M, antes de realizar la medida. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio.

Tras comprobar la precisión del método, pasamos a comprobar su exactitud utilizando los datos de absorbancia de las concentraciones de la tabla 4 denominadas concentración verdadera en la tabla 5. De esta manera las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas como concentraciones estimadas en la tabla Y. Al igual que antes, valores pequeños de C.V. y sus errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico.

Verdadera (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
$10^{-5}$	$(1.03 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	2.91	1.94
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.05 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	1.64	0.33
$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.03 \pm 0.11) \cdot 10^{-5}$	0.59	2.19
$6 \cdot 10^{-5}$	$(6.07 \pm 0.06) \cdot 10^{-5}$	1.15	0.99
$7 \cdot 10^{-5}$	$(7.22 \pm 0.17) \cdot 10^{-5}$	3.04	2.35
$8 \cdot 10^{-5}$	$(8.31 \pm 0.22) \cdot 10^{-5}$	3.73	2.65
$9 \cdot 10^{-5}$	$(9.39 \pm 0.26) \cdot 10^{-5}$	4.15	2.77
$10^{-4}$	$(1.05 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	4.76	1.91
$2 \cdot 10^{-4}$	$(2.09 \pm 0.05) \cdot 10^{-4}$	4.31	2.39
$3 \cdot 10^{-4}$	$(2.96 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	1.35	1.01
$4 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$(1.04 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	3.85	1.92
$5 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$(1.03 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	2.91	0.97
$7 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$(1.04 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	3.85	1.92

**Tabla 5.** Comparación de las concentraciones “actuales” de clorhidrato de gemcitabina en solución con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de  $3 \cdot 10^{-4}$  M fueron diluidas hasta  $10^{-4}$  M, antes de realizar la medida. Los valores “estimados” son la media ( $\pm$  D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado – actual)/estimado], también se muestran los C.V.

La misma metodología se usó para la gemcitabina clorhidrato (tabla 6) a pH 7.4 (tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), demostrando los bajos valores de los coeficientes de variación, (<5%, en todos los casos, la precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A) - concentración molar (C) [ $A = (0.037 \pm 0.016) + (8648.13 \pm 175,3) \cdot C$ ] se confirma estadísticamente, con un error

inferior al 0.01%. Por último, la exactitud del método analítico se demostró tal y como ha sido descrito en el caso anterior (tabla 7)

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
$10^{-5}$	$0.085 \pm 0.001$	1.18
$3 \cdot 10^{-5}$	$0.272 \pm 0.006$	2.21
$5 \cdot 10^{-5}$	$0.446 \pm 0.008$	1.79
$6 \cdot 10^{-5}$	$0.531 \pm 0.022$	4.14
$7 \cdot 10^{-5}$	$0.625 \pm 0.013$	2.08
$8 \cdot 10^{-5}$	$0.717 \pm 0.011$	1.53
$9 \cdot 10^{-5}$	$0.803 \pm 0.025$	3.11
$10^{-4}$	$0.907 \pm 0.015$	1.65
$2 \cdot 10^{-4}$	$1.729 \pm 0.031$	1.79
$3 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.911 \pm 0.018$	1.98
$4 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.902 \pm 0.015$	1.66
$5 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.898 \pm 0.011$	1.22
$7 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.892 \pm 0.015$	1.68

**Tabla 6.** Absorbancia (media  $\pm$  D.E.) de las soluciones de clorhidrato de gemcitabina para cada una de las concentraciones indicadas, en presencia tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de pH = 7.4. Las concentraciones por encima de  $2 \cdot 10^{-4}$  M fueron adecuadamente diluidas hasta  $10^{-4}$  M, antes de realizar la medida. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio.



Verdadera (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
$10^{-5}$	$(9.83 \pm 0.05) \cdot 10^{-6}$	1.73	0.51
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.14 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	4.46	0.64
$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.16 \pm 0.08) \cdot 10^{-5}$	3.11	1.55
$6 \cdot 10^{-5}$	$(6.14 \pm 0.06) \cdot 10^{-5}$	2.28	0.98
$7 \cdot 10^{-5}$	$(7.22 \pm 0.12) \cdot 10^{-5}$	3.05	1.66
$8 \cdot 10^{-5}$	$(8.29 \pm 0.14) \cdot 10^{-5}$	3.49	1.69
$9 \cdot 10^{-5}$	$(9.28 \pm 0.32) \cdot 10^{-5}$	3.02	3.45
$10^{-4}$	$(1.05 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	4.81	3.81
$2 \cdot 10^{-4}$	$(1.99 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	0.51	2.01
$3 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$(1.05 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	4.76	2.86
$4 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$(1.04 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	3.85	1.92
$5 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$(1.04 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	3.85	2.88
$7 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$(1.03 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	2.91	1.94

**Tabla 7.** Comparación de las concentraciones “actuales” de clorhidrato de gemcitabina en solución con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de  $2 \cdot 10^{-4}$  M fueron diluidas hasta  $10^{-4}$  M, antes de realizar la medida. Los valores “estimados” son la media ( $\pm$  D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado – actual)/estimado], también se muestran los C.V.

Como conclusión, tras el estudio realizado podemos afirmar que el método espectrofotométrico queda validado en todos los casos, pudiendo usar dichos coeficientes de absortividad para evaluar la concentración de nuestro fármaco en disoluciones de concentración desconocida.

#### **7.2.4. DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE FÁRMACO EN LAS NANOPARTÍCULAS. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO**

Para determinar cuantitativamente la incorporación del antitumoral clorhidrato de gemcitabina a las nanopartículas magnéticas diseñadas nos basamos en la metodología establecida por otros autores [Fawaz y cols., 1997; Müller y cols., 1991; Sullivan y Birkinshaw, 2004] para cuantificación del fármaco vehiculado y liberado por diferentes tipos de sistemas coloidales y que ha sido puesta a punto por nuestro grupo de investigación [Arias y cols., 2008a, b, c]. Concretamente, esta técnica se basa en la aplicación de la Ley de Lambert Beer a un medio con más de un tipo de sustancia absorbente. La absorbancia total de un sistema multicomponente queda determinada por la suma de las absorbancias de cada una de las especies existentes, siempre que no existan interacciones entre ellas. Así, aceptamos que existe contribución por parte de cada una de las sustancias presentes en el medio de dispersión y/o preparación de nuestro nanosistema a la absorbancia total del mismo.

En la vehiculización del clorhidrato de gemcitabina pueden considerarse sustancias susceptibles de contribuir en la absorción total: el principio activo no incorporado en el nanotransportador, residuos de síntesis y degradación del sistema, y resto de componentes del medio, como el PVA. Por lo que puede estimarse la cantidad de fármaco que no ha sido incorporada al sistema transportador restando a la absorción total del sistema la correspondiente a las sustancias presentes. En definitiva, determinaremos la cantidad total de fármaco vehiculado por diferencia entre concentración inicial y final de fármaco en el medio de síntesis. [Arias y cols., 2008 d, 2010 a, 2011 b].

### **7.3 INCORPORACIÓN SUPERFICIAL DEL FÁRMACO**

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

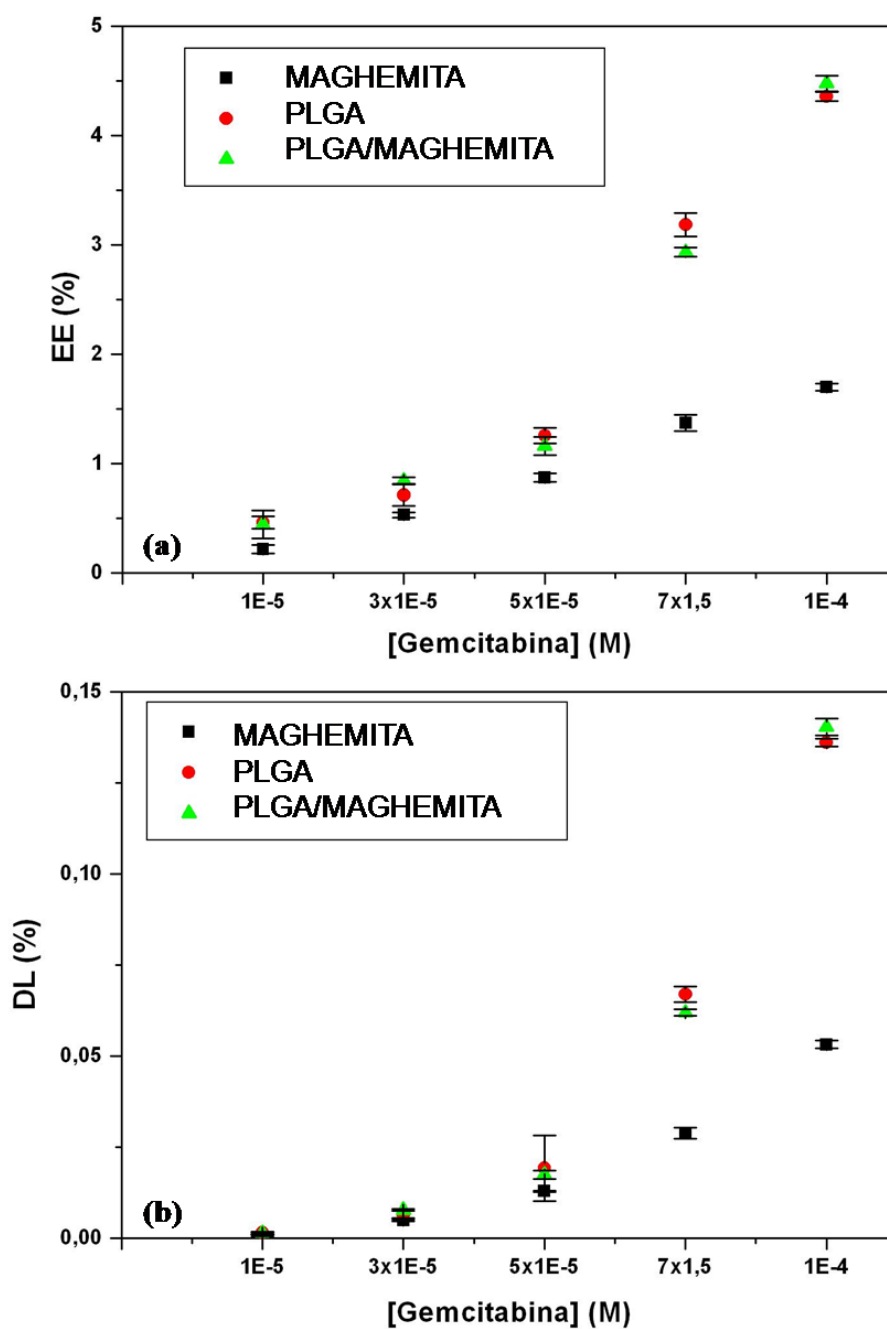
Para estudiar la adsorción del clorhidrato de gemcitabina en los nanotransportadores diseñados nos centramos en la evaluación del grado de unión a la superficie como mecanismo coadyuvante a la captación del fármaco por el polímero (PLGA) y las partículas compuestas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA). Además realizaremos el estudio de la adsorción en los núcleos de maghemita para una posterior aplicación en la incorporación del fármaco en el interior de la matriz del sistema transportador. En ambos casos realizaremos determinaciones espectrofotométricas para valorar la fijación del principio activo.

### 7.3.1 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

Para determinar la adsorción superficial del fármaco sobre las nanopartículas partimos de una serie de disoluciones acuosas de 10mL, con distintas concentraciones molares de principio activo ( $10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$  y  $10^{-4}$ ). En el medio de dispersión añadimos una concentración de nanopartículas del 1% (p/v) en todos los casos, tomando una muestra del medio de dispersión antes de añadir el principio activo como blanco de las determinaciones espectrofotométricas. Pasadas 24 horas de contacto entre partículas y fármaco a  $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  y bajo agitación mecánica (50 rpm), separamos los sobrenadantes mediante doble centrifugación durante 40 minutos en el caso del polímero y 60 minutos en el caso de la maghemita y las partículas compuestas de maghemita y PLGA. Estos experimentos se realizaron por triplicado en los 3 casos para cada una de las concentraciones de fármaco.

El cálculo de la adsorción superficial de fármaco en los tres tipos de nanopartículas se realizó mediante la comparación de la absorbancia de las muestras del medio (tomadas antes de añadir los coloides) con los sobrenadantes obtenidos tras una doble centrifugación de las suspensiones con fármaco, y una vez eliminada la contribución a la absorbancia total del sistema de los residuos o subproductos del experimento de adsorción [Arias y cols., 2010 b]. La cantidad de fármaco incorporado en la superficie de las nanopartículas se expresa en términos de eficacia de atrapamiento (*entrapment efficiency, EE%*) [(fármaco vehiculizado (mg)/cantidad total de fármaco utilizado (mg))x100] y de carga de fármaco (*drug loading, DL%*) [(fármaco vehiculizado (mg)/masa total del sistema transportador (mg))x100] [Arias y cols., 2009; Brigger y cols., 2004].

Los resultados de adsorción de gemcitabina obtenidos en los tres tipos de nanopartículas (figura 46) muestran una mínima adsorción de este fármaco sobre la superficie polimérica (polímero puro y nanopartículas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA), esta adsorción puede deberse a la atracción electrostática entre el fármaco cargado positivamente y el polímero cargado negativamente. Existiendo además una repulsión electrostática por parte de las nanopartículas de maghemita. En cualquier caso y, tal como es de esperar, la vehiculización de fármaco a nivel superficial resulta ser bastante baja (figura 44). Concretamente, los valores máximos de *EE*% es  $\approx 1.69\%$ ,  $\approx 4.35\%$  y  $\approx 4.47\%$ , en el caso de la  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA respectivamente. Esta mínima vehiculización queda mejor explicada teniendo en cuenta los valores de *DL* % obtenidos:  $\approx 0.0531\%$ ,  $\approx 0.136\%$  y  $\approx 0.14\%$  en  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA, respectivamente. Desde un punto de vista termodinámico podríamos justificar la baja incorporación superficial del fármaco hidrófilo a la superficie de nuestro sistema hidrófobo a pesar de la favorable interacción electrostática comentada. Por otro lado, la existencia de cierta adsorción de este fármaco hidrófilo en la superficie de los núcleos magnéticos (a pesar de la repulsión electrostática comentada) puede explicarse si tenemos en cuenta el carácter hidrófilo de éstos últimos.



**Figura 46.** Valores de *EE* (%) (a) y *DL* (%) (b) del clorhidrato de gemcitabina en la superficie de las nanopartículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ■), poli(D,L-lactida-*co*-glicolida (PLGA, ●) y maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA, ▲) en función de la concentración molar de fármaco.

## **7.4. INCORPORACIÓN EN MATRIZ DEL FÁRMACO**

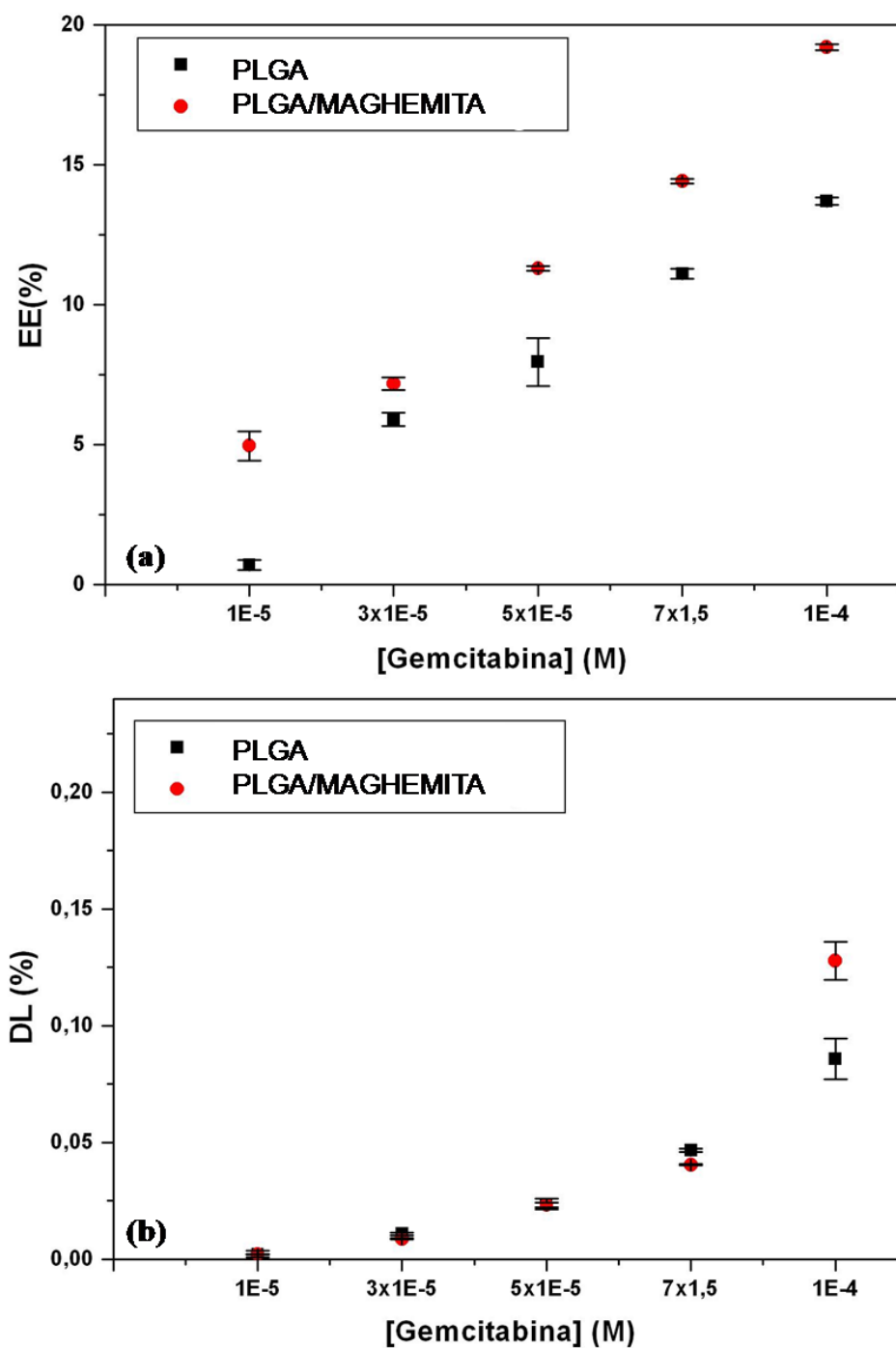
El siguiente paso de nuestro estudio, tras confirmar la escasa adsorción del clorhidrato de gemcitabina en la superficie de nuestras nanopartículas, es el análisis del que, por norma general, es el principal método de vectorización de fármacos en sistemas transportadores, es decir, la incorporación del principio activo durante la síntesis del nanotransportador. El principal factor que influye en esta incorporación es la concentración del propio fármaco. De esta manera, pretendemos definir las condiciones de vehiculización óptimas que permiten la incorporación máxima del principio activo en el sistema transportador magnético coloidal que proponemos. El análisis de la influencia de la concentración de nuestro principio activo sobre su incorporación en la matriz polimérica se realizó mediante el procedimiento de síntesis y determinación espectrofotométrica ya descritos y justificados anteriormente.

La única modificación del proceso de síntesis de las nanopartículas de PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA fueron las distintas concentraciones de fármaco utilizadas entre 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-4</sup> M. Para favorecer la incorporación de los fármacos en al interfase  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA y así lograr una mayor vehiculización, mantuvimos en contacto durante 24 horas (25.0±0.5°C y 50 rpm) los núcleos de óxido de hierro con las moléculas de fármaco antes de llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA. Los experimentos se repitieron por triplicado para cada una de las concentraciones molares de fármaco.

La determinación de la absorción de fármaco en la matriz de las nanopartículas se realizó mediante la comparación de la absorbancia de las muestras del medio (tomadas antes de llevar a cabo la síntesis) con los sobrenadantes obtenidos tras una doble centrifugación de las suspensiones de nanopartículas formuladas, y una vez eliminada la contribución a la absorbancia total del sistema de los residuos o subproductos del experimento de adsorción [Arias y cols., 2010 b]. Como en la adsorción en superficie, la cantidad de fármaco incorporado en la matriz de las nanopartículas se ha expresado en términos de *EE* y *DL* (%) [Arias y cols., 2009; Brigger y cols., 2004].

La cantidad de clorhidrato de gemcitabina absorbida por las nanopartículas del polímero PLGA y las nanopartículas compuestas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA, quedan recogidas en la figura 47. Podemos ver como la absorción aumenta al aumentar la concentración de fármaco en el medio de síntesis, lo que nos indica un efecto positivo del aumento de dicha concentración en la eficacia de la vehiculización en ambos casos, efecto que aparece descrito en la bibliografía encontrada sobre el desarrollo de sistemas coloidales para el transporte de fármacos. [Arias y cols., 2008a, b, c, 2011b; Ulbrich y Šubr, 2004].





**Figura 47.** Valores de *EE* (%) (a) y *DL* (%) (b) del clorhidrato de gemcitabina en la matriz polimérica de las nanopartículas de poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) (PLGA, ■) y maghemita/poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA, ●) en función de la concentración molar de fármaco.

Como podemos comprobar, los valores obtenidos mediante el procedimiento de absorción en matriz de fármaco son claramente superiores a los conseguidos mediante el procedimiento de adsorción en superficie, esto justifica la selección de este método de vehiculización para la síntesis de partículas compuestas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA). Por ejemplo, para la máxima concentración de fármaco utilizada, el valor máximo de *EE* (%) conseguido en las nanopartículas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA pasa de  $\approx 4.47\%$  mediante el método de adsorción (figura 46) a  $\approx 19.19\%$  mediante el método de absorción.

### 7.5 LIBERACION DE FÁRMACO

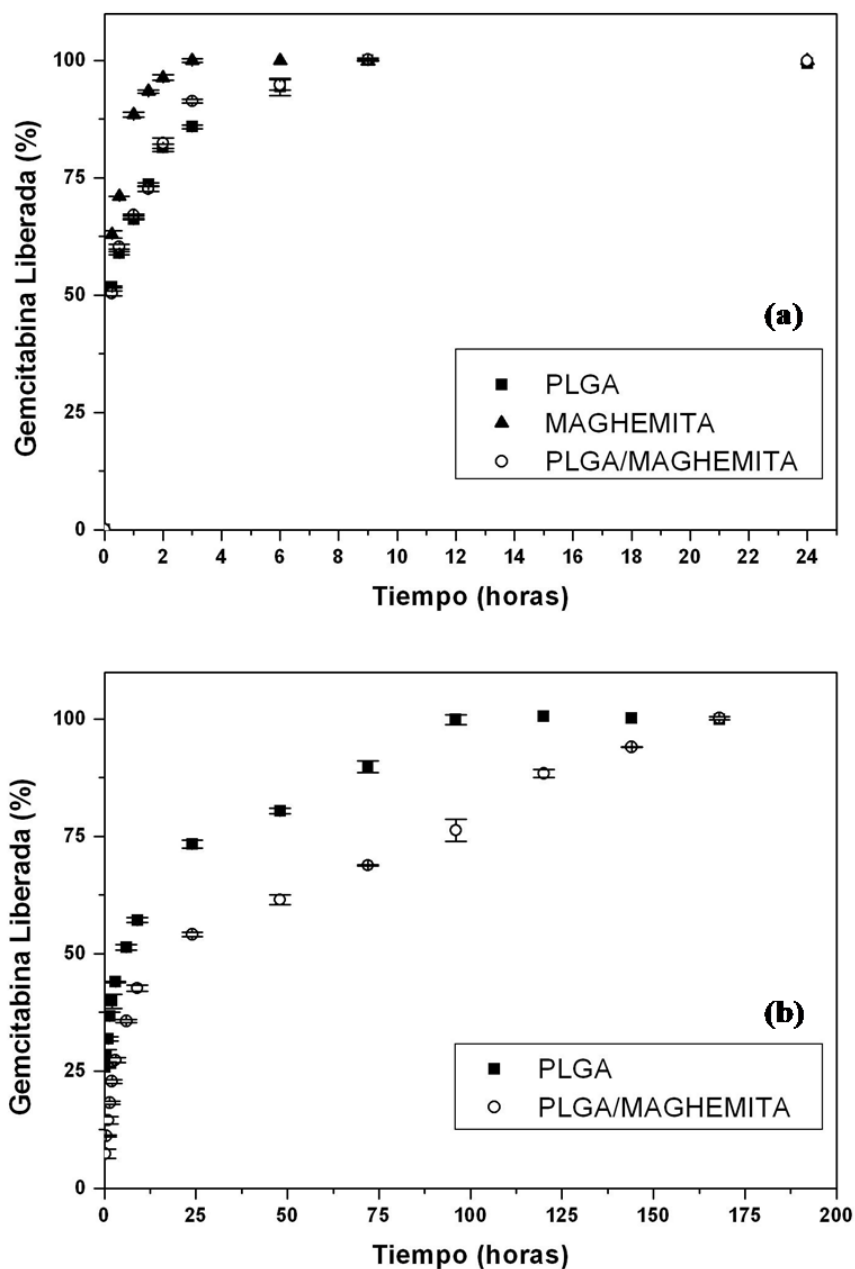
Anteriormente hemos definido las condiciones óptimas de vehiculización del antitumoral gemcitabina clorhidrato en el polímero PLGA y las partículas compuestas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA. El siguiente paso es usar las condiciones definidas para preparar los nanosistemas de maghemita para realizar los ensayos de liberación *in vitro* desde el polímero y partículas compuestas, en ambos ensayos usamos una concentración de 10<sup>-4</sup> M de clorhidrato de gemcitabina.

Como en los ensayos de adsorción y absorción, realizamos el ensayo de liberación *in vitro* por triplicado a 37.0 $\pm$ 0.5°C. Para la realización de este ensayo usamos el método de diálisis y como medio de liberación usamos tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH= 7.4 $\pm$ 0.1) como medio de liberación. Previo al ensayo dejamos las bolsas de diálisis sumergidas en agua bidestilada 12h. Las bolsas de diálisis utilizadas (Spectrum<sup>®</sup> Spectra/Por<sup>®</sup> 6, EE.UU.) tienen un tamaño de poro de 2000 Da capaz de retener las nanopartículas en su interior, dejando sólo pasar a su través el fármaco liberado hasta el medio de liberación. Concretamente, las suspensiones de las partículas con el fármaco vehiculizado se centrifugaron a 10000 rpm durante 35 minutos en el caso del polímero PLGA y a 10000 rpm durante 60 minutos en el caso de la maghemita

y las partículas compuestas, para eliminar el principio activo no incorporado. Tras esto se introdujeron 2 mL de suspensión de nanopartículas (concentración de fármacos: 2.99 mg/mL) en las bolsas de diálisis, cerrando los extremos de la misma con pinzas. A continuación, se sumergieron las bolsas en un vaso con 100 mL de tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. La temperatura de 37.0±0.5°C y la agitación mecánica (50 rpm) de las bolsas se mantuvieron constante durante todo el ensayo. Las muestras tomadas del medio (1 mL) se recogieron a intervalos de tiempo prefijado (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 9, 12, 24 horas y 2, 3, 4, 5, 6, y 7 días tanto para adsorción como absorción) analizándose por el método UV-Vis ya validado y descrito previamente a la longitud de onda máxima correspondiente. Con cada muestra tomada se añadía el mismo volumen de solución tampón (mantenido a la misma temperatura) tras cada toma para mantener las condiciones *sink* del ensayo.

La figura 48 recoge los valores de liberación de gemcitabina adsorbida desde las nanopartículas sintetizadas. Como podemos observar en el caso del PLGA puro y las nanopartículas compuestas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA esta liberación se produce lentamente, siendo completa a las 9 horas, mientras que en el caso de las nanopartículas de maghemita la liberación es total a las 3 horas. Esto puede justificarse por una interacción superficial desfavorable entre las moléculas de fármaco cargadas positivamente y la superficie de las partículas de maghemita que tiene también carga positiva. En cualquier caso, el proceso es demasiado rápido en los tres sistemas por lo que no es adecuado para fines terapéuticos, ya que la dosis de principio activo vehiculizada en el sistema transportador quedaría libre antes de llegar al lugar de acción, dando lugar a una extensa biodistribución.

En cuanto al proceso de liberación de la gemcitabina cuando es incorporada en la matriz de las nanopartículas es mucho más largo (figura 48b). Observando la figura podemos decir que en ambos casos se da un proceso de liberación bifásica: primero se produce una fase de liberación rápida probablemente asociada a la pérdida del fármaco asociado a la superficie o débilmente atrapado (por ejemplo vemos como pasadas 2 horas se ha liberado un 40% del fármaco en el PLGA y un 22% en el caso de las partículas compuestas). Tras esta tenemos una fase de liberación sostenida, en la cual el mecanismo responsable podría ser la degradación de la cubierta polimérica y/o la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica. En ambos casos la liberación de la gemcitabina es completa pasados 7 días. Por último, podemos observar que la velocidad de liberación en las partículas compuesta es algo más lenta que en el caso del polímero puro, esto se debe a que, existe cierta cantidad de principio activo adsorbida en la superficie de los núcleos magnéticos cuando se produce el recubrimiento polimérico. De esta forma la cantidad de fármaco localizada en la interfase  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  debe difundir a través de toda la matriz para poder salir al exterior, lo que ralentiza la velocidad del proceso.



**Figura 48.** Liberación de gemcitabina (%) (a) adsorbida y (b) absorbida desde las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ( $\square$ ), PLGA ( $\blacktriangle$ ),  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA ( $\circ$ ) en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7.4±0.1) a 37.0±0.5°C.

Nuestro estudio de la liberación del clorhidrato de gemcitabina desde las nanopartículas finaliza con el ajuste cinético de los perfiles de liberación, para lo que usamos el análisis de varianza de la regresión al modelo (criterio ANOVA) y del coeficiente de determinación,  $r^2$ . Seleccionamos los ajustes con mayor valor del estadístico  $F$  de Fisher (cociente entre las medias de cuadrados de regresión y residual) admitiendo que aquel que presente un mayor valor de  $r^2$  (una mayor suma de cuadrados de regresión) se corresponde con la ecuación de la cinética que mejor se ajusta a los resultados obtenidos *in vitro* [Doménech y cols., 1998; Morales y cols., 2004]. Para elegir el modelo más fiable a la hora de explicar la cinética de liberación de nuestro fármaco, hemos ensayado distintos modelos matemáticos:

- a) Cinética de orden cero: en este sistema la velocidad de liberación de fármaco es constante. Es decir:

$$Q_t = K_0 t \quad (45)$$

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

- b) Cinética de orden uno: aquí la liberación de fármaco depende de la concentración del mismo en el sistema.

$$\begin{aligned} \frac{dQ_t}{dt} &= K_1(Q_\infty - Q_t) \\ Q_t &= Q_\infty(1 - e^{-K_1 t}) \end{aligned} \quad (46)$$

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

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

$$Q_t = A + B \cdot \sqrt{t} \quad (47)$$

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

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = A + B \cdot t \quad (48)$$

La tabla 8 recoge los valores de  $F$  y  $r^2$  correspondientes al ajuste cinético de la liberación de clorhidrato de gemcitabina desde las nanopartículas de maghemita, de poli(D,L-lactida-co-glicolida) y de los nanocompuestos maghemita/ poli(D,L-lactida-co-glicolida)

	VALORES DE $F$ Y $r^2$				
		Cinética de orden cero	Cinética de orden uno	Cinética de raíz cuadrada	Cinética de raíz cúbica
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	F	5.42	<b>788.17</b>	<b>375.81</b>	126.02
	$r^2$	0.424	<b>0.840</b>	0.665	0.014
PLGA	F	24.10	<b>208.09</b>	<b>1058.37</b>	124.37
	$r^2$	0.767	0.599	<b>0.920</b>	0.336
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$	F	17.78	<b>219.40</b>	<b>636.24</b>	106.84
	$r^2$	0.706	0.641	<b>0.875</b>	0.273

**Tabla 8.** Valores del estadístico  $F$  y del coeficiente de determinación  $r^2$  obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de clorhidrato de gemcitabina liberado en función del tiempo desde las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , PLGA y  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  (método de formulación mediante adsorción superficial).

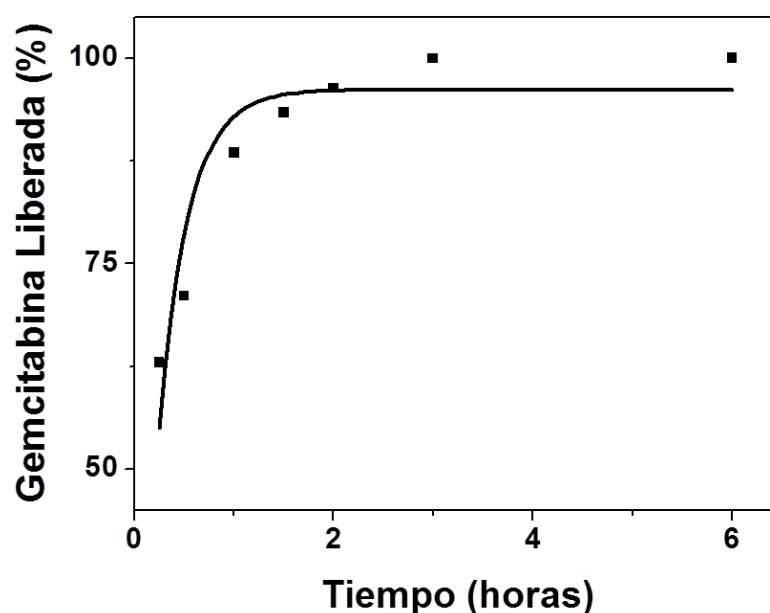
En el caso de la maghemita, la liberación del fármaco adsorbido sobre las nanopartículas obtenidas presenta valores de  $F$  y  $r^2$  que indican un ajuste significativo a una cinética de orden uno, con los coeficientes de ajuste indicados en la tabla 9 (la figura 48 es un ejemplo que muestra el buen acuerdo entre los datos experimentales y la curva de ajuste).

SISTEMA	A	B
Gemcitabina, Maghemita	(96.15 ± 2.81)	(3.39 ± 0.49)

**Tabla 9.** Coeficientes de ajuste de la ecuación (46) a la cinética de liberación del clorhidrato de gemcitabina desde la superficie de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

Esta cinética depende de la diferencia de concentración de fármaco entre el sistema y el medio. Por lo que inicialmente se produce una liberación muy rápida de fármaco desde las partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  hacia el medio donde la concentración es menor, hasta igualar las concentraciones. Alcanzado este punto se dará una liberación sostenida.





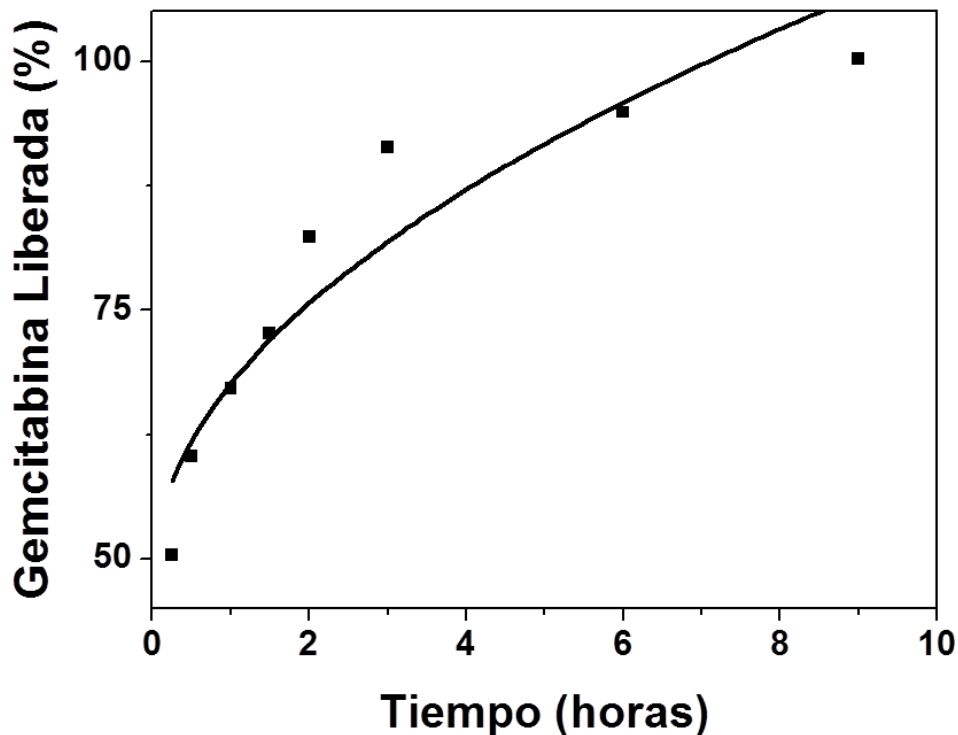
**Figura 49.** Ejemplo de ajuste (línea continua) de la ecuación (46) a datos experimentales (símbolos) en el caso de clorhidrato de gemcitabina adsorbida sobre  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

En el caso del PLGA y las partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ , la liberación del fármaco adsorbido sobre las nanopartículas obtenidas presenta valores de  $F$  y  $r^2$  que indican un ajuste significativo a una cinética de raíz cuadrada, con los coeficientes de ajuste indicados en la tabla 10 (la figura 50 es un ejemplo que muestra el buen acuerdo entre los datos experimentales y la curva de ajuste).

SISTEMA	A	B
Gemcitabina, PLGA	$(47.83 \pm 3.60)$	$(19.10 \pm 2.11)$
Gemcitabina, PLGA/Maghemita	$(48.11 \pm 4.70)$	$(19.48 \pm 2.75)$

**Tabla 10.** Coeficientes de ajuste de la ecuación (47) a la cinética de liberación del clorhidrato de gemcitabina desde la superficie de las nanopartículas de PLGA y  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ .

Esta cinética puede explicarse por la mayor concentración de fármaco presente en la superficie de la nanopartícula y la baja concentración de fármaco en el medio, lo que producirá difusión (dependencia con  $\sqrt{t}$ , ecuación 46) desde la zona superficial, en la que el fármaco se encuentra más concentrado hacia el seno de la disolución, donde la concentración es menor. No hay alteración de la matriz.



**Figura 50.** Ejemplo de ajuste (línea continua) de la ecuación (47) a datos experimentales (símbolos) en el caso de clorhidrato de gencitabina adsorbida sobre  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ .

Respecto a la liberación del fármaco desde el interior de las nanopartículas sintetizadas, tenemos que diferenciar en el ajuste cinético las dos fases características del proceso: una fase rápida de 9h de duración y posteriormente, una fase de liberación más lenta y prolongada (figura 47) Tal y como vemos en la tabla 9, la cinética que

mejor describe la liberación desde el polímero PLGA en ambas fases es la de raíz cuadrada (vease tablas 12-13 para los coeficientes de ajuste y figura 51) lo que nos indica una difusión inicial desde la superficie de las nanopartículas hacía el medio. En cuanto al sistema compuesto por  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA presenta una fase inicial de cinética de raíz cuadrada y una segunda fase con una cinética de orden 0 (coeficientes de ajuste en tablas 12 y 14), que implica una liberación constante y sostenida del fármaco a lo largo del tiempo, sin efecto significativo de la cantidad ya liberada. Este tipo de liberación en el sistema compuesto puede explicarse dado que el fármaco que se encuentra en el interior de una matriz que alimenta continuamente la superficie del sistema con nuevas moléculas que pasan al medio. Se requiere para ello una elevada cantidad de fármaco absorbida en la matriz y no fuertemente ligado a esta.

	VALORES DE $F$ Y $r^2$				
		Cinética de orden cero	Cinética de orden uno	Cinética de raíz cuadrada	Cinética de raíz cúbica
PLGA (1ª fase)	F	60.72	<b>116.56</b>	<b>3692.07</b>	103.46
	$r^2$	0.895	0.544	<b>0.985</b>	0.488
PLGA (2ª fase)	F	64.69	<b>424.99</b>	<b>3144.73</b>	285.16
	$r^2$	0.941	0.673	<b>0.956</b>	0.513
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /PLGA (1ª fase)	F	75.22	<b>397.27</b>	<b>1935.15</b>	32.34
	$r^2$	0.914	0.957	<b>0.991</b>	0.517
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /PLGA (2ª fase)	F	<b>699.73</b>	282.63	<b>2587.66</b>	251.10
	$r^2$	<b>0.991</b>	0.741	0.971	0.709

**Tabla 11.** Valores del estadístico  $F$  y del coeficiente de determinación  $r^2$  obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de clorhidrato de gemcitabina liberado en función del tiempo desde la matriz de las nanopartículas de PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA (método de formulación mediante absorción).

SISTEMA	A	B
Gemcitabina, PLGA	(20.19 ± 1.00)	(12.77 ± 0.59)
Gemcitabina, PLGA/Maghemita	(1.19 ± 0.86)	(14.15 ± 0.50)

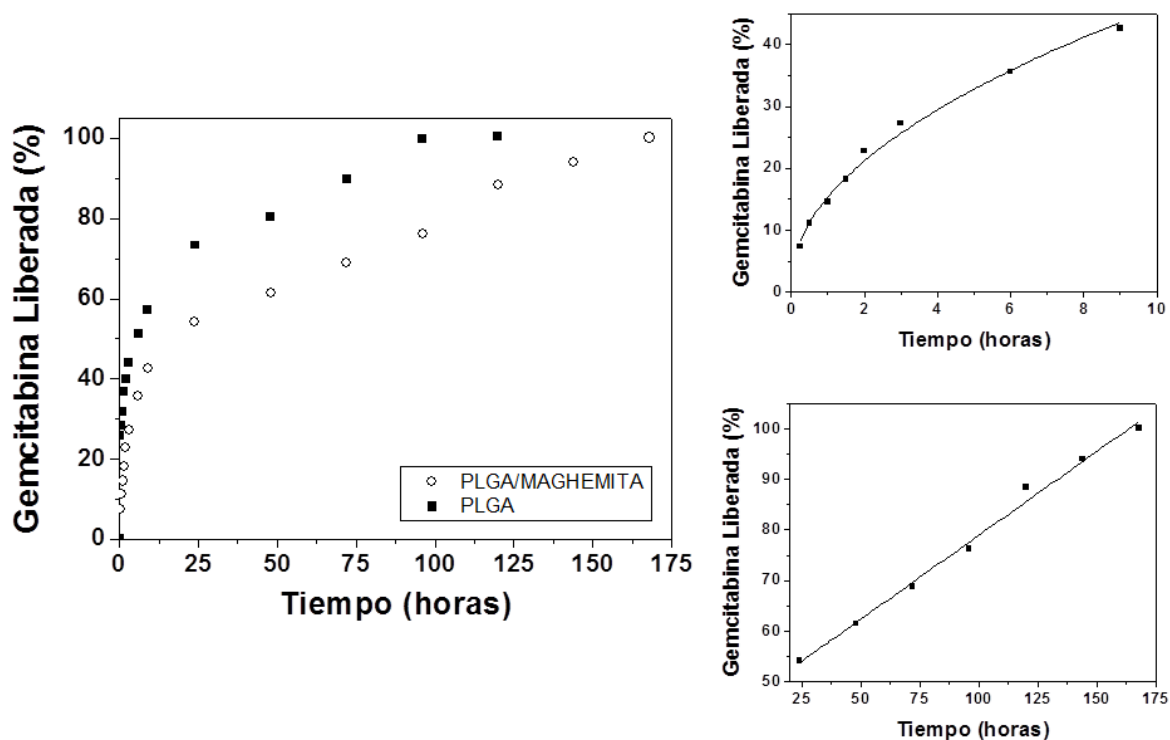
**Tabla 12.** Coeficientes de ajuste de la ecuación (47) a la cinética de liberación que describen la primera etapa de liberación de los diferentes fármacos desde PLGA y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA.

SISTEMA	A	B
Gemcitabina, PLGA	(48.28 ± 4.49)	(4.93 ± 0.53)

**Tabla 13.** Coeficientes de ajuste de la ecuación (47) a la cinética de liberación que describen la segunda etapa de liberación de los diferentes fármacos desde PLGA.

SISTEMA	A	B
Gemcitabina, PLGA/Maghemita	(21.48 ± 4.07)	(5.95 ± 0.41)

**Tabla 14.** Coeficientes de ajuste de la ecuación (45) a la cinética de liberación que describen la segunda etapa de liberación de los diferentes fármacos desde  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA.



**Figura 51.** Izquierda: datos experimentales de la cinética de liberación de clorhidrato de gemcitabina desde las partículas poliméricas (PLGA) y compuestas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA). Derecha: líneas de mejor ajuste de los datos de estas últimas a los modelos descritos en el texto, para la fase inicial de liberación (arriba) y para tiempos largos (abajo).

La figura 51 ilustra los resultados y su mejor ajuste para el fármaco absorbido en matriz. Creemos importante insistir en que la liberación sostenida del clorhidrato de gemcitabina en el tiempo es idónea para lograr un efecto farmacológico óptimo *in vivo*. Es decir, casi toda la dosis de principio activo vehiculizada en los nanocompuestos se liberará exclusivamente en el lugar de acción, una vez que las nanopartículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA se acumulen de forma selectiva a este nivel con la ayuda del campo magnético aplicado.

# **Capítulo 8:**

# **Conclusiones**



El presente trabajo de investigación plantea dos objetivos principales. Uno es el diseño de un sistema multifuncional para el transporte y la liberación modificada de principios activos, constituido por un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico biodegradable. El segundo es la vehiculización de un antineoplásico. Las aportaciones de este trabajo pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

### **Sobre la síntesis de las partículas magnéticas compuestas maghemita/poli(D,L-lactida-co-glicolida ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA))**

1. Se ha desarrollado una metodología reproducible para la síntesis de partículas coloidales esféricas de composición mixta, núcleo magnético ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y recubrimiento polimérico biodegradable (PLGA). Siendo el núcleo magnético el responsable del pequeño tamaño, de la morfología esférica y de las propiedades magnéticas de las partículas obtenidas. Mientras que el recubrimiento polimérico biodegradable posibilitará el transporte y liberación modificada de fármaco.

### **Sobre la estructura, composición química.**

2. El microanálisis EDX nos da una prueba clara de la eficacia del recubrimiento, pudiendo observar en el espectro de las partículas compuestas los picos característicos a ambos materiales.



3. El espectro de infrarrojos es una prueba clara de la eficacia del recubrimiento, ya que permite la identificación de los grupos funcionales del polímero en las partículas compuestas. Estas bandas del espectro de las partículas compuestas son menos intensas, por la menor cantidad de PLGA en ellas. Además, se observa una banda característica del óxido de hierro en el espectro de las partículas compuestas.
4. Con la difracción se prueba de forma paralela, la eficacia del recubrimiento polimérico y la formación de las partículas compuestas con la existencia de bandas características de ambos materiales en las partículas compuestas. El grado de cristalinidad de la maghemita se mantiene tras aplicar el recubrimiento polimérico.
5. El análisis térmico de los materiales por separado y los sistemas compuestos nos permite afirmar la gran estabilidad térmica del sistema, dado que durante los procesos tecnológicos a los que será sometido no alcanzará temperaturas tan altas, por lo que además podrá ser esterilizado con calor sin descomponerse.

### **Sobre las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales.**

6. El estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de nanopartículas mediante electroforesis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento. Éste oculta muy eficazmente los núcleos magnéticos, haciendo que la superficie de los coloides magnéticos compuestos sea indistinguible de la de las nanopartículas de polímero puro.

7. Empleando la información obtenida del estudio electrocinético y termodinámico de los materiales, hemos justificado el mecanismo de formación de las nanopartículas  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA. Estas se generan como consecuencia de la atracción electrostática entre las partículas de maghemita cargadas positivamente y el polímero con carga negativa, lo que induce la concentración de esta última en las inmediaciones de la superficie de los óxidos de hierro. El recubrimiento polimérico termina de forjarse gracias a que las interacciones ácido-base y de van der Waals son netamente atractivas. Es decir, termodinámicamente es más favorable para el polímero permanecer en contacto con la maghemita que estar aislado en el agua.
8. Utilizando un modelo termodinámico aplicable a la interfase sólido/líquido, ha sido posible llevar a cabo una completa caracterización termodinámica superficial de las partículas sintetizadas, mediante la determinación del ángulo. El modelo permite caracterizar el sólido mediante tres componentes de su energía libre superficial:  $\gamma_s^{LW}$  (Lifshitz-van der Waals, representativa de las interacciones no polares o dispersivas en la interfase),  $\gamma_s^+$  (aceptor de electrones o ácido de Lewis) y  $\gamma_s^-$  (donante de electrones o base de Lewis).
9. La diferente naturaleza de los tres materiales analizados, PLGA,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA se observa en los cambios debidos a las interacciones interfaciales sólido-líquido y a la contribución de la energía superficial total de cada sólido.
10. Como es de esperar, estos cambios de energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los materiales, ya que la naturaleza hidrófila de la maghemita se pierde al quedar perfectamente recubierta por la poli(D,L-lactida-*co*-glicolida), lo que podemos considerar una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento polimérico.

### Sobre las propiedades magnéticas.

11. El análisis de las propiedades magnéticas mediante la determinación del ciclo de histéresis de la maghemita y de las partículas compuestas, permitió apreciar el carácter magnético blando de los núcleos magnéticos, de las partículas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ . Al quedar englobados los núcleos magnéticos dentro de la matriz polimérica se obtiene una mayor capacidad de respuesta a campos magnéticos aplicados.
12. Podemos señalar que las partículas magnéticas compuestas ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ) cumplen el requisito buscado: 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.
13. Se ha desarrollado una *prueba de concepto in vivo* sobre las interesantes posibilidades que podrían ofrecer las nanopartículas maghemita/ poli(D,L-lactida-co-glicolida) como sistemas transportadores de fármacos. Para ello, se ha aplicado un método histológico de tinción de los núcleos de óxido de hierro en un modelo de tumor subcutáneo L1210 desarrollado en ratones DBA/2. Sólo los cortes histológicos de las masas tumorales de los ratones tratados con las nanopartículas maghemita/ poli(D,L-lactida-co-glicolida) guiadas magnéticamente mostraron una importante acumulación de hierro en el intersticio tumoral.

### **Sobre la capacidad de transporte y liberación controlada de fármaco**

14. Se ha validado y utilizado el procedimiento espectrofotométrico para la determinación de la incorporación del fármaco en las nanopartículas compuestas maghemita/ poli(D,L-lactida-*co*-glicolida), y para la cuantificación de la cantidad del mismo cedida al medio en los ensayos de liberación.
15. Se han obtenido tras las determinaciones correspondientes las condiciones óptimas de vehiculización de gemcitabina clorhidrato mediante dos métodos: *i*) la adición del principio activo en el medio acuoso donde precipitará el polímero y que contiene los núcleos magnéticos en suspensión, antes de que se desencadene la formación de las nanopartículas compuestas; y, *ii*) la adsorción tras la formación e incubación de los nanocompuestos en una disolución de principio activo.
16. El análisis espectrofotométrico de la incorporación de fármaco en las nanopartículas maghemita/ poli(D,L-lactida-*co*-glicolida) pone de manifiesto la contribución de la adsorción superficial al proceso de vehiculización de los fármacos. Se ha observado un efecto positivo de la concentración de principio activo en el medio de contacto sobre la cantidad adsorbida por las nanopartículas compuestas, pero la absorción del principio activo en matriz mejora considerablemente los resultados de vehiculización obtenidos. Existe también un importante efecto positivo de la concentración de principio activo utilizada sobre los resultados de vehiculización.

17. El estudio de la liberación *in vitro* del fármaco incorporado en la superficie de las nanopartículas compuestas revela de forma general un perfil de cesión muy rápido del mismo, completo en menos de cuatro horas y que se ajusta, según el el análisis de varianza de la regresión al modelo (criterio ANOVA) y del coeficiente de determinación,  $r^2$ , a una cinética de liberación raíz cuadrada. Mientras que la liberación del fármaco incorporado en los nanosistemas mediante absorción en matriz resulta ser mucho más interesante para obtener un óptimo efecto farmacológico.

# **Capítulo 9:**

# **Bibliografía**



- Acharya S, Dilnawaz F, Sahoo SK. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials*. 2009; 30: 5737–5750.
- Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD, Weiner LM. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res*. 2001; 61: 4750–4755.
- Adamson AW. *Physical chemistry of surfaces*. Nueva York: John Wiley & Sons 1982.
- Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lübbe AS. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res*. 2000; 60: 6641-6648.
- Allen L.V. Jr. Dosage form design and development. *Clin. Ther*. 2008; 30: 2102–2111.
- Allen LM, Matijević EJ. Stability of colloidal silica: I. Effect of simple electrolytes. *J. Colloid Interface Sci*. 1969; 31: 287-296.
- Allen TM, Cullis PT. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science* 2004; 303: 1818-1822.
- Allen TM. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci*. 1994; 15: 215-220.
- Als-Nielsen J, Mcmorrow D. *Elements of Modern X-ray Physics*. Modern x-ray physics & new developments. John Wiley & Sons; 2001.



- Álvarez Paneque A, Reguera Ruiz E, Estévez Hernández O, Martínez García R, Canino Ramos C, Díaz Castañón S. Síntesis y caracterización de un sistema de nanopartículas superparamagnéticas basado en la ferrita de manganeso ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) tipo espinela. *Revista Cubana de Química* 2008; 20: 70-76.
- Ang KL, Venkatraman S, Ramanujan RV. Magnetic PNIPA hydrogels for hyperthermia applications in cancer therapy. *Mater. Sci. Eng. C*. 2007; 27: 347-351.
- Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Rel.* 2001; 77: 309-321.
- Arias JL, López-Viota M, Ruiz MA, López-Viota J, Delgado AV. Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/Shell nanoparticles for biomedical applications. *Int. J. Pharm.* 2007a; 339: 237-245.
- Arias JL, Harivardhan Reddy L, Couvreur P. Magneto-responsive squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. *Langmuir* 2008a; 24: 7512-7519.
- Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008b; 69: 54-63.
- Arias JL, Ruiz MA, Gallardo V, Delgado AV. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J. Control. Release* 2008c; 125: 50-58.
- Arias JL, Linares-Molinero F, Gallardo V, Delgado AV. Study of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) (core/shell) particles as anticancer drug delivery systems: Loading and release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008d; 33: 252-261.

- Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J. Drug Target.* 2009; 17(8): 586-598.
- Arias JL, Martínez-Solez GI, López-Viota M, Ruiz MA. Formulation of chitosan nanoparticles loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett. Drug Des. Discov.* 2010a; 7: 70-78.
- Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA. Formulation and physicochemical characterization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2010b; 75: 204-208.
- Arias JL, Martínez-Solez GI, López-Viota M, Ruiz MA. Formulation of chitosan nanoparticles loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett. Drug Des. Discov.* 2010c; 7: 70-78.
- Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Delgado AV. Engineering of an antitumor (core/shell) magnetic nanoformulation based on the chemotherapy agent ftorafur. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2011a; 384: 157-163.
- Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* 2011b; 12: 97-104.
- Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: An overview. *Mini Rev. Med. Chem.* 2011; 11: 1-17.
- Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules* 2008; 13: 2340-2369.
- Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* 2007; 2: 22-32.

- Aulton M.E. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design* (2nd ed.) Churchill Livingstone, Spain (2002)
- Bawa P, Pillay V, Choonara YE, Toif LC. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. *Biomed. Mater.* 2009; 4: 022001-022015.
- Bee A, Massart R. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Magn. Mater* 1995; 149: 6-9.
- Bergman AM, Pinedo HM, Peters GJ. Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resist. Upd.* 2002; 5:19-33.
- Betancourt T, Brown B, Brannon-Peppas L. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomed.* 2007; 2: 219–232.
- Billmeyer FW. Morfología y orden en los polímeros cristalinos. En: *Ciencia de los Polímeros*. (Ed.: Billmeyer FW). Barcelona: Reverté 1975; pp. 148-167.
- Bisby RH, Mead C, Morgan CG. Active uptake of drugs into photosensitive liposomes and rapid release on UV photolysis. *Photochem. Photobiol.* 2000; 72: 57-61.
- Bischoff CA, Walden P. *Ber.* 1893; 26: 262.
- Blagoeva PM, Balansky RM, Mircheva TJ, Simeonova MI. Diminished genotoxicity of mitomycin C and famorubicin included in polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Mutat. Res.* 1992; 268: 77-82.
- Booth F. Surface conductance and cataphoresis. *Trans. Faraday Soc.* 1948a; 44: 955-959.

- Booth F. The cataphoresis of spherical, solid non-conducting particles in a symmetrical electrolyte. *Proc. Roy. Soc.* 1950; 203: 514-533.
- Booth F. Theory of electrokinetic effects. *Nature* 1948b; 161: 83-86.
- Bouffard DY, Laliberté J, Momparler RL. Kinetics studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 45: 1857-1861.
- Bowen K, Tanner BK. *High resolution X-ray Diffractometry and Topography*. Taylor & Francis; 1998.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 631-651.
- Brigger I, Morizet J, Laudani L, Aubert G, Appel M, Velasco V, Terrier-Lancombe MJ, Desmaële D, d'Angelo J, Couvreur P, Vassal G. Negative preclinical results with stealth<sup>®</sup> nanospheresencapsulated doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *J. Control Release* 2004; 100: 29-40.
- Buanz A.B.M., Parkinson G.N., Gaisford S. Characterization of Carbamazepine-Nicotinamide Co-crystal polymorphs with rapid Heating DSC and XRPD Cryst. *Growth Des.* 2011; 11: 1171-1181.
- Budrugaec P., Miub L. The suitability of DSC method for damage assessment and certification of historical leathers and parchments. *J. of Cultural Heritage* 2008; 9: 146-153.
- Burke T, Lee S, Ferguson PJ, Hammond JR. Interaction of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and formycin B with Na<sup>+</sup>-dependent and -independent nucleoside transporter of Ehrlich ascites tumor cells. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1998; 286: 1333-1340.

- Byrn S.R., Pfeiffer R.R., Stephenson G., Grant D.J.W., Gleason W.B. Solid-state pharmaceutical chemistry. *Chem. Mater.* 1994; 6: 1148–1158.
- Byrn S.R., Pfeiffer R.R., Stowell J.G. (Eds.), *Solid-state Chemistry of Drugs* (2nd ed), SSCI, Inc, West Lafayette, Indiana, USA (1999).
- Callister WDJr. Estructura de los polímeros. En: *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales.* (Ed. Callister WDJr). Vol. 2. Barcelona: Reverté 1996a; pp. 482-486.
- Carothers WH, Dorough GL, van Natta FJ. *Amer. Chem. Soc.* 1932; 54: 761.
- Cass CE. Nucleoside transport. Drug transport in antimicrobial and anticancer Chemotherapy. En: Georgopapadakou, NH. (Ed.). Marcel Dekker, Nueva York. 1995: 403pp.
- Chan DCF, Kirpotin DB, Bunn JrPA. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer. *J. Magn. Mater.* 1993; 122: 374-378.
- 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. *Cancer Res.* 1995,5, 4079.
- Charles SW, Popplewell J. Ferromagnetic liquids. *Ferromagnetic Materials.* Ed.: Wohlfart E. P. North-Holland Publishing Company; 1980. 2 p. 509-559.
- Charles SW. The preparation of magnetic fluids. En: *Ferrofluids.* (Ed.: Odenbach S). Berlin: Springer 2003; pp. 3-18.

- Chatterjee J, Haik Y, Chen CJ. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J. Mag. Mater.* 2003; 257: 113-118.
- Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1310-1316.
- Christenson HK, Horn RG. Solvation forces measured in non-aqueous liquids. *Chemica Scripta* 1985; 25: 37-41.
- Christenson HK. Non-DLVO forces between surfaces-solvation, hydration and capillary effects. *J. Disp. Sci. Technol.* 1988; 9: 171-206.
- Ciofani G, Riggio C, Raffa V, Menciacchi A, Cuschieri A. A bi-modal approach against cancer: Magnetic alginate nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia. *Med. Hypotheses* 2009; 73: 80-82.
- Cohen S, Alonso MJ, Langer R. Novel approaches to controlled-release antigen delivery. *Int. J. Technol. Assess. Health Care* 1994; 10: 121-130.
- Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharm. Res.* 2006; 23: 1417-1450.
- Craig D.Q.M. Dispersions as Pharmaceutical Dosage Forms. *Technological Applications of Dispersions*. Ed.: Williams R.A. Nueva York: Marcel Dekker. 1994. p. 457-497.
- Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin. Immunol.* 2006; 121 917: 159–176.
- Debye PJW. Molekularkräfte und ihre Elektrische Deutung. *Physik Zeit.* 1921; 22: 302-308.

- Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, Ferrari M. Intravascular delivery of particulate systems: Does geometry really matter? *Pharm. Res.* 2009; 26: 235-243.
- Delgado A, González-caballero F, Bruque JM. On the zeta potential and surface charge density of montmorillonite in aqueous electrolyte solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 1986; 113: 203-211.
- Delgado A. *Interfacial electrokinetics and electrophoresis.* New York: Marcel Dekker 2002.
- Depeyrot J, Sousa EC, Aquino R, Tourinho FA, Dubois E, Bacri JC y cols. Rare earth doped maghemita EDL-MF: a perspective for nanoradiotherapy? *J. Magn. Magn. Mater.* 2002; 252: 375-377.
- Derjaguin BV, Dukhin SS. Nonequilibrium double layer and electrokinetic phenomena. En: *Surface and Colloid Science.* (Ed.: Matijević E). Vol. 7. New York: Wiley 1974; pp. 273-335.
- Derjaguin, B.V. A theory of the hetero-coagulation, interaction and adhesion dissimilar particles in solutions of electrolytes. *Dis. Faraday Soc.* 1954; 18: 85-98.
- Derycke A, Kamuhabwa A, Gijssens A, Roskams T, de Vos D, Kasran A, Huwyler J, Missiaen L, de Witte PAM. Transferrin-conjugated liposome targeting of the photosensitizer AlPcS4 to rat bladder carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004; 96: 1620-1630.
- Dewhirst MW, Prosnitz L, Thrall D, Prescott D, Clegg S, Charles C, MacFall, J, Rosner G, Samulski T, Gillette E, LaRue S. Hyperthermia treatment of malignant diseases: Current status and a view toward the future. *Semin. Oncol.* 1997; 24: 616-625.

- DiFeo T.J. Drug product development: a technical review of chemistry, manufacturing, and controls information for the support of pharmaceutical compound licensing activities. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2003; 29: 939–958.
- Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Develop. Res.* 2006; 67: 55-60.
- Doménech J, Martínez J, Plá JM. En: *Biofarmacia y farmacocinética*. Madrid: Síntesis 1998.
- Drenth J. *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer. 1994.
- Dukhin SS, Derjaguin BV. Equilibrium double layer and electrokinetic phenomena. En: *Surface and colloid science*. (Ed.: Matijević E). Vol. 7. Nueva York: Wiley 1974; pp. 49-272.
- Durán J, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloid as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97: 2948-2983.
- Durán J, Delgado AV, Chibowski E, González-Caballero F. Surface free energy components of monodisperse zinc sulphide. *Mater. Chem. Phys.* 1994; 38, 42-49.
- Durán J, Guindo M, Delgado AV. Electrophoretic Properties of Colloidal Dispersions of Monodisperse Zinc Sulfide: Effects of Potential-Determining Ions and Surface Oxidation. *J. Colloid. Interface Sci.* 1995; 173: 436-442.
- Esmaeili F, Grahremani MH, Ostad SN, Atyabi F, Seyedabadi M, Malekshahi MR, Amini M, Dinarvand R. Folate-receptor-targeting delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J. Drug Target.* 2008; 16: 415-423.



- Fang X, Parkinson FE, Mowles DA, Young JD, Cass CE. Functional characterization of a recombinant sodium-dependent nucleoside transporter with selectivity for pyrimidine nucleosides (cNT1rat) by transient expression in cultured mammalian cells. *Biochem J.* 1996; 317:457-465.
- Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 6315-6320.
- Fawaz F, Guyot M, Lagueny AM, Devissaguet JPh. Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: Preparation and characterization, *Int. J. Pharm.* 1997; 154: 191-203.
- Fernández-Pacheco R, Marquina C, Valdivia JG, Gutiérrez M, Romero MS, Cornudella R, Laborda A, Vilorio A, Higuera T, García A, García de Jalón JA, Ibarra MR. Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants. *J. Magn. Mater* 2007; 311: 318-322.
- Fischer HC, Chan WCW. Nanotoxicity: The growing need for *in vivo* study. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007; 18: 565-571.
- Florey K. Fluorouracil. En: *Analytical profiles of drug substances*. (Eds.: Rudy BC, Senkowski BZ). Vol. 2. New York and London: Academic Press 1973a; pp. 221-244.
- Florey K. Diclofenac Sodium. En: *Analytical profiles of drug substances*. (Eds.: Adeyeye CM and Li PK). Vol. 19. New York and London: Academic Press 1973b; pp. 123-144.
- Flórez J. *Farmacología humana*. Barcelona: Maason S.A. 2008.

- Flower WC y Van Le L. Gemcitabine as a single-agent treatment for ovarian cancer. *Gynecologic Oncol.* 2003; 90: S21-S23.
- Ford JL., Timmins P. *Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and applications.* E. Horwood, Chichester and New York. 1989.
- Fowkes FM, Mostafa MA. Acid-base interactions in polymer adsorption. *I.E.C. Prod. Res. Dev.* 1978; 17: 3-7.
- Gaber MH, Wu NZ, Hong K, Huang SK, Dewhirst MW, Papahadjopoulos D. Thermosensitive liposomes: Extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1996; 36: 1177-1187.
- Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz AT, Zalipsky S. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1177-1192.
- Gang J, Park SB, Hyung W, Choi EH, Wen J, Kim HS, Shul YG, Haam S, Song SY. Magnetic poly  $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model. *J. Drug Target.* 2007; 15: 445-453.
- Gao J, Zhonga W, Hea J, Li H, Zhanga H, Zhoua G, Li B, Lua Y, Zoua H, Koua G, Zhanga D, Wanga H, Guoa Y, Zhong Y. Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes. *Int. J. Pharm.* 2009; 374: 145-152.
- Gao Z, Fein HD, Rapoport N. Ultrasound-enhanced tumour targeting of polymeric micellar drug carrier. *Mol. Pharm.* 2004; 1: 317-330.
- Garg A, Tisdale AW, Haidari E, Kokkoli E. Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide. *Int. J. Pharm.* 2009; 366: 201-210.

- Geng Y, Yuan W, Wu F, Chen J, He M, Jin T. Formulation erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation. *J. Control Release.* 2008; 130: 259-265.
- Glöckl G, Hergt R, Zeisberger M, Dutz S, Nagel S, Weitschies W. The effect of field parameters, nanoparticles properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2935-S2950.
- Good RJ. Contact angle, wetting and adhesion: A critical review. En: *Contact angle, wettability and adhesion.* (Ed.: Mittal KL). Utrecht: Koninklijke Brill NV. 1993; pp. 3-36.
- González-Rodríguez ML, Maestrelli F, Mura P, Rabasco AM. In vitro release of sodium diclofenac from a central core matrix tablet aimed for colonic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003; 20: 125-131.
- Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S, Gabizon A. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 1949-1957.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev.* 2002; 2: 48-58.
- Grainger DW. Nanotoxicity assessment: All small talk. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009; 61: 419-421.
- Griffith Da, Jarvis SM. Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996; 1286: 153-181.

- Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, Langer RS, Farokhzad OC. Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today* 2007; 2: 14-21.
- Guan H, McGuire MJ, Li S, Brown KC. Peptide-targeted polyglutamic acid doxorubicin conjugates for the treatment of alpha(v)beta(6)-positive cancers. *Bioconjug. Chem.* 2008; 19: 1813-1821.
- Guo X, Szoka FC. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery. *Acc. Chem. Res.* 2003; 36: 335-341.
- Gupta PK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005; 26: 3995-4021.
- Gupta PK, Hung CT. Albumin microspheres. III. Synthesis and characterization of microspheres containing adriamycin and magnetite. *Int. J. Pharm.* 1988; 3: 167-177.
- Gupta PK, Hung CT. Magnetically controlled targeted micro-carrier systems. *Life Sci.* 1989; 44: 175-186.
- Gupta PK, Hung CT. Targeted delivery of low dose doxorubicin hydrochloride administered via magnetic albumin microspheres in rat. *J. Microencapsul.* 1990; 7: 85-94.
- Gupta PK, Hung CT. Magnetically Controlled Targeted Chemotherapy. En: *Microspheres and Regional Cancer Therapy*. Eds.: Willmott N, Daly J. CRC Press. Boca Raton. FL; 1994 p.71-116.
- Häfeli UO. Magnetically modulated therapeutic systems. *Int. J. Pharm.* 2004; 277: 19-24.

- Hamaker HC. The London-van der Waals attraction between spherical particles. *Physica* 1937; 4: 1058-1072.
- Hammond JR, Lee S, Ferguson J. [3H]Gemcitabine uptake by nucleoside transporter in a human head and neck squamous carcinoma cell line. *Pharm. Exp. Ther.* 1999; 288: 1185-1191.
- Han SK, Na K, Bae YH. Sulfonamide based pH sensitive polymeric micelles: Physicochemical characteristics and pH-dependent aggregation. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2003; 214: 49-59.
- Hau P, Fabel K, Baumgart U, Rummele P, Grauer O, Bock A, Dietmaier C, Dietmaier W, Dietrich J, Dudel C, Hübner F, Jauch T, Drechsel E, Kleiter I, Wismeth C, Zellner A, Brawanski A, Steinbrecher A, Marienhagen J, Bogdahn U. Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer* 2004; 100: 1199-1207.
- Hauck M, Coffin D, Dodge R, Dewhirst M, Mitchell J, Zalutsky MA. A local hyperthermia treatment which enhances antibody uptake in a glioma xenograft model does not affect tumor tumour interstitial blood pressure. *Int. J. Hyperth.* 1997; 13: 307-316.
- Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.* 1988; 48: 4024-4031.
- Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure an obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4: 806-813.
- Henry DC. The cataphoresis of suspended particles. Part. I. The equation of cataphoresis. *Proc. Roy. Soc.* 1931; 133: 106-129.

- Hergt R, Dutz S, Müller R, Zeisberger M. Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2919-S2934.
- Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res.* 1990; 50: 4417-4422.
- Hilgenbrink AR, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: From therapeutics to diagnostics. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94: 2135-2146.
- Hilger I, Dietmar E, Linß W, Streck S, Kaiser WA. Developments for the minimally invasive treatment of tumours by targeted magnetic heating. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2951-S2958.
- Hodge LS, Taub ME, Tracy TS. Effect of its deaminated metabolite 2'-2'-difluorodeoxyuridine, on the transport and toxicity of gemcitabine in HeLa cells. *Biochemical Pharmacol.* 2011; 81: 950-956.
- Holgado MA, Arias JL, Cozar MJ, Alvarez-Fuentes J, Gañan-calvo AM, Fernández-Arevalo M. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing effects on drug loading and release properties. *Int. J. Pharm.* 2008; 359: 27-35.
- Horn RG, Israelachvili J. Direct measurement of structural forces between two surfaces in a nonpolar liquid. *J. Chem. Phys.* 1981; 75: 1400-1411.
- Huang L.F., Tong W.Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 321-334.
- Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* 1991; 51: 6110-6117.

- Huber DL. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* 2005; 1: 482-501.
- Hunter RJ. *Foundations of colloid science*. Oxford: Oxford University Press 1987.
- Hunter RJ. Microwave-enhanced electrochemical processes in micellar surfactant media. *J. Solid State Electrochem.* 1993; 9: 809-815.
- Hunter RJ. The interpretation of electrokinetic potentials. *J. Colloid Int. Sci.* 1966; 22: 231-239.
- Hunter RJ. *Zeta Potential in colloid science*. Nueva York: Academic Press 1981.
- Hurst HC. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: the ERBB2 promoter and its exploitation for cancer treatment. *Breast Cancer Res.* 2001; 3: 395–398.
- Huwylar J, Drewe J, Krähenbühl S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *Int. J. Nanomed.* 2008; 3: 21-29.
- Hwang SH, Rait A, Pirollo KF, Zhou Q, Yenugonda VM, Chinigo GM, Brown ML, Chang EH. Tumor-targeting nanodelivery enhances the anticancer activity of a novel quinazolinone analogue. *Mol. Cancer. Ther.* 2008; 7: 559-568.
- Iinuma 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.* 2002; 99: 130–137.
- Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 714-727.

- Israelachvili J. Special interactions: Hydrogen-bonding and hidrophobic and hydrophilic interactions. En: Intermolecular and surface forces. Londres: Academic Press 1991; pp. 151-168.
- 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).
- J.D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, Adv. Drug Deliv. Rev. 60 (2008) 1615–1626
- Jabr-Milane LS, van Vlerken LE, Yadav S, Amiji MM. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. Cancer Treat. Rev. 2008; 34: 592-602.
- Jain AR The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactida-co-glycolide) (PLGA) devices. Biomaterials 2000; 21: 2475-2490.
- Jain RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors: Lessons from in vivo imaging of gene expression and function. J. Control. Release 2001; 74: 7-25.
- Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glicolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release propierties. J. Microencapsul. 1990; 7: 297-325.
- James AM. Surface and colloid science. New York: Plenum Press 1979.
- Kallumadil M, Tada M, Nakagawa T, Abe M, Southern P, Pankhurst QA. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. J. Magn. Magn. Mater. 2009; 321: 1509-1513.



- Kamada H, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Kodaira H, Tsunoda S, Okamoto T, Mukai Y, Shibata H, Nakagawa S, Mayumi T. Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 2545-2550.
- Karanth H, Murthy RS. pH-sensitive liposomes: Principle and application in cancer therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 2007; 59: 469-483.
- Karmali PP, Kotamraju VR, Kastantin M, Black M, Missirlis D, Tirrell M, Ruoslahti E. Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors. *Nanomedicine: NBM* 2009; 5: 73-82.
- Keesom WH. *Physik. Chem.* 1921; 22: 129, 643.
- Kim D, Lee ES, Park K, Kwon IC, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive micelle: Antitumoral efficacy against ovarian A2780/DOXR tumor. *Pharm. Res.* 2008a; 25: 2074-2082.
- Kim IY, Kang YS, Lee DS, Park HJ, Choi EK, Oh YK, Son HJ, Kim JS. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice. *J. Control. Release* 2009; 140: 55-60.
- Kim MJ, Lee HJ, Lee IA, Kim IY, Lim SK, Cho HA, Kim JS. Preparation, of pH-sensitive, long-circulating and EGFR-targeted immunoliposomes. *Arch. Pharm. Res.* 2008b; 31: 539-546.
- Kim SH, Jeong JH, Chun KW, Park TG. Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate. *Langmuir* 2005; 21: 8852-8857.

- Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, Marks JD, Benz CC, Park JW. Antibody targeting of long circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res.* 2006; 66: 6732–6740.
- Knecht V, Risselada HJ, Mark AE, Marrink SJ. Electrophoretic mobility does not always reflect the charge on an oil droplet. *J. Colloid. Interface Sci.* 2008; 318: 477-486.
- Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, Braun RD, Colvin OM, Needham D, Dewhirst MW. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: Importance of triggered drug release. *Cancer Res.* 2000; 60: 6950-6957.
- Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: Effect of particle size. *Cancer Res.* 2001; 60: 4440-4445.
- Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *Int. J. Hyperther.* 1999; 15: 345-370.
- Kono K. Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 307-319.
- Kos J, Obermajer N, Doljaka B, Kocbeka P, Kristl J. Inactivation of harmful tumour-associated proteolysis by nanoparticulate system. *Int. J. Pharm.* 2009; 381: 106-112.
- Kost J, Noecker R, Kunica E, Langer R. Magnetically controlled release systems: effect of polymer coposition. *J. Biomed. Mater. Res.* 1985; 19: 935-940.
- Lai TY, Lee WC. Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2009; 204: 148-153.

- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Elst LV, Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* 2008; 108: 2064-2110.
- LaVan DA, McGuire T, Langer R. Smallscale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnol* 2003; 21: 1184-1191.
- Lawrence TS, Chang EY, Hahn TM, Shewach DS. Delayed radiosensitization of human colon carcinoma cells after a brief exposure to 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine). *Clin. Cancer Res.* 1997; 3: 777-782.
- Lee, B.S. et al. (2006) Polycefin, a new prototype of a multifunctional nanoconjugate based on poly (beta-L-malic acid) for drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 17, 317–326
- Lemieux P, Page M. Sensitivity of multidrug-resistant MCF-7 cells to a transferrin-doxorubicin conjugate. *Anticancer Res.* 1994; 14: 397-403.
- Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanotechnology and aptamers: Applications in drug delivery. *Trends Biotechnol.* 2008; 26: 442-449.
- Li JL, Wang L, Liu XY, Zhang ZP, Guo HC, Liu WM, Tang SH. In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* 2009a; 274: 319-326.
- Liang B, He ML, Chan CY, Chen YC, Li XP, Li Y, Zheng D, Lin MC, Kung HF, Shuai XT, Peng Y. The use of folate-PEG-grafted-hybranched-PEI nonviral vector for the inhibition of glioma growth in the rat. *Biomaterials* 2009; 30: 4014-4020.

- Liburdy RP, Tenforde TS, Magin RL. Magnetic field-induced drug permeability in liposome vesicles. *Radiation Res.* 1986; 108: 102-111.
- Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL, Wang LF. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. *Biomaterials* 2009; 30: 5114-5124.
- London F. Zur Theorie und systematic der molekularkräfte. *Physik Zeit.* 1930; 63: 245-279.
- Lopes de Menezes DE, Pilarski LM, Allen TM. In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 1998; 58: 3320-3330.
- López García JJ, Moya AA, Horno JJ, Delgado AV, González-Caballero F. A network model of the electrical double layer around a colloid particle. *J. Colloid Interface Sci.* 1996; 183: 124-130.
- Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009; 13: 256-262.
- Lu YJ, Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 675-693.
- Lübbe AS, Bergemann C, Huhnt W, Fricke T, Riess H, Brock JW, Huhn D. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: Tolerance and efficacy. *Cancer Res.* 1996b; 56: 4694-4701.

- Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, Matthias M, Dörken B, Herrmann F, Gürtler R, Hohenberger P, Haas N, Sohr R, Sander B, Lemke AJ, Ohlendorf D, Huhnt W, Huhn D. Clinical experiences with magnetic drug targeting: A phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* 1996a; 56: 4686-4693.
- Lyklema J, Overbeek JThG. Electrochemistry of silver iodide the capacity of the double layer at the silver iodide-water interface. *J. Colloid Sci.* 1961a; 16: 595-608.
- Lyklema J, Overbeek JThG. On the interpretation of electrokinetic. *J. Colloid Sci.* 1961b; 16: 501-512.
- Lyklema J. Structure of the solid/liquid interface and the electrical double layer. En: *Solid/liquid dispersions.* (Ed.: Tadros TF). Londres: Academic Press pp. 1987; 63-90.
- Lyklema J. Thermodynamic foundation of interface and colloid science. En: *Fundamentals of Interface and Colloid Science: Solid-Liquid Interfaces.* Londres: Academic Press 1995; 2.1-2.103.
- Lynch I, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 2008; 3: 40-47.
- Lyon RJP. Infrared absorption spectroscopy. En: *Physical methods, in determinative mineralogy.* (Ed.: Zussman J). Lóndres: Academic Press 1967; pp. 371-399.
- Mackey JR, Yao SY, Smith KM, Karpinski E, Baldwin SA, Class CE, Young JD. Gemcitabine transport in *Xenopus* oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91: 1876-1881.

- Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 71: 409-419.
- Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, Kennel SJ, Huang L, Iwatsuru M. Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipatic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal-antibodies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995; 1234: 74-80.
- Matsuda A, Sasaki T. Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. *Cancer Sci.* 2004; 95: 105-111.
- Meers P. Enzyme-activated targeting of liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 265-272.
- Minko T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 491-509.
- Mitra S, Gaur U, Gosh PC, Maitra AN. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Release* 2001; 74: 317-323.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 283-318.
- Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: Critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* 2003; 42: 463-478.
- Morales ME, Gallardo V, Calpena AC, Doménech J, Ruiz MA. Comparative study of morphine diffusion from sustained release polymeric suspensions. *J. Control. Release* 2004; 95: 75-81.

- Moroz P, Jones SK, Gray BN. Magnetically mediated hyperthermia: Current status and future directions. *Int. J. Hyperthermia* 2002; 18: 267-284.
- Morrison FA. Electrophoresis of a particle of arbitrary shape. *J. Colloid Interface Sci.* 1970; 34: 210-214.
- Müller RH, Lherm C, Herbort J, Couvreur P. Propidium-iodide-loaded polyalkylcyanoacrylate particles: Labelling conditions and loading capacity. *Colloid Polymer Sci.* 1991; 269: 147-152.
- Müller RH, Maaßen S, Wayhers H, Specht F, Lucks JS. Citotoxicity of magnetic-loaded polylactide, polylactide/glicolide particles and solid lipod nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1996; 138: 85-94.
- N.C. Belloq, S.H. Pun, G.S. Jensen, M.E. Davis, Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003) 1122–1132
- Na K, Lee ES, Bae YH. Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH dependant cell interaction, internalization and cytotoxicity in vitro. *J. Control Rel.* 2003; 87: 3-13.
- Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 285-305.
- Neuberger T, Scöpf B, Hofmann H, Hofmann M, Von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 483-496.

- Ninhan BW, Parsegian VA. Van der Waals forces: Special characteristics in lipid-water systems and a general method of calculation based on the Lifshitz. Theory. J. Biophys. 1970; 10: 646-663.
- O'Brien RW, White LR. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1978; 274: 1607-1624.
- Ohshima H. Interfacial electrokinetic phenomena. En: Electrical phenomena at interfaces. (Eds.: Ohshima H, Furusawa K). Vol. 2. Nueva York: Marcel Dekker 1998; pp. 19-55.
- Önyüksel H, Mohantya PS, Rubinsteina I. VIP-grafted sterically stabilized phospholipid nanomicellar 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin: A novel targeted nanomedicine for breast cancer. Int. J. Pharm. 2009; 365: 157-161.
- Overbeek JHG. Electrokinetic Phenomena. En: Colloid Science. (Ed.: Krut HR). Vol. 1. Amsterdam: Elsevier 1952; 194-244.
- Overbeek JHG. Theorie der elektroforese. Der relaxationseffekt. Kolloid Beih. 1943; 54: 287-364.
- Pan J, Feng SS. Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers. Biomaterials 2009; 30: 1176-1183.
- Pan XQ, Lee RJ. In vivo antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal daunorubicin in a murine leukemia model. Anticancer Res. 2005; 25: 343-346.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Application of magnetic nanoparticles in biomedicine. J. Phys. D. Appl. Phys. 2003; 36: R167-R181.



- Panofski WKH, Phillips M. Three-dimensional potential problems. En: Classical electricity and magnetism. (Eds.: Panofski WKH, Phillips M). Addison-Wesley. Reading 1975; 81-94.
- Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting enables neuroprotection in brain ischemia following delayed intravenous administration of neurotrophins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002; 513: 397-430.
- Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Moore D, Papahadjopoulos D, Benz CC. Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced efficacy due to targeted delivery. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 1172-1181.
- Park JW, Kirpotin DB, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Papahadjopoulos D, Benz CC. Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced anticancer efficacy due to targeted delivery. *J. Control. Release* 2001; 74: 95-113.
- Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* 2002; 4: 95-99.
- Parsegian VA, Ninham BW. Application of Lifschitz theory to the calcinations of van der Waals forces across thin liquid films. *Nature* 1969; 224: 1197-1198.
- Patil YB, Toti US, Khadair A, Ma L, Panyam J. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* 2009a; 30: 859-866.
- Pérez-Artacho B, Gallardo V, Ruiz MA, Arias JL. Maghemite/poly(D,L-lactide-co-glycolide) composite nanoplatfrom for therapeutic applications. *J Nanopart Res.* 2012; 14:768.

- Peters GJ, van der Wilt CL, van Moorse CJA, Kroep JR, Bergman AM, Ackland SP. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol. & Therapeutics*. 2000; 87: 227-253.
- Plaza RC, Arias JL, Espín M, Jiménez ML, Delgado AV. Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *J. Colloid Interface Sci*. 2002; 245: 86-90.
- Plunkett W, Huang P, Gandhu C. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs*. 1995; 6:7-13.
- Poblete V., Pilleux PM., Etal C. Ciencia De Los Materiales “Microscopia Electrónica De Barrido” Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2001.
- Pouliquen D, Chouly C. Magnetic microcarriers for medical applications. En: *The MML series: Medical & biotechnology applications*. (Ed.: Arshady R). Vol. 2. Londres: Citus Books 1999; pp. 343-382.
- Purushotham S, Ramanujan RV. Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomater*. 2009; 6: 502-510.
- Rapoport N, Christensen D, Fein HD, Barrows L, Gao Z. Ultrasound-triggered drug targeting to tumors in vitro and in vivo. *Ultrasonics* 2004; 42: 943-950.
- Rapoport N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Prog. Polym. Sci*. 2007; 32: 962-990.
- Reddy GR, Bhojani MS, McConville P, Moody J, Moffat BA, Hall DE, Kim G, Koo YEL, Woolliscroft MJ, Sugai JV, Johnson TD, Philbert MA, Kopelman R, Rehemtulla A, Ross BD. Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin. Cancer Res*. 2006; 12: 6677-6686.

- Reddy LH, Coyvreur P. Novel approaches to deliver gemcitabine to cancers. *Curr. Pharm. Desing.* 2008; 14: 1124-1137.
- Reddy LH. Drug delivery to tumors: Recent strategies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57: 1231-1242.
- Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Ritzel RG, Mowles DA, Carpenter P, Chen XZ, Karpinski E, Hyde RJ, Baldwin SA, Cass CE, Young JD. Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative  $NA^{+}$ -nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 2914-2927.
- Rosengart AJ, Kaminski MD, Chen H, Caviness PL, Ebner AD, Ritter JA. Magnetizable implants and functionalized magnetic carriers: A novel approach for noninvasive yet targeted drug delivery. *J. Magn. Mater.* 2005; 293: 633-638.
- Ruiz van Haperen VWT, Veerman G, Boven E, Noordhuis P, Vermoken JB, Peters GJ. Schedule dependence of sensitivity to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in relation to accumulation and retention of this triphosphate in solid tumour cell lines and solid tumours. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 48: 1327-1339.
- Ruiz van Haperen VWT, Veerman G, Vermorken JB, Pinedo HM, Peters GJ. Regulation of phosphorylation of deoxycytidine and 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine); effects of cytidine 5'-triphosphate and uridine 5'-triphosphate in relation to chemosensitivity for 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Biochem. Pharmacol.* 1996; 51: 911-918.
- Russel WB, Saville DA, Schowalter WR. Electrostatics. En: *Colloidal dispersions.* (Eds.: Russel WB, Saville DA). Cambridge: University Press 1989; 88-128.

- Saéz-Fernández E, Ruiz MA, López-Ruiz A, Arias JL. Revisión del estado actual y posibilidades de las aproximaciones más importantes al transporte específico de agents quimioterápicos a las células tumorales. *Ars Pharm.* 2010; 51: 121-135.
- Sahoo SK, Labhasetwar V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol. Pharm.* 2005; 2: 373-383.
- Sahoo SK, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int. J. Cancer* 2004; 112: 335-340.
- Sapra, P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid Res.* 2003; 42: 439-462.
- Saslowski O, Weingarten C, Benoit JP, Couvreur P. Magnetically responsive microspheres for the pulsed delivery of insulin. *Life Sci.* 1988; 42: 1521-1528.
- Scherer F, Anton M, Schillinger U. Magnetofaction: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 2002; 9: 102-109.
- Schiffelers RM, Koning G.A, ten Hagen TL, Fens MH, Schraa AJ, Janssen AP, Kok RJ, Molema G, Strom G. Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J. Control. Release* 2003; 91: 115-122.
- Schröder A, Honen R, Turjeman K, Gabizon A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *J. Control. Release* 2009; 137: 63-68.
- Senyei A, Widder KJ, Czerlinski G. Magnetic guidance of drug-carrying microspheres. *J. Appl. Phys.* 1978; 49: 3578-3583.

- Shen Z, Wei W, Zhao Y, Ma G, Dobashi T, Maki Y, Su Z, Wan J. Thermosensitive polymer-conjugated albumin nanospheres as thermal targeting anti-cancer drug carrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008; 35: 271-282.
- Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm.* 2005; 293: 261-270.
- Shewach DS, Lawrence TS. Gemcitabine and radiosensitization in human tumor cells. *Invest. New Drugs.* 1996; 14: 257-263.
- Shmeeda H, Mak L, Tzemach D, Astrahan P, Tarshish M, Gabizon A. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 818-824.
- Shum P, Kim JM, Thompson DH. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 273-284.
- Silverstein RM, Webster FX. *Infrared Spectrometry. Spectrometric Identification of Organic Compounds.* 6<sup>a</sup> Ed. John Wiley & Sons. New York. 1998; p 71-144.
- Skinner, S. et al. (1990) Microvascular architecture of experimental colon tumors in The rat. *Cancer Res.* 50, 2411–2417.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principios de análisis instrumental.* Madrid: Mc Graw Hill 2001.
- Sloat BR, Sandoval MA, Li D, Chung WG, Dharmika SP, Lansakara P, Proteau PJ, Kiguchi K, DiGiovanni J, Cui Z. In vitro and in vivo anti-tumor activities of a gemcitabine derivative carrier by nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2011; 409: 278-288.

- Smid K, Van Moorsel CJA, Noordhuis P, Voorn DA, Peters GJ. Interference of gemcitabine triphosphate with the measurement of deoxynucleotides using an optimised DNA polymerase elongation assay. *Int. J. Oncol.* 2001; 19: 157-162.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradation polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 2001; 70: 1-20.
- Steinke F, Andräa W, Heidec R, Wenera C, Bellemann ME. Rotating magnetic microspheres as heating mechanism for remote controlled drug release. *J. Magn. Magn. Mater.* 2007; 311: 216-218.
- Storniolo AM, Allerheiligen SRB, Pearce HL. Preclinical, pharmacologic and phase I studies of gemcitabine. *Semin. Oncol.* 1997; 24: S7-2-S7-7.
- Stubbs M, McSheehy RMJ, Griffiths JR, Bashford L. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol. Med. Today* 2000; 6: 15-19.
- Sullivan CO, Birkinshaw C. In vitro degradation of insulin-loaded poly(*n*-butylcyanoacrylate) nanoparticles, *Biomaterials* 2004; 25: 4375-4382.
- Sun B, Ranganathan B, Feng SS. Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. *Biomaterials* 2008; 29: 475-486.
- Suryanarayanan R. X-Ray Powder Diffractometry. En: *Physical characterization of pharmaceutical solids.* (Ed.: Brittain HG). New York: Marcel Dekker Inc. 1995; pp. 187-221.
- Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Kawamura T, Shimada S, Matsumoto K, Saida T, Honda H. Heat immunotherapy using magnetic nanoparticles and dendritic cells for T-lymphoma. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 100: 112-115.

- Taratula O, Garbuzenko OB, Kirkpatrick P, Pandya I, Savla R, Pozharov VP, He H, Minko T. Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery. *J. Control. Release* 2009; 140: 284-293.
- Tartaj P, Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T, Serna CJ. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D Appl. Phys.* 2003; 36: R182-R197.
- Tashjian JA, Dewhirst MW, Needham D, Viglianti BL. Rationale for and measurement of liposomal drug delivery with hyperthermia using non-invasive imaging techniques. *Int. J. Hyperthermia* 2008; 24: 79-90.
- Tietze R, Jurgons R, Lyer S, Schreiber E, Wiekhorst F, Eberbeck D, Richter H, Steinhoff U, Trahms L, Alexiou C. Quantification of drug-loaded magnetic nanoparticles in rabbit liver and tumor after in vivo administration. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009; 321: 1465-1468.
- Tonato M, Mosconi AM, Martin C. Safety profile of gemcitabine. *Anticancer Drugs.* 1995; 6: 27-32.
- Ulbrich K, Šubr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1023-1050.
- Van Moorsel CJA, Pinedo HM, Veerman G, Bergeman AM, Kuiper CJm, Vermorken JB, Van der Vijgh WJF, Peters GJ. Mechanism of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small cell lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer.* 1999; 80: 981-990.
- Van Olphen HJ. *An introduction to clay colloidal chemistry.* Nueva York: Wiley 1977.

- Van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between bipolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 1986; 111: 378-390.
- Van Oss CJ. Acid/base interracial interactions in aqueous media *Coll. Surf A.* 1993; 70: 1-49.
- Van Oss CJ. *Interfacial forces in aqueous media.* Boca Raton: CRC Press 2006.
- Van Oss CJ. *Interfacial Forces in Aqueous Media.* Marcel Dekker Inc. New York, 1994.
- Weiseh O, Kievit FM, Gunn JW, Ratner BD, Zhang M. A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells. *Biomaterials* 2009; 30: 649-657.
- Vera P, Gallardo V, Salcedo J, Delgado AV. Colloidal Stability of a Pharmaceutical Latex: Experimental Determinations and Theoretical Predictions *J. Colloid Interface Sci.* 1995; 177: 553- 560.
- Vippagunta S.R., Brittain H.G., Grant D.J. Crystalline solids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 48: 3–26.
- Visser J. On Hamaker constants: A comparison between Hamaker constants and Lifshitz-van der Waals constants. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1972; 4: 331-363.
- Wagner E. Programmed drug delivery: Nanosystems for tumor targeting. *Expet. Opin. Biol. Ther.* 2007; 7: 587-593.
- Widder KJ, Senyei AE, Scarpelli DG. Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery in vivo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1978; 158: 141-146.



- Wiersema PH, Loeb AL, Overbeek JTG. Calculation of the electrophoretic mobility of a spherical colloid particle. *J. Colloid Interface Sci.* 1966; 22: 78-99.
- Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* 1978; 202: 1290Y1293.
- Yellen BB, Forbes ZG, Halverson DS, Fridman G, Barbee KA, Chorny M, Levy R, Friedman G. Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 647-654.
- Yong CS, Oh YK, Kim YI, Kim JO, Yoo BK, Rhee JD, Lee KC, Kim DD, Park YJ, Kim CK, Choi HG. Physicochemical characterization and in vivo evaluation of poloxamer-based solid suppository containing diclofenac sodium in rats. *Int. J. Pharm.* 2005; 301: 54-61.
- Zara GP, Cavalli R, Bargoni A, Fundaro A, Vighetto D, Gasco MR. Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: Pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues. *J. Drug Target.* 2002; 10: 327-335.
- Závišová V, Koneracká M, Múčková M, Kopčanský P, Tomašovičová N, Lancz G, Timko M, Pätoprstá B, Bartoš P, Fabián M. Synthesis and characterization of polymeric nanospheres with the anticancer drug paclitaxel and magnetic particles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009; 321: 1613-1616.
- Zhang CF, Jugold M, Woenne EC, Lammers T, Morgenstern B, Mueller MM, Zentgraf H, Bock M, Eisenhut M, Semmler W, Kiessling F. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res.* 2007; 67: 1555-1562.

- Zhang J, Misra RDK. Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core-shell nanoparticle carrier and drug release response. *Acta Biomater.* 2007; 3: 838-850.
- Zhang Y, Schlachetzki F, Pardridge WM. Global non-viral gene transfer to the primate brain following intravenous administration. *Mol. Ther.* 2003; 7: 11-18.
- Zhou D., Porter WR., Zhang G. Drug stability and degradation studies (Eds.), *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory & Practice*, Academic Press, Burlington, MA, USA. 2009: 87–124
- Zhu L, Huo Z, Wang L, Tong X, Xiao Y, Ni K. Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive magnetoliposomes. *Int. J. Pharm.* 2009; 370: 136-143.



# **Capítulo 10:**

## **Resume Tesi Dottorale**



## **10.1 INTRODUZIONE**

### **10.1.1 SISTEMI TRASPORTATORI DI FARMACI**

L'attività farmacologica di qualsiasi principio attivo dipende principalmente dalla natura della loro interazione con il tessuto o con l'organo di bersaglio. Per avere un'effetto farmacologico, è necessario che il farmaco raggiunga la regione in quantità sufficiente. Una formulazione adatta della sostanza attiva può contribuire all'accumulo efficiente nel punto di azione con trascurabile circolazione sistemica. Per questo motivo, la preparazione di farmaci è un campo fondamentale e sperimentale nelle scienze farmaceutiche.

I sistemi di rilascio modificato dei farmaci migliorano la farmacoterapia convenzionale consentendo di controllare la durata dell'effetto farmacologico; a causa di queste forme, il farmaco arriva in grande quantità e velocità nella circolazione sistemica, ma abbiamo ancora una volta un'incontrollata biodistribuzione sistemica, che è responsabile degli effetti negativi in molti tessuti sani, inoltre, bisogna ricordare che la concentrazione finale raggiunta dal farmaco nella regione bersaglio può essere così bassa che l'effetto terapeutico sarebbe, alla fine, molto ridotto. [Arias, 2008].

Il principale ostacolo per l'efficacia degli agenti chemioterapeutici è lo sviluppo di meccanismi di resistenza da parte di cellule tumorali, nonostante l'uso di dosi elevate. La chemioterapia è efficace solo se otteniamo una strategia di trattamento in grado di superare meccanismi di resistenza cellulare e fisiologici della regione tumorale, senza dimenticare i problemi di farmacocinetica di molti farmaci antitumorali.

Nel tentativo di superare queste limitazioni, è stata proposta la veicolizzazione degli agenti antitumorali nei colloidi [Kim et al., 2008b]: l'obiettivo è quello di evitare che il farmaco sia esposto a diversi meccanismi di resistenza che riducano al minimo il suo ingresso nella cellula tumorale, anche nel caso in cui si aumenti la sua residenza a livello intracellulare. Un buon sviluppo della nanoparticella può simultaneamente combattere ciascuno dei meccanismi di resistenza espresso dalla cellula cancerogena (ad esempio, l'uso del farmaco come substrato per la glicoproteina-P, il meccanismo principale di rimozione), e assicura allo stesso tempo un trasporto efficace della dose dell'agente antitumorale nella cellula. A tal fine, il sistema di trasporto sviluppato deve: *i*) evitare la rapida rimozione dal RES, modificando la superficie con molecole che forniscono protezione sterica (ad esempio, catene di PEG); *ii*) veicolizzare diversi tipi di agenti chemioterapici a dosi elevate; e *iii*) assicurare la più alta concentrazione possibile di farmaci nell'interstizio tumorale e una maggiore captazione intracellulare [Jabr-Milane Jabr et al., 2008].

Nella terapia, i sistemi colloidali dimostrano un'enorme capacità di accumulazione, ed in concreto del principio attivo nel punto di azione, assicurando una distribuzione minima delle stesse nel resto del corpo [Arias et al., 2008; Couvreur e Vauthier, 2006; Reddy, 2005 ].

I sistemi di trasporto colloidali vengono utilizzati per rilasciare il farmaco in una zona specifica del corpo (direzionalità), ritardare e prolungare il rilascio (rilascio modificato) solo al sito di azione. In generale, i sistemi trasportatori colloidali di farmaci sono composti da sospensioni acquose di nanoparticelle biodegradabili contenenti principi attivi incorporati in superficie (adsorbito) o all'interno della matrice (assorbito) e questi sistemi sono normalmente somministrati per via parenterale.

Tutto ciò presenta un certo numero di vantaggi rispetto alla terapia tradizionale, perchè la combinazione di farmaci (indipendentemente dal gruppo di trattamento a cui appartengono) con i sistemi di trasporto colloidali permette:

- L'accumulo specifico del farmaco nella regione bersaglio.
- L'aumento del tempo di esposizione cellula / farmaco antitumorale.
- Il miglioramento del profilo farmacocinetico del farmaco.
- La protezione del farmaco all'interno del sistema di trasporto contro processi di degradazione *in vitro* (in condizioni di conservazione) e *in vivo* (contro i sistemi enzimatici ai quali è suscettibile).

Tra i diversi sistemi colloidali progettati per il trasporto specifico di farmaci sono importanti, per il loro grande potenziale, i sistemi magnetici colloidali. Questo tipo di nanoparticelle è formato da un nucleo magnetico (principalmente di ossido di ferro) circondato da una matrice organica (ad esempio polimero, amido o polisaccaride) o inorganico (ad esempio, silice).

L'uso di queste nanoparticelle magnetiche e di campi magnetici permette di dirigere il farmaco a una posizione specifica. Questo farmaco è veicolizzato nella nanoparticella magnetica per essere successivamente somministrato per via parenterale. Contemporaneamente, un campo magnetico viene applicato selettivamente sul sito d'azione. Quando il colloide magnetico raggiunge la zona di influenza del campo, viene attratto da esso. In questo modo, è possibile accumulare la dose di farmaco completa somministrata nel punto di azione, mentre, se ne controlla il rilascio [Duran et al., 2008]. Il meccanismo mediante il quale si produce il rilascio del principio attivo dal colloide magnetico può essere vario e complesso. Generalmente, questo



meccanismo comprende i seguenti processi [Alexiou et al., 2000; Häfeli, 2004, Neuberger et al., 2005]:

- Diffusione attraverso la matrice che lo contiene;
- Rilascio per degradazione enzimatica;
- Rilascio per distruzione del colloide in presenza di avverse condizioni fisico-chimiche (ad esempio: pH, temperatura ...);
- Rilascio per esposizione ad un campo elettromagnetico alternato che provoca cambiamenti nella matrice in cui è veicolizzato.

Non tutti i tipi di colloide possono essere utilizzati per il trasporto di farmaci. Le caratteristiche che dovrebbe avere un trasportatore magnetico di farmaci sono [Arias et al., 2001, Arias et al., 2007; Häfeli, 2004; Lübbe et al., 1996a; Lübbe et al., 1996b; Müller et al., 1996, Pankhurst et al., 2003]:

1. Piccole dimensioni (meno di 500 nm) per garantire un'ampia distribuzione a livello capillare e per fusione uniforme nel punto di azione.
2. Un'adatta risposta magnetica *in vivo* a campi magnetici applicati.
3. Possibilità di trasportare un'ampia varietà di agenti terapeutici in una quantità sufficiente che consenta il corretto trasporto di una quantità biologicamente attiva, senza caricare l'organismo con troppo materiale magnetizzabile.
4. Velocità di rilascio controllabile (o predittiva) nella posizione desiderata.

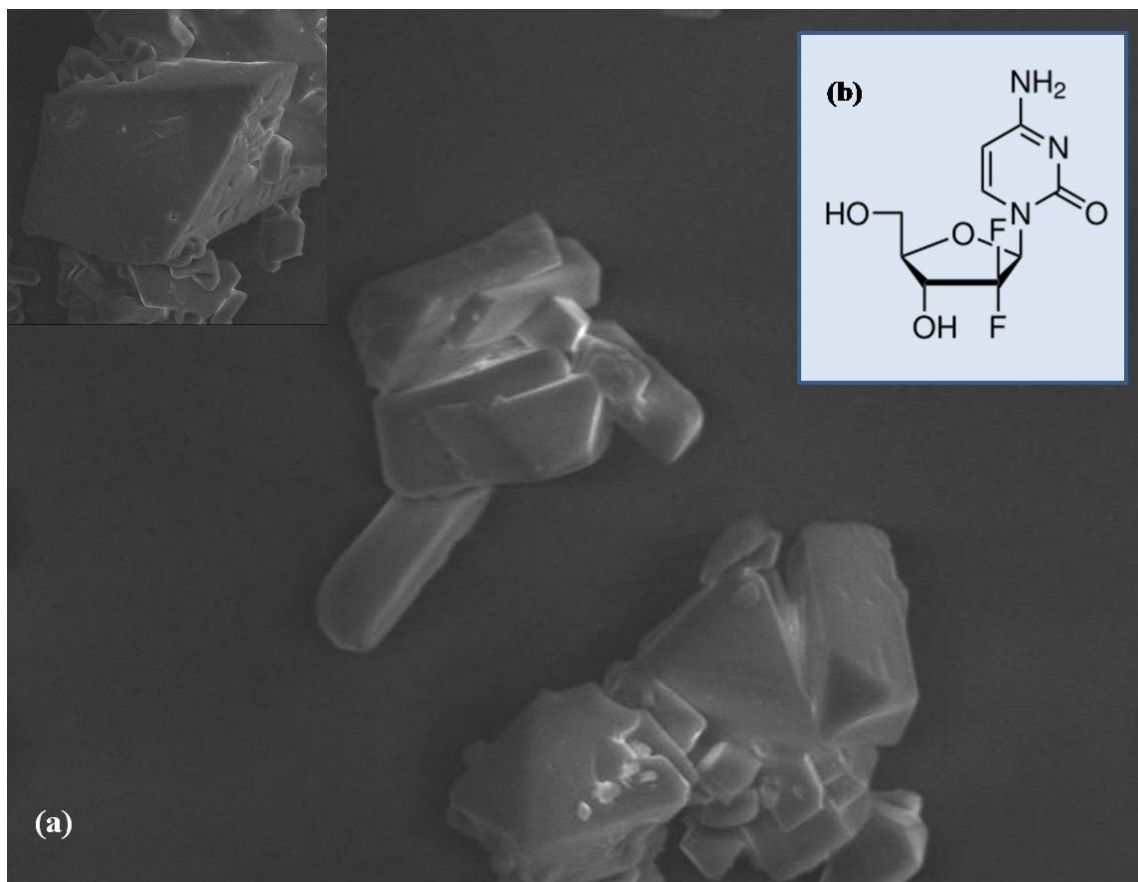
5. I componenti utilizzati nella sua formulazione devono garantire la massima biocompatibilità e antigenicità bassa.
6. Biodegradabilità, con eliminazione totale e minima di tossicità dei prodotti di degradazione generati.

L'uso di campi magnetici alternati genera l'effetto di ipertermia oltre a provocare il rilascio controllato del principio attivo veicolizzato [Guo e Szoka, 2003; Lavan et al., 2003]. L'applicazione di campi magnetici esterni insieme al colloide magnetico provoca il riscaldamento specifico alla massa tumorale a circa 42°C, che se è mantenuta per 30 minuti provocherà la morte delle cellule tumorali [Glockl et al., 2006; Hergt et al., 2006, Hilger et al., 2006, Moroz et al., 2002, Pankhurst et al., 2003]. Inoltre, questo riscaldamento distruggerà i nuclei magnetici consentendo il rilascio del farmaco [Liburdy et al., 1986; Steinke et al., 2007; Wagner, 2007].

### **10.1.2 CLORIDRATO DI GEMCITABINA**

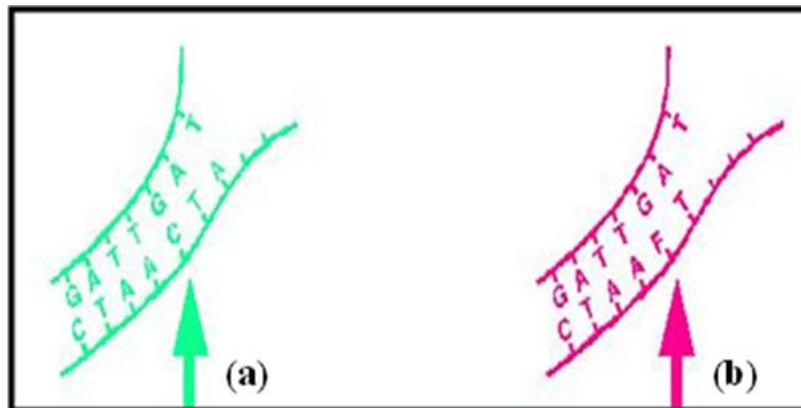
I farmaci antimetaboliti agiscono sulla fase di sintesi del ciclo cellulare interferendo sulla sintesi di DNA e RNA. Hanno la stessa struttura dei metaboliti coinvolti nei processi di crescita e divisione e possono essere incorporati nelle molecole di DNA e RNA allo scopo di trasmettere messaggi falsi o inibire enzimi specifici necessari per sintetizzare composti essenziali [Florez, 2008].

Il cloridrato di gemcitabina (o 2', 2'-difluorodesossitocidina) è un antimetabolita analogo alla pirimidina; è idrofilo quindi non può attraversare le membrane per diffusione passiva [Cars, 1995], questo significa che sono necessari sistemi di trasporto specializzati.



**Figura 52.** Microfotografía elettronica a scansione (SEM) del cloridrato di gemcitabina (a).  
Formula chimica del cloridrato di gemcitabina (b)

Il metabolita attivo della gemcitabina è il 2,2-difluoro-deossicitidina trifosfato (dFdCTP) che è integrato nei siti C durante l'allungamento della catena catalizzata dalle DNA polimerasi  $\alpha$  e  $\epsilon$ . Una volta incorporata, questa rallenta l'allungamento, ma permette ancora l'incorporazione di almeno una sequenza di nucleotidi con la conseguente "terminazione mascherata della catena di DNA" che impedisce il riconoscimento ed il taglio da parte dell'esonucleasi, cioè, impedisce la riparazione del DNA [Peters et al., 2000, Van Moorsel et al., 1999b].



**Figura 53.** Incorporazione della d-Citidina Tri-fosfato [Nucleosido normale] (a).  
 Incorporazione della Gemcitabina Tri-fosfato [di-fluor, desoxi-CTP].

Questo farmaco ha dimostrato di essere efficace per il trattamento di tumori solidi (polmoni, colon, cancro ovarico) ed è stato approvato per l'uso nel trattamento di tumori pancreatici, della vescica e della mammella. [Arias et al., 2009; Reddy e Couvreur, 2008].

Nonostante sia realmente efficace quando somministrato per via endovenosa può essere deaminato rapidamente diventando (2', 2'-difluoro-2'-deossiuridina) metabolita inattivo che ha un'emivita media in plasma molto breve, tra 8 e 17 minuti; questo implica la necessità di utilizzare dosi molto elevate che ci porta ad un maggior numero di effetti collaterali. [Couvreur & Reddy, 2008; Matsuda e Sasaki, 2004; Bouffard et al., 1993].

## **10.2 SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE**

### **10.2.1 POLI(D,L-LACTIDE-CO-GLICOLIDE) (PLGA)**

Il metodo di sintesi della poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA) si basa sul metodo di emulsione con evaporazione del solvente [Holgado et al., 2008]. Questo si basa sulla dissoluzione di 250 mg di PLGA a temperatura ambiente in 10 mL di acetato di etile; a detta soluzione è aggiunta una fase acquosa di alcool polivinilico (PVA) 0.3% (w/v) sotto agitazione meccanica per 30 minuti. Dopo questo tempo, la dispersione risultante viene sottoposta ad agitazione magnetica (1500 rpm) per un tempo sufficiente da garantire la completa evaporazione del solvente organico.

La sospensione bianca di nanoparticelle polimeriche ottenute è stata sottoposta ad una procedura di pulizia comprendente due cicli di centrifugazione a 8000 rpm (centrifuga ad alta velocità Centrikon T-124, Kontron, Francia) e ridispersione in acqua ultrapura finché la conduttività del supernatante ottenuto è inferiore a 10 mS/cm. Il pellet ottenuto è stato ridisperso per sonicazione in acqua distillata e conservato in una bottiglia di vetro per l'uso successivo.

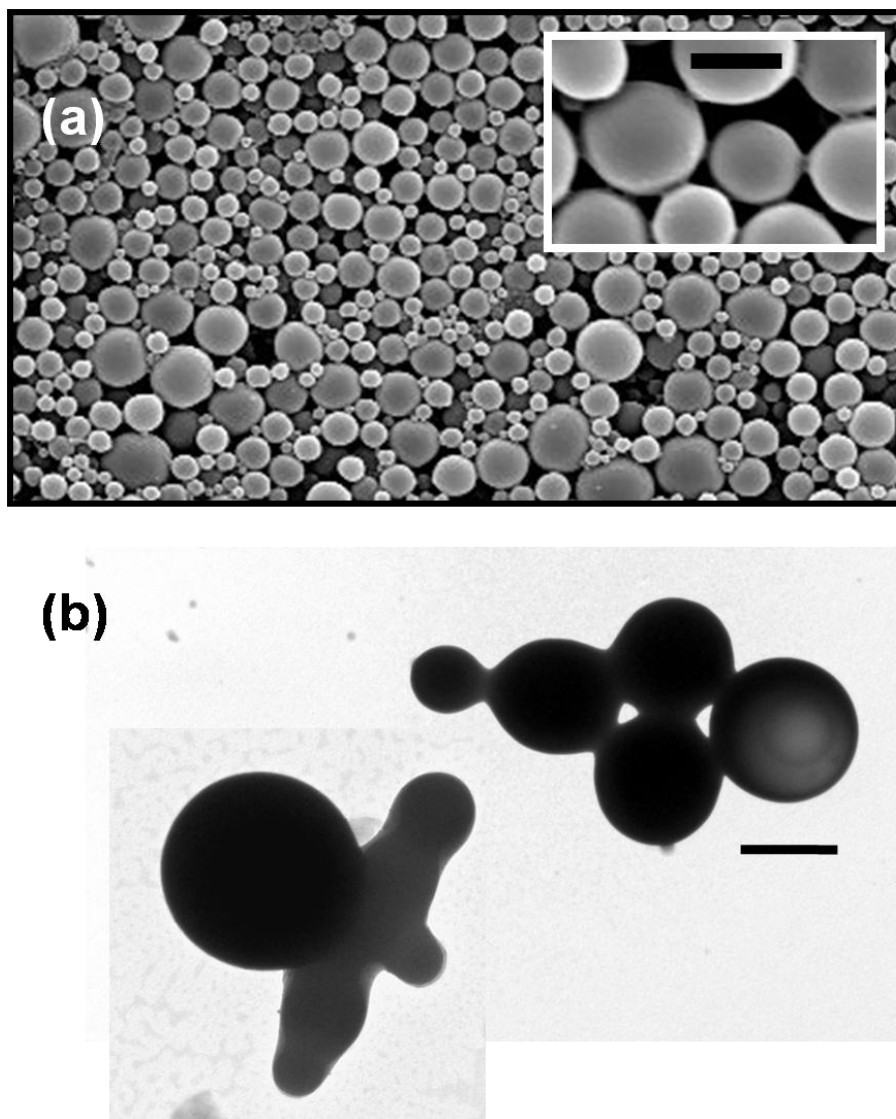
Bisogna cercare di ottenere una dimensione più piccola e più omogenea possibile, per garantire la migliore biodistribuzione del colloide dopo la somministrazione. Uno dei parametri decisivi per ottenere questo è la velocità di agitazione durante la sintesi. Abbiamo dunque testato l'influenza delle velocità 8000, 19500 e 26000 rpm sulla geometria delle particelle. In tutti i casi, si ottengono particelle sferiche, ma si osserva che la dimensione delle particelle e l'omogeneità sono fortemente condizionate dalla velocità di agitazione. In particolare, come mostrato in

tabella 15, la velocità che permette una dimensione minore e un maggior grado di omogeneità possibile è 19500 rpm. Per questo motivo, la velocità di agitazione usata nella sintesi di particelle PLGA fu sempre 19.500 rpm.

<b>Tipo di Particella</b>	<b>Velocità di agitazione (rpm)</b>	<b>Dimensione media (nm)</b>
PLGA	8.000 rpm	800 ± 1000
PLGA	19.500 rpm	600 ± 400
PLGA	26.000 rpm	1200 ± 1240
COMPOSTE	19.500 rpm	5000 ± 3400

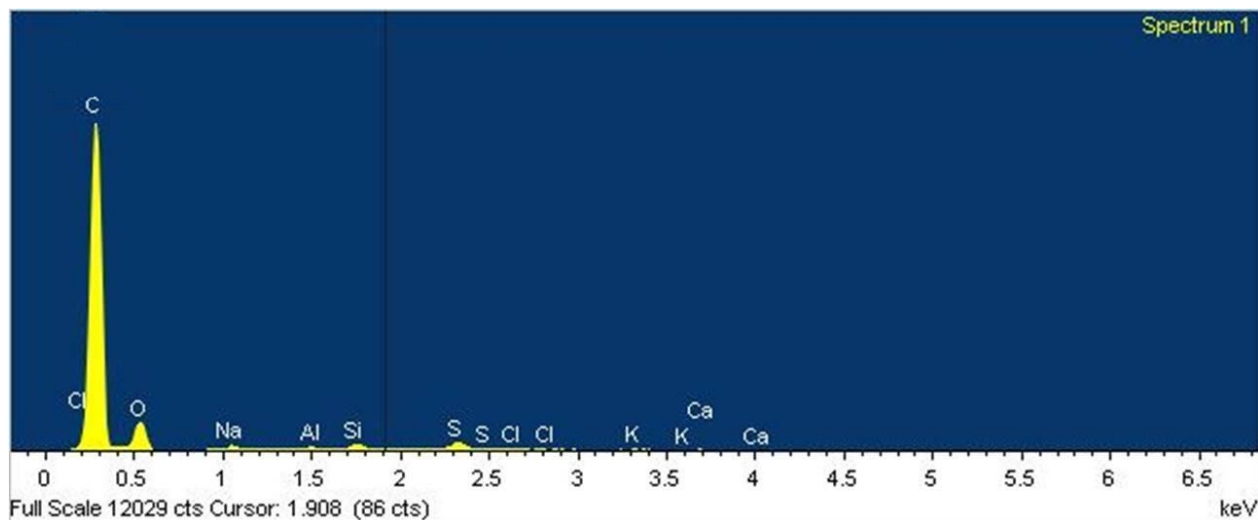
**Tabella 15.** Dimensione media delle particelle di PLGA a seconda della velocità di agitazione.

Dettagli di questa popolazione si rifletta nelle figure 54a e 54b.



**Figura 54.** Microfotografia elettronica a scansione ad alta risoluzione (FeSEM) delle particelle di poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA) (a) (insetto: particolare del campione). Lunghezza della barra: 500 nm. Microscopio elettronico ad alta risoluzione trasmissione (HRTEM) delle particelle di poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA) (b). Lunghezza della barra: 500 nm.

Nella figura 55 si vede lo spettro EDX della poli (D, L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA) nel quale prevalgono il C (84%) e O (15,30%), componenti di questo polimero biodegradabile. Inoltre presenta alcune tracce di contaminanti, come Ca, K e Cl in quantità inferiore all'1%.



**Figura 55.** Spettro EDX della poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA)

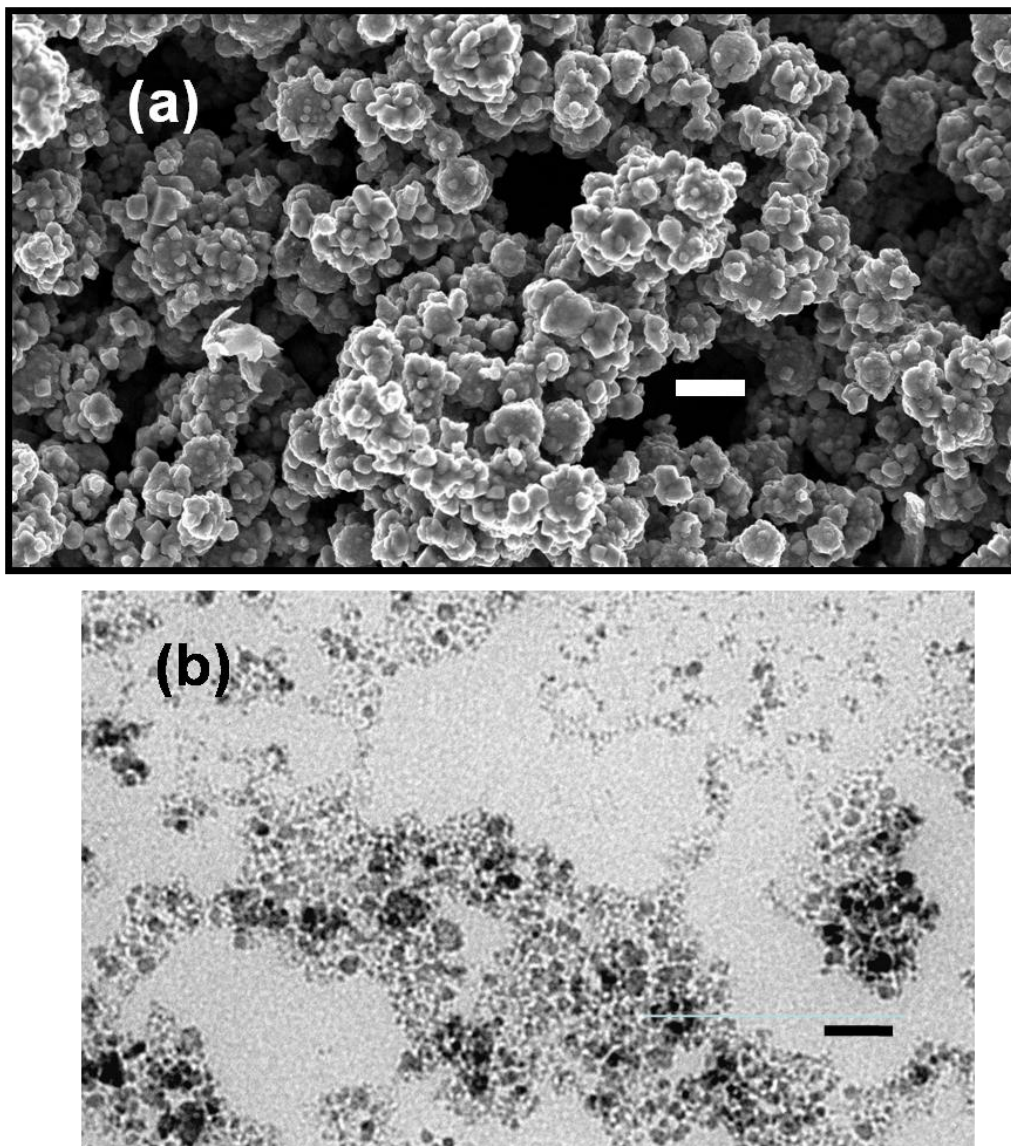
### 10.2.2 MAGHEMITA ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

Per la sintesi di nanoparticelle di maghemite si usa il metodo di sintesi e l'ossidazione di nanoparticelle di magnetite [Bee et al., 1995] basato sulla preparazione di 40 mL di una soluzione di tricloruro di ferro (FeCl<sub>3</sub>) 1 M e 10 mL di una soluzione 2 M di cloruro di ferro (FeCl<sub>2</sub>) in acido cloridrico 2 M. Si prepara una soluzione acquosa di ammoniaca (NH<sub>3</sub>) 0,7 M a cui, sotto agitazione meccanica, (700 rpm) sono stati aggiunti 4 ml al minuto di soluzione di FeCl<sub>3</sub> e 1 mL di FeCl<sub>2</sub>, fino a un totale di 40 mL e 10 mL rispettivamente.



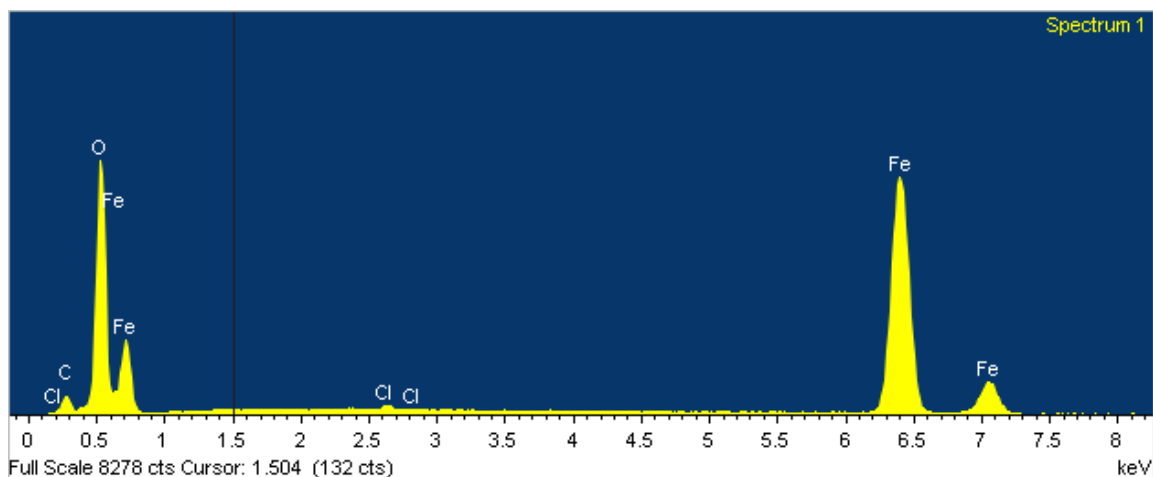
Immediatamente si produce la precipitazione dei nuclei di magnetite, che vengono sottoposti ad un processo di decantazione magnetica, eliminando il solvente. Poi si aggiungono 500 ml di una soluzione di acido perclorico ( $\text{HClO}_4$ ) 2 M e si lasciano trascorrere 12 ore. Infine, l'ossidazione dei nuclei di magnetite viene effettuata dopo la accurata rimozione di  $\text{HClO}_4$ ; aggiungendo 600 ml di nitrato ferrico [ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ], redispersando i nuclei di magnetite e la dispersione viene riscaldata a  $90^\circ\text{C}$ . Questa temperatura è mantenuta per 30 minuti per garantire la completa conversione della magnetite in maghemite. Infine, i nuclei di maghemite vengono rimossi dalla dispersione e mantenuti in acqua bidistillata.

Abbiamo ottenuto particelle di morfologia cubica e con una dimensione di  $7\pm 2$  nm (figure 56a y 56b), per questo si pensa che sono superparamagnetiche.



**Figura 56.** Microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (FeSEM) di particelle maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (a) (inserto: particolare del campione). Lunghezza della barra: 1  $\mu\text{m}$ . Microscopio elettronico ad alta risoluzione trasmissione (HRTEM) delle particelle di maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (b). Lunghezza della barra: 200 nm.

Nella figura 57 si vede lo spettro EDX delle particelle di maghemite, si osserva una prevalenza di Fe (49,41%) e di O (33,45%) come componenti di questo ossido, più tracce di alcuni contaminanti come Cl e C in una quantità inferiore all'1%.

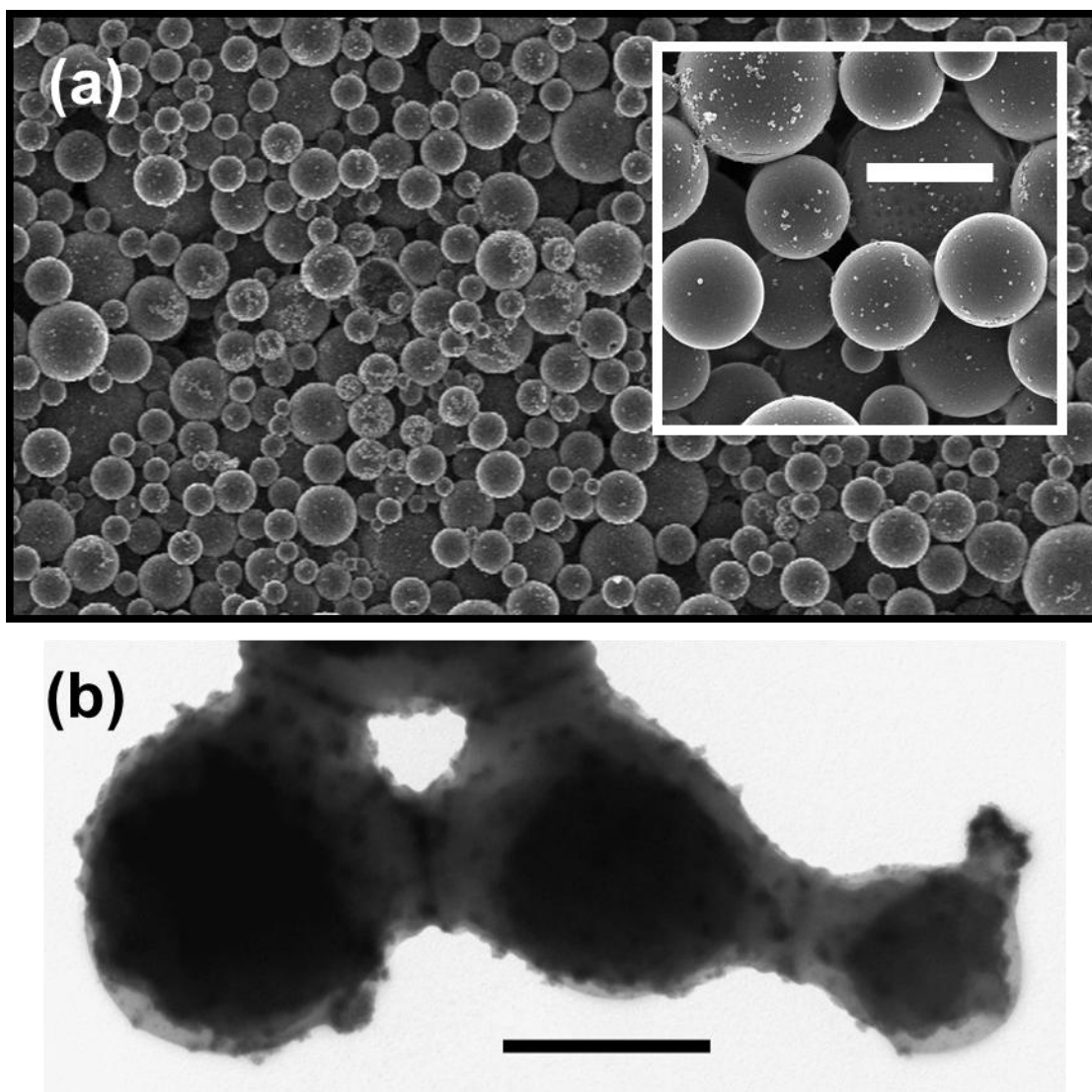


**Figura 57.** Spettro EDX della maghemita

### 10.2.3 PARTICELLE COMPOSTE DI PLGA/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

La procedura seguita per la sintesi delle particelle composte di maghemite e poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA) si basa sul metodo di emulsione con evaporazione del solvente previamente descritto per la sintesi delle nanoparticelle polimeriche pure [Holgado et al., 2008].

Le particelle magnetiche miscelate ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA) ottenute utilizzando le condizioni ottimali di sintesi di PLGA hanno una morfologia sferica e una dimensione di circa  $5,1 \pm 3,4$   $\mu$ m abbastanza eterogenei (Figure 58a e 58b). Nel dettaglio della figura 58a appare evidente che la maggior parte dei nuclei magnetici sono incorporati nella matrice di PLGA. Nonostante ciò, come si può vedere nella figura 58b, risulta che alcuni di essi sono anche presenti sulla superficie della matrice.



**Figura 58.** Microfotografia elettronica a scansione ad alta risoluzione (FeSEM) delle particelle composte  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  (a) (inserto: dettaglio del campione). Lunghezza della barra: 200 nm. Microfotografia elettronica di trasmissione ad alta risoluzione (HRTEM) delle particelle composte  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  (b). Lunghezza della barra: 150 nm.

Come si può osservare nella microanalisi per dispersione di raggi X (Figura 59) del composto del nostro sistema, la composizione viene modificata dalla presenza di questo, il quale contiene C (40%) e O (49%) mentre la percentuale di Fe viene diminuita (9%); la comparsa dei picchi caratteristici di entrambi i materiali è un'ulteriore prova dell'efficacia del rivestimento. Inoltre ci sono tracce di alcuni elementi contaminati come alluminio, cromo o nichel.

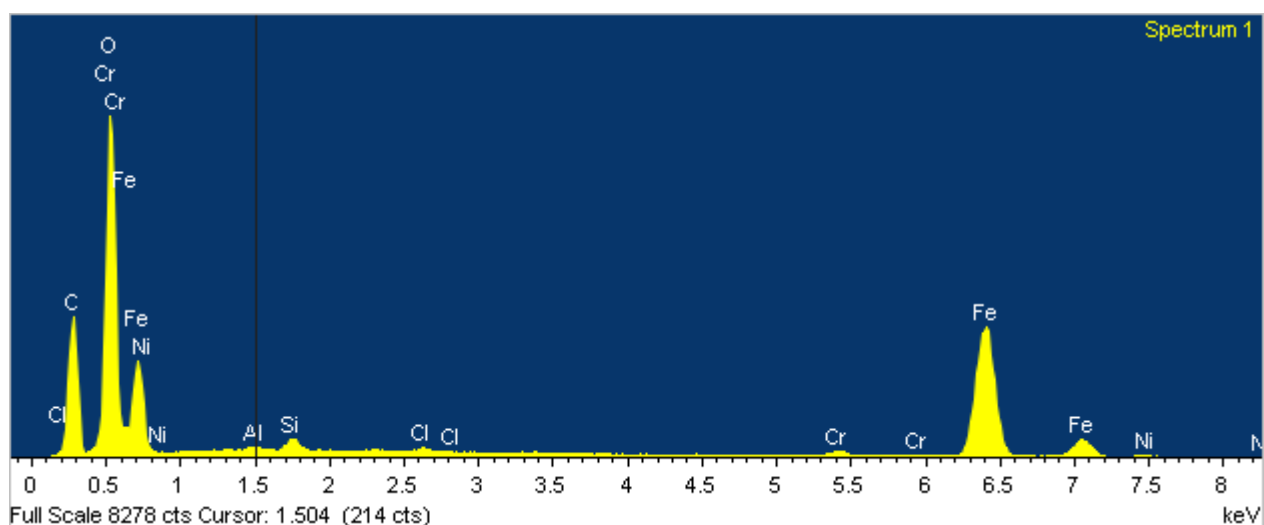


Figura 59. Spettro EDX delle particelle composte  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA.

## 10.2.4 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA PER TRASFORMATTA DI FOURIER

Con l'analisi delle nanoparticelle con infrarossi vogliamo dotare il nostro studio di una nuova prova dell'efficacia della metodologia di sintesi delle nanoparticelle di  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA. Le nanoparticelle composte devono avere uno spettro infrarosso dove compaiono le bande caratteristiche del PLGA, insieme alla banda caratteristica della  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. In questo modo viene dimostrato che le particelle magnetiche composte sono costituite da  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e PLGA.

La figura 60 registra lo spettro infrarosso dei tre tipi di materiali ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PLGA e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA). La sua analisi è una prova della efficacia del rivestimento, in quanto consente l'identificazione dei gruppi funzionali del polimero nelle particelle composte. Inoltre, c'è anche l'esistenza del picco caratteristico degli ossidi di ferro nello spettro delle particelle miste di  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA. In particolare, le bande osservate sono:

**A:** banda corrispondente alla vibrazione di stiramento del legame C = O di un estere alifatico saturo, appare a 1748 cm<sup>-1</sup>.

**B:** Gruppo di tre bande tra il 1450 e 1375 cm<sup>-1</sup>. Presenta una banda a 1451 cm<sup>-1</sup> corrispondente alla vibrazione molecolare di piegatura asimmetrica del legame C-H del CH<sub>3</sub> ( $\delta_{AS}$  CH<sub>3</sub>), a 1384 cm<sup>-1</sup> la banda della vibrazione molecolare di piegatura asimmetrica del legame C-H del CH<sub>3</sub> ( $\delta_s$  CH<sub>3</sub>) e infine, una banda della vibrazione di stiramento del OH del gruppo carbossilico a 1423 cm<sup>-1</sup>.

**C:** Banda appartenente alla vibrazione di stiramento CO legame del gruppo carbossilico (1269 cm<sup>-1</sup>).

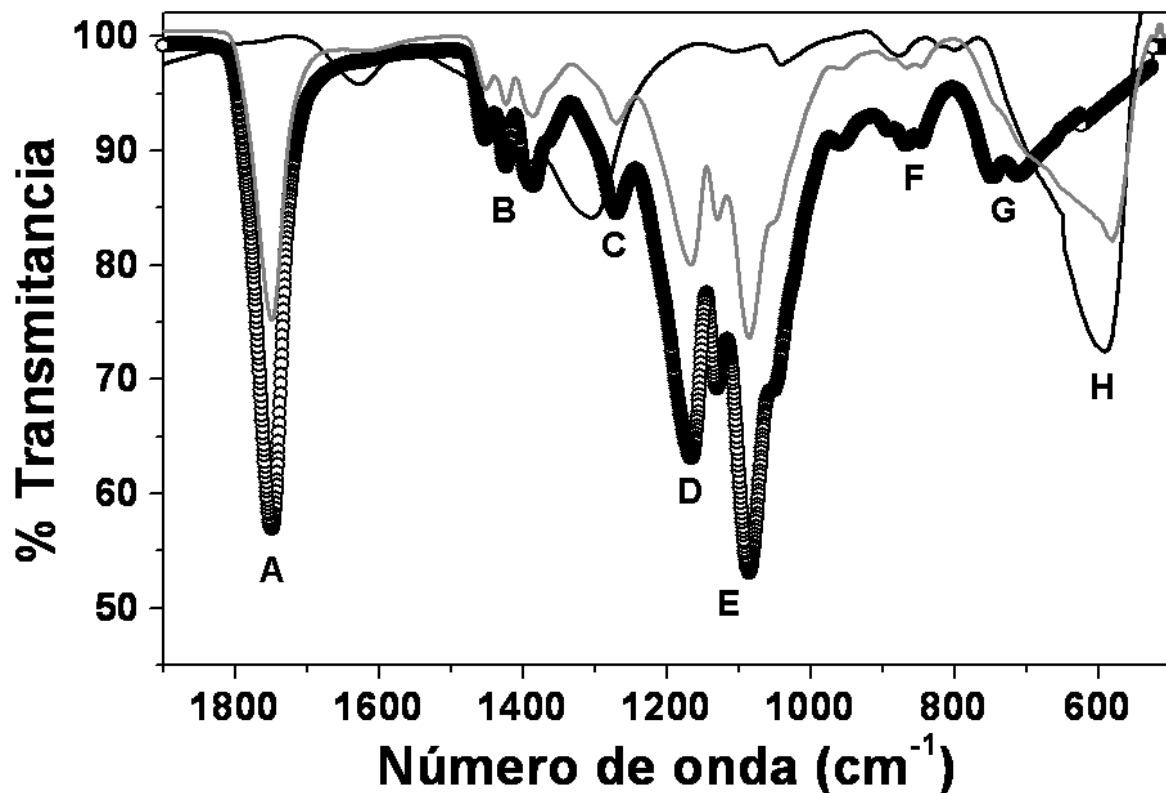
**D:** Banda corrispondente alla vibrazione di stiramento del legame C-O del gruppo alcolico (1165 cm<sup>-1</sup>).

**E:** Due bande asimmetriche accoppiate (1130 e 1084 cm<sup>-1</sup>) corrispondenti alla vibrazione di stiramento del C-O del gruppo estere e un estere di alcol primario, rispettivamente.

**F:** A 855 cm<sup>-1</sup> mostra una banda media caratteristica di un alcano.

**G:** Banda appartenente alla vibrazione di oscillazione del CH<sub>2</sub> ( $\rho$ CH<sub>2</sub>), si osserva a 730 cm<sup>-1</sup> ed è tipica di una lunga catena di CH<sub>2</sub>.

**H:** Singola banda assente nello spettro delle particelle di polimero. Appare a  $592\text{ cm}^{-1}$  ed è una banda larga e debole caratteristica degli ossidi di ferro [Lyons, 1967].



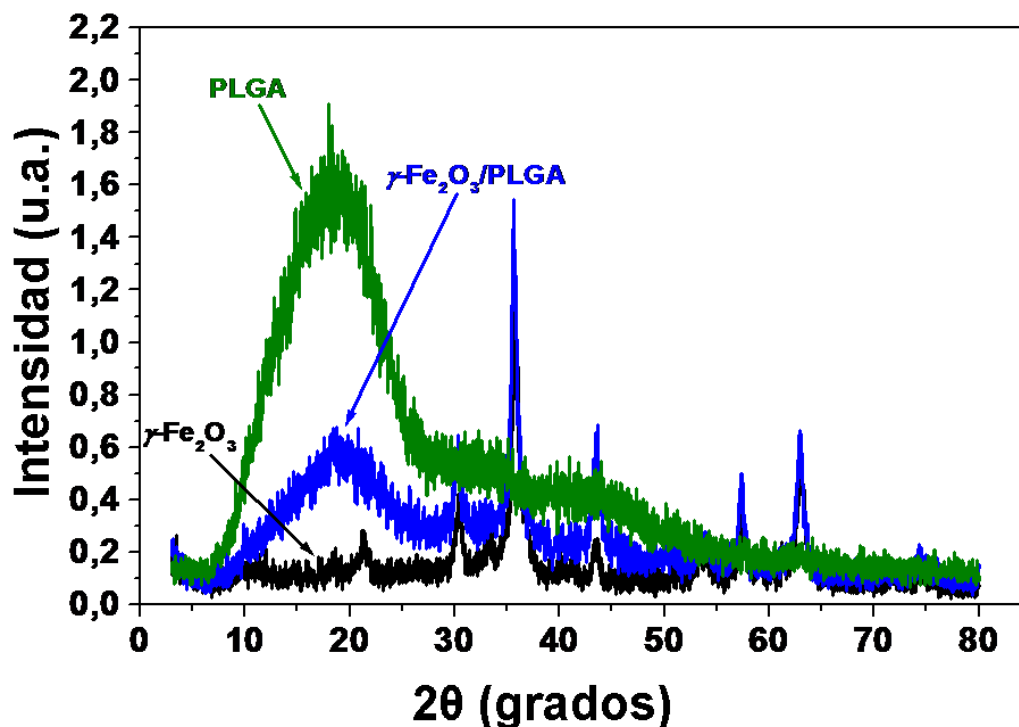
**Figura 60.** Spettro IR delle particelle di maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (linea nera), poli(D,L-lattide-co-glicolide) (PLGA) (- o -), e delle particelle composte  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA (linea grigia) .

### 10.2.5 DIFFRAZIONE A RAGGI X

Usiamo la diffrazione ai raggi X per confrontare qualitativamente i tre tipi di colloidali sintetizzati [Billmeyer, 1975; Suryanarayanan, 1995]. L'obiettivo è di confermare che i raggi X delle particelle di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  raccoglie le peculiarità dei due tipi di materiali che li compongono. Questo sarebbe una chiara prova dell'efficacia del metodo di formulazione sviluppato. Inoltre, si intende verificare che la struttura cristallina dei nuclei di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  rimane invariata quando sono compresi nella matrice della poli (D,L-lattide-*co*-glicolide). Questo è molto importante perché un'alterazione di questo tipo potrebbe eventualmente determinare le proprietà magnetiche del colloide composto.

Come si può osservare nella figura 61, tutti i picchi caratteristici dei due materiali che costituiscono le particelle miste ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e PLGA) appaiono nel diffrattogramma di questi. Si può anche dire, che la struttura cristallina dei nuclei di ossido di ferro rimane invariata dopo l'inclusione nella matrice polimerica. Inoltre, i diffrattogrammi di PLGA e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  coincidono con quelli in letteratura, questo permette di identificare questi campioni come tali materiali [Depeyrot et al., 2002; Geng et al., 2008]. La maggior intensità dei picchi corrispondenti alla  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nel campione di particelle miscelati  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  può essere dovuta al contributo del PLGA a questo diffrattogramma. L'esistenza di picchi caratteristici della maghemita indica che le particelle colloidali composte conservano la struttura cristallina del nucleo magnetico.

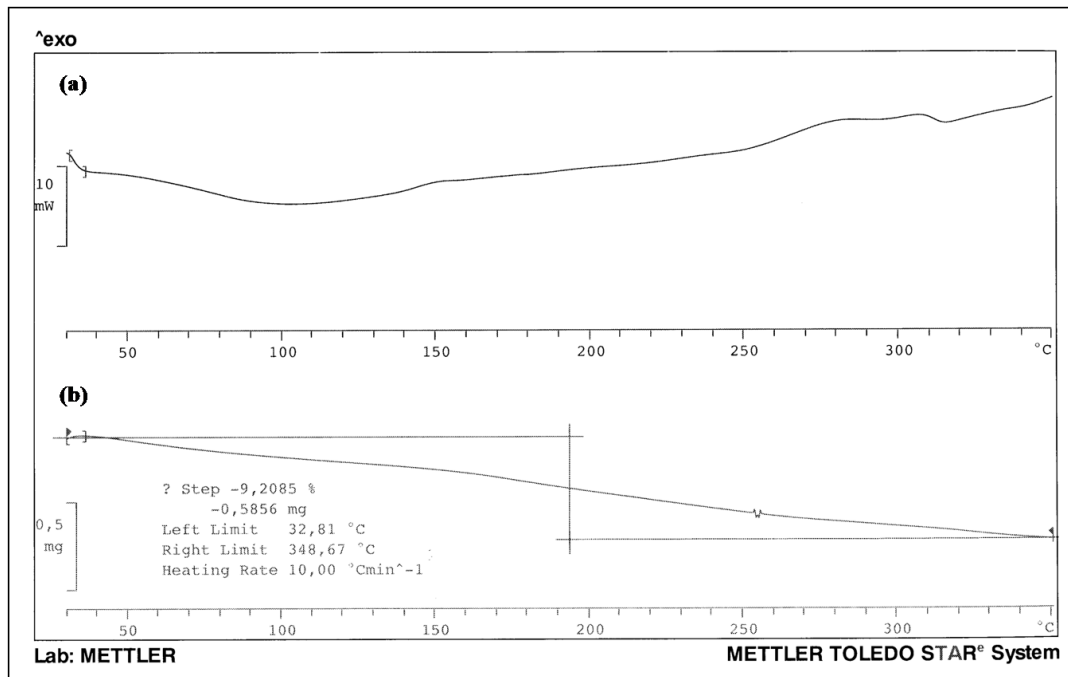




**Figura 61.** Diffrattogramma a raggi X delle particelle di maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli (D, L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA), e particelle composte di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA.

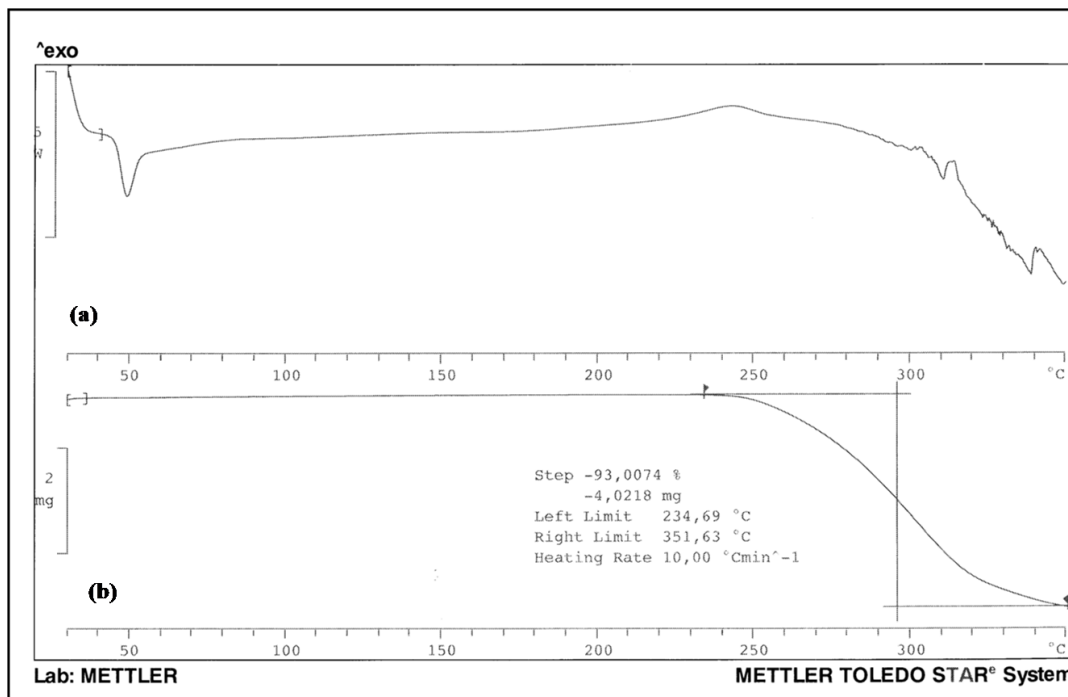
### 10.2.6 ANALISI TERMICA: DSC E TGA

La calorimetria differenziale a scansione o DSC viene utilizzata per misurare il flusso di calore interno ed esterno al campione per determinare la temperatura del fenomeno termico durante una variazione di temperatura controllata. L'analisi termogravimetrica o TGA associato alla DSC serve a distinguere una transizione dalla degradazione o desolvatazione. L'associazione di queste due tecniche permette di individuare eventi termici associati ad una variazione di peso come risultato di una disidratazione, o il rilascio di prodotti gassosi derivanti da una decomposizione; in questo modo è possibile associare i picchi presenti nel termogramma DSC di un evento concreto. Nella termogravimetria la variazione nella massa del campione può essere determinata in funzione della temperatura o del tempo.



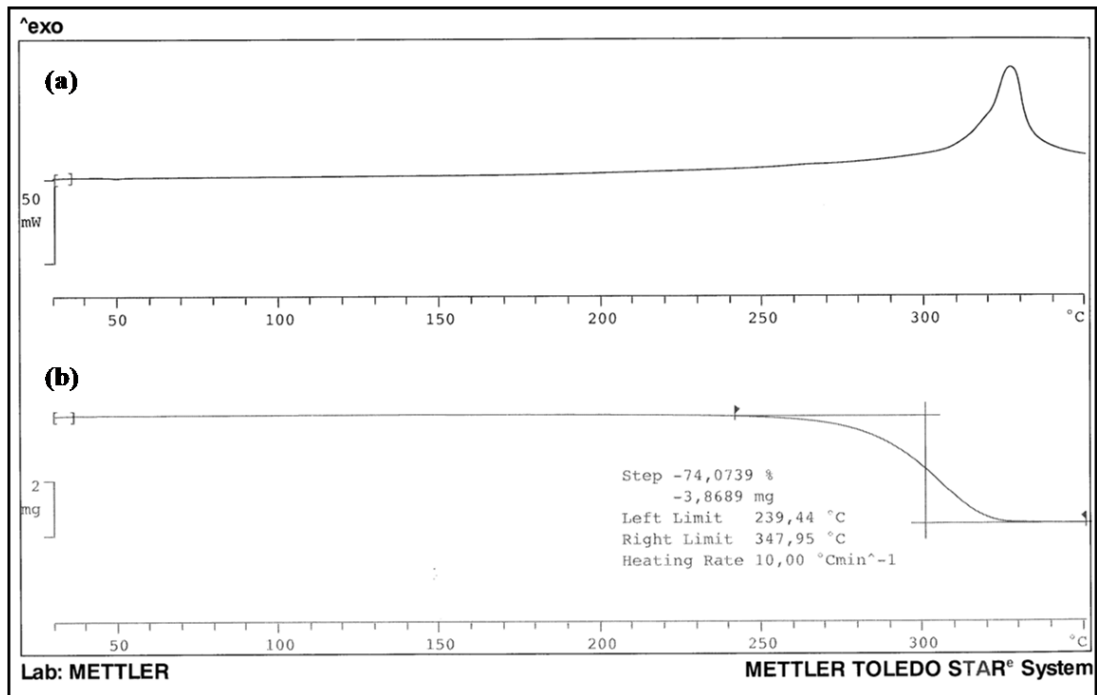
**Figura 62.** Termogramma di calorimetria differenziale a scansione (DSC) di  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  (a). Termogramma ottenuto mediante termogravimetria (TGA) di  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  (b).

Il termogramma della maghemita ( $\gamma$ - $Fe_2O_3$ ) (figura 62) presenta una linea base molto irregolare con un profilo termogravimetrico che indica una perdita di peso che incomincia a 40°C e che al raggiungimento dei 350°C nella nostra analisi non è ancora completa. Questa perdita di peso è approssimativamente del 9% per la trasformazione di maghemita in un ossido inferiore.



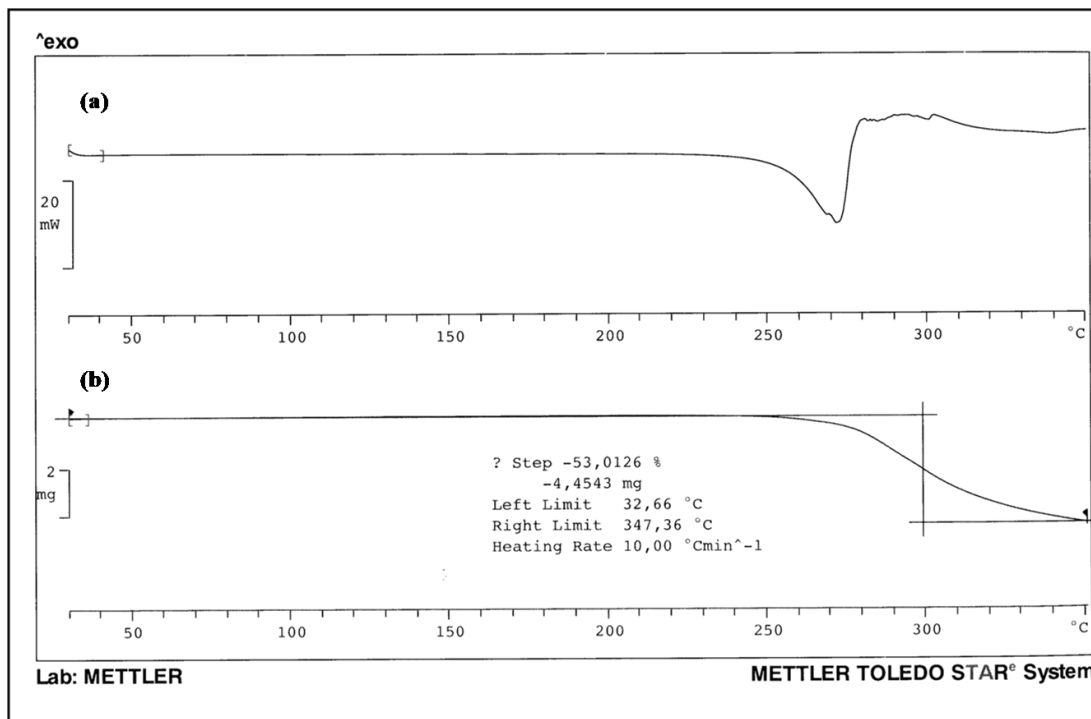
**Figura 63.** Termogramma di calorimetria differenziale a scansione (DSC) di PLGA (a).  
Termogramma ottenuto mediante termogravimetria (TGA) di PLGA(b).

Come si può osservare (figura 63), il polimero non ha caratteristiche importanti nel suo termogramma. Appare un endoterma, probabilmente di fusione, a 50°C, temperatura oltre la quale presenta un profilo abbastanza stabile al riscaldamento fino a 200°C. Raggiunta questa temperatura, il profilo tende a cambiare indicando la decomposizione del polimero. Questo è confermato dal profilo termogravimetrico che indica una perdita in peso di quasi il 100% tra 250 e 350°C a causa della combustione.



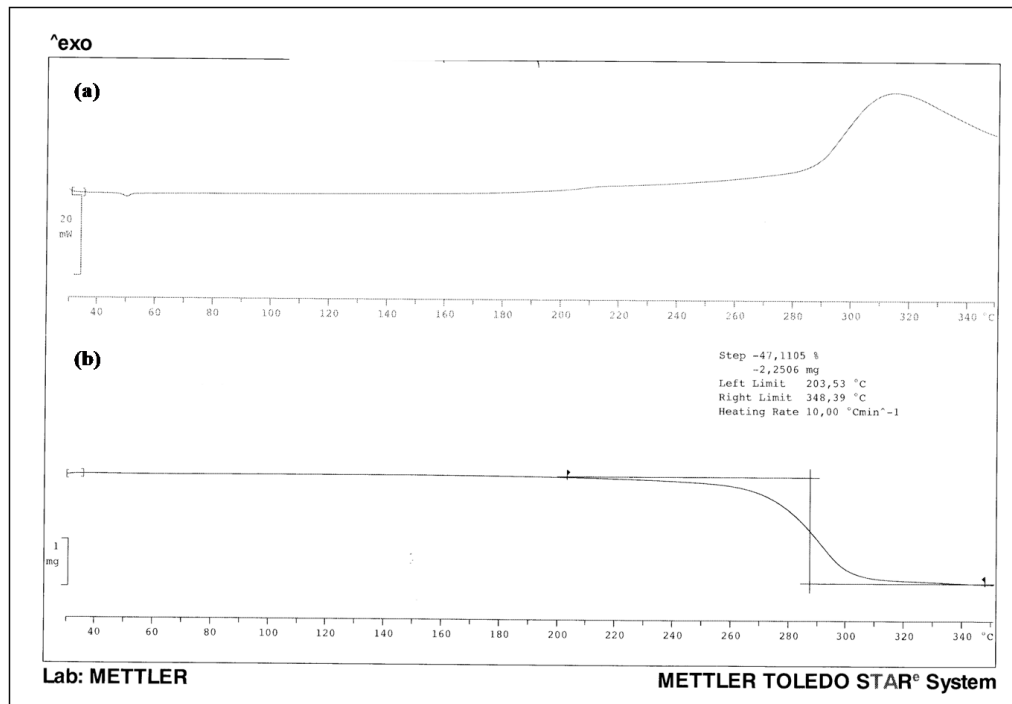
**Figura 64.** Termogramma di calorimetria differenziale a scansione (DSC) delle particelle composte  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  (a). Termogramma ottenuto mediante termogravimetria (TGA) delle particelle composte  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  (b).

Come si può vedere nel termogramma delle nostre particelle composte (figura 64) appare un esoterma a circa  $330^\circ\text{C}$ , mentre la linea di base del termogramma è abbastanza regolare. Questo evidenzia che l'associazione del polimero con l'ossido di ferro produce una stabilizzazione del sistema. La reazione esotermica ha un profilo molto arrotondato, dove convergono la decomposizione termica del polimero e il nucleo magnetico, ipotizziamo che la maghemita agisca da ossidante quando è legata al polimero, generando una reazione esotermica che è assente nel termogramma del composto puro, ma che agisca anche come stabilizzante, perchè la perdita di peso al riscaldamento è inferiore ( $\approx 74\%$ ).



**Figura 65.** Termogramma di calorimetria differenziale a scansione (DSC) del antitumorale cloridrato di gemcitabina (a). Termogramma ottenuto mediante termogravimetria (TGA) del antitumorale cloridrato di gemcitabina (b).

Nel termogramma del farmaco della nostra ricerca (figura 65) si vede che questo presenta una buona stabilità termica con un punto di fusione vicino ai 225°C. Tuttavia, ha un endoterma irregolare di fusione molto ampio (circa 40°C) e asimmetrico che segnala una decomposizione confermata dal profilo termogravimetrico indicando una perdita di peso del 50% tra i 250 e i 350°C.



**Figura 66.** Termogramma di calorimetria differenziale a scansione (DSC), del sistema di trasporto costituito da  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA e l'antitumorale cloridrato di gemcitabina (a). Termogramma ottenuto mediante termogravimetria (TGA) del sistema di trasporto costituito da  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA e l'antitumorale cloridrato di gemcitabina (b).

Infine, si fa l'analisi DSC e TGA al nostro sistema di trasporto contenente l'antitumorale cloridrato di gemcitabina (figura 66). Il termogramma è molto simile a quello del sistema di trasporto senza il farmaco, anche se in questo caso l'esoterma è ampio e arrotondato, questo indica che il calore di decomposizione del polimero e quello del nucleo magnetico si aggiungono a quello del farmaco. Tuttavia, come si può osservare la perdita di peso in questo caso è leggermente inferiore ( $\approx 47\%$ ).

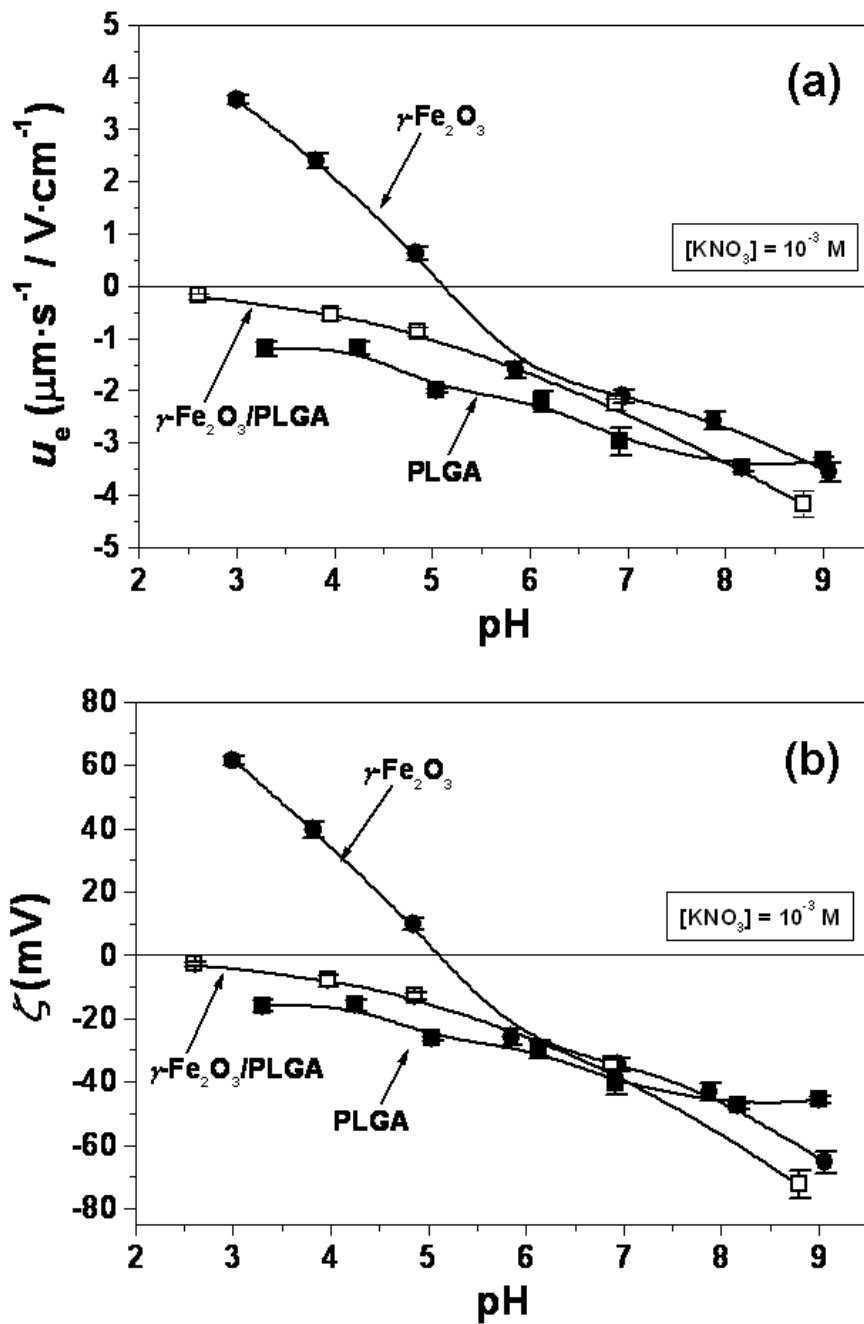
Poiché il nostro sistema non raggiungerà temperature così elevate durante i processi tecnologici a cui sarà sottoposto normalmente, si può affermare la sua notevole stabilità termica, sottolineando inoltre, che può essere sterilizzato con il calore senza subire decomposizione.

## **10.3 PROPRIETÀ ELETTRICHE SUPERFICIALI**

### **10.3.1 STUDIO DELL'EFFETTO DEL PH E DELLA FORZA IONICA SULLE PROPRIETÀ ELETTRICHE SUPERFICIALI**

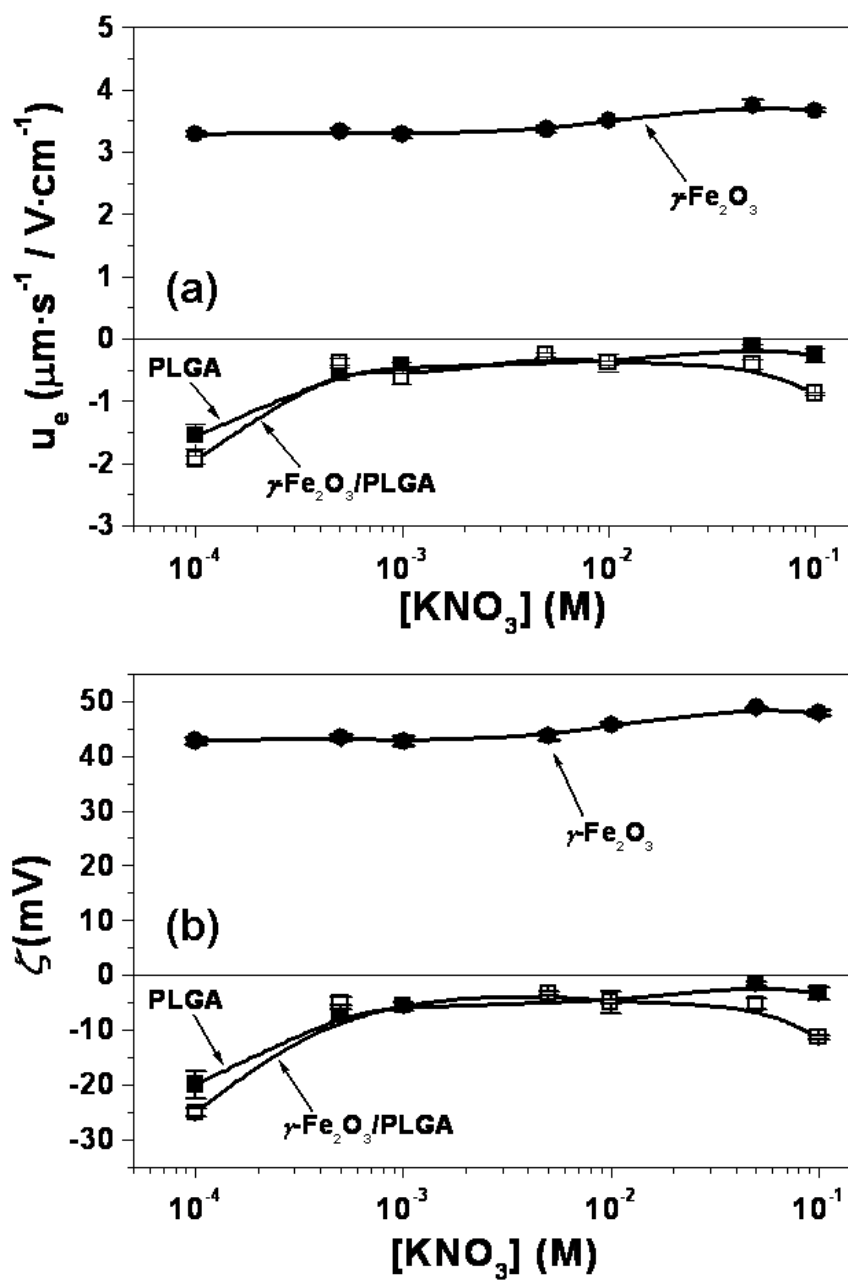
La determinazione della mobilità elettroforetica delle varie sospensioni di maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lattide-co-glicolide) (PLGA) e nanoparticelle composte ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ) è stata effettuata utilizzando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, England), basata sull'analisi dell'autocorrelazione della luce laser diffusa dalle particelle in movimento. Questo dispositivo consente di determinare  $u_e$  con errori  $\leq 5\%$ , e la temperatura rimane costante (fino a  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) utilizzando un modulo Peltier.

La figura 67 mostra i valori di  $u_e$  in funzione del pH in presenza di  $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M. La maghemita ha una carica superficiale netta positiva fino a un valore del  $\text{pH} \approx 5$ , corrispondente al punto isoelettrico o pH di potenziale zeta zero [Piazza et al., 2002]. Per contro, il PLGA e le particelle composte hanno carica superficiale netta negativa ad ogni intervallo di pH studiato e rileva soltanto l'esistenza di un pH di potenziale zeta zero  $\text{pH}=5$ . In questa figura si vede come il rivestimento polimerico nasconde efficacemente il nucleo magnetico rendendo la superficie delle particelle miste elettrocinetica indistinguibili da quelle del polimero puro.



**Figura 67.** Mobilità elettroforética ( $u_e$ ) (a) e potenziale zeta ( $\zeta$ ) (b) delle particelle di maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ●), poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA, ■) e particelle composte maghemita/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ , □) in funzione del pH, in presenza di  $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M.





**Figura 68.** Mobilità elettroforetica ( $u_e$ ) (a) e potenziale zeta ( $\zeta$ ) (b) delle particelle di maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ●), poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA, ■) e particelle composte maghemita/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ , □) in funzione della concentrazione di  $\text{KNO}_3$  a pH naturale (pH = 5).

Per confermare questi risultati, abbiamo determinato la mobilità elettroforetica dei tre tipi di particelle in funzione della concentrazione molare di  $\text{KNO}_3$  a pH naturale delle dispersioni acquose (pH=5). I risultati di quest'analisi sono mostrati in figura 68. Come si vede, le particelle di maghemite hanno una carica di superficie netta positiva in tutta la gamma di concentrazioni molarie di  $\text{KNO}_3$ . Sembra che la forza ionica del mezzo determina il valore della mobilità elettroforetica, poiché i valori rimangono costanti per tutto l'intervallo. Non è lo stesso nel caso del PLGA e le particelle miste  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ , poiché la carica elettrica di superficie negativa diminuisce notevolmente con l'aumentare della forza ionica della dispersione. Anche in questo caso, la somiglianza elettrocinetica tra il polimero puro e le particelle miste di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  e la differenza dalla maghemite si osservano perfettamente.

### 10.3.2 MECCANISMO DI FORMAZIONE DI RIVESTIMENTO POLIMERICO

Con le informazioni precedentemente presentate si può spiegare il meccanismo con cui è formato lo strato polimerico sulla superficie del maghemite:

- Possiamo parlare di una interazione elettrostatica attrattiva tra le particelle di maghemite cariche positivamente. A causa della carica di superficie positiva dei nuclei magnetici e negativa del polimero si ha una concentrazione di polimero vicino alla superficie della maghemite.
- In aggiunta parleremo di un meccanismo termodinamico utilizzando l'equazione Dupré e calcolando l'energia libera di interazione tra la maghemite (M) e il polimero (P) in soluzione acquosa (A),  $\Delta G_{\text{MAP}} = \gamma_{\text{MP}} - \gamma_{\text{MA}} - \gamma_{\text{PA}}$ . Il risultato di questo calcolo è  $-19.76 \text{ mJ/m}^2$ . Ciò significa che le interazioni acido-base, e le forze di van der Waals fra la maghemite e il polimero sono

sostanzialmente attraenti. Vale a dire che è termodinamicamente più favorevole per il polimero rimanere in contatto con la maghemita che essere isolato durante la dispersione acquosa [Arias et al., 2001].

## **10.4 PROPRIETÀ DI SUPERFICIE**

### **TERMODINAMICHE**

Ci concentreremo su una breve descrizione della tecnica per misurare gli angoli di contatto, dal momento che è quella che abbiamo usato nella nostra ricerca.

Il sistema fisico a cui si applica questa tecnica è costituito da una superficie solida, una goccia di liquido depositato su di essa e aria. Misurando l'angolo di contatto ( $\theta$ ) tra la fase liquida e gassosa circostante (interfase gas-liquido) saranno ottenuti i valori dei componenti della tensione superficiale del solido. L'applicazione di questo metodo è limitato ai casi in cui la superficie solida è piana, rigida e omogenea su scala macroscopica.

La definizione termodinamica dell'angolo di contatto è data dalla equazione di Young. Per una superficie solida delle caratteristiche di cui sopra su cui è depositata una goccia di liquido puro, l'angolo di contatto di equilibrio è solo una grandezza che soddisfa l'equazione di Young:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_L \cos\theta \quad (49)$$

ve  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{SL}$  e  $\gamma_L$  sono, rispettivamente, le tensioni interfacciali solido-vapore e solido-liquido e la tensione superficiale del liquido. La equazione 49 può essere scritta come:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos\theta + \pi_e \quad (50)$$

dove  $\gamma_S$  è la tensione superficiale del solido e  $\pi_e$  la pressione di superficie è definita da:

$$\pi_e = \gamma_S - \gamma_{SV} \quad (51)$$

cioè, la pressione bidimensionale esercitata dal vapore adsorbito sulla superficie solida. Nel caso in cui  $\gamma_S$  supera  $\gamma_L$ , questo adsorbimento provoca una diminuzione della tensione superficiale del solido fino a raggiungere, in caso di saturazione, il valore della tensione superficiale del liquido. In queste condizioni limite,  $\pi_e = \gamma_S - \gamma_L$ . Altrimenti, corrisponde generalmente ai solidi a bassa energia superficiale, come quelli utilizzati in questo lavoro,  $\pi_e$  è trascurabile e l'equazione di Young può essere scritta nel seguente modo:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos\theta \quad (52)$$

Un fattore importante da considerare nelle misurazioni dell'angolo di contatto, è il fenomeno di isteresi. Quando una goccia di liquido viene depositata sulla superficie di un solido, si può produrre, a seconda del metodo utilizzato, un passo (la goccia viene depositata su una superficie asciutta) o una regressione della goccia (una volta depositata viene retratta, muovendosi sulle aree e umide), con i rispettivi angoli di contatto  $\theta_a$  (in avanti) e  $\theta_r$  (indietro). Si è verificato che  $\theta_r$  è sempre inferiore a  $\theta_a$ . Questo fenomeno può ostacolare la stima del vero angolo di contatto perché c'è una forte dipendenza dell'ampiezza dell'isteresi e il volume delle gocce utilizzato.

Gli angoli di contatto dei fluidi selezionati sono stati determinati in strati sottili dei tre tipi di materiali depositati su vetrini da microscopio. Queste superfici lisce si ottengono dopo l'aggiunta uniforme di una sospensione acquosa ( $\approx 10\%$  w / v) di ogni tipo di colloide sulla superficie pulita e secca di una lastra di vetro. I valori degli angoli di contatto (in gradi) ottenuti con i fluidi selezionati sono la media di 16 determinazioni a  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , misurata su una goccia nuovo dopo ogni due passi.

	ACQUA	FORMAMIDA	$\alpha$ -BROMONAFTALENO
MAGHEMITA	$32 \pm 2$	$18 \pm 2$	$13 \pm 2$
PLGA	$65 \pm 2$	$24 \pm 2$	$21 \pm 2$
COMPOSTE	$61 \pm 2$	$23 \pm 2$	$20 \pm 2$

**Tabella 16.** Angoli di contatto (gradi) dei liquidi usati nelle determinazioni in compresse con tre tipi di materiali.

### 10.4.1 COMPONENTI DELLA ENERGIA LIBERA SUPERFICIALE

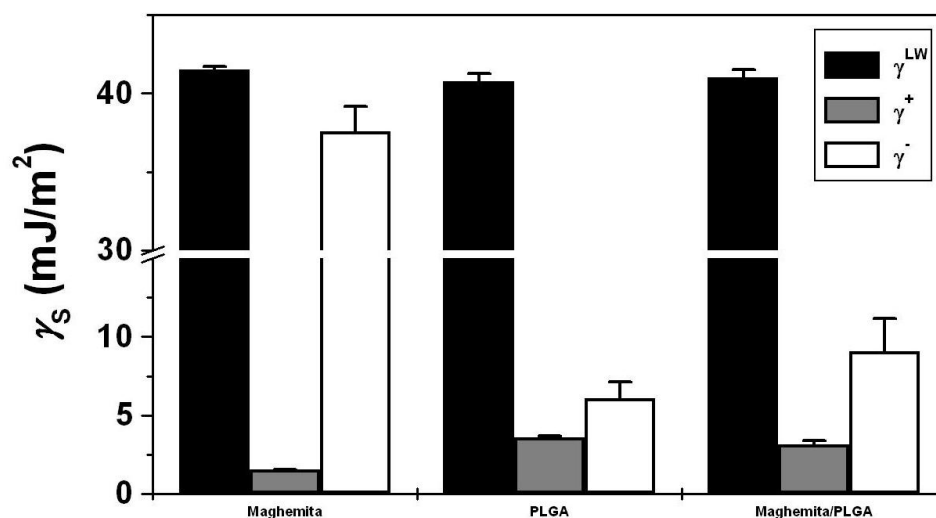
La valutazione dei componenti  $\gamma_s$  della energia libera di superficie è quella che ci da un'autentica informazione sulla superficie fisica termodinamica della maghemita, PLGA e le particelle composte.

Per la maghemita la componente Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_s^{\text{LW}}$ ) è  $42.49 \pm 0.34$   $\text{mJ/m}^2$ , la componente elettrone-accettore ( $\gamma_s^+$ ) è  $1.03 \pm 0.07$   $\text{mJ/m}^2$ , e il contributo elettrone-donatore ( $\gamma_s^-$ ) è  $39.41 \pm 1.82$   $\text{mJ/m}^2$ .

Per il PLGA la componente Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_s^{LW}$ ) è  $40.78 \pm 0.52$  mJ/m<sup>2</sup>, la componente elettrone-accettore ( $\gamma_s^+$ ) è  $3.59 \pm 0.11$  MJ/m<sup>2</sup>, e il contributo elettrone-donatore ( $\gamma_s^-$ ) è  $4.6 \pm 1.7$  mJ/m<sup>2</sup>.

Per le particelle composte la componente Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_s^{LW}$ ) è  $41.01 \pm 0.51$  mJ/m<sup>2</sup>, la componente elettrone-accettore ( $\gamma_s^+$ ) è  $3.15 \pm 0.22$  mJ/m<sup>2</sup>, e il contributo elettrone-donatore ( $\gamma_s^-$ ) è  $9.5 \pm 2.14$  mJ/m<sup>2</sup>.

Con questi risultati (figura 69), possiamo notare che le nostre particelle sono essenzialmente materiali elettrone-donatori in modo che possano avere interazioni acido-base con le fasi di ogni polarità ( $\gamma^+$ ,  $\gamma^-$ , o entrambi, diversi da zero), ma le forze AB non contribuiscono alla sua energia libera di coesione.



**Figura 69.** Valori dei componenti della energia libera di superficie dei tre tipo di particelle: maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA), y compuestas maghemita/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA).

## 10.4.2 ANALISI DELLA NATURA IDROFILA/IDROFOBA

Come abbiamo già spiegato sopra, una caratterizzazione termodinamica completa è essenziale affinché le interazioni coinvolte nella determinazione dell'energia libera di superficie dei solidi si manifestino in modi diversi come: l'aggregazione delle particelle in sospensione o l'adesione a diversi substrati. Quello che cerchiamo è che i metodi utilizzati insieme con la sua base teorica, permettano di specificare la componente  $LW$  dell'energia di interazione tra le particelle disperse e quantificare la contribuzione non DLVO all'energia totale perchè si riferiscono alla componente  $AB$  della tensione superficiale tanto del solido in sospensione come del liquido.

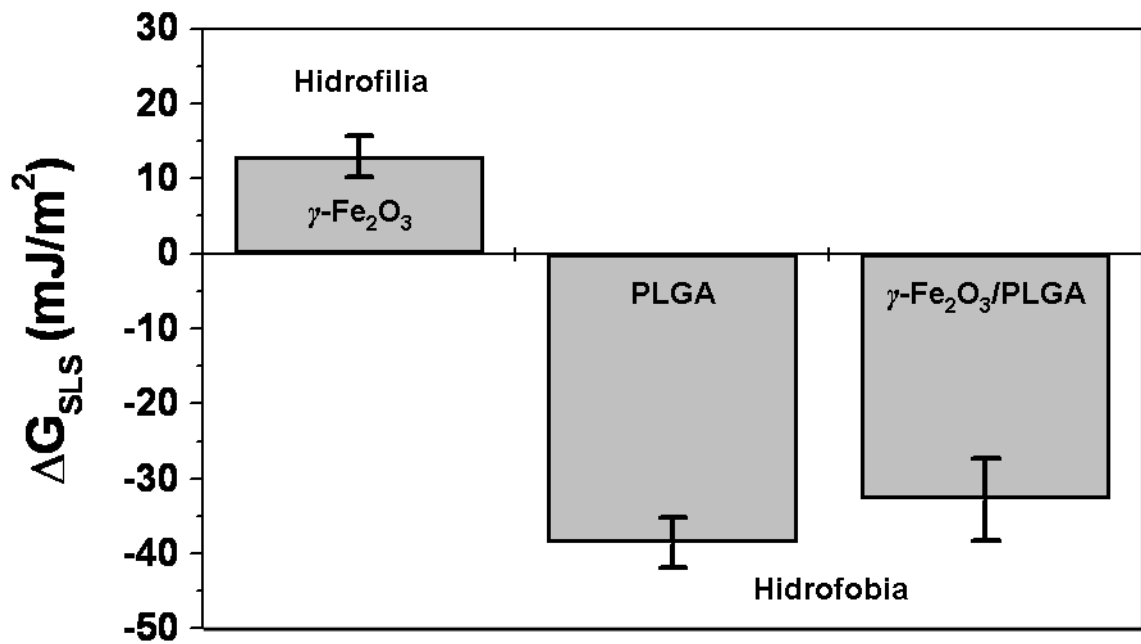
Qui consideriamo l'importanza dei termini di energia  $LW$  e  $AB$  dell'energia di interazione tra le particelle descritte in questo lavoro (fase 1) in soluzione acquosa (fase2):

$$\Delta G_{121} = \Delta G_{121}^{LW} + \Delta G_{121}^{AB} \quad (53)$$

Utilizzando l'equazione 53, si possono ottenere i valori di  $\Delta G_{121}^{LW}$  di ciascuna componente:  $\Delta G_{121}^{LW}$  (mJ/m<sup>2</sup>) per la maghemita è di 12.98±2.71 mJ/m<sup>2</sup>, per il polimero è di -38,59±3.33 mJ/m<sup>2</sup> e per le particelle composte è di -32.76±5.44 mJ/m<sup>2</sup>.

Ovviamente, questi cambiamenti di energia libera superficiale si manifestano nelle caratteristiche idrofobe/idrofile di questo materiale polimerico. Secondo van Oss [1994], si può utilizzare il seguente criterio per determinare quando un materiale può essere considerato idrofilo o idrofobo. Se  $\Delta G_{121}^{TOT}$  risulta essere negativo le interazioni interfacciali favoriscono l'attrazione tra le stesse particelle e sono considerati idrofobe. L'idrofilia e la repulsione sono associate a valori positivi di

$\Delta G_{121}^{TOT}$ . Nel nostro caso, le particelle composte hanno un valore di  $\Delta G_{121}^{TOT} = -24.4 \pm 3.7 \text{ mJ/m}^2$ , indicativo del suo carattere idrofobo (figura 70).



**Figura 70.** Valori di  $\Delta G_{SLS}$  (mJ/m<sup>2</sup>) e natura idrofoba/idrofila dei tre tipi di nanoparticelle: maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA), e particelle composte di maghemita/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ).

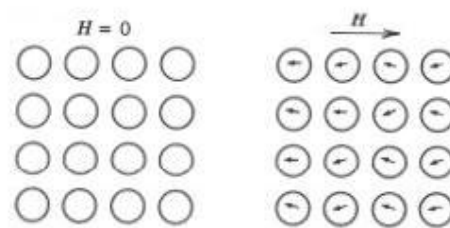


## 10.5 PROPRIETÀ MAGNETICHE

### 10.5.1 PROPRIETÀ MAGNETICHE

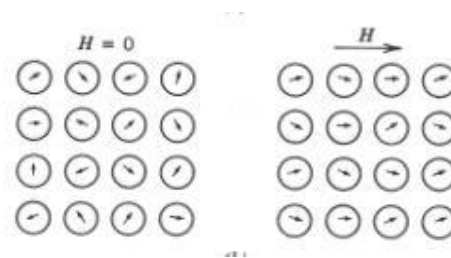
Esistono diversi tipi di magnetismo provocati dal movimento di elettroni in un materiale [Callister, 1996]. Quando gli elettroni si muovono attraverso un filo, si genera un campo magnetico intorno al filo. Le proprietà magnetiche macroscopiche dei materiali sono il risultato dei momenti magnetici associati a singoli elettroni. In generale, tutti i materiali hanno almeno un tipo di magnetismo, a seconda del comportamento di risposta degli elettroni e dei dipoli magnetici atomici quando si applica un campo magnetico esterno. I principali tipi di magnetismo sono i seguenti:

- **Diamagnetismo:** forma molto debole di magnetismo che si verifica soltanto quando si applica un campo magnetico esterno, producendo una variazione nel movimento orbitale degli elettroni del materiale.



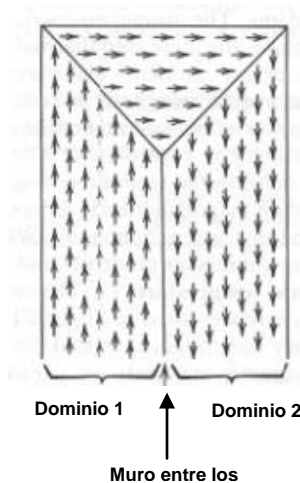
**Figura 71.** Schema dei dipoli in un materiale diamagnetico.

- Paramagnetismo:** a causa degli elettroni spaiati del materiale. Ogni atomo è associato ad un momento magnetico netto provocato dalla rotazione degli elettroni. Quando si applica un campo magnetico i dipoli sono allineati con esso, dando come risultato una magnetizzazione positiva. Tuttavia, poiché i dipoli non interagiscono tra di loro, abbiamo bisogno di campi magnetici estremamente grandi per allinearli. Una volta scomparso il gradiente magnetico, la magnetizzazione viene persa. È molto importante evidenziare il superparamagnetismo, che deriva da un cambiamento qualitativo nella struttura dei materiali magnetici nanometrici. Questa passa dall'essere costituita da diversi domini magnetici all'essere formata da un singolo dominio magnetico o monodomain causando la scomparsa della isteresi [Alvarez Paneque et al., 2008].



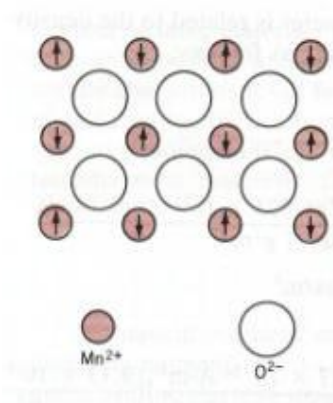
**Figura 72.** Schema dei dipoli magnetici in un materiale paramagnetico.

- **Ferromagnetismo:** è costituito da una forte interazione tra i momenti dipolari atomici vicini. Questa situazione li mantiene allineati anche quando il campo magnetico esterno viene eliminato (figura 73).



**Figura 73.** Schema dei domini magnetici in un materiale ferromagnetico.

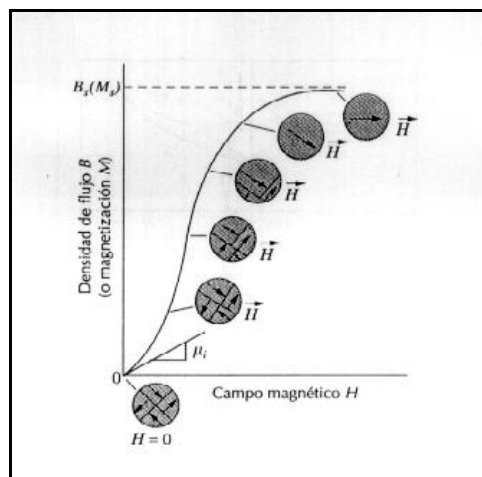
- **Antiferromagnetismo:** In questo caso, la presenza di un campo magnetico fa sì che i momenti magnetici prodotti in dipoli vicini si allineino con il campo magnetico in direzioni opposte. Questo produce una magnetizzazione nulla (figura 74).



**Figura 74.** Orientamento dei domini magnetici in un materiale antiferromagnetico.

### 10.5.2 CICLO DI ISTERESI

Qualsiasi materiale ferromagnetico o ferrimagnetico a temperature inferiori a quella di Curie è costituito di piccole regioni tridimensionali in cui sono allineati tutti i momenti magnetici nella stessa direzione [Callister, 1996]. Queste regioni sono chiamate domini e ciascuno è magnetizzato a saturazione. I domini adiacenti sono separati da pareti di dominio, attraverso le quali la direzione di magnetizzazione cambia gradualmente. La densità di flusso ( $B$ ) e l'intensità del campo magnetico ( $H$ ) non sono proporzionali nel caso di materiali ferromagnetici. Se il materiale è inizialmente non magnetizzato, allora  $B$  varia a seconda di  $H$  come viene mostrato nella figura 75. La curva inizia all'origine, e all'aumentare  $H$ , l'induzione  $B$  comincia a crescere lentamente e quindi più velocemente fino a raggiungere un certo livello e diventa indipendente da  $H$ . Questo valore massimo di  $B$  è la densità di flusso di saturazione ( $B_s$ ) e la magnetizzazione corrispondente è la magnetizzazione di saturazione ( $M_s$ ). Secondo l'equazione  $B = \mu \cdot H$ , la permeabilità ( $\mu$ ) è la pendenza della curva  $B$  contro  $H$ , e si può vedere dalla figura 75 che cambia con  $H$ . In alcuni casi, la pendenza di  $B$  contro  $H$  (se  $H = 0$ ) è una proprietà del materiale, detta permeabilità iniziale ( $\mu_i$ ), come mostrato nella figura 75.

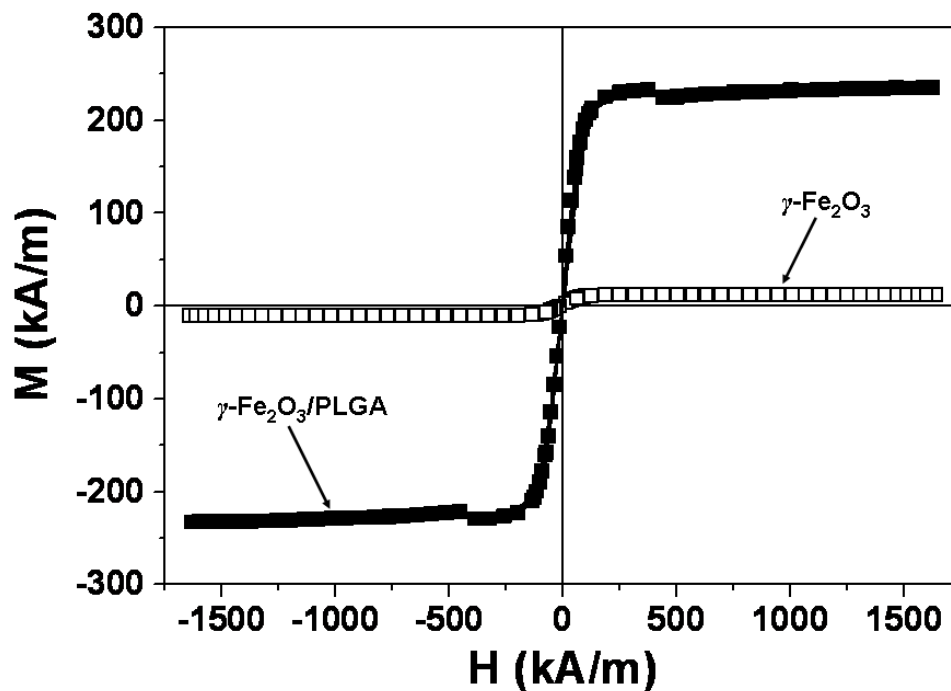


**Figura 75.** Comportamento di  $B$  contro  $H$  di un materiale ferromagnetico inizialmente smagnetizzato. Essi rappresentano le configurazioni dei domini durante varie fasi della magnetizzazione.

Le proprietà magnetiche delle particelle di maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e composte ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ) sono ben definite dalla determinazione del ciclo di isteresi di questi materiali a  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Tali determinazioni sono state eseguite utilizzando un dispositivo magnetometro- susceptibilmetro manics DSM-8 (Paris).

La figura 76 contiene i cicli di isteresi magnetica delle nanoparticelle magnetiche di maghemita e le particelle composte. Nel caso della maghemita non si osserva un ciclo di isteresi come era invece previsto data la natura superparamagnetica di essa. Dalle porzioni lineari delle curve si può stimare una predisposizione iniziale  $\chi_i = 0.12 \pm 0.02$  per la nanomaghemita e  $\chi_i = 2.51 \pm 0.11$  per le particelle magnetiche miste  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ . L'aumento della magnetizzazione di saturazione si verifica quando i nuclei magnetici sono compresi entro la poli (D,L-lattide-co-glicolide), essendo la suscettività magnetica in questo caso,  $9 \pm 2$  kA/m nella nanomaghemita e  $206 \pm 12$  kA/m per le particelle magnetiche composte. Le proprietà magnetiche delle nanoparticelle di maghemite sono state già descritte in letteratura [Chatterjee et al., 2003].

Pertanto, si può concludere che la grande magnetizzazione delle particelle magnetiche composte li rende ideali nello sviluppo di sistemi colloidali trasportatori di farmaci. Questo grazie alla loro capacità di rispondere a campi magnetici applicati, con i quali si può guidare il colloide specificamente alla regione bersaglio (ad esempio, una massa tumorale).

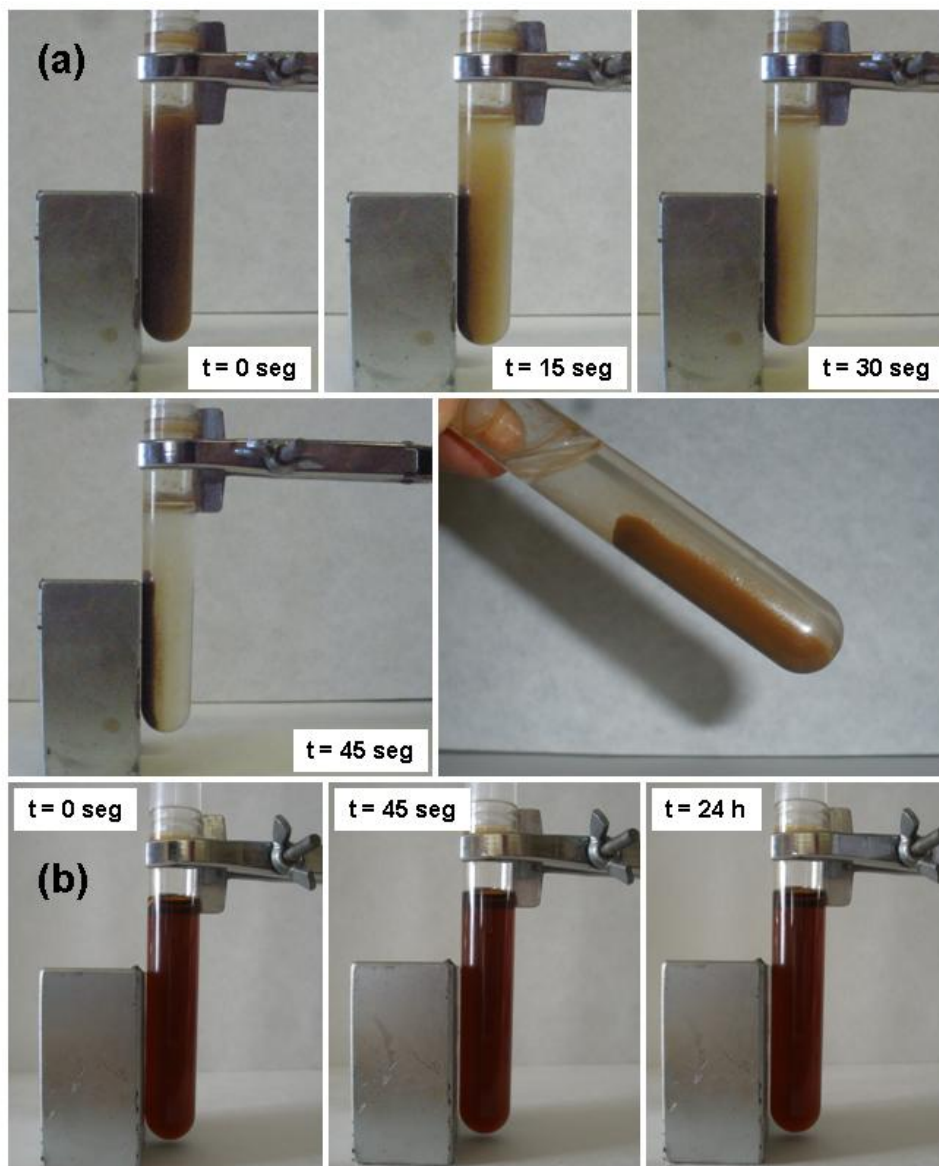


**Figura 76.** Ciclo di isteresi delle particelle di maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ( $\square$ ) e le particelle miste maghemita/poli (D,L-lattide-co-glicolide) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ) ( $\blacksquare$ ).

### 10.5.3 PROVA IN VITRO

La capacità di rispondere ai gradienti magnetici applicati delle particelle di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  fu analizzata qualitativamente mediante analisi dell'effetto di un magnete permanente di 400 mT in una sospensione acquosa di tali colloidi. Brevemente, sono state preparate sospensioni acquose dei due tipi di colloide aventi una concentrazione di 1% (w/v). Ad una temperatura di  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , si mettono a contattato la sospensione di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  con un gradiente magnetico di 400 mT, osservando il comportamento delle particelle magnetiche in queste condizioni. Come viene mostrato nella figura 77, le nanoparticelle magnetiche composte sono attratte molto più rapidamente dal magnete e questo conferma le eccellenti proprietà

magnetiche del nanosistema sviluppato. Il supernatante è completamente trasparente in meno di 1 minuto. Tuttavia, questo non si osserva nel caso della dispersione acquosa di maghemite pura che mantiene il suo aspetto omogeneo anche 24 ore dopo l'esposizione al gradiente magnetico esterno. In virtù di ciò, le particelle sono superparamagnetiche.



**Figura 77.** Sedimentazione dipendenti dal tempo delle particelle magnetiche composto maghemite/poli (D,L-lattide-*co*-glicolide) ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ ) (a) e particelle di maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) (b), risposta ad un magnete permanente di  $\approx 400$  mt.

#### 10.5.4 ORIENTAMENTO MAGNETICO *IN VIVO*

Con questo metodo si intende studiare il potenziale delle nanoparticelle composte in farmaco magnetico portato al luogo di azione. Nello specifico, si studia la presenza di ferro che fa parte delle nanoparticelle composte nel tessuto tumorale. Questo studio è basato sulla reazione chimica che avviene tra i nuclei di maghemita e il ferrocianuro di potassio che si traduce in un precipitato blu verdastro di ferrocianuro ferrico o blu di Prussia. Con questa reazione, si tengono le nanoparticelle attratte verso la massa tumorale dal gradiente magnetico applicato e questo ci permette di visualizzare in modo efficace l'accumulo [Gang et al., 2007].

Come viene mostrato nella figura 78, i topi trattati con la formulazione sviluppata ma senza applicazione del gradiente magnetico, appena presentano contenuto in ferro e quindi, neanche presentano contenuto in nanosistemi, questo viene indicato mediante una colorazione blu di Prussia molto debole. Tuttavia, in campioni tumorali trattati con nanoparticelle  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  che sono stati guidati al tessuto bersaglio con un gradiente magnetico applicato, la colorazione blu è più evidente. Visti i risultati crediamo che il test di concetto sul guidato magnetico dei nanocomposti magnetici fino al luogo di azione ha successo, e per questo, possiamo ipotizzare che la veicolizzazione dell'agente chemioterapico nel nostro sistema di trasporto realizzato  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  migliora notevolmente l'accumulo selettivo di questa dose. Pertanto, può essere stimato un miglioramento significativo dalla attività antitumorale del farmaco quando somministrato incluso in questi nanocompositi sensibili ai campi magnetici applicati.

FOTO 78



## **10.6 CAPACITA DE VEICOLIZZAZIONE DI FARMACI**

### **10.6.1 DETERMINAZIONE DELLA INCORPORAZIONE DI FARMACO NELLE NANOPARTICELLE. METODO SPETTROFOTOMETRICO.**

Per determinare quantitativamente l'incorporazione dell' antitumorale cloridrato di gemcitabina nelle nanoparticelle magnetiche sviluppate usiamo una metodologia stabilita da altri autori per la quantificazione del farmaco veicolizzato e rilasciato da diversi tipi di sistemi colloidali, messa a punto dal nostro gruppo di ricerca [Arias et al ., 2008a, b, c]. Questa tecnica si basa sull'applicazione della legge di Lambert Beer ad un mezzo con più di un tipo di materiale assorbente. L'assorbanza totale di un sistema multicomponente è determinata dalla somma delle assorbanze di ciascuna delle specie esistenti, sempre che non esista nessuna interazione tra di loro. Quindi, si assume che esiste contributo di ciascuna delle sostanze presenti nel mezzo di dispersione e/o preparazione del nostro nanosistema all'assorbanza totale di esso.

Nella veicolizzazione del cloridrato di gemcitabina si possono considerare come sostanze che contribuiscono al totale assorbimento: il principio attivo che non è stato incorporato nel sistema trasportatore, residui di sintesi e degradazione del sistema e altri componenti del mezzo, come PVA. Si calcola la quantità di farmaco che è stato incorporato nel sistema trasportatore sottraendo l'assorbimento totale del sistema corrispondente alle sostanze presenti. Infine, si determinerà la quantità totale di farmaco veicolizzato mediante la differenza tra la concentrazione iniziale e finale del farmaco nel mezzo di sintesi. [Arias et al., 2008d, 2010c, 2011].

### 10.6.2 INCORPORAZIONE SUPERFIZIALE DI FARMACO.

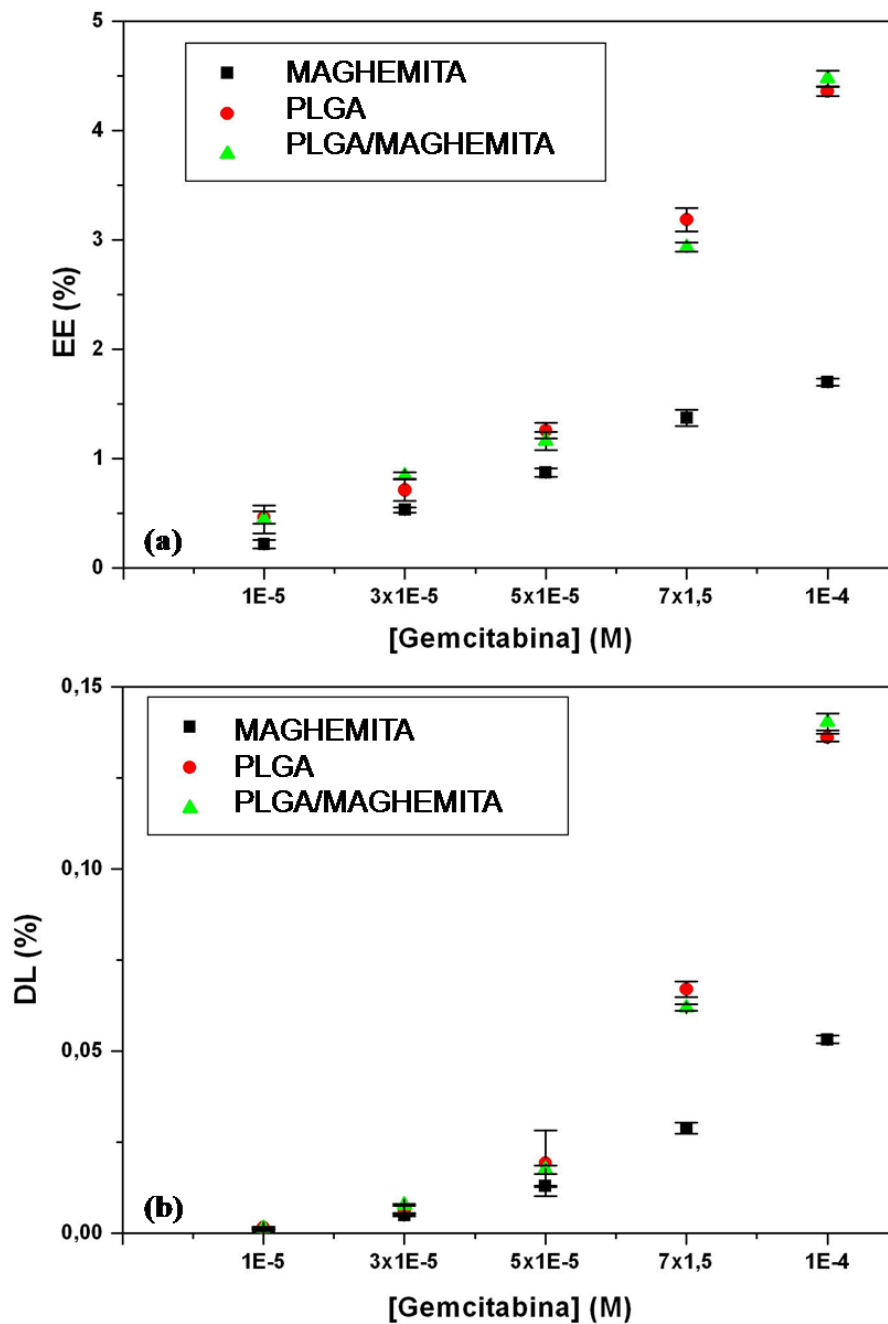
Ci sono due metodi generali per veicolizzare un farmaco nei sistemi colloidali [Arias et al., 2010b]: l'aggiunzione di esso al momento in cui vengono generate le nanoparticelle, restando il principio attivo intrappolato principalmente nella matrice del colloide (assorbimento) o l'adsorbimento superficiale dopo la formazione delle nanoparticelle in una soluzione di principio attivo. È prevedibile un maggiore assorbimento di farmaco mediante il metodo di assorbimento [Arias et al., 2009b; Soppimath et al., 2001].

Ci concentreremo sulla valutazione del grado di legarsi alla superficie in aggiunta al meccanismo di assorbimento del farmaco da parte del polimero (PLGA) e le particelle composte ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA). Per determinare l'adsorbimento in superficie del farmaco sulle nanoparticelle si parte da una serie di soluzioni acquose di 10mL, a diverse concentrazioni molar di principio attivo ( $10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$  e  $10^{-4}$ ). Nel mezzo di dispersione si aggiunge una concentrazione di nanoparticelle pari in tutti i casi all'1% (w/v), prelevando un campione del mezzo di dispersione prima di aggiungere il principio attivo come elemento principale per le determinazioni spettrofotometriche. Dopo 24 ore di contatto tra le particelle ed il farmaco a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  sotto agitazione meccanica (50 rpm), si separano le supernatanti mediante doppia centrifugazione per 40 minuti nel caso di polimero e 60 minuti nel caso della maghemita e le particelle composte di maghemita e PLGA.

Il calcolo della adsorzione in superficie del farmaco nei tre tipi di nanoparticelle viene effettuato confrontando l'assorbanza dei campioni del mezzo (presa prima di aggiungere i colloidali) con i supernatanti ottenuti dopo la doppia centrifugazione delle sospensioni di farmaco, e dopo aver eliminato il contributo all'assorbanza totale del sistema di rifiuti o sottoprodotti dell'esperimento di adsorbimento [Arias et al., 2010b]. La quantità di farmaco incorporato nella superficie delle nanoparticelle è

espressa in termini di efficienza di intrappolamento (*entrapment efficiency, EE%*) [(farmaco veicolizzato (mg) / quantità totale di farmaco utilizzato (mg)) x 100] e carica di farmaco (*drug loading, DL%*) [(farmaco veicolizzato (mg) / massa totale del sistema di trasporto(mg)) x 100] [Arias et al., 2009b; Brigger et al., 2004].

I risultati di adsorbimento di gemcitabina ottenuti nei tre tipi di nanoparticelle presentano un basso assorbimento di questo farmaco sulla superficie del polimero (polimero puro e nanoparticelle  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA); questo può essere dovuto all'attrazione elettrostatica tra il farmaco caricato positivamente ed il polimero caricato negativamente. Si può anche notare una repulsione elettrostatica da parte delle nanoparticelle di maghemite. In ogni caso, come previsto, la veicolizzazione del farmaco sulla superficie è piuttosto bassa (figura 79). In particolare, i valori massimi di EE% sono  $\approx 1,69\%$ ,  $\approx 4,35\%$  e  $\approx 4,47\%$ , nel caso di  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PLGA e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA rispettivamente. Questa minima veicolizzazione si spiega meglio tenendo in considerazione i valori di DL% ottenuti:  $\approx 0,0531\%$ ,  $\approx 0,136\%$  e  $\approx 0,14\%$  in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PLGA e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA, rispettivamente. Da un punto di vista termodinamico si potrebbe giustificare la bassa incorporazione di farmaco idrofobo nella superficie idrofila del nostro sistema, nonostante la favorevole interazione elettrostatica discussa. Inoltre, l'esistenza di un certo assorbimento del farmaco idrofilo sulla superficie dei nuclei magnetici (nonostante la repulsione elettrostatica menzionata) può essere spiegato se si considera il carattere idrofilo di quest'ultimo.



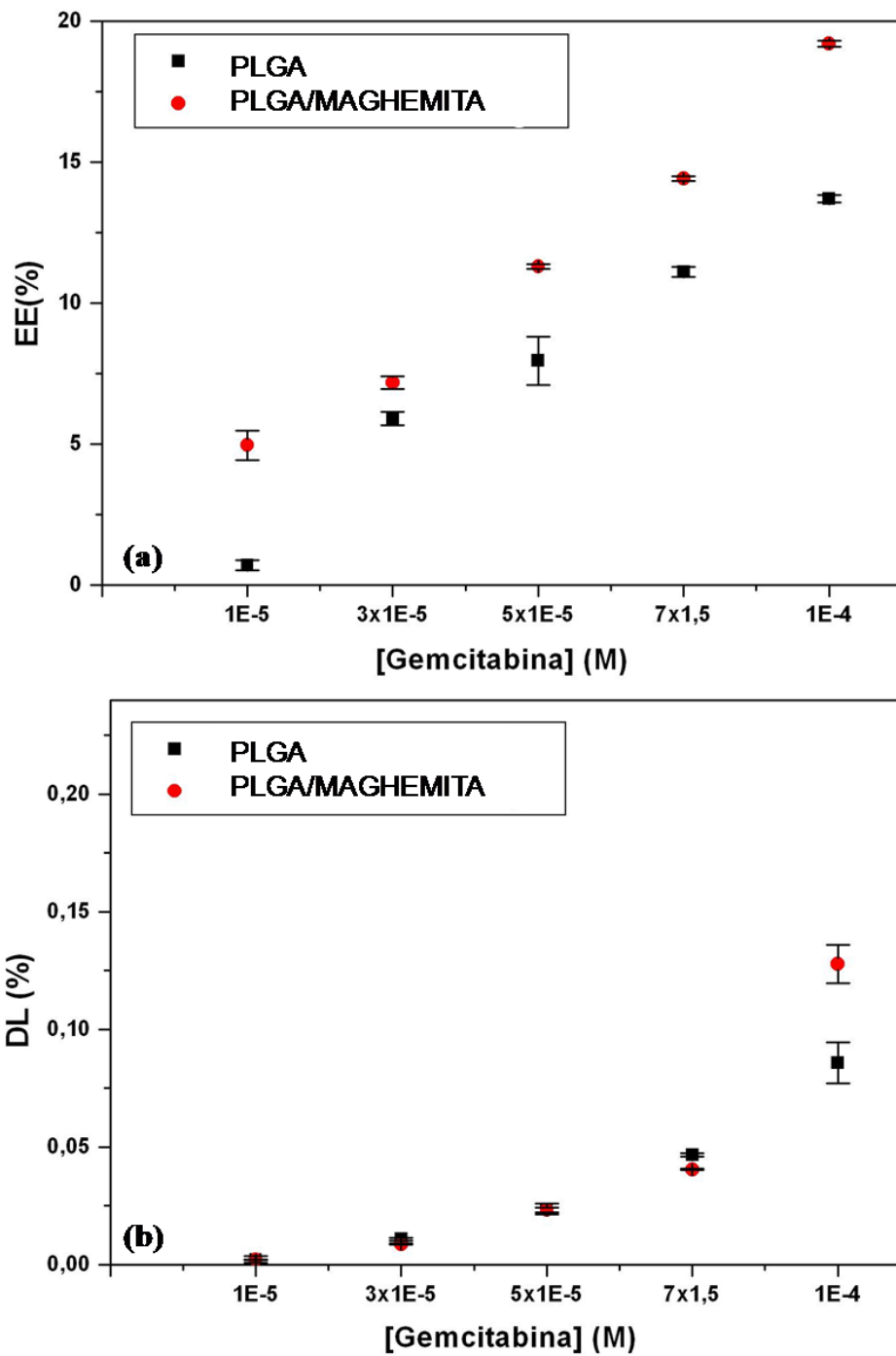
**Figura 79.** Valori di EE (%) (a) e DL (%) (b) del cloridrato di gemcitabina sulla superficie delle nanoparticelle di maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ■), poli(D,L-lattide-*co*-glicolide (PLGA, ●) e maghemita/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA, ▲) rispetto alla concentrazione molare del farmaco.

### 10.6.3 INCORPORAZIONE DI FARMACO NELLA MATRICE POLIMERICA.

Dopo aver confermato la bassa adsorzione di cloridrato di gemcitabina sulla superficie delle nostre nanoparticelle, analizziamo il metodo principale di vettorizzazione di farmaci in sistemi di trasporto, ossia l'incorporazione del principio attivo durante la sintesi del sistema trasportatore, dove la concentrazione del farmaco è il principale fattore. Così, vogliamo definire le condizioni ottimali che consentono la massima incorporazione della sostanza attiva nel sistema colloidale trasportatore magnetico proposto.

L'analisi dell'influenza della concentrazione del principio attivo sulla incorporazione nella matrice polimerica è stata fatta mediante il processo di sintesi e quello di determinazione spettrofotometrica già descritti e giustificati sopra, dove solo sono state modificate le differenti concentrazioni di farmaco utilizzate tra  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M. Per favorire l'inserimento dei farmaci nell'interfaccia  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  ed una maggiore veicolizzazione, si tengono in contatto per 24 ore ( $25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$  e 50 rpm), i nuclei di ossido di ferro con le molecole di farmaco prima di fare la sintesi delle nanoparticelle di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ . La determinazione dell'assorbimento di farmaco nella matrice delle nanoparticelle è stata eseguita nello stesso modo, come nel caso precedente. In entrambi i casi, l'esperimento è stato eseguito in triplicato per ogni concentrazione.

La quantità di clidrato di gemcitabina cloridrato assorbito dalle nanoparticelle di polimero PLGA e le nanoparticelle composite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ , sono indicati nella figura 80. L'assorbimento aumenta con la crescente concentrazione del farmaco nel mezzo di sintesi, indicando un effetto positivo dell'aumento della concentrazione sull'efficacia della veicolizzazione in entrambi i casi, un effetto che è descritto nella letteratura trovata sullo sviluppo di sistemi colloidali per il trasporto di farmaci. [Arias et al, 2008a, b, c, 2011b;. Ubrich e subr, 2004].



**Figura 80.** Valori di EE (%) (a) e DL (%) (b) del cloridrato di gemcitabina nella matrice polimerica delle nanoparticelle di poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) (PLGA, ■) e maghemita/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA, ●) rispetto alla concentrazione molare di farmaco.

Come si vede, i valori ottenuti dal processo di assorbimento in matrice di farmaco sono chiaramente superiori a quelli ottenuti con il processo di adsorbimento in superficie, questo giustifica la scelta di questo metodo di veicolizzazione per la sintesi delle particelle composte ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA). Ad esempio, per la massima concentrazione di farmaco utilizzato, il valore massimo di EE (%) ottenuto nelle nanoparticelle  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA passa dal  $\approx 4,47\%$  con metodo adsorbimento (figura 79) al  $\approx 19,19\%$  con il metodo di assorbimento.

### 10.6.4 RILASCIO DI FARMACO

Dopo aver definito le condizioni ottimali di veicolizzazione, sono stati effettuati i test rilascio *in vitro* dal polimero e le particelle composte, utilizzando una concentrazione di  $10^{-4}$  M di cloridrato di gemcitabina.

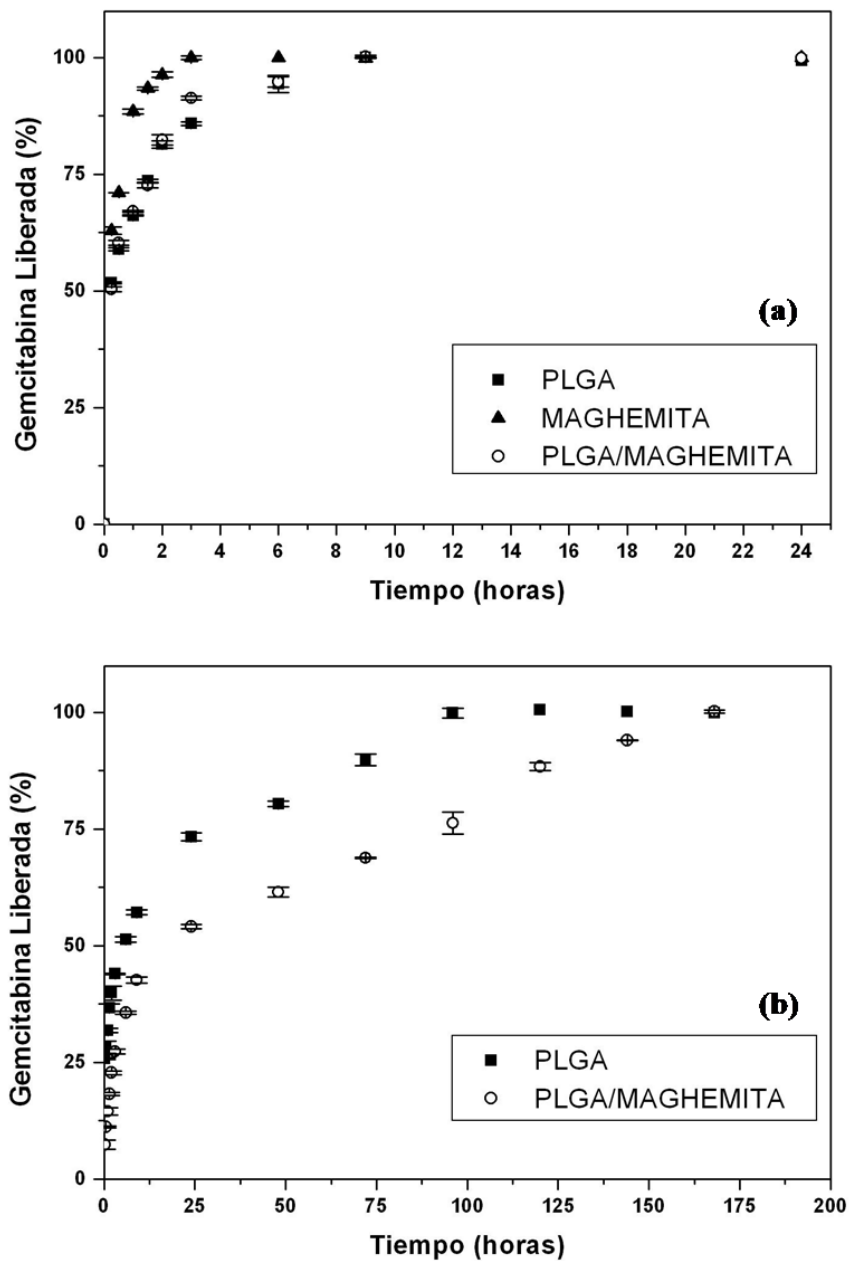
Per eseguire questo test abbiamo utilizzato il metodo di dialisi e il tampone NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH= 7,4 $\pm$ 0,1) come mezzo di liberazione. Prima della prova lasciamo i sacchetti di dialisi immersi 12 ore in acqua bi distillata; le borse hanno una dimensione dei pori di 2000 Da, in grado di trattenere le nanoparticelle all'interno, lasciando solo passare il farmaco attraverso di essa fino al mezzo di liberazione. Le sospensioni delle particelle con il farmaco veicolizzato sono state centrifugate a 10000 rpm per 35 minuti nel caso del polimero di PLGA e 10000 rpm per 60 minuti nel caso delle particelle composte e la maghemita, per rimuovere il principio attivo non incorporato. Dopo di che, sono stati introdotti 2 mL di sospensione di nanoparticelle (concentrazione di farmaco: 2,99 mg/mL) nei sacchetti di dialisi, chiudendoli con una pinzetta. Quindi, i sacchetti sono stati immersi in un bicchiere con 100 mL di tampone NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. La temperatura di 37,0 $\pm$ 0,5°C e l'agitazione meccanica (50 rpm) dei sacchi sono stati mantenuti costanti per tutta la prova. I campioni prelevati dal mezzo (1 mL) sono stati raccolte ad intervalli di tempo predeterminati (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 9, 12, 24 ore e 2,

3, 4, 5, 6 e 7 giorni sia per adsorbimento sia per assorbimento) e analizzati mediante il metodo UV-Vis previamente validato e descritto alla massima lunghezza d'onda corrispondente. Con ciascun campione prelevato è stato aggiunto lo stesso volume di soluzione tampone (mantenuta alla stessa temperatura) dopo ogni colpo per mantenere così le condizioni sink della prova.

La figura 81 rappresenta i valori di clodrato di gemcitabina adsorbito rilasciato dalle nanoparticelle sintetizzate. Nel caso del PLGA puro e le nanoparticelle composte  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  questo rilascio avviene lentamente, ed è completo dopo 9 ore, mentre nel caso delle nanoparticelle di maghemita è completo in 3 ore. Questo può essere giustificato da un'interazione superficiale sfavorevole tra le molecole di farmaco caricate positivamente e la superficie delle particelle di maghemita che ha anche una carica positiva. Poiché il processo è troppo veloce nei tre sistemi, non è quindi adatto a scopi terapeutici in quanto la dose del principio attivo nel sistema di trasporto veicolizzata sarebbe liberata prima di raggiungere il sito di azione, con la conseguente biodistribuzione estesa.

Il processo di liberazione di gemcitabina quando questa è incorporata nella matrice delle nanoparticelle è molto più lungo (figura 81b). In entrambi i casi esiste un processo di rilascio bifasico: prima si verifica una fase di rilascio rapido associata con la perdita di farmaco associato alla superficie o debolmente intrappolato. Dopo questa fase abbiamo un rilascio prolungato, in cui il meccanismo responsabile può essere la degradazione dello strato polimerico e/o la diffusione del farmaco attraverso la matrice polimerica. In entrambi i casi il rilascio di gemcitabina è completa dopo 7 giorni. Infine, si noti che la velocità di rilascio delle particelle composte è alquanto inferiore a quella del polimero puro, in quanto vi è una certa quantità di principio attivo adsorbito sulla superficie dei nuclei magnetici quando il rivestimento polimero viene prodotto. Quindi la quantità di farmaco che si trova nella interfaccia  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  si deve diffondere attraverso la matrice per uscire, rallentando la velocità del processo.





**Figura 81.** Rilascio del cloridrato di gemcitabina (%) (a) adsorbita e (b) assorbita dalle nanoparticelle di PLGA (■) e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  (o) rispetto al tempo di incubazione in un tampone di NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH= 7.4±0.1) a 37.0±0.5°C.

Per completare lo studio abbiamo fatto la regolazione cinetica dei profili di rilascio, mediante l'analisi della varianza del modello di regressione (test ANOVA) e il coefficiente di determinazione,  $r^2$ . Selezioniamo i valori con il maggior valore dello statistico  $F$  di Fisher (rapporto tra le medie dei quadrati di regressione e residuale) ammettendo che quello che presenta un valore più alto di  $r^2$  (una somma maggiore delle regressioni quadrati) corrisponde all'equazione cinetica che si avvicina maggiormente ai risultati ottenuti *in vitro* [Domenech et al., 1998, Morales et al., 2004]. Per scegliere il modello più affidabile abbiamo testato diversi modelli matematici:

a) cinetica di ordine zero: in questo sistema la velocità di rilascio di farmaco è costante. Cioè:

$$Q_t = K_0 t \quad (54)$$

dove  $Q_t$  è la quantità cumulativa di farmaco al tempo  $t$ , e  $K_0$  la costante di rilascio.

b) cinetica del primo ordine: qui il rilascio del farmaco dipende dalla loro concentrazione nel sistema.

$$\begin{aligned} \frac{dQ_t}{dt} &= K_1 (Q_\infty - Q_t) \\ Q_t &= Q_\infty (1 - e^{-K_1 t}) \end{aligned} \quad (55)$$

essendo il  $Q_\infty$  la massima quantità rilasciata, considerato in soluzione per un tempo molto maggiore di  $1/K_1$ .

c) Cinetica di radice quadrata (Higuchi) relativo al rilascio per diffusione del farmaco.

$$Q_t = A + B \cdot \sqrt{t} \quad (56)$$

d) cinetica radice cubica: il rilascio avviene per l'erosione o la dissoluzione della matrice polimerica in tutto il suo volume:

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = A + B \cdot t \quad (57)$$

La tabella 17 riporta i valori di  $F$  e  $r^2$  corrispondenti alla regolazione cinetica del rilascio di cloridrato di gemcitabina dalle nanoparticelle di maghemite, poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) e nanocomposte maghemite/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide).

	VALORI DI $F$ Y $r^2$				
		Cinetica di ordine zero	Cinetica di primo ordine	Cinetica di radice quadrata	Cinetica di radice cubica
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	F	5.42	<b>788.17</b>	<b>375.81</b>	126.02
	$r^2$	0.424	<b>0.840</b>	0.665	0.014
PLGA	F	24.10	<b>208.09</b>	<b>1058.37</b>	124.37
	$r^2$	0.767	0.599	<b>0.920</b>	0.336
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$	F	17.78	<b>219.40</b>	<b>636.24</b>	106.84
	$r^2$	0.706	0.641	<b>0.875</b>	0.273

**Tabella 17.** Valori dello statistico  $F$  e il coefficiente di determinazione  $r^2$  ottenuti nello studio del profilo della quantità accumulate di cloridrato di gemcitabina rilasciato in funzione del tempo dalle nanoparticelle di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , PLGA e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  (metodo di preparazione mediante adsorzione in superficie).

Nel caso della maghemita, il rilascio del farmaco adsorbito sulle nanoparticelle ottenute presenta valori di  $F$  e  $r^2$  che indicano una cinetica di primo ordine, con i coefficienti di regolazione elencati in tabella 18. Questa cinetica dipende dalla differenza di concentrazione tra il farmaco ed il mezzo. Si produce inizialmente un rilascio molto rapido del farmaco da parte delle particelle di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  verso il mezzo in cui la concentrazione è inferiore, fino ad arrivare a concentrazioni pari. Giunti a questo punto ci sarà un rilascio sostetuto.

SISTEMA	A	B
Gemcitabina, Maghemita	$(96.15 \pm 2.81)$	$(3.39 \pm 0.49)$

**Tabella 18.** Coefficienti di regolazione dell'equazione (46) per la cinetica di rilascio di cloridrato di gemcitabina dalla superficie delle particelle di maghemita.

Nel caso del PLGA e delle particelle di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ , il rilascio del farmaco adsorbito sulle nanoparticelle ottenute presenta valori di  $F$  e  $r^2$  che indicano una cinetica di radice quadrata, con i coefficienti di correzione indicati nella tabella 19. Questa cinetica può essere spiegata con la maggiore concentrazione di farmaco presente sulla superficie delle nanoparticelle e la bassa concentrazione di farmaco nel mezzo, con conseguente diffusione (dipendenza di  $\sqrt{t}$ , equazione 56) dalla zona di superficie, in cui il farmaco è più concentrato, verso il centro della soluzione, dove la concentrazione è inferiore. Non c'è nessuna alterazione della matrice.

SISTEMA	A	B
Gemcitabina, PLGA	$(47.83 \pm 3.60)$	$(19.10 \pm 2.11)$
Gemcitabina, PLGA/Maghemita	$(48.11 \pm 4.70)$	$(19.48 \pm 2.75)$

**Tabella 19.** Coefficienti di regolazione dell'equazione (46) per la cinetica di rilascio di cloridrato di gemcitabina dalla superficie delle particelle di PLGA e le particelle composte.

Rispetto al rilascio di farmaco dall'interno delle nanoparticelle sintetizzate, è necessario differenziare nella regolazione cinetica le due fasi caratteristiche del processo: una fase rapida della durata di 9 ore e successivamente una fase di rilascio più lento e prolungato (figura 81). Come si può vedere nella tabella 17, la cinetica che meglio descrive la liberazione dal polimero PLGA in entrambe le fasi è la cinetica di radice quadrata (vedere le tabelle 21-23 per i coefficienti di regolazione e la figura 80); questo indica una diffusione iniziale dalla superficie delle nanoparticelle verso il mezzo. Il sistema composto da  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  presenta una fase iniziale con una cinetica di radice quadrata e una seconda fase con una cinetica di ordine 0 (coefficienti di regolazione nelle tabelle 21 e 23), che implica un rilascio costante e prolungato del farmaco nel tempo, senza effetto significativo della quantità già rilasciata. Questo tipo di rilascio nel sistema composto può essere spiegato dal fatto che il farmaco è all'interno di una matrice che alimenta continuamente il sistema con nuove molecole che passano al centro. Ciò richiede un'elevata quantità di farmaco assorbito nella matrice e non strettamente legata a questo.

	VALORI DI $F$ Y $r^2$				
		Cinetica di ordine zero	Cinetica di ordine uno	Cinetica di radice quadrata	Cinetica di radice cubica
PLGA (1 <sup>a</sup> fase)	F	60.72	<b>116.56</b>	<b>3692.07</b>	103.46
	$r^2$	0.895	0.544	<b>0.985</b>	0.488
PLGA (2 <sup>a</sup> fase)	F	64.69	<b>424.99</b>	<b>3144.73</b>	285.16
	$r^2$	0.941	0.673	<b>0.956</b>	0.513
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /PLGA (1 <sup>a</sup> fase)	F	75.22	<b>397.27</b>	<b>1935.15</b>	32.34
	$r^2$	0.914	0.957	<b>0.991</b>	0.517
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /PLGA (2 <sup>a</sup> fase)	F	<b>699.73</b>	282.63	<b>2587.66</b>	251.10
	$r^2$	<b>0.991</b>	0.741	0.971	0.709

**Tabella 20.** Valori dello statistico  $F$  e coefficiente di determinazione  $r^2$  ottenuti nello studio del profilo della quantità accumulate di cloridrato di gemcitabina rilasciato in funzione del tempo dalle nanoparticelle di  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, PLGA e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> /PLGA (metodo di preparazione mediante assorbimento in matrice).

SISTEMA	A	B
Gemcitabina, PLGA	(20.19 ± 1.00)	(12.77 ± 0.59)
Gemcitabina, PLGA/Maghemita	(1.19 ± 0.86)	(14.15 ± 0.50)

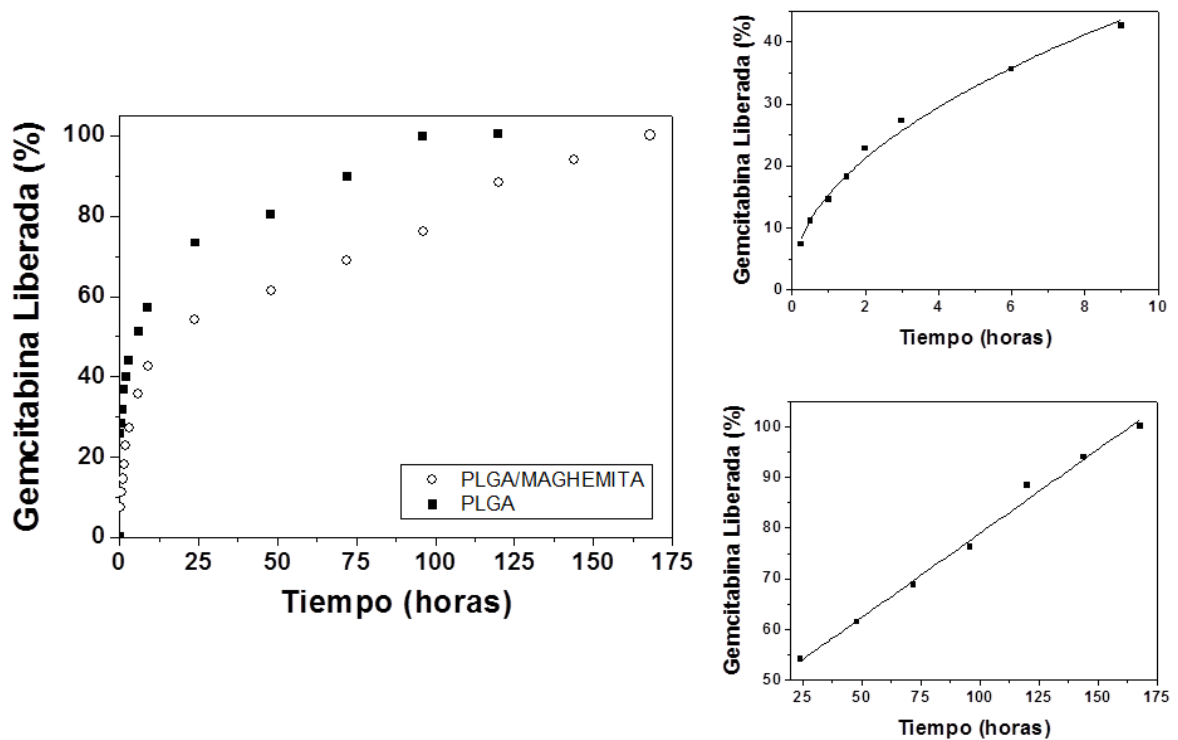
**Tabella 21.** Coefficienti di regolazione dell'equazione (46) per la prima fase di rilascio di farmaco dalle particelle di PLGA e  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA.

<b>SISTEMA</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Gemcitabina, PLGA	(48.28 ± 4.49)	(4.93 ± 0.53)

**Tabella 22.** Coefficienti di regolazione dell'equazione (46) per la seconda fase di rilascio di farmaco dalle delle particelle di PLGA.

<b>SISTEMA</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Gemcitabina, PLGA/Maghemita	(21.48 ± 4.07)	(5.95 ± 0.41)

**Tabella 22.** Coefficienti di regolazione dell'equazione (46) per la seconda fase di rilascio di farmaco dalle delle particelle di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PLGA.



**Figura 82.** Sinistra: dati sperimentali della cinetica di rilascio del cloridrato di gemcitabina dalle particelle di polimero (PLGA) e composte ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA). Destra: linee di migliore regolazione ai dati di quest'ultimi ai modelli descritti nel testo per la fase di rilascio iniziale (in alto) e per tempi lunghi (sotto).

La figura 82 illustra i risultati e le migliori regolazioni per farmaci assorbiti nella matrice. Riteniamo importante sottolineare che il rilascio prolungato di cloridrato di gemcitabina nel tempo è tale da rendere un ottimo effetto farmacologico in vivo. Questo significa che quasi l'intera dose del principio attivo veicolizzata nelle nanocomposte sarà liberata solo al sito di azione, una volta che le nanoparticelle  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA si accumulano selettivamente a questo livello con l'aiuto del campo magnetico applicato.



## **10.7 CONCLUSIONI**

La presente ricerca si pone due obiettivi principali. Il primo è lo sviluppo di un sistema flessibile di trasporto e rilascio modificato di principi attivi, costituito da un nucleo magnetico e un rivestimento di polimero biodegradabile. Il secondo è la veicolizzazione di un farmaco antitumorale. I contributi di questo lavoro possono essere riassunti nelle seguenti conclusioni:

### **Sulla sintesi delle particelle magnetiche composte maghemite/poli(D,L-lattide-co-glicolide ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA)**

1. Abbiamo sviluppato un metodo riproducibile per la sintesi di particelle sferiche colloidali di composizione mista, nucleo magnetico ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e rivestimento polimerico biodegradabile (PLGA). Il nucleo magnetico è responsabile delle ridotte dimensioni, della morfologia sferica e delle proprietà magnetiche delle particelle ottenute. il rivestimento di polimero biodegradabile consente invece il trasporto e il rilascio modificato del farmaco.

### **Sulla struttura, composizione chimica.**

2. La microanalisi EDX fornisce una prova evidente dell'efficacia del rivestimento, e ci permette di osservare nello spettro delle particelle composte i picchi caratteristici dei due materiali.

3. Lo spettro infrarosso è una prova evidente dell'efficacia del rivestimento, in quanto consente l'identificazione dei gruppi funzionali del polimero nelle particelle composte. Queste bande dello spettro delle particelle composte sono meno intense per la minor quantità di PLGA che in esse si trovano. Inoltre, si osserva una banda caratteristica dell'ossido di ferro nello spettro delle particelle composte.
4. Con la diffrattometria si testa in parallelo l'efficienza del rivestimento polimerico e la formazione delle particelle composte con l'esistenza di bande caratteristiche di entrambi i materiali nelle particelle composte. Il grado di cristallinità della maghemita viene mantenuto dopo l'applicazione del rivestimento polimerico.
5. L'analisi termica separata dei materiali e i sistemi composti ci permettono di affermare la stabilità termica del sistema, perché durante i processi tecnologici a cui deve essere sottoposta non raggiungerà temperature così alte. In aggiunta a ciò, può essere sterilizzato con calore, senza decomposizione.

**Sulle proprietà elettriche e la superficie termodinamica.**

6. Lo studio comparativo delle proprietà elettriche superficiali dei tre tipi di nanoparticelle mediante elettroforesi è un'ulteriore prova dell'efficacia del rivestimento. Questo nasconde efficacemente i nuclei magnetici, facendo sì che la superficie del colloide magnetico composto sia indistinguibile dalle nanoparticelle polimeriche pure.

7. Utilizzando le informazioni ottenute dallo studio elettrocinetico e termodinamico dei materiali, abbiamo giustificato il meccanismo di formazione delle nanoparticelle  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$ . Queste sono generate come risultato dell'attrazione elettrostatica tra le particelle di maghemite caricate positivamente e il polimero caricato negativamente, che induce la concentrazione di quest'ultimo nella prossimità della superficie degli ossidi di ferro. Il rivestimento polimerico finisce di formarsi grazie al fatto che le interazioni acido-base, e di van der Waals sono chiaramente attrattive. Vale a dire che è termodinamicamente più favorevole per il polimero rimanere in contatto con la maghemite che essere isolato in acqua.
8. Usando un modello termodinamico applicabile alla interfaccia solido/liquido è stato possibile effettuare una completa caratterizzazione termodinamica superficiale delle particelle sintetizzate mediante la determinazione dell'angolo. Il modello permette di caratterizzare il solido da tre componenti di energia libera di superficie:  $\gamma_s^{\text{LW}}$  (Lifshitz-van der Waals, che rappresenta le interazione non polari o dispersive a livello della interfaccia),  $\gamma_s^+$  (accettore di elettroni o acido di Lewis) e  $\gamma_s^-$  (donatore di elettroni o base di Lewis).
9. La diversa natura dei tre materiali testati, PLGA,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PLGA}$  si osserva nei cambiamenti dovuti alle interazioni interfacciali solido-liquido e nel contributo dell'energia superficie totale di ogni solido.
10. Come era previsto, questi cambiamenti di energia libera di superficie si manifestano nelle caratteristiche idrofobe/idrofile dei materiali, poiché la natura idrofila della maghemite si perde essendo perfettamente rivestito con la poli(D, L-lattide-co-glicolide). Possiamo considerare ciò una nuova prova dell'efficacia del rivestimento polimerico.

**Sulle proprietà magnetiche.**

11. L'analisi delle proprietà magnetiche mediante la determinazione del ciclo di isteresi della maghemita e delle particelle composte, permette di vedere il carattere magnetico morbido dei nuclei magnetici delle particelle  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA. Quando i nuclei magnetici sono compressi nella matrice polimerica si ottiene una maggiore reattività ai campi magnetici applicati.
12. Abbiamo osservato che le particelle composte magnetiche ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/PLGA) soddisfano la condizione richiesta: la sua superficie è comparabile a quella del polimero, ma hanno la proprietà di essere magnetizzabili. Pertanto, costituiscono un veicolo ideale per il trasporto di farmaci.
13. Abbiamo sviluppato un test di concetto *in vivo* sulle interessanti possibilità che potrebbero fornire le nanoparticelle di maghemita/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) come sistemi di trasporto di farmaci. Per questo, è stato applicato un metodo istologico di colorazione dei nuclei di ossido di ferro in un modello di tumore sottocutaneo L1210 sviluppato in topi DBA / 2. Solo le sezioni istologiche di masse tumorali di topi trattati con nanoparticelle maghemita/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide) magneticamente guidato ha mostrato un accumulo significativo di ferro nell'interstizio tumorale.

**Sulla capacità di trasporto e il rilascio controllato di farmaco**

14. È stata convalidata ed usata la procedura spettrofotometrica per la determinazione dell'incorporazione del farmaco nelle nanoparticelle composte maghemita/poli(D,L-lattide-*co*-glicolide), e per quantificare la loro quantità trasferita al supporto nelle prove di rilascio.

15. Si sono stabilite, dopo le determinazioni necessarie, le condizioni ottimali di veicolizzazione di cloridrato di gemcitabina da due metodi: *i*) l'aggiunta del principio attivo nel mezzo acquoso dove precipiterà il polimero e che contiene i nuclei magnetici sospesi, prima della attivazione della formazione delle nanoparticelle composte, e *ii*) l'assorbimento dopo la formazione e l'incubazione dei nanocompositi in una soluzione di principio attivo.
16. L'analisi spettrofotometrica dell'incorporazione di farmaco nelle nanoparticelle maghemite/poli(D,L-lattide-co-glicolide) mostra il contributo del assorbimento in superficie al processo di veicolizzazione di farmaci. È stato osservato un effetto positivo della concentrazione di principio attivo nel mezzo di contatto sulla quantità adsorbita dalle nanoparticelle composte. Tuttavia, l'assorbimento del principio attivo nella matrice migliora significativamente i risultati della veicolizzazione ottenuti. Vi è anche un significativo effetto positivo della concentrazione di principio attivo utilizzato sui risultati della veicolizzazione.
17. Lo studio del rilascio *in vitro* del farmaco incorporato sulla superficie delle nanoparticelle composte rivela generalmente un profilo di rilascio molto veloce, completo in meno di quattro ore e che si avvicina, secondo l'analisi della varianza della regressione al modello (ANOVA test) e il coefficiente di determinazione,  $r^2$ , ad una cinetica di rilascio di radice quadrata. Mentre il rilascio del farmaco incorporato nella matrice per assorbimento risulta essere molto più interessante per ottenere un ottimo effetto farmacologico.

## **10.8 BIBLIOGRAFIA**

Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lübke AS. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.* 2000; 60: 6641-6648.

Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Rel.* 2001; 77: 309-321.

Arias JL, López-Viota M, Ruiz MA, López-Viota J, Delgado AV. Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/Shell nanoparticles for biomedical applications. *Int. J. Pharm.* 2007; 339: 237-245.

Arias JL, Harivardhan Reddy L, Couvreur P. Magneto-responsive squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. *Langmuir* 2008a; 24: 7512-7519.

Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008b; 69: 54-63.

Arias JL, Ruiz MA, Gallardo V, Delgado AV. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J. Control. Release* 2008c; 125: 50-58.

Arias JL, Linares-Molinero F, Gallardo V, Delgado AV. Study of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) (core/shell) particles as anticancer drug delivery systems: Loading and release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008d; 33: 252-261.

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J. Drug Target.* 2009; 17(8): 586-598.

Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA. Formulation and physicochemical characterization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2010b; 75: 204-208.

Arias JL, Martínez-Solez GI, López-Viota M, Ruiz MA. Formulation of chitosan nanoparticles loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett. Drug Des. Discov.* 2010c; 7: 70-78.

Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* 2011b; 12: 97-104.

Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules* 2008; 13: 2340-2369.

Bee A, Massart R. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Magn. Mater* 1995; 149: 6-9.

Billmeyer FW. Morfología y orden en los polímeros cristalinos. En: *Ciencia de los Polímeros*. (Ed.: Billmeyer FW). Barcelona: Reverté 1975; pp. 148-167.

- Bouffard DY, Laliberté J, Momparler RL. Kinetics studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 45: 1857-1861.
- Brigger I, Morizet J, Laudani L, Aubert G, Appel M, Velasco V, Terrier-Lancombe MJ, Desmaële D, d'Angelo J, Couvreur P, Vassal G. Negative preclinical results with stealth<sup>®</sup> nanospheresencapsulated doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *J. Control Release* 2004; 100: 29-40.
- Callister WDJr. Estructura de los polímeros. En: *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales.* (Ed. Callister WDJr). Vol. 2. Barcelona: Reverté 1996; pp. 482-486.
- Cass CE. Nucleoside transport. Drug transport in antimicrobial and anticancer Chemotherapy. En: Georgopapadakou, NH. (Ed.). Marcel Dekker, Nueva York. 1995: 403pp.
- Chatterjee J, Haik Y, Chen CJ. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J. Mag. Mag. Mater.* 2003; 257: 113-118.
- Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharm. Res.* 2006; 23: 1417-1450.
- Depeyrot J, Sousa EC, Aquino R, Tourinho FA, Dubois E, Bacri JC y cols. Rare earth doped maghemita EDL-MF: a perspective for nanoradiotherapy? *J. Magn. Magn. Mater.* 2002; 252: 375-377.



Doménech J, Martínez J, Plá JM. En: *Biofarmacia y farmacocinética*. Madrid: Síntesis 1998.

Durán J, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloid as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97: 2948-2983.

Flórez J. *Farmacología humana*. Barcelona: Maason S.A. 2008.

Gang J, Park SB, Hyung W, Choi EH, Wen J, Kim HS, Shul YG, Haam S, Song SY. Magnetic poly  $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model. *J. Drug Target.* 2007; 15: 445-453.

Geng Y, Yuan W, Wu F, Chen J, He M, Jin T. Formulation erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation. *J. Control Release.* 2008; 130: 259-265.

Glöckl G, Hergt R, Zeisberger M, Dutz S, Nagel S, Weitschies W. The effect of field parameters, nanoparticles properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2935-S2950.

Guo X, Szoka FC. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery. *Acc. Chem. Res.* 2003; 36: 335-341.

Häfeli UO. Magnetically modulated therapeutic systems. *Int. J. Pharm.* 2004; 277: 19-24.

- Hergt R, Dutz S, Müller R, Zeisberger M. Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2919-S2934.
- Hilger I, Dietmar E, Linß W, Streck S, Kaiser WA. Developments for the minimally invasive treatment of tumours by targeted magnetic heating. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2951-S2958.
- Holgado MA, Arias JL, Cozar MJ, Alvarez-Fuentes J, Gañan-calvo AM, Fernández-Arevalo M. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing effects on drug loading and release properties. *Int. J. Pharm.* 2008; 359: 27-35.
- Jabr-Milane LS, van Vlerken LE, Yadav S, Amiji MM. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. *Cancer Treat. Rev.* 2008; 34: 592-602.
- Kim MJ, Lee HJ, Lee IA, Kim IY, Lim SK, Cho HA, Kim JS. Preparation, of pH-sensitive, long-circulating and EGFR-targeted immunoliposomes. *Arch. Pharm. Res.* 2008b; 31: 539-546.
- LaVan DA, McGuire T, Langer R. Smallscale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnol* 2003; 21: 1184-1191.
- Liburdy RP, Tenforde TS, Magin RL. Magnetic field-induced drug permeability in liposome vesicles. *Radiation Res.* 1986; 108: 102-111.
- Lübbe AS, Bergemann C, Huhnt W, Fricke T, Riess H, Brock JW, Huhn D. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: Tolerance and efficacy. *Cancer Res.* 1996b; 56: 4694-4701.

Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, Matthias M, Dörken B, Herrmann F, Gürtler R, Hohenberger P, Haas N, Sohr R, Sander B, Lemke AJ, Ohlendorf D, Huhnt W, Huhn D. Clinical experiences with magnetic drug targeting: A phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* 1996a; 56: 4686-4693.

Matsuda A, Sasaki T. Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. *Cancer Sci.* 2004; 95: 105-111.

Morales ME, Gallardo V, Calpena AC, Doménech J, Ruiz MA. Comparative study of morphine diffusion from sustained release polymeric suspensions. *J. Control. Release* 2004; 95: 75-81.

Moroz P, Jones SK, Gray BN. Magnetically mediated hyperthermia: Current status and future directions. *Int. J. Hyperthermia* 2002; 18: 267-284.

Müller RH, Maaßen S, Wayhers H, Specht F, Lucks JS. Citotoxicity of magnetic-loaded polylactide, polylactide/glicolide particles and solid lipod nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1996; 138: 85-94.

Neuberger T, Scöpfung B, Hofmann H, Hofmann M, Von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 483-496.

Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Application of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2003; 36: R167-R181.

- Pérez-Artacho B, Gallardo V, Ruiz MA, Arias JL. Maghemite/poly(D,L-lactide-co-glycolide) composite nanoplatform for therapeutic applications. *J Nanopart Res.* 2012; 14:768.
- Peters GJ, van der Wilt CL, van Moorse CJA, Kroep JR, Bergman AM, Ackland SP. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol. & Therapeutics.* 2000; 87: 227-253.
- Plaza RC, Arias JL, Espín M, Jiménez ML, Delgado AV. Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *J. Colloid Interface Sci.* 2002; 245: 86-90.
- Reddy LH, Coyvreur P. Novel approaches to deliver gemcitabine to cancers. *Curr. Pharm. Desing.* 2008; 14: 1124-1137.
- Reddy LH. Drug delivery to tumors: Recent strategies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57: 1231-1242.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradation polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* 2001; 70: 1-20.
- Steinke F, Andräa W, Heidec R, Wernera C, Bellemann ME. Rotating magnetic microspheres as heating mechanism for remote controlled drug release. *J. Magn. Mater.* 2007; 311: 216-218.
- Suryanarayanan R. X-Ray Powder Diffractometry. En: *Physical characterization of pharmaceutical solids.* (Ed.: Brittain HG). New York: Marcel Dekker Inc. 1995; pp. 187-221.

Ulbrich K, Šubr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1023-1050.

Van Moorsel CJA, Pinedo HM, Veerman G, Bergeman AM, Kuiper CJm, Vermorken JB, Van der Vijgh WJF, Peters GJ. Mechanism of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small cell lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer.* 1999; 80: 981-990.

Van Oss CJ. *Interfacial Forces in Aqueous Media.* Marcel Dekker Inc. New York, 1994.

Wagner E. Programmed drug delivery: Nanosystems for tumor targeting. *Expet. Opin. Biol. Ther.* 2007; 7: 587-593.