



**DESARROLLO DE LIPOSOMAS  
MAGNÉTICOS PARA LA MEJORA DE  
LA QUIMIOTERAPIA CONTRA EL  
CÁNCER DE COLON**

**TESIS DOCTORAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOMEDINA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Cristina Lorente Guirado**

**Granada, 2019**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Cristina Lorente Guirado  
ISBN: 978-84-1306-358-4  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/57974>



## INDICE

RESUMEN .....	1
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1.1. Cáncer de colon .....	8
1.1.1. Epidemiología .....	10
1.1.2. Etiología .....	11
1.1.3. Detección y estadificación .....	14
1.1.4. Base molecular .....	19
1.1.5. Tratamiento .....	25
1.1.6. Resistencia y cáncer de colón .....	28
1.2. Nanoestrategias para el transporte selectivo de fármacos .....	29
1.2.1. Transporte pasivo .....	31
1.2.2. Transporte activo .....	34
1.3. Coloides magnéticos en el transporte de fármacos .....	52
<b>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS, CONTRIBUCIÓN Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>57</b>
2.1. Objetivos .....	59
2.2. Contribución .....	60
2.3. Plan de trabajo .....	61
<b>CAPÍTULO 3. FORMULACIÓN DE MAGNETOLIPOSOMAS</b>	
<b>FOSFATIDILCOLOINA/MAGHEMITA .....</b>	<b>63</b>
3.1. Nanopartícula de maghemita .....	65
3.1.1. Metodología de síntesis .....	65
3.1.2. Resultados y discusión .....	67
3.2. Liposomas .....	68

3.2.1. Metodología de síntesis .....	69
3.2.2. Resultados y discusión .....	70
3.3. Magnetoliposomas .....	71
3.3.1. Metodología de síntesis .....	72
3.3.2. Resultados y discusión .....	74
<b>CAPÍTULO 4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA .....</b>	<b>77</b>
4.1. Estructura y composición química .....	79
4.1.1. Difractometría de rayos X .....	79
4.1.1.1. Metodología de síntesis .....	80
4.1.1.2. Resultados y discusión .....	81
4.1.2. Espectroscopía de infrarrojos por Transformada de Fourier .....	82
4.1.2.1. Metodología de síntesis .....	83
4.1.2.2. Resultados y discusión .....	85
4.2. Propiedades eléctricas superficiales .....	87
4.2.1. Descripción clásica de la doble capa eléctrica .....	88
4.2.2. Metodología experimental .....	93
4.2.3. Resultados y discusión .....	94
4.2.4. Estabilidad en el tiempo de los magnetoliposomas .....	98
4.3. Termodinámica superficial .....	101
4.3.1. Interacciones superficiales .....	102
4.3.1.1. Interacciones dispersivas .....	103
4.3.1.2. Interacciones no-DLVO .....	104
4.3.1.3. Contribución a la Teoría de van Oss y cols. ....	106
4.3.2. Metodología experimental .....	110
4.3.3. Resultados y discusión .....	114
4.3.3.1. Componentes de la energía libre superficial .....	114

4.3.3.2. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba .....	116
4.4. Propiedades magnéticas .....	118
4.4.1. Metodología de síntesis .....	120
4.4.2. Resultados y discusión .....	124
4.5.1.1. Ciclo de histéresis .....	124
4.5.1.2. Prueba <i>in vitro</i> a nivel macroscópico y microscópico .....	125
4.5. Estudio reológico .....	127
4.5.1. Metodología de síntesis .....	130
4.5.2. Resultados y conclusión .....	131
<b>CAPÍTULO 5. CAPACIDADE DE VEHICULIZACIÓN DE LA PREDNISOLONA .....</b>	<b>135</b>
5.1. Prednisolona .....	137
5.2. Caracterización de la prednisolona mediante espectrofotometría UV-Vis .....	141
5.2.1. Absorbancia óptica de las disoluciones .....	141
5.2.1.1. Metodología experimental .....	143
5.2.1.2. Resultados y discusión .....	144
5.2.2. Validación del método .....	148
5.2.2.1. Metodología experimental .....	149
5.2.2.2. Resultados y discusión .....	149
5.2.3. Metodología espectrofotométrica para determinar la incorporación de prednisolona .....	152
5.3. Incorporación matricial de prednisolona .....	153
5.3.1. Metodología experimental .....	153
5.3.2. Resultados y discusión .....	159
5.4. Liberación de prednisolona .....	158
5.4.1. Metodología experimental .....	158

5.4.2. Resultados y discusión .....	159
<b>CAPÍTULO 6. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>167</b>
6.1. Hemocompatibilidad .....	169
6.1.1. Metodología experimental .....	169
6.1.2. Resultados y discusión .....	170
6.2. Estudios de proliferación .....	171
6.2.1. Metodología experimental .....	171
6.2.2. Resultados y discusión .....	172
6.3. Internalización celular de los magnetoliposomas .....	174
6.2.1. Metodología experimental .....	177
6.2.2. Resultados y discusión .....	179
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>187</b>
<b>CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>195</b>



## Resumen

El desarrollo de sistemas transportadores de fármacos ha alcanzado en Biomedicina un papel muy importante, concretamente en la terapia de enfermedades severas como el cáncer o la artritis reumatoide, por citar algunos ejemplos. Las ventajas del uso de la Nanotecnología con fines farmacéuticos provienen esencialmente de la versatilidad de los métodos de formulación desarrollados para la obtención de una amplia variedad de coloides basados en nanopartículas en dispersión acuosa. Así, las nanoplataformas obtenidas pueden presentar diferentes geometrías, estructuras y propiedades fisicoquímicas, según las necesidades biomédicas en cuestión.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo central el diseño de un sistema liposomal con capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados, que permita el transporte eficaz del fármaco prednisolona hasta una célula o tejido diana. Con este fin, se realizó un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas que permitieran obtener nanocompuestos biodegradables y biocompatibles constituidos por núcleos magnéticos de óxido de hierro (maghemita,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) embebidos en una matriz vesicular (liposoma basado en L- $\alpha$ -fosfatidilcolina). El desarrollo de un procedimiento de formulación reproducible se basó en una exhaustiva caracterización fisicoquímica del coloide superparamagnético, que incluyó el análisis del efecto de la relación maghemita:matriz liposomal (masa:masa) en la obtención del mejor recubrimiento, la caracterización del tamaño y forma, estructura y composición química, características electrocinéticas y termodinámicas superficiales, propiedades magnéticas, y propiedades reológicas del coloide.

Se evaluó la capacidad para el transporte de fármacos de las nanopartículas, empleando como fármaco el glucocorticoide prednisolona. Se acometieron estudios para optimizar la capacidad de carga, junto con estudios *in vitro* de liberación, que permitieron caracterizar un perfil de cesión bifásico o sostenido en el tiempo. Finalmente, se realizaron estudios *in vitro* que demostraron la hemocompatibilidad del nanomaterial, y estudios de proliferación en fibroblastos de colon humano CCD-18, en

la línea celular de carcinoma de colon humano T-84, y en linfocitos y RAW 264.7 macrófagos que probaron la ausencia de toxicidad *per se* del coloide.

Imágenes de microscopía electrónica de transmisión y la técnica de tinción *Prussian blue* confirmó la internalización de los magnetoliposomas por células T-84 mediante endocitosis y/o macropinocitosis, que resultó ser máxima tras sólo 24 horas de incubación. Se comprobó cómo los nanocompuestos quedaban concentrados a nivel mitocondrial, y que eran capaces de inducir una migración celular *in vitro* bajo la acción de un campo magnético aplicado.

Por tanto, cabe concluir que se ha desarrollado un coloide basado en magnetoliposomas con prometedoras aplicaciones en Biomedicina.



# **1. INTRODUCCIÓN**



La actividad farmacológica de un principio activo utilizado en el tratamiento de cualquier proceso fisiopatológico depende, principalmente, de la naturaleza de su interacción con el tejido o célula diana. En este sentido, es necesario que dicho fármaco llegue a su lugar de acción a una concentración terapéutica eficaz y constante, durante el tiempo necesario para ejercer su acción. Sin embargo, la acumulación del principio activo en la biofase se puede ver condicionada por diversos factores, principalmente [Durán y cols., 2008; Arias, 2011]:

- Un carácter hidrófobo facilita la precipitación en sangre del fármaco en forma de soluto y su retirada de la circulación sistémica.
- Una extensa biodistribución y la extravasación no específica (o no selectiva) de las moléculas de principio activo a tejidos sanos que incluso puede ser responsable de fenómenos de toxicidad colateral.
- Una intensa biodegradación y rápido aclaramiento plasmático de la dosis de fármaco administrada antes de su llegada al tejido u órgano diana.

Todo esto conduce al fracaso de la terapia farmacológica y, por tanto, para alcanzar el efecto deseado es necesaria la administración de dosis altas y frecuentes, lo que generalmente da lugar a la aparición de toxicidad en el organismo o, incluso, a incumplimiento terapéutico por parte del paciente.

En las últimas décadas, para mejorar el tratamiento terapéutico destinado a tratar cualquier proceso fisiopatológico, los investigadores han centrado su interés en el desarrollo de sistemas coloidales como vehículos transportadores de fármacos. Este tipo de plataformas actúa liberando toda la dosis de fármaco en el sitio específico del organismo, a la vez que lo protege de una rápida degradación y eliminación.

El desarrollo de sistemas transportadores de fármacos ha alcanzado en Biomedicina un papel muy importante, concretamente en la terapia de enfermedades severas como el cáncer [Arias, 2011; Albano y cols., 2018] o la artritis reumatoide [Arias, 2013; Patel y cols., 2018], por citar algunos ejemplos.

Las ventajas del uso de la Nanotecnología con fines farmacéuticos provienen esencialmente de la versatilidad de los métodos de síntesis desarrollados para la obtención de una amplia variedad de nanopartículas o sistemas coloidales. Así, las nanoplataformas obtenidas pueden presentar diferentes geometrías y propiedades fisicoquímicas según las necesidades biomédicas en cuestión [Couvreur y Vauthier, 2006].

## **1.1. CÁNCER DE COLON**

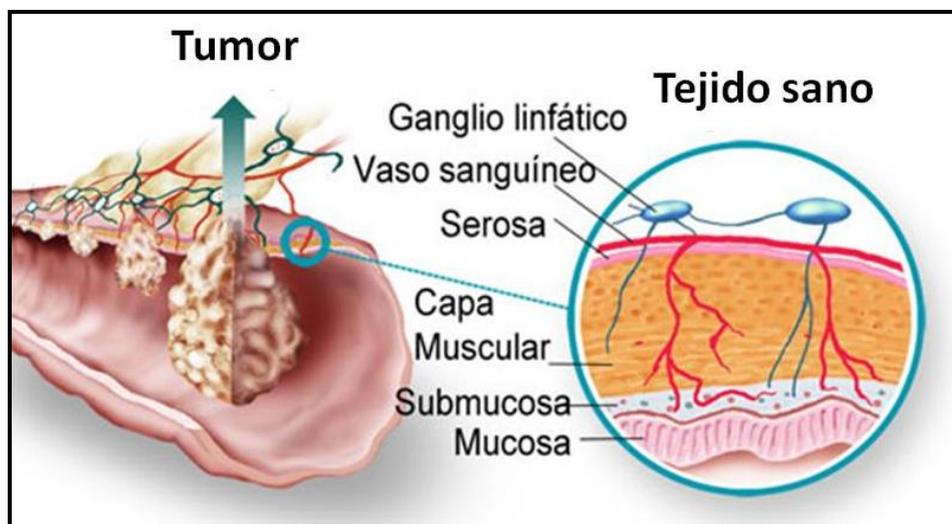
El desarrollo del cáncer en los seres humanos implica una sucesión de complejos mecanismos en los que están implicados los oncogenes, genes supresores de tumores y otros genes que controlan directa o indirectamente la proliferación celular durante décadas. Las diferentes combinaciones de alelos mutantes de estos genes se encuentran en los genomas de los muchos tipos de cáncer humano, así como en diferentes tipos de cáncer del mismo tejido [Willian y cols., 2002]. De hecho, el análisis más convincente de la complejidad del programa genético del desarrollo del cáncer en los seres humanos viene de estudios detallados del cáncer colorrectal [Volgstein y cols., 1998] donde se evidencia los muchos y diferentes alteraciones y vías genéticas que dan lugar al estado neoplásico. Por ello, cada tumor es único y el espectro de cambios genéticos que culminan en tumores humanos es infinitamente variable. Aún así, se pueden fijar una serie de características especiales que poseen las células malignas [Hanahan y Weinberg, 2000]:

- Crecen y se dividen sin la necesidad de señales apropiadas o en presencia de señales inhibitorias.
- Inducen cambios en el citoesqueleto y alteraciones en la matriz extracelular del tejido, lo que altera su capacidad de adhesión celular, movimiento, apariencia o interacción con células vecinas.
- No inhiben su crecimiento por contacto con otras células, lo que provoca una pérdida de la organización del tejido normal.

- Presentan alteraciones en el tamaño y forma de sus núcleos, y pueden secretar enzimas que digieren las barreras celulares, lo que les permite invadir y destruir tejidos normales adyacentes.

Cuando estas alteraciones celulares se producen en las células epiteliales del intestino grueso (colon) o en el recto es el denominado cáncer colorrectal (CCR). Ésta es una tumoración maligna de enorme importancia desde el punto de vista socio-sanitario, debido a su gran prevalencia y al gasto sanitario que supone su tratamiento.

El colon forma parte del aparato digestivo y al igual que el recto está constituido por varias capas de tejido, la más interna es la mucosa. Ésta se encuentra rodeada por la submucosa, y más externamente se sitúa la capa muscular que a su vez está recubierta por la capa serosa (capa más externa). En la mucosa existen glándulas, lugar donde se producen con mayor frecuencia los tumores malignos. La tumoración vegetante o infiltrativa originada tiene tendencia a crecer y a diseminarse paso a paso a través de los conductos linfáticos (ganglios) o bien a distancia (vía sanguínea: metástasis) (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Imagen de AECC. Capas del colon.

### 1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbi-mortalidad del mundo, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos en el mundo en el año 2012 (últimos datos disponibles a nivel mundial estimados por los proyectos EUCAN y GLOBOCAN, OMS). Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos aumente en las dos próximas décadas a 22 millones de casos nuevos al año.

En España el CCR es el que mayor incidencia tiene (16%), mientras que el de mayor mortalidad es el de pulmón (20%) y el que tiene una prevalencia más alta a cinco años es el cáncer de mama (18%). Si hacemos distinción de sexo, tanto en hombres como mujeres es el segundo cáncer más frecuente siguiendo al cáncer de próstata y al cáncer de mama, respectivamente (Tablas 1 y 2). Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), se calcula una incidencia de 41441 pacientes al año en España, siendo responsable de 15449 fallecimientos y una prevalencia a cinco años de 89705 casos [Galceran y cols. 2016; Bray y cols. 2013].

**Tabla 1.** Incidencia del cáncer en España en hombres y mujeres [SEOM 2018].

INCIDENCIA DEL CÁNCER EN ESPAÑA (%)			
Hombres		Mujeres	
Próstata	22.42	Mama	28.04
Colorrectal	16.64	Colorrectal	16.85
Pulmón	15.01	Útero	6.22
Vejiga urinaria	11.71	Pulmón	5.98
Estómago	3.46	Vejiga urinaria	3.69
Labios, cavidad oral y faringe	3.34	Linfoma no Hodking	3.51
Hígado	2.85	Páncreas	3.43
Linfoma no Hodking	2.81	Estómago	3.34
Riñón	2.41	Ovario	3.28
Páncreas	2.36	Leucemia	2.76

**Tabla 2.** Mortalidad del cáncer en España en hombres y mujeres [SEOM 2018].

<b>MORTALIDAD DEL CÁNCER EN ESPAÑA (%)</b>			
<b>Hombres</b>		<b>Mujeres</b>	
<b>Pulmón</b>	26.40	<b>Mama</b>	15.14
<b>Colorrectal</b>	10.69	<b>Colorrectal</b>	11.76
<b>Próstata</b>	9.01	<b>Pulmón</b>	9.86
<b>Vejiga</b>	5.98	<b>Páncreas</b>	7.52
<b>Hígado</b>	5.21	<b>Estómago</b>	3.54
<b>Estómago</b>	5.11	<b>Útero</b>	5.32
<b>Páncreas</b>	4.91	<b>Ovarios</b>	5.24
<b>T. mal definidos</b>	3.99	<b>Hígado</b>	4.02
<b>Riñón</b>	3.16	<b>Leucemia</b>	3.51
<b>Leucemia</b>	2.97	<b>Linfoma no Hodgkin</b>	1.99

Según la OMS, el CCR ocupa el cuarto lugar como responsable del mayor número de fallecimientos a nivel mundial en 2012 (694.000 muertes). Sin embargo, y pese a que las cifras de mortalidad son muy elevadas, los estudios indican que la supervivencia de los pacientes con cáncer ha aumentado de forma continua en los últimos años en todos los países europeos, especialmente el cáncer de recto lo que es probable que esté relacionado con los avances en el tratamiento.

Datos recientes indican que en 2017 el cáncer de pulmón ha seguido constituyendo la principal causa de muerte por tumores a nivel europeo. El cáncer colorrectal ha experimentado un descenso del 5,3% y del 6,7 % desde 2012. La reducción del cáncer colorrectal en ambos sexos, así como en los tumores de próstata, mama y útero reflejan las mejoras en el diagnóstico precoz y en los nuevos tratamientos (Malvezzi y cols., 2017).

### **1.1.2. ETIOLOGÍA**

El desarrollo del CCR no tiene una única causa concreta. Es bien sabido que existen factores genéticos que dan lugar a su desarrollo, al mismo tiempo que otras

enfermedades como la poliposis crónica, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa pueden desencadenar esta patología [Peloquin y cols., 2013; Strum, 2016; Dulay y cols., 2016]. Generalmente comienza como pólipos benignos que lentamente se convierten en cancerosos. También existen diversos factores ambientales los cuales desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad:

-Tabaquismo. El consumo de tabaco de forma crónica aumenta el riesgo de desarrollo de CCR debido a su efecto mutagénico. Por ejemplo, una mutación en el gen APC (*adenomatous polyposis coli*) situado en el brazo largo del cromosoma 5 (q21-q22) da lugar a múltiples pólipos premalignos en el colon precursores de CCR [Sarebo y cols., 2006]. Además, existen numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que los componentes más importantes del tabaco, como es la nicotina, inducen la proliferación del CCR por diferentes vías [Ye y cols., 2004; Wong y cols., 2007; Wei y cols, 2011].

-Alcohol. Se ha demostrado que no es un carcinógeno por sí mismo, pero sí puede causar lesiones directas en el epitelio digestivo al mismo tiempo que puede favorecer la absorción de otros carcinógenos [Doll y cols., 1999]. Además, el consumo de alcohol está asociado con una malabsorción de folato. La deficiencia de folato puede afectar la expresión génica alterando los patrones de metilación del ADN o mediante la inducción de sustituciones de bases, rupturas de ADN, y la amplificación de genes. Además del papel del alcohol en la modulación de la metilación del ADN a través de su asociación con la deficiencia de folato, el etanol podría ejercer directamente su efecto sobre la metilación del ADN, reduciendo la actividad de la metionina sintasa, disminuyendo los niveles de glutatión e inhibiendo la actividad del ADN metilasa, los determinantes importantes de la regulación epigenética. Por lo tanto, la ingestión de alcohol, ya sea directamente o a través de su asociación con deficiencia de folato, modula la metilación del ADN, un importante determinante epigenético en la expresión génica, y en el mantenimiento de la integridad del ADN y la estabilidad cromosómica, que están implicados en el desarrollo del cáncer [Hamid y cols., 2009].

-Edad. El CCR aumenta su incidencia a partir de los 50 años de edad [Amersi y cols., 2005; El-Bolkainy y cols., 2006], motivo por el que se está potenciando su detección precoz mediante pruebas de *screening* (sangre oculta en heces) [Haug y Becker, 2016]. Sin embargo, existen diferencias importantes en la incidencia según la edad en las diferentes zonas del mundo inducidas por la dieta, el estilo de vida y el microbioma.

-Obesidad. Está relacionada con mayor índice de CCR [Bardou y cols., 2015].

-Dieta. El consumo de carnes rojas y procesadas, azúcares simples y refinados, junto con un pobre ejercicio físico regular está interrelacionado con el síndrome metabólico intestinal e inflamación los cuales están relacionados con el riesgo de CCR [Kushi y cols., 2012; Birt y Phillips, 2014]. La ingesta de alimentos altos en colesterol puede aumentar el riesgo de CCR [Jarvinen y cols., 2001].

El CCR se puede dividir en tumores esporádicos (no hereditarios) y hereditarios [Carethers y Jung, 2015]. Los CCRs hereditarios debidos a mutaciones en genes dominantes constituyen el 10-15% de los CCRs. Estos tumores se desarrollan generalmente a edades más tempranas que los no hereditarios. Sin embargo, estudios en gemelos monozigóticos y dizigóticos indican que la proporción de CCRs debido a las mutaciones en la línea germinal es mucho mayor que las atribuidas en unos pocos genes dominantes [Lichtenstein y cols., 2000]. De hecho, la proporción de todos los CCR debido a mutaciones heredadas se aproxima al 35%. Por el contrario, aproximadamente el 60-65% de los CCR surge de factores ambientales. Estos casos se denominan esporádicos y aumentan la incidencia a partir de edades superiores a 50 años. Un tercer subconjunto de CCR se asocia con enfermedades inflamatorias intestinales crónicas como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, pero comprenden menos del 1% de todos los CCR [Carethers y Jung, 2015].

### 1.1.3. DETECCIÓN Y ESTADIFICACIÓN

Las pruebas utilizadas en la detección del CCR son:

- Examen físico: para revisar los signos generales de salud y verificar si hay signos de enfermedad, como masas o cualquier otra cosa anómala.
- Antecedentes familiares: se evalúan los antecedentes de enfermedades y los tratamientos anteriores del paciente.
- Análisis de sangre y orina: para conocer el estado general del paciente y detectar complicaciones asociadas al proceso tumoral.
- Prueba de sangre oculta en heces: técnica no invasiva la cual detecta la presencia de residuos sólidos mediante microscopía. Existen dos tipos de FOBT (del inglés *fecal occult blood test*):
  - FOBT con guayacol (reactivo derivado de resina de madera de árboles de Guajacum) para detectar hemo en las heces. El inconveniente que presenta es que no indica la procedencia de la sangre, por lo que posteriormente se tienen que hacer las pruebas de imagen [Schreuders y cols., 2016].
  - FOBT inmunoquímica. Se utilizan anticuerpos específicos para la hemoglobina. Proporciona un resultado cuantitativo en términos de hemoglobina fecal por gramo de heces [Rozen y cols., 2010]. Pero a veces puede presentar falsos positivos [Lbianca y cols., 2010].
- Tacto rectal: exploración digital del ano y parte del recto, buscando posibles alteraciones en las paredes del recto.
- Radiografía: examen del intestino grueso que utiliza una forma especial de rayos X llamada fluoroscopia, que posibilita ver órganos internos en movimiento, y un medio de contraste de bario o un contraste yodado soluble en agua.
- Sigmoidoscopia: procedimiento para observar el interior del recto y el colon sigmoide (inferior) y verificar si hay pólipos (áreas pequeñas de tejido abultado), otras áreas anormales o cáncer. Brevemente, se introduce un sigmoidoscopio (60 cm) que tiene una herramienta para extraer pólipos o muestras de tejido, los

cuales se observan al microscopio para verificar si hay signos de cáncer [Kuipers y cols., 2013].

- Colonoscopia: es una prueba con la que se puede visualizar la mucosa de todo el colon y el recto mediante un endoscopio que se introduce por el ano. Si se observa una lesión sospechosa durante la realización de la colonoscopia, se procederá a extraer una pequeña muestra de ésta (biopsia) [Hazewinkel y Dekkers, 2011].

Para determinar el tratamiento más adecuado es importante clasificar el tumor, es decir, determinar en qué estadio o fase se encuentra. Para ello, una vez que se ha diagnosticado el CCR, se realizan pruebas para determinar si las células cancerosas se diseminaron dentro del colon o a otras partes del cuerpo, o por el contrario sólo afectan a esa porción del tubo digestivo. Las pruebas que suelen realizarse son:

- Tomografía computarizada (TAC): permite la toma de imágenes del interior del cuerpo desde ángulos diferentes. Se inyecta un tinte en una vena o se administra vía oral, y se crean las imágenes en un ordenador conectado a una máquina de rayos X.
- Resonancia magnética de imagen (RMI): se inyecta gadolinio en vena, que se acumula alrededor de las células cancerosas, revelándose más brillantes en la imagen. Con ayuda de un imán, ondas de radio y un ordenador se crean las imágenes del colon.
- Tomografía por emisión de positrones (TEP): se administra por vía intravenosa una pequeña cantidad de glucosa radiactiva para medir la actividad metabólica del organismo. El explorador de TEP rota alrededor del cuerpo y toma una imagen de los lugares que absorben la glucosa. Las células malignas tienen un aspecto más brillante en la imagen porque son más activas y absorben más glucosa que las células normales.
- Ecografía: se basa en la emisión de ultrasonidos que rebotan al chocar con las diferentes estructuras a las que llegan y mediante un ordenador forman una imagen que se visualiza en una pantalla. En el CCR se puede realizar una ecografía

abdominal para valorar el estado del hígado, o una ecografía endorrectal cuando las lesiones están a nivel del recto.

- Cirugía: permite la extirpación del tumor y determinar a qué distancia se diseminó en el colon.
- Biopsia de ganglios linfáticos: extracción de todo un ganglio linfático o una parte, y posterior observación al microscopio para determinar si hay células cancerosas.
- Hemograma o recuento sanguíneo completo (RSC): se toma una muestra de sangre para verificar la cantidad de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, hemoglobina y hematocrito.
- Marcadores tumorales: sustancias que aparecen en cantidades superiores a lo normal en el torrente sanguíneo de los pacientes que padecen cáncer. Los más precisos son el antígeno carcinoembrionario (ACE), el antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9) y la forma metilada del gen Septina 9 (mSEPT9). El mSEPT9 se encuentra en más del 90% de los tumores de colon, pasando a la sangre en forma de ácido desoxirribonucleico (ADN) libre, indicando su presencia la posibilidad de que exista una neoformación relacionada con CCR. Los marcadores tumorales se emplean como pruebas que ayudan al seguimiento del tumor tras los tratamientos y para detectar recidivas, pero no son válidos para realizar un diagnóstico precoz.

Cuando el cáncer se disemina a otra parte del cuerpo, se llama metástasis. Las células cancerosas se desprenden de donde se originaron (tumor primario) y se desplazan a través de:

- Tejidos: el cáncer se disemina desde donde comenzó y se extiende hacia las áreas cercanas.
- Sistema linfático: el cáncer se disemina hasta entrar en el sistema linfático, desplazándose a través de los vasos linfáticos a otras partes del cuerpo. Forma un tumor (tumor metastásico) en otra parte del cuerpo.
- Sangre: el cáncer entra en la sangre, desplazándose a través de los vasos sanguíneos a otras partes del cuerpo. Genera un tumor metastásico en otra región del organismo.

Para poder determinar el tratamiento más adecuado para el CCR es importante conocer en qué fase o estadio se encuentra. Existen dos tipos de clasificaciones que se utilizan con igual frecuencia aunque quizá la primera sea la más completa:

### 1. Clasificación *TMN*

Estas siglas hacen referencia a tres aspectos del cáncer:

La *T* se refiere al nivel de extensión del tumor primario en las paredes del intestino:

- Tis: es el tumor “in situ”, confinado a la mucosa, que no traspasa las capas de la misma.
- T1: tumor que invade la submucosa.
- T2: Tumor que invade la muscularis propia.
- T3: tumor que llega hasta la subserosa o los tejidos grasos perirectales.
- T4: Tumor que invade tejidos de órganos adyacentes.

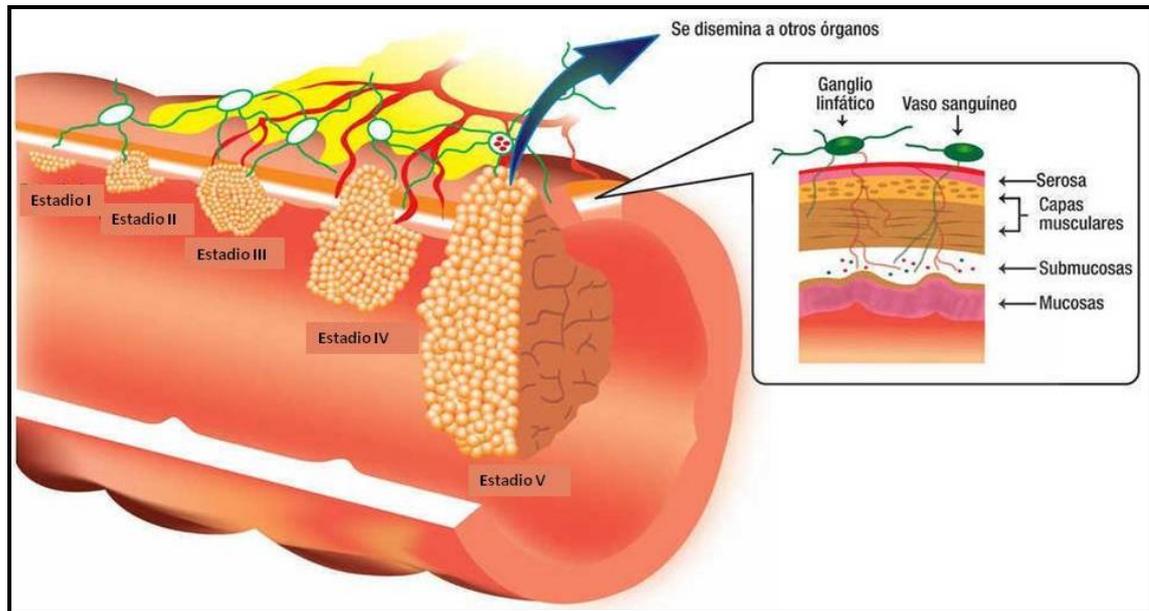
La *N* se refiere a la presencia o no de afectación de los ganglios linfáticos regionales o más próximos a la zona donde se origina el tumor.

- N0 significa ausencia de afectación ganglionar.
- N1 significa la presencia de afectación tumoral en 1 a 3 ganglios linfáticos perirectales.
- N2 significa metástasis o afectación de 4 o más ganglios linfáticos.

La *M* se refiere a la presencia confirmada de metástasis a distancia:

- M0 es ausencia de metástasis.
- M1 es presencia de metástasis a distancia.

El estadio del cáncer se realiza teniendo en cuenta la clasificación *TNM* (Figura 1.2):



**Figura 2.** Etapas del CCR.

- ❖ **Estadio 0 o carcinoma *in situ*:** es la etapa más temprana. Se encuentran células anormales en la mucosa (capa más interna de la pared del colon).
- ❖ **Estadio I:** el tumor afecta a la pared del colon o recto sin pasar la capa muscular. No existe afectación de los ganglios linfáticos.
- ❖ **Estadio II:** el tumor ha infiltrado todas las capas de la pared del colon o recto. Puede invadir estructuras cercanas. No se aprecia afectación ganglionar. Se divide a su vez en tres etapas: IIA (el cáncer se disemina a través de la capa muscular del colon a la serosa), IIB (el cáncer atraviesa la capa serosa, pero no se disemina a órganos cercanos) y IIC (el cáncer se disemina a órganos cercanos).
- ❖ **Estadio III:** el cáncer ha invadido los órganos más próximos y hay afectación ganglionar. Se divide en: estadio IIIA (infiltra la capa muscular y de 1 a 3 ganglios o infiltra hasta la submucosa y de 4 a 6 ganglios), estadio IIIB (infiltra a la serosa y se ha diseminado de 1 a 3 ganglios o bien se infiltra hasta la muscular y de 4 a 6 ganglios linfáticos o hasta la submucosa pero se ha diseminado hasta más de 7 ganglios) y estadio IIIC (el cáncer infiltra hasta la

serosa y de 4 a 6 ganglios linfáticos o bien invade la capa muscular y a 7 o más ganglios o invade a otras estructuras más próximas y a ganglios independientemente del número).

- ❖ **Estadio IV:** el cáncer se ha diseminado a otros órganos. Se divide en estadio IVA (el cáncer se ha diseminado a un órgano alejado del colon, como el hígado, un pulmón o un ovario, o a un ganglio linfático lejano) y IVB (el cáncer se ha diseminado a más de un órgano que no está cerca del colon o al revestimiento de la pared abdominal).

## 2. Clasificación de Astler y Coller

- **Estadio A:** lesión limitada a la mucosa, sin afectación ganglionar.
- **Estadio B1:** el tumor afecta a parte de la pared del colon o recto, sin atravesarla ni afectar ganglios.
- **Estadio B2:** afecta a toda la pared sin invasión ganglionar.
- **Estadio C:** la enfermedad puede afectar a parte o a toda la pared, con afectación ganglionar.
- **Estadio D:** existe afectación de otros órganos alejados.

### 1.1.4 BASE MOLECULAR

El CCR puede tener carácter hereditario o esporádico. El CCR hereditario a su vez puede clasificarse principalmente en CCR hereditario no polipoideo (HNPCC) o síndrome de Lynch, y poliposis adenomatosa familiar (FAP) ambos son autosómicos dominantes [Burt, 2000]. En menor proporción, el CCR también se asocia con enfermedades inflamatorias intestinales crónicas como puede ser Crohn y colitis ulcerosa [Carethers y Jung, 2015].

En el CCR se produce una secuencia de fallos genéticos debido a mutaciones en genes supresores de tumores, oncogenes y genes reparadores del ADN que afectan al equilibrio entre proliferación celular y apoptosis [Vogelstein y cols., 2013]. El CCR comienza con la displasia del epitelio, que deriva a adenoma temprano, adenoma

tardío, carcinoma y metástasis. Son cambios que tardan normalmente décadas en producirse, de ahí la frecuencia de aparición de la patología en edades avanzadas [Leslie y cols., 2002; Vogelstein y cols., 2013; Kheiriseid y cols., 2013].

El primer evento genético que se produce en CCR es la mutación en el gen APC, gen supresor de tumores que se encuentra en un fragmento del brazo largo (q) del cromosoma 5 entre las posiciones 21 y 22 y se encarga de regular diversas funciones celulares, entre las que se encuentran la división y la migración celular de las células del colon. Por tanto, una mutación en APC implica un aumento en la proliferación celular que da lugar a pequeños adenomas (<1cm). En ellos, la hipermetilación del ADN favorece la expresión aberrante de genes previamente silentes, se producen aneuploidías como resultado de la distribución de cromosomas durante la mitosis, y pérdidas alélicas de genes supresores. En adenomas grandes (tamaño > 1 cm), aparece hasta en un 50% de casos una mutación en el gen KRAS (secuencia asociada al retrovirus Kirsten, del inglés *Kirsten retrovirus associated sequence*), que se traduce en una proteína atrapada en su estado activo que envía de forma continua señales mitóticas e impide la apoptosis. Esto favorece el crecimiento del adenoma y la posible expansión clonal de alguna célula inicialmente alterada.

A medida que progresa la evolución desde adenoma se pierden algunas alteraciones pero persisten las de KRAS y APC, y se producen deleciones en 18q y 17p entre otras regiones, que implican los genes DCC (suprimido en carcinoma colorrectal, del inglés *deleted in colon carcinoma*) y p53. La mutación en estos dos genes provoca la aparición de carcinomas invasivos. Alteraciones posteriores en Rb (retinoblastoma) o c-myc (virus de mielocitomatosis aviar, del inglés *avian myelocytomatosis virus*) confieren malignidad. Por tanto, el comportamiento clínico del CCR resulta de interacciones a muchos niveles.

En células tumorales existen dos tipos de inestabilidad generadas a partir de vías diferentes: la inestabilidad a nivel cromosómico (translocaciones, deleciones, duplicaciones, aneuploidías o inversiones) y la inestabilidad a nivel genómico (mutaciones puntuales o deleciones/inserciones de secuencias microsatélite). La mayoría de los casos de CCR esporádico se deben a una inestabilidad cromosómica mediante cambios en el número de copias y en la estructura de los cromosomas.

### **Inestabilidad genómica**

Los genes involucrados en la reparación de errores de apareamiento (MMR, del inglés *mismatch repair*) se encargan de corregir los errores que ocurren durante la replicación del ADN. La inactivación de estos genes incrementa la tasa de mutaciones durante la síntesis de ADN. Las células con este defecto se asocian a inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés *microsatellite instability*). Los microsatélites son por su propia naturaleza y estructura secuencias inestables y tienden a formar bucles que de no ser reparados pueden llevar a la aparición de deleciones e inserciones en las mismas.

La inestabilidad genómica se ha observado en más del 80% de los casos de HNPCC y alrededor del 10-15% en CR esporádico y cáncer gástrico [Thibodeau y cols., 1998]. En pacientes con HNPCC su presencia sugiere un defecto en los genes MMR [de Jong y cols., 2004]. En los CR, habitualmente por hipermetilación bialélica y consiguiente silenciamiento de la región promotora del gen MLH1 a nivel somático. Estos tumores se asocian con edad elevada y sexo femenino y su comportamiento clínico es menos agresivo.

El HNPCC se ha asociado con mutaciones germinales en los genes MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 y PMS2. La mayoría de mutaciones encontradas en pacientes con HNPCC se encuentran en los genes MLH1 y MSH2. El resto de las mutaciones representan el 1% del total de las mutaciones encontradas. Este tipo de CCR supone una aceleración de la evolución de mucosa normal a carcinoma [Vasen, 1999]. Aparece unos 20 años antes que en la población general, sobre los 45 años, y tiene un patrón hereditario autosómico dominante. La alteración de estos dos genes a su vez produce nuevas mutaciones en genes que regulan la apoptosis como la proteína X asociada al gen Bcl-2 (BAX, del inglés *BCL2-associated X protein*), genes implicados en el control y regulación del crecimiento tumoral como TGF- $\beta$  ( ) o incluso en genes reparadores como hSMH3 y hSMH6 [Malkhosyan y cols., 1996].

Otra ruta alternativa que implica genes reparadores es la inactivación germinal de un gen reparador de excisión de bases, MYH, que escinde del ADN la guanina oxidada.

Portar 2 alelos inactivos implica un fenotipo polipósico con un riesgo de CCR del 100% a los 60 años [Järvinen y cols. 2000].

Finalmente, la metilación aberrante de ADN proporciona un mecanismo de silenciamiento de genes. Ésta implica la adición de un grupo metilo a la citosina en su carbono 5, por parte de ADN metilasas, con lo que se define una quinta base de ADN, la 5-metilcitosina. En tejidos normales, la metilación ocurre en regiones fuera de los exones, pero en el CCR es frecuente en las islas CpG de ciertas regiones promotoras [Sharma y cols., 2010]. En el fenotipo esporádico con MSI, la silenciación epigenética bloquea la expresión del gen MLH1 [Gregoretti y cols., 2004 y Kane y cols., 1997]. El fenotipo metilador de islas de CpG se observa en el 15% de los cánceres esporádicos. Algunos de los genes que se inactivan mediante hipermetilación de sus respectivos promotores son p16INK4 $\alpha$ , p14ARF, APC, MGMT, LKB1, hMLH1, RasSF1 $\alpha$ , CRBP1 y RarB2.

### **Inactivación de genes supresores**

a) APC: la mutación del gen APC es crítica en la carcinogénesis de colon. APC es un gen supresor de tumores encargado de regular la división, migración y el mantenimiento de la estabilidad genómica mediante la fosforilación de la proteína  $\beta$ -catenina (vía de señalización *Wnt*). Una mutación en APC impide la fosforilación y  $\beta$ -catenina se acumula. La  $\beta$ -catenina migra al núcleo, interaccionando con los factores de transcripción e induciendo la expresión génica, lo que supone un aumento de la proliferación y la evasión de la apoptosis. Las mutaciones en línea germinal del gen APC tienen lugar en etapas tempranas de la carcinogénesis, estando presentes en el 80% de los adenomas y CCRs. Las mutaciones en la línea germinal del gen APC son las responsables de la aparición de FAP, enfermedad genética de herencia autosómica dominante como de herencia autosómica recesiva presentándose como poliposis atenuadas con alteraciones en el gen MYH [Lamlum y cols., 1999; Takahashi-Yanaga y Kahn, 2010]. Se caracteriza por la presencia de cientos de pólipos adenomatosos con alta tasa de transformación maligna, de tal manera que a los 40 años todos los portadores han desarrollado un cáncer [Lynch y cols., 2008; Goss y cols., 2000].

b) TP53. Una mutación en el gen TP53 produce la inactivación de la proteína p53, que actúa como supresora del crecimiento celular, provocando la parada del ciclo celular que conduce a la apoptosis. Se activa por múltiples mecanismos de estrés celular [Vazquez y cols. 2008]. En la mayoría de los tumores, los dos alelos de TP53 están inactivados, habitualmente por una combinación de una mutación en uno de ellos y una delección en el segundo alelo del cromosoma 17p [Somasundaram y El-Deiry, 2000]. La inactivación de TP53 suele coincidir con la transición de grandes adenomas en carcinomas invasivos [Baker y cols. 1990].

c) TGF- $\beta$  del inglés, *transforming growth factor beta* es una citoquina que incluye tres isoformas (1,2,3) involucrada en la detención del ciclo celular entre otras funciones celulares. Aproximadamente, en un tercio de los CCR se han detectado mutaciones somáticas que inactivan al dominio quinasa del gen TGF $\beta$ R2 (receptor del factor de crecimiento transformante beta 2, del inglés *transforming growth factor beta receptor 2*) por mutaciones o delecciones que inactivan el componente SMAD4 o sus factores de transcripción SMAD3 y SMAD2. La inactivación de esta ruta coincide con la transición de adenoma a displasia de alto grado o carcinoma [Sjöblom y cols. 2006; Markowitz y cols., 1995].

d) Pérdidas alélicas en el cromosoma 18: la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 18 se observa en el 70% de lo CCR. Se produce concretamente en la región 18q21 donde se encuentran varios genes implicados en la carcinogénesis como DCC y SMAD4 o DPC4. DCC es una proteína transmembrana de la superfamilia de inmunoglobulinas. Es un gen supresor de tumores y la pérdida de heterocigosidad en él es el evento genético más frecuente en CCR avanzado [Shibata y cols., 1996; Saito y cols., 1999]. Esto puede indicar que la pérdida de DCC es más importante en la progresión del tumor que en la formación del mismo [Takayama y cols., 2006]. Por último, SMAD4 es un componente crítico en la regulación de TGF- $\beta$  [Luciakova y cols., 2011].

e) Gen p16 (CDKN2, MTS1, INK4α o CDK4I): es un gen supresor de tumores que actúa en el control de la fase G1 del ciclo celular. Codifica una proteína que inactiva los complejos ciclina quinasa dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4 y CDK6) impidiendo la fosforilación del producto del Rb necesario para la progresión del ciclo celular [Serrano y cols., 1993]. La inactivación de este gen se produce por metilación de la región promotora CpG, perdiendo así la función represora [Lee y cols., 2004; Lind y cols., 2004].

### **Activación de oncogenes**

a) Ras (HRAS, NRAS, KRAS) es una proteína G que codifica GTPasas en la membrana interna de la célula. Activa numerosas rutas de transducción de señales, pero es especialmente importante la de las proteínas quinasa mitógeno activada (MAPK)(*Mitogen-Activated Protein Kinases*), las cuales también a través de la transducción de señales activan a otras proteinquinasas y genes reguladores de proteínas. Las mutaciones impiden la hidrólisis de GTP a GDP, lo que conlleva una permanente activación de la proteína que envía de forma continua señales al oncogén BRAF. Esto supone la activación de la ruta de señalización MAPK resultando en la proliferación celular y evasión de apoptosis de las células cancerígenas [Rajagopalan y cols., 2002]. Las mutaciones de KRAS aparecen en un 37% de los carcinomas de colon.

b) El gen BRAF codifica una quinasa serina/treonina que, inducida por factores de crecimiento, activa la señalización de RAS/RAF/MEK/ERK implicada en la proliferación celular. La alteración más frecuente de BRAF induce la activación constitutiva de la vía MAPK, facilitando la evasión de la apoptosis. Esta mutación se asocia a la inactivación transcripcional del gen MLH1 por hipermetilación de su promotor, pero no a la mutación en línea germinal de éste [Samowitz y cols., 2005]. Así esta mutación se perfila en un 12-15% de CCR esporádicos. Las mutaciones BRAF son detectables incluso en pequeños pólipos [Nosho y cols., 2008] y en comparación con las mutaciones RAS, son más comunes en pólipos hiperplásicos, adenomas dentados y cáncer de colon próxima.

c) Vía de señalización del fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K): la familia de PI3K (I,II,III) constituye un gran grupo de proteínas kinasas de serina/treonina. La activación anormal de esta vía conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica que se relaciona con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer. Un tercio de los CCRs portan mutaciones somáticas en esta ruta [Hiles y cols., 1992]. En un 8-10% de los tumores colorrectales se detectan mutaciones activadoras de la tirosina quinasa en ausencia de adhesión a sustrato [Samuels y cols., 2004]. La fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) es una proteína supresora de tumores que actúa inhibiendo la ruta PI3K [Zhou y cols., 2003]. La pérdida de función de la PTEN debida a la metilación de su promotor, resulta en la estimulación de la ruta [Goel y cols., 2004].

### **1.1.5 TRATAMIENTO**

El tratamiento del CCR va a depender del estadio en el que se encuentre la enfermedad. El objetivo de la terapia anticancerosa es la eliminación completa de todas las células malignas mediante diferentes métodos como es la cirugía, radioterapia o métodos farmacológicos. Se pueden combinar diferentes tipos de tratamiento, simultáneamente o uno después del otro, dependiendo de la etapa del cáncer. En el caso que no sea posible su erradicación se recurre a métodos paliativos, los cuales intentan reducir o eliminar el mayor número de células malignas, aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia con la mejor calidad de vida posible.

- ∞ Cirugía: la extirpación quirúrgica del cáncer es el tratamiento más común para todos los estadios de cáncer de colon. Incluso si el médico extirpa todo el cáncer visible, el paciente se puede someter a quimioterapia o radioterapia después (terapia adyuvante) para destruir toda célula cancerosa que haya quedado.
  
- ∞ Ablación por radiofrecuencia: uso de un catéter especial con electrodos pequeños que destruyen células cancerosas.

- ∞ Criocirugía: se congela y se destruye el tejido maligno.
  
- ∞ Quimioterapia: uso de medicamentos para interrumpir el crecimiento de células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación. Por vía parenteral u oral los medicamentos alcanzan el torrente sanguíneo y pueden llegar a las células cancerosas (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se focaliza directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas de esas áreas (quimioterapia regional). La forma en que se administra la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando. Se dispone de diversas formas de quimioterapia: *i*) quimioterapia de inducción, en una situación de enfermedad avanzada, con una intención curativa o meramente paliativa; *ii*) quimioterapia adyuvante, para eliminar la enfermedad residual micrometastásica; *iii*) quimioterapia neoadyuvante, como tratamiento primario del tumor en estadio clínico locorregional antes de cirugía, en asociación o no con radioterapia concomitante; y *iv*) quimioterapia regional, por vía intraarterial, intraperitoneal o intratecal, para aumentar la concentración del fármaco en el lugar de acción. Algunos medicamentos comunes empleados para el cáncer colorrectal son 5-fluorouracilo, capecitabina, irinotecán, oxaliplatino, trifluridina/tipiracilo.
  
- ∞ Terapia dirigida: consiste en el uso de agentes biológicos dirigidos a moléculas específicas de la célula tumoral o de su entorno. Se utilizan anticuerpos monoclonales asociados a la quimioterapia los cuales mejoran los resultados frente a la quimioterapia sola. Los anticuerpos monoclonales tienen la característica de actuar destruyendo células tumorales, sin poseer prácticamente efecto sobre las células sanas, por lo que los efectos secundarios suelen ser bien tolerados. Existen dos tipos de anticuerpos monoclonales autorizados para su uso: dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR) y dirigidos contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (anti-VEGF).

- CETUXIMAB: Anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico cuya diana es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*) el cual está implicado en angiogénesis, proliferación, migración y adhesión celular. Su combinación en terapias FOLFOX o FOLFIRI están dando mejores resultados. Sin embargo, su respuesta se ve condicionada por mutaciones en los genes KRAS, BRAF, NRAS y PIK3CA. El gen KRAS se encuadra dentro de la familia de genes RAS . Estos genes codifican una proteína G la cual está relacionada con el acoplamiento de señales de transducción de receptores de superficie, entre los que se encuentra EFGR. Al unirse KRAS a GTP se promueve el retraso de la señalización celular de proliferación e inhibe la apoptosis, actuando como un oncogén. Las mutaciones en la KRAS bloquean la actividad GTPasa y promueven la conformación KRAS-GTP. De este modo, está activada de forma constitutiva la ruta RAS/RAF/MAPK que se encuentra por debajo de EGFR, dejando de depender de su ligando. Por ello, se produce una disminución de la eficacia de las terapias con Cetuximab.
  
- PANITUMUMAB. Anticuerpo monoclonal que desarrolla la misma función que Cetuximab y deja de ser eficaz cuando RAS está mutado.
  
- BEVAZIZUMAB. Anticuerpo monoclonal cuyo objetivo es detener la angiogénesis mediante unión al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*). El VEGF es un elemento clave en el tumor ya que éste necesita los nutrientes transportados en los vasos sanguíneos para crecer y diseminarse.
  
- ZIV-AFLIBERCEPT y RAMUCIRUMAB. Actúan uniéndose a la VEGF-A, la VEGF-B y el factor de crecimiento placentario (PIGF, del inglés *placental growth factor*), y se ha añadido a regímenes como el FOLFIRI, lo que ha mejorado la respuesta al tratamiento.

- REGORAFENIB. Es un tipo de terapia dirigida que bloquea ciertas proteínas quinasas que ayudan a las células del tumor a formar nuevos vasos sanguíneos para alimentar al tumor. Este fármaco se aprobó en 2012 por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) para pacientes con cáncer colorrectal metastásico que ya hayan recibido ciertos tipos de quimioterapia y otras terapias dirigidas.

### 1.1.6 RESISTENCIA Y CÁNCER DE COLON

La resistencia a la terapia frente al cáncer de colon recae de una forma importante a las células madre cancerosas (CSCs, del inglés *cancer stem cells*). La célula madre se caracteriza por tres propiedades: autorenovación, capacidad de desarrollarse en múltiples líneas celulares y el potencial de proliferar extensamente. Estos atributos funcionales la asimilan al fenotipo de la célula tumoral. Las CSCs intervienen tanto en procesos de quimioresistencia [Liu y cols., 2013] como de radioresistencia [Peitzsch y cols., 2013], incluso pueden evadir nuevas terapias inmunogénicas [Chang y cols., 2016; Radvanyi, 2013; Yoshida y Saya, 2016; Zhao, 2016]. Además, se cree que puede ser una causa central en la heterogeneidad tumoral, una característica clave de la resistencia terapéutica [Yoshida y Saya, 2016]. Los principales mecanismos de resistencia asociados a esta población son:

-Resistencia a la apoptosis mediante proteínas como la survivina [Zheng y cols., 2012]. La survivina es una proteína inhibidora de la apoptosis que desarrolla un papel importante en la resistencia a la quimioterapia.

-Resistencia múltiple a fármacos (MDR, del inglés *multidrug resistance*). Se produce una expresión elevada de la familia de transportadores ABC entre los que se encuentran la glicoproteína-P (P-gp, del inglés *P-glycoprotein*) [Cojoc y cols., 2015], BCRP, MRP1 y MRP3 [Pawłowski y cols., 2013] entre otras. Éstas actúan expulsando el fármaco contra gradiente hacia el medio extracelular, mediante el gasto de ATP.

- Alteración de los procesos de reparación del ADN por enzimas como la MGMT (O6-metilguanina-DNA metiltransferasa) [Nyskohus y cols., 2013] o el sistema MMR [Haghighi y cols., 2014].

Por todo esto, el estudio de las CSC ha supuesto una nueva estrategia terapéutica frente al cáncer.

## **1.2. NANOESTRATEGIAS PARA EL TRANSPORTE SELECTIVO DE FÁRMACOS**

La quimioterapia convencional implica la distribución de manera no específica de los fármacos en el organismo, afectando tanto a células cancerosas como a células sanas. Esto limita la dosis de fármaco que llega al tumor produciendo niveles de toxicidad excesivos. Además, la heterogeneidad de las células de la masa cancerosa (desarrollan diferentes características bioquímicas, morfológicas e inmunológicas, tras numerosas mutaciones) se traduce en diferencias de sensibilidad a la acción de los agentes antineoplásicos, desde una sensibilidad elevada hasta una resistencia total. Las células malignas presentan diferencias en cuanto a la fase del ciclo celular en que se encuentran; mientras unas están en fase de elevado crecimiento o proliferación otras pueden estar en fase de reposo. Generalmente muchas neoplasias se diagnostican en etapas de crecimiento desacelerado, asociado 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 en división rápida, podría decirse que, en principio, gran parte de esta población celular puede ser resistente. Bajo estas circunstancias, una reducción inicial del número de células, por ejemplo mediante métodos quirúrgicos o radioterapia, puede modificar el equilibrio intratumoral y estimular a las células malignas que se dividen lentamente para que lo hagan con más rapidez, convirtiéndose en 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 una quimioterapia,

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 la molécula quimioterápica disminuye ya que se van seleccionando las variantes resistentes.

Por todo esto, se puede deducir la dificultad de la masa tumoral para responder a un único fármaco por lo que a veces es necesario la acción conjunta de varios agentes farmacológicos, unas veces se hará al mismo tiempo y otras de manera sucesiva o en diferentes fases. La eficacia de la quimioterapia basada en un tratamiento plurifarmacológico será mayor cuanto mejor se cumplan los siguientes requisitos: *i*) los fármacos han de ser activos frente a más de uno de los tipos de células que forman la población tumoral; *ii*) han de actuar por mecanismos bioquímicos diferentes o en fases celulares distintas; *iii*) han de poseer toxicidad orgánica diferente o manifestarse con una secuencia temporal distinta y, *iv*) el efecto óptimo se alcanzará cuando sus actividades respectivas se sumen, si bien es preferible que presenten sinergia o potenciación.

Aún así, uno de los principales inconvenientes de la terapia convencional es que el fármaco no llega a concentraciones adecuadas al intersticio tumoral. Por ello, para solucionar éste y otros problemas, se han desarrollado nanosistemas transportadores de fármacos hasta la masa tumoral [Reddy, 2005; Arias, 2008, 2011]. La vehiculización de fármacos va a permitir: a) que los fármacos lleguen a concentraciones adecuadas a las células cancerosas; b) un aumento del tiempo de exposición fármaco-célula diana; c) una disminución de la toxicidad de células sanas; d) mejorar el perfil farmacocinético del fármaco; y e) protección de las moléculas tanto *in vitro* (condiciones de almacenamiento) como *in vivo* (frente a fenómenos de degradación) [Arias, 2008; Davis y cols., 2008; Kumar y cols., 2015; Mattos y cols., 2016].

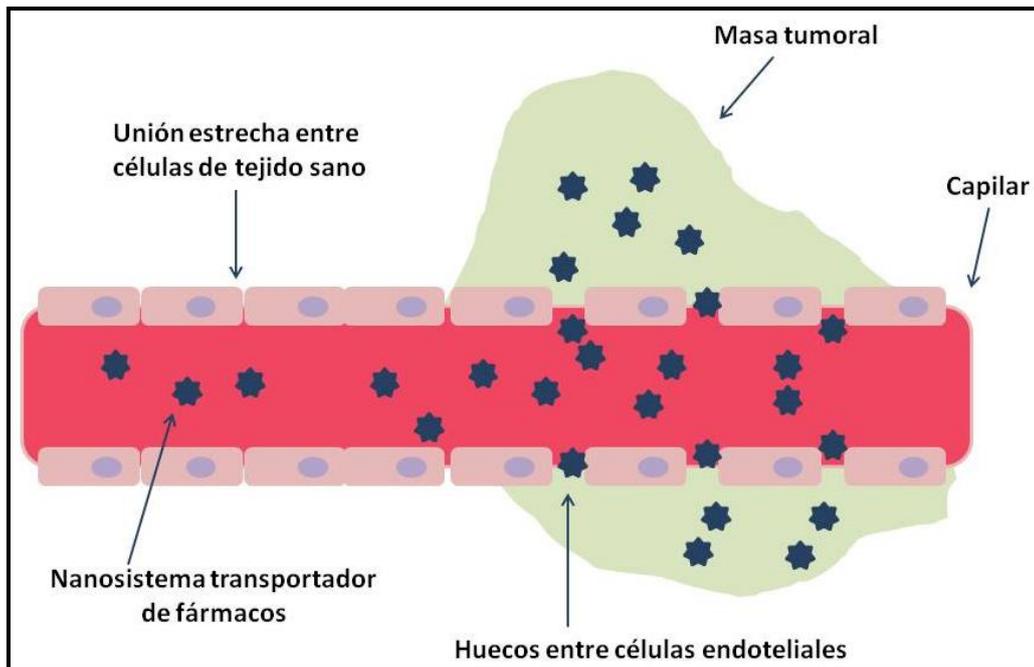
Estos sistemas transportadores de fármacos son de tipo coloidal y su naturaleza química puede ser orgánica o inorgánica. Además, deben ser biodegradables y biocompatibles y presentar una buena capacidad de vehiculización de fármacos [Reddy, 2005; Couvreur y Vauthier, 2006; Arias 2008, 2011]. Dentro de los sistemas coloidales destacan los nanocompuestos de tipo polimérico [Arias y cols., 2007b, 2010a, 2010b, 2010c; Sáez-Fernández y cols., 2009; Pérez- Artacho y cols., 2012; Pretel

y cols., 2017] y de tipo lipídico [Arias y cols., 2011a; Clares y cols., 2013; Muñoz de Escalona y cols., 2016; Lorente y cols., 2018a, Lorente y cols., 2018b). Sin embargo, recientes investigaciones han probado que esta simple asociación coloide - agente antitumoral no siempre resulta suficiente para lograr el mejor tratamiento posible, ya que el nanosistema es secuestrado por el sistema retículoendotelial (SRE) y jamás llegaría a entrar en contacto con la célula cancerosa a no ser que el tumor se encuentre en el SRE [Dufort y cols., 2012; Maeda, 2012; Yu y Zheng, 2015]. De ahí que se desarrollen diferentes tipos de estrategias de transporte de fármacos para llegar a su lugar de acción en la concentración adecuada y puedan ejercer su acción farmacológica.

### **1.2.1 TRANSPORTE PASIVO**

Las estrategias de transporte pasivo de fármacos están basadas en el efecto de permeabilidad y retención aumentada (*EPR*, del inglés *enhanced permeability and retention effect*) [Matsumura y Maeda, 1986] (Figura 1.3). Este fenómeno se puede describir en la mayoría de los tumores sólidos, aunque hay que tener en cuenta la heterogeneidad de cada uno. Cuando se produce una tumoración intervienen mediadores de la inflamación como son bradiquininas, óxido nítrico (NO) y prostaglandinas produciendo una nueva vasculatura (angiogénesis) en la zona tumoral para satisfacer la demanda de oxígeno y nutrientes de las células cancerosas. Esta nueva vasculatura presenta una arquitectura irregular con fenestraciones de entre 100 y 600 nm las cuáles determinan una mayor permeabilidad de macromoléculas que circulan en sangre al intersticio tumoral en comparación con los vasos que irrigan tejidos sanos. Además, en la zona tumoral existe un drenaje linfático pobre y afuncional, lo que origina una mayor acumulación de macromoléculas en el espacio intersticial. El paso de las moléculas desde la circulación al interior del tumor se puede producir por convección o difusión pasiva. La convección se refiere al movimiento de las moléculas dentro de los fluidos y debe ser el modo de transporte predominante para la mayoría de las moléculas grandes a través de poros grandes cuando la tasa de filtración neta es cero. Por el contrario, los compuestos de bajo peso molecular, como

el oxígeno, se transportan principalmente por difusión, definido como un proceso de transporte de moléculas a través de la membrana celular, de acuerdo con un gradiente de concentración y sin la contribución de la energía celular. Sin embargo, la convección a través del intersticio tumoral es pobre debido a la hipertensión intersticial, dejando a la difusión como el principal modo de transporte de fármacos [Danhier y cols., 2010].



**Figura 1.3.** Efecto de permeabilidad y retención aumentada (*EPR*). El nanosistema transportador de fármacos sólo abandona la circulación sistémica cuando alcanza la microvasculatura alterada que rodea el tumor.

El EPR sirve, por tanto, como estrategia para que las nanopartículas se acumulen en el interior del tumor y liberen el fármaco para que pueda ejercer su acción [Torchilin 2011; Duncan y cols., 2014]. De esta manera, se pueden alcanzar concentraciones del nanosistema hasta 10 veces más altas en el tumor en comparación con el tejido sano [Misra y cols., 2010]. No obstante, para conseguir un efecto EPR eficaz los nanotransportadores deben cumplir una serie de requisitos para que éstas no sean atrapadas por el SRE y puedan llegar hasta el tumor [Maeda y cols., 2016]:

i) Deben de presentar una geometría adecuada, forma esférica y tamaño lo suficientemente grande para no ser extravasadas a tejidos sanos y lo suficientemente pequeñas para retrasar el reconocimiento por SER. El tamaño ideal del nanotransportador debe estar entre 10 y 100 nm. De hecho, para una extravasación eficiente de las fenestraciones en la vasculatura los nanotransportadores deben ser mucho menores que 400 nm. Por otro lado, para evitar la filtración por los riñones, los nanotransportadores deben ser más grandes que 10 nm; y para evitar una captura específica por el hígado, los nanotransportadores deben ser más pequeños que 100 nm.

ii) Deben de tener una carga superficial nula o casi nula para evitar el aclaramiento renal.

iii) Deben ser hidrófilas para evitar la opsonización y posterior retirada de la circulación por los macrófagos. Para conseguir una superficie hidrófila de las nanopartículas se suelen utilizar polímeros o copolímeros hidrófilos como los poloxámeros, las poloxaminas, los polisacáridos o, muy habitualmente, los polietilénóxidos (por ejemplo, el polietilenglicol, PEG). Estas modificaciones superficiales reducen significativamente el carácter hidrófobo del sistema coloidal y además les dota de una protección estérica frente a la interacción con opsoninas [Venkatasubbu y cols., 2013; Rabanel y cols., 2014; Fang y cols., 2017; Dolor y cols., 2018], que retrasará la identificación por el SRE y posterior endocitosis por macrófagos y retirada de la circulación sanguínea.

Solo así aumentará el tiempo de vida media de las nanopartículas y podrán alcanzar el tejido diana (una zona inflamada, el lugar de una infección o una masa tumoral).

Hoy en día, el efecto EPR es un fenómeno bien reconocido y ha sido validado en varios modelos de tumores sólidos y pacientes con cáncer [Fang y cols., 2011; Torchilin, 2011; Duncan, 2014 y Maeda, 2015]. Sin embargo, el efecto EPR depende de la neovasculatura tumoral y del flujo sanguíneo. Los tumores en los que se ha

producido una rica angiogénesis demuestran buenos efectos de EPR y por tanto, buena respuesta al tratamiento. Mientras que tumores con deficiente vasculatura tumoral presentan un menor flujo sanguíneo y por tanto una menor permeación de macromoléculas o nanosistemas y una consiguiente respuesta pobre al tratamiento. Por ejemplo, el cáncer de próstata, el cáncer de páncreas y el cáncer de hígado metastásico en humanos son hipovasculares [Islam y cols., 2018]. Por tanto, el efecto EPR puede variar según el tipo de tumor y el estado en el que se encuentre. Los vasos sanguíneos en el tumor no son estáticos sino dinámicos y de ahí la variación en el flujo sanguíneo. Para mejorar el EPR en los tumores y así mejorar la eficacia del tratamiento terapéutico se utilizan mediadores vasculares como óxido nítrico (NO), bradiquininas y monóxido de carbono (CO) entre otros [Wu y cols, 2001; Maeda, 2014; Islam y cols., 2018] para aumentar el flujo sanguíneo de la masa tumoral.

### **1.2.2. TRANSPORTE ACTIVO**

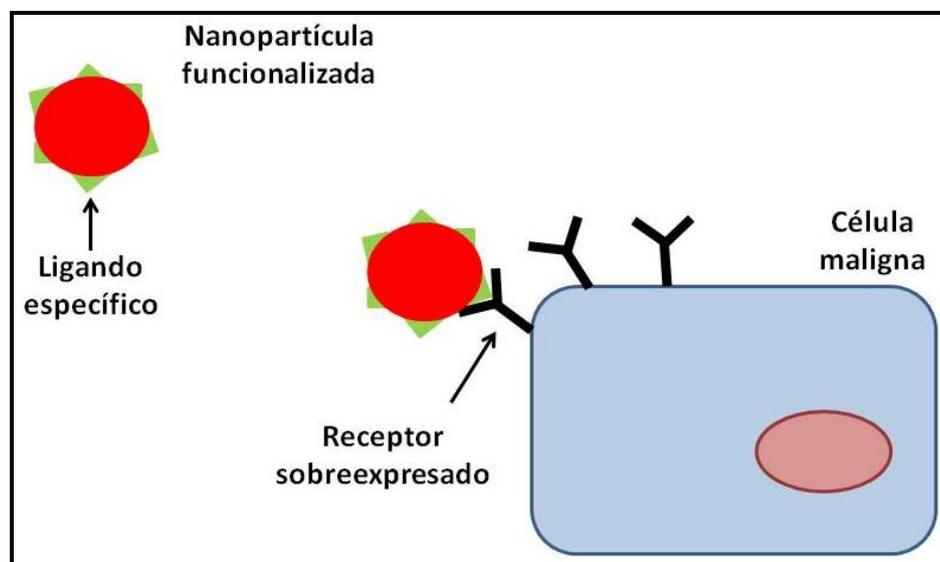
Las nanopartículas utilizadas en el transporte de fármacos pueden, en principio, alcanzar la masa tumoral de forma “pasiva” (*EPR effect*) pero no pueden ser captadas tal cuál por las células cancerosas. Por tanto, para asegurar un efecto farmacológico óptimo debe controlarse el destino biológico del coloide transportador de fármacos. Para conseguir que las nanopartículas lleguen a su lugar de acción y liberen la dosis de fármaco adecuada en las células tumorales se han desarrollado diferentes tipos de estrategias de transporte activo que incluso se pueden combinar con las estrategias de transporte pasivo [Arias, 2011]:

- incorporación sobre la nanopartícula de ligandos específicos de receptores localizados en la superficie de las células tumorales. Entre los diferentes tipos de ligandos investigados destacan los anticuerpos monoclonales, péptidos (principalmente integrinas), aptámeros, ácido fólico, folatos y transferrinas [Bazak y cols., 2015].

- diseño de nanopartículas capaces de responder a estímulos internos o propios de la región tumoral, o a estímulos externos aplicados en la zona diana como son reacciones redox, luz, ultrasonidos, cambios de pH, temperatura, gradientes de campos magnéticos, sistemas enzimáticos [Reddy y cols., 2012].

### 1.2.2.1. Estrategias basadas en interacciones ligando-receptor

Este tipo de estrategia implica la utilización de ligandos específicos en la superficie de la nanopartícula que reconozcan las moléculas o receptores sobreexpresados de las células diana [Shi y cols., 2011, Koshkaryev y cols., 2013]. De esta manera se producirá un aumento en la interacción entre la nanopartícula y las células tumorales en este caso y por tanto, se mejorará la internalización de fármacos sin alterar la biodistribución global [Byrne y cols., 2008; Arias, 2011; Reddy y cols., 2012; Xu y cols., 2013]. La unión específica del sistema coloidal a la célula tumoral, se logra mediante mecanismos de reconocimiento molecular (unión ligando-receptor o interacción antígeno-anticuerpo) (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Destino celular de nanopartículas funcionalizadas con ligandos específicos para receptores sobreexpresados en la célula maligna.

#### a) Anticuerpos monoclonales y sus fragmentos

Los anticuerpos o también llamados inmunoglobulinas (IgG) son una de las estrategias más utilizadas para vectorizar nanopartículas. Como todo IgG contienen dos regiones: un fragmento que reconoce específicamente a un antígeno (Fab) y un fragmento constante, fijador del complemento (Fc) (responsable del reconocimiento por los macrófagos y por el sistema inmunológico). El interés del uso de fracciones de anticuerpos proviene desde los años 80 y se han aprobado más de 30 tipos de anticuerpos monoclonales para su uso clínico incluyendo rituximab, trastuzumab, cetuximab y bevacizumab [Leserman y cols., 1980; Kamaly y cols., 2012]. La conjugación de anticuerpos monoclonales en la superficie de las nanopartículas combina su alta especificidad y afinidad con las propiedades únicas de las propias nanopartículas [Yu y cols., 2012]. Las primeras nanopartículas vectorizadas con anticuerpos fueron liposomas. Aunque estos sistemas mostraron una mayor captación celular *in vitro*, todavía se enfrentan a muchas limitaciones y desafíos, que en gran medida limitan su uso *in vivo*. Sus principales limitaciones son el gran peso molecular que presentan, el rápido aclaramiento plasmático debido al reconocimiento por el fragmento Fc, su sensibilidad relativa a factores ambientales (temperatura, concentración, enzimas...) y su baja resistencia a disolventes orgánicos [Bertrand y cols., 2014]. Esto crea desafíos técnicos a la hora de reproducir estas nanopartículas y elevados costes económicos que resulta en una producción industrial casi imposible actualmente.

Por ello, gran parte de la investigación biomédica actual se orienta a la búsqueda de antígenos específicos de membrana expresados en ciertos tipos de cáncer, así como en el desarrollo de derivados quiméricos humanizados para disminuir la inmunogenicidad y el desarrollo de nuevas formulaciones y nanosistemas que incorporen los anticuerpos con técnicas consistentes, reproducibles y escalables a nivel industrial. Entre los antígenos más investigados se encuentran el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER1), el receptor de transferrina (TfR) y el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) [Bazak y cols., 2015]. Aún así, algunas

nanopartículas dirigidas con anticuerpos han llegado a fases clínicas. Por ejemplo, liposomas funcionalizados con MCC-465 (un fragmento de anticuerpo) dieron resultados positivos en estudios preclínicos con una adecuada biodistribución y un eficiente suministro de doxorubicina en células cancerosas de estómago [Matusumura y cols., 2004]. Otro ejemplo de liposomas con un fragmento de anticuerpo de cadena única es SGT-53, que se dirige a receptores de transferrina en la superficie de las células tumorales. Su administración conllevó a una evidente inhibición del crecimiento tumoral en múltiples cánceres (incluyendo cabeza y cuello, próstata y mama) [Senzer y cols., 2013].

#### b) Péptidos

Las integrinas son una familia de receptores de adhesión celular que se unen a la matriz extracelular y a los ligandos de la superficie de la célula. Son proteínas que desempeñan un papel en el desarrollo del cáncer, concretamente en la angiogénesis y en la metástasis. Por ejemplo, se sabe que la integrina  $\alpha(v)\beta_3$  desempeña un papel clave en la formación de nuevos vasos en tejidos con células tumorales. Al ser receptores para una variedad de proteínas de la matriz extracelular que contienen la secuencia arginina-glicina-aspártico (RGD), estas integrinas median la migración de las células a otros tejidos, su crecimiento y su supervivencia [Shan y cols., 2015]. Este proceso natural del cáncer puede utilizarse para vehicular fármacos mediante nanosistemas a las células tumorales, ya que la expresión de un péptido sintético con la secuencia RGD puede dirigir el nanosistema a la célula tumoral, e inhibir así su crecimiento y proliferación [Danhier y cols., 2012]. Por ejemplo, un estudio reciente en líneas celulares de cáncer de pulmón en el que se han desarrollado nanopartículas de quitosán y de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) funcionalizadas con el péptido RGD las cuales vehiculizan paclitaxel, demuestra una administración selectiva de dicho fármaco y una inducción de la apoptosis celular [Babu y cols., 2017].

El diseño de nanoplataformas modificadas apropiadamente con péptidos también encuentra aplicación en la terapia génica contra el cáncer. A modo de ejemplo, se han

diseñado nanopartículas de quitosan marcadas con la secuencia RGD transportadoras de siRNA las cuales produjeron un aumento intratumoral selectivo en cáncer de ovario y el silenciamiento de genes que producen el crecimiento múltiple de las células tumorales lo que dio lugar a una inhibición significativa del crecimiento del tumor [Han y cols., 2010].

#### c) Aptámeros

Los aptámeros son macromoléculas que contienen una cadena única de ARN o ADN capaces de reconocer de forma específica, estable y con alta afinidad varios tipos de moléculas diana como proteínas de membrana [Ni y cols., 2011]. Presentan numerosas ventajas: fácil aislamiento químico, una afinidad de unión selectiva, un tamaño pequeño, ausencia de inmunogenicidad y pueden modificarse superficialmente mediante grupos funcionales para favorecer la conjugación con nanosistemas [Zhang y cols., 2011]. Por ejemplo, se ha comprobado en estudios de toxicidad *in vitro* de células de cáncer de próstata la superioridad en la eficacia de la combinación de cisplatino y docetaxel vehiculizados en nanopartículas poliméricas modificadas superficialmente por el aptámero A10 sobre nanopartículas con un solo fármaco o nanopartículas no dirigidas [Kolishetii y cols., 2010]. También se han desarrollado nanopartículas teranósticas compuestas de óxido de hierro superparamagnético vehiculizadoras de doxorrubicina y dirigidas por el aptámero RNA específico para PSMA capaces de detectar el tumor *in vivo* mediante resonancia magnética de imagen y liberar la dosis de fármaco en el tejido tumoral [Yu y cols., 2011].

#### d) Ácido fólico y sus derivados

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble que interviene en la replicación del ADN y en muchos tipos de cáncer sus receptores se encuentran sobreexpresados [Zhao y cols., 2008; Assaraf y cols., 2014] cómo en cáncer colorrectal [D'Angelica y cols.,

2011] y cáncer de mama [Zhang y cols., 2014]. Sus propiedades inherentes le proporcionan grandes ventajas para ser utilizados como ligandos en la orientación de nanopartículas hacia la masa tumoral: *i)* es una vitamina estable, y relativamente barata lo que facilita su síntesis [Talekar y cols., 2011]; su bajo peso molecular le confiere una simple conjugación química y no inmunogenicidad [Byrne y cols., 2008; Yu y cols., 2010]; presenta alta afinidad por su receptor por lo que hay una rápida internalización en las células tumorales [Talekar y cols., 2011]; tras el reconocimiento de su receptor libera la carga mediante endocitosis a diferencia de otros ligandos que necesitan el lisosoma para su destrucción [Byrne y cols., 2008]. Finalmente, la expresión de los receptores de ácido fólico se produce de forma consistente en tumores malignos muy agresivos y de bajo pronóstico y también en células leucémicas permitiendo a las nanopartículas llegar a ellos a través de la circulación, eliminando así la focalización no específica y minimizando la toxicidad [Elnakat y cols., 2004; Hilgenbrink y cols., 2005]. Por todo esto, la funcionalización superficial de nanopartículas con folatos es muy exitosa y queda evidente por la gran cantidad de estudios desarrollados en los que aumenta la eficacia del fármaco transportado y disminuye la toxicidad asociada a éste. Por ejemplo, liposomas transportadores de 5-FU funcionalizados con ácido fólico en células de cáncer colorrectal muestran una mayor actividad antitumoral *in vitro* que los liposomas sin funcionalizar, y una mayor actividad que el fármaco libre en estudios *in vivo* [Handali y cols., 2018]. También, se han desarrollado liposomas cargados de doxorubicina funcionalizados con ácido fólico los cuáles han demostrado mayor eficacia terapéutica *in vivo* en modelo murino de tumor ascítico y parece ser una herramienta prometedora en la vehiculización intracavitaria de medicamentos *in vivo* [Shmeeda y cols., 2006; Gabizon y cols., 2010]. Otro ejemplo reciente muestra que nanopartículas de PLGA y PEG funcionalizadas con ácido fólico presentan una citotoxicidad superior sobre las no funcionalizadas en líneas celulares de cáncer de colon HT-27 y de mama MCF-7 donde se encuentra sobreexpresado el receptor de folato [El-Hammadi y cols., 2017]. Otros tipos de nanopartículas funcionalizadas con éste o sus derivados son nanopartículas de oro como agentes de diagnóstico tumoral [Prasad y cols., 2018] o nanopartículas poliméricas cargadas de paclitaxel [Gong y cols., 2018] entre otros muchos tipos. De

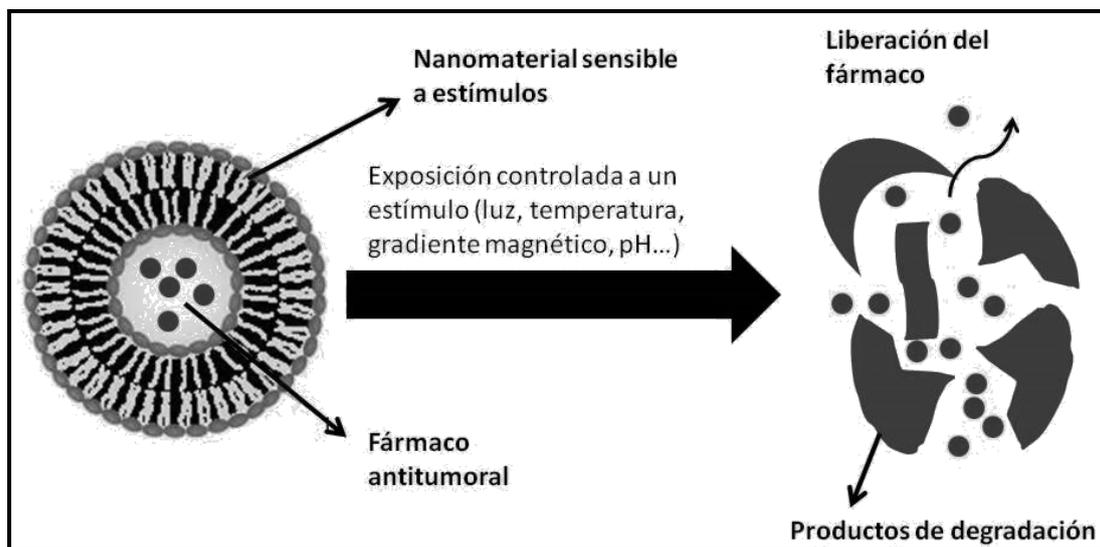
manera similar, se han diseñado nanopartículas conjugadas de quitosan y de poli(etilenimina) para la transfección de genes en células tumorales [Lai y cols., 2015].

#### e) Transferrina

La transferrina es una glicoproteína sérica que transporta el hierro a través del torrente sanguíneo hacia las células, y mediante la unión a los receptores de transferrina de la superficie celular produce la internalización de éste mediante endocitosis. La regulación positiva de los receptores de la transferrina en células malignas metastásicas y resistentes a fármacos (que puede alcanzar hasta 100 veces más que en células normales), el estado extracelular de la transferrina en el cuerpo y su internalización en las células hace de la transferrina o agentes imitadores de la transferrina adecuados para la administración de terapias contra el cáncer [Byrne y cols., 2008; Danhier y cols., 2010]. Por ejemplo, se han llevado a cabo muchos y variados estudios realizados con diferentes tipos de nanotransportadores liposomales para la administración intracelular de doxorubicina usando transferrina como ligando [Sriraman y cols., 2016]. Estos estudios han demostrado que el fármaco llega de forma eficiente a diferentes células neoplásicas que expresan el receptor de transferrina y se internalizan vía endocítica evitando así la salida del fármaco de la célula mediante la glicoproteína P [Fonseca y cols., 2005]. También existen otros ejemplos como nanopartículas magnéticas de PLGA vehiculizadoras de paclitaxel que obtienen altos efectos citotóxicos y mayor reconocimiento celular sobre células de cáncer de mama MCF-7 y glioma U-87 al estar funcionalizadas con transferrina a diferencia de no llevar ligando [Cui y cols., 2017]. Este tipo de funcionalización superficial de nanoplataformas también permite la mejora de la fototerapia antitumoral [Derycke y cols., 2004] y el diagnóstico del cáncer mediante resonancia magnética de imagen [Jiang y cols., 2012].

### 1.2.2.1. Estrategias basadas en el diseño de coloides sensibles a estímulos de diferente naturaleza

El microentorno tumoral se caracteriza por cambios anormales en las condiciones fisiológicas que incluyen cambios en el pH, la temperatura, los niveles de enzimas expresadas y la concentración de oxígeno [Koo y cols., 2011; Yokoyama 2014]. Estas características han sido ampliamente explotadas para desarrollar coloides transportadores de fármacos sensibles a estímulos, de manera que se desintegran y liberan el fármaco en respuesta a los estímulos en el sitio de la enfermedad [Pärnaste y cols., 2017] (Figura 1.5). Además, la liberación de agentes activos desde la nanopartícula puede manipularse externamente desde el exterior del organismo utilizando dispositivos que generan luz, ultrasonidos o incluso un campo magnético [Liu y cols., 2017].



**Figura 1.5.** Liberación de fármaco antitumoral debido a la exposición controlada a un estímulo. La degradación de la partícula posibilita la entrega de fármaco a la masa tumoral.

Generalmente este tipo de nanopartículas son de tipo polimérico o incluso lipídico, y su degradación a veces es reversible una vez que cesa el estímulo. Los estímulos pueden ser agrupados en tres categorías: físicos (luz, gradientes de campo magnético,

ultrasonidos, temperatura), químicos (pH, fuerza iónica) y biológicos (enzimas) [Delcea y cols., 2011]. Al mismo tiempo pueden clasificarse según su origen en: endógenos (por ejemplo, cambios de pH de tipo patológico, cambios de temperatura, interacción con sistemas enzimáticos, etc.), o exógenos (por ejemplo, gradientes de campo magnético, campo eléctrico, luz, ultrasonidos, etc.). El objetivo es que tras la administración sistémica de las nanopartículas se pueda desencadenar la liberación del fármaco con uno de esos estímulos (Figura 4) [Karimi y cols., 2016]. Así se consigue reducir la toxicidad y los efectos adversos debidos a la distribución inespecífica del principio activo y se aumenta la eficacia terapéutica [Liu y cols., 2016]. Adicionalmente, con esta estrategia puede conseguirse la modulación de la duración e intensidad del efecto farmacológico [Arias 2011].

#### a) pH

Esta estrategia consiste en el diseño de nanopartículas capaces de diferenciar cambios de pH sutiles en tejidos enfermos como tejidos inflamados, isquémicos o tumorales, e incluso en compartimentos intracelulares como los endosomas y los lisosomas [Liu y cols., 2016]. Existen dos estrategias para conseguir nanopartículas que respondan a variaciones del pH: utilizar polímeros o lípidos con grupos ionizables que experimenten cambios en la conformación o en la solubilidad y que estos materiales tengan enlaces sensibles a pH ácido cuya escisión permita la liberación del fármaco anclado al mismo o la modificación de la carga del polímero [Mura y cols., 2013]. En cualquier caso, el factor clave es la selección de un material con un pH crítico que coincida con el rango de pH deseado para su aplicación [Tayo, 2017]. Generalmente, los materiales poliméricos presentan grupos débilmente ácidos (por ejemplo, ácidos carboxílicos y sulfónicos) o básicos (por ejemplo, aminas, imidazol y piridina) [Manchun y cols., 2012; Pang y cols., 2016]. Estos grupos son capaces de aceptar o donar iones  $H^+$  en respuesta a los cambios de pH del microambiente. Por tanto, la protonación/desprotonación de estos grupos cambia la extensión de la ionización y la carga en las cadenas de polímero [Liu y cols., 2017]. Como consecuencia de estos cambios en la carga electrostática, la alteración de las cadenas poliméricas conduce a

la interrupción del volumen hidrodinámico del sistema y su conformación. Cuando se incrementa la carga en las cadenas se genera una repulsión electrostática entre ellas, lo que hace que la conformación del sistema cambie de un colapso a un estado expandido. Por otro lado, una disminución en la carga neta de las cadenas resultará en su transición de del estado expandido a la configuración colapsada.

En el caso del cáncer, se diseñan nanopartículas que utilizan la ligera diferencia en el pH entre los tejidos sanos (pH= 7.4) y el medio extracelular de los tumores sólidos (pH= 6.5-7.2) para desencadenar la liberación del fármaco [Mura y cols., 2013]. El medio ácido tumoral se puede explicar con el denominado efecto Warburg. Las células cancerosas producen energía principalmente por un proceso de glicolisis anaeróbica seguida de fermentación láctica en lugar de utilizar la respiración celular aeróbica. Por eso, se producen metabolitos ácidos que se acumulan en el intersticio de las células tumorales. Esto se debe a que los tumores proliferan rápidamente, el flujo sanguíneo está disminuido y hay un rápido déficit de nutrientes y oxígeno [Karimi y cols., 2016]. El pH significativamente más bajo en los compartimentos subcelulares (incluyendo los endosomas) también se puede utilizar como una ruta para administrar fármacos contra el cáncer a través de nanopartículas endocitadas [Kopansky y cols., 2011]. El pH disminuye de 7.4 a aproximadamente 5 ó 6 en endosomas y aproximadamente 4 ó 5 en los lisosomas [Taghizadeh y cols., 2015]. Para ello se utilizan polímeros con enlaces que se escinden en medio ácido como hidrazonas [Lu y cols., 2011]. En el caso de los liposomas, están constituidos por derivados de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) que pasan de una fase lamelar, donde las moléculas ambifílicas están ordenadas en capas, a una fase hexagonal fusogénica a pH ácido, donde se agregan las moléculas ambifílicas y se libera el fármaco [Mura y cols., 2013]. La conjugación de DOPE con polímeros de bajo peso molecular como polietilenimina (PEI) mejora significativamente la administración de genes y ARNip (ARN pequeño de interferencia) mediante una combinación de propiedades de fusogenicidad y tamponamiento [Sawant y cols., 2012]. Además, la combinación de estos con PEG mejora la estabilidad de los liposomas termosensibles, facilita la interacción con la membrana endosomal [Auguste y cols., 2008] y aumenta el tiempo de circulación de los liposomas *in vivo* [Johnsson y Edwards, 2001]. Alternativamente, la sensibilidad de los liposomas al pH se

puede conferir mediante el uso de cadenas poliméricas ancladas en ellos, las cuales se someten a transición de fases en ambiente ácido, lo que provoca la desestabilización de la membrana lipídica y la liberación del fármaco [Momekova y cols., 2017].

#### b) Temperatura

Los nanosistemas elaborados con materiales termosensibles se caracterizan por sufrir un proceso de degradación cuando aumenta la temperatura. Esta estrategia ha sido ampliamente estudiada en oncología. La termorrespuesta generalmente se rige por un cambio brusco no lineal en las propiedades de al menos un componente del material nanotransportador cuando aumenta la temperatura. Una respuesta tan aguda desencadena la destrucción del coloide y consiguiente liberación del fármaco en su lugar de acción. Los nanotransportadores termosensibles deben ser estables y retener su carga a la temperatura corporal (37 °C) y administrar rápidamente el medicamento dentro de un tumor en torno a un intervalo de 39-42 °C, intervalo de temperatura que es característico de la masa tumoral [Tagami y cols., 2012]. En cuanto al estímulo térmico, éste también puede generarse externamente con un dispositivo adecuado [Li y cols., 2013]. En este caso, el aumento en la temperatura produce un aumento en el tamaño de poro en el endotelio de la microvasculatura que irriga el tumor (de  $\approx$ 7-20 nm a más de 400 nm) y como consecuencia una mayor permeabilidad de la vasculatura del tejido tumoral a las nanopartículas y mejora de la liberación del fármaco en el tumor [May y Li, 2013]. Además, el propio calentamiento de la región tumoral mediante métodos externos ha demostrado cierta toxicidad *per se* sobre las células cancerosas [Wust y cols., 2006].

Los coloides más sensibles a la temperatura son generalmente liposomas y micelas poliméricas o nanopartículas (generalmente poli (N-isopropilacrilamida), PNIPAM) que exhiben una baja temperatura crítica de disolución. Para los liposomas, la termorrespuesta generalmente surge de la temperatura de transición de fase de los lípidos constituyentes ( $\approx$ 39°C) y las variaciones conformacionales asociadas a las bicapas lipídicas [Mura y cols., 2013]. El lípido más empleado es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) ( $T_c \approx$ 41°C, temperatura de fase de transición). Aunque

los liposomas DPPC puros pueden aumentar la liberación del fármaco, la cantidad y la velocidad de liberación son relativamente bajas. Por lo que se propuso agregar otros fosfolípidos (principalmente, DSPC y HSPC) a DPPC. Esto tendría un impacto positivo en la cantidad y la velocidad de liberación del fármaco. Sin embargo, se produce un aumento en la  $T_c$  de los liposomas compuestos de DPPC/DSPC (43-45°C) que permite desencadenar la liberación de fármacos, pero este rango puede hacer que el tejido normal que rodea el tumor corra un riesgo de necrosis [Gaber y cols., 1995]. Por lo tanto, para mantener que el calentamiento suave (39-42 °C) pueda promover la liberación de fármacos se propuso como componentes de éste tipo de liposomas la incorporación de lisofosfolípidos en fase gel [Winter y cols., 2011]. Se incorporó un 10% en moles de lisolípido monopalmitoil fosfocolina (MPPS) en los liposomas termosensibles convencionales PEGilados compuestos de DPPC reduciéndose la  $T_c$  de 43 °C a 39-40 °C y mejoró la liberación de fármacos (aproximadamente el 50% de los medicamentos se liberarán a 40 °C durante 20 segundos). ThermoDox® es un liposoma termosensible que contiene lisofosfolípidos y vehiculiza doxorubicina. Está desarrollado por la compañía Celsion. Actualmente, está en evaluación de ensayos clínicos: en fase III para el cáncer de hígado primario y en fase II para el cáncer de mama recurrente.

Otra estrategia muy interesante para aumentar la termosensibilidad de los liposomas es la introducción de polímeros termosensibles en su estructura, por ejemplo, la DNIPAM o el PNIPAM-co-PAA (poli(*N*-isopropilacrilamida-co-ácido propilacrílico)) [Chountoules y cols., 2017].

### c) Sistemas enzimáticos

Se pueden desarrollar nanotransportadores que usen las enzimas como estímulo para liberar el fármaco. Ciertas patologías se asocian con la sobreexpresión de enzimas como las proteasas, relacionadas con la invasión tumoral y enfermedades cardiovasculares; las fosfolipasas, implicadas en muchos tipos de cáncer, trombosis e infecciones; y las oxidorreductasas, con un papel fundamental en medios oxidativos de

enfermedades como la diabetes o el cáncer. Existen estudios recientes en los que se utilizaron secuencias peptídicas cortas, escindibles por las metaloproteinasas de la matriz, como enlazadores entre las cadenas de PEG de superficie y los liposomas funcionalizados con péptidos de penetración celular [Zhu y cols., 2012]. Usando este enfoque, la administración sistémica de nanopartículas cargadas con ARNsi dió como resultado una actividad de silenciamiento génico de casi el 70% en ratones portadores de tumores [Hatakeyama y cols., 2011]. De manera similar, los recubrimientos de polímeros sensibles a la proteasa o los lipopéptidos se han diseñado para lograr la liberación activada de nanopartículas porosas de sílice [Singh y cols., 2011] o liposomas [Banerjee y cols., 2009].

También es posible administrar medicamentos a compartimentos intracelulares mediante el uso de enzimas. Por ejemplo, nanopartículas de sílice mesoporosas funcionalizadas con derivados de polisacáridos permitieron la administración específica de doxorubicina después de la escisión mediada por enzimas lisosómicas de los enlaces glucósidos y la reducción de la longitud de la cadena de polisacáridos [Bernardos y cols., 2010]. De manera similar, otros estudios muestran como la enzima lisosomal catepsina B, sobreexpresada en varios tumores malignos, permitió la liberación de la carga mediante la rápida degradación enzimática de los polimerosomas [Lee y cols., 2011]. La capacidad de respuesta de la enzima se puede extender a los tratamientos de infección bacteriana. Por ejemplo, la liberación a demanda de antibióticos, lograda con nanogeles sensibles a la lipasa liberadores de vancomicina [Xiong y cols., 2012] inhibió significativamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y también fue eficaz para matar bacterias intracelulares. Estos ejemplos representativos resaltan el potencial de la administración de fármacos activada por enzimas. Sin embargo, todavía es necesario trabajar para obtener información precisa de los niveles de enzimas en el sitio deseado para controlar de forma precisa la captación celular y para demostrar que la liberación *in vivo* del fármaco está correlacionada con la actividad enzimática.

#### d) Reacciones REDOX

En el organismo se producen gran cantidad de potenciales redox. El medio intracelular es más reductor que el medio extracelular y las áreas con tejido dañado o tumores son más oxidantes que los tejidos sanos [Philipps y cols., 2014; Lin y cols., 2016]. Los enlaces disulfuro, propensos a ser escindidos por el glutatión (GSH), pueden usarse para conseguir sensibilidad redox. La liberación citosólica de los fármacos puede ser activada por las diferentes concentraciones de GSH que se encuentran en los compartimentos extracelular ( $\approx 2^{-10}$   $\mu\text{M}$ ) e intracelular ( $\approx 2^{-10}$   $\mu\text{M}$ ), y en los tejidos tumorales en comparación con los sanos (en los tejidos tumorales la concentración de GSH es mayor) [Mura y cols., 2013]. Esto se ha logrado en micelas transportadoras de paclitaxel [Li y cols., 2012].

Se han desarrollado nanocápsulas cargadas con la proteína caspasa-3 (CP-3) que inducen apoptosis en células cancerígenas humanas. El núcleo está constituido por la molécula bioactiva, la CP-3, rodeada por cadenas del monómero con carga positiva N-(3-aminopropil) metacrilamida y de acrilamida entrecruzadas con N-N'-bis(acriloil)cistamina, que será el que presente los enlaces disulfuro (S-S). Las nanocápsulas, gracias a su carga positiva, son internalizadas por las células cancerígenas y, como la concentración de GSH es muy alta en el citosol, los enlaces disulfuro se reducen a grupos tioles provocando la liberación de la CP-3 situada en el núcleo de la nanocápsula. Así se induce la apoptosis de las células cancerígenas [Zhao y cols., 2011]. Se han utilizado los enlaces disulfuro en micelas, en liposomas, en dendrímeros y en las compuertas de nanopartículas de sílice mesoporosa [Mura y cols., 2013].

Por otro lado, la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) es importante en procesos patológicos por el estrés oxidativo. Los altos niveles de ROS son característicos de muchos tipos de cáncer, de procesos inflamatorios y de zonas isquémicas tras infartos o ictus [Chen y cols., 2016]. Por ejemplo, se han desarrollado nanoesferas constituidas por un poliéster borónico que, en medios con ROS, como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se degradan. En medio oxidante, se induce la transformación del grupo arilo del éster borónico en un fenol rompiendo el poliéster y liberando el fármaco incorporado

[de Gracia Lux y cols., 2012]. También hay nanotransportadores poliméricos con grupos tiocetal con el mismo objetivo [Chen y cols., 2016].

e) Luz

Debido a su naturaleza no invasiva, seguridad, bajo coste y fácil producción; y a la posibilidad del control temporal de la liberación del fármaco, se han diseñado una gran variedad de nanosistemas sensibles a la luz de una longitud de onda específica: ultravioleta, visible o del infrarrojo cercano. La forma de conseguir un nanotransportador sensible a la luz es incorporando grupos químicos fotosensibles con enlaces covalentes. Al aplicar la luz se producen cambios conformacionales que desencadenan la liberación del fármaco. Algunos nanotransportadores son de un solo uso porque la luz produce un cambio estructural irreversible con el objetivo de liberar toda la carga de fármaco; otros consiguen una liberación pulsátil porque se aplican ciclos de luz/oscuridad que producen cambios estructurales reversibles [Crucho, 2014]. El mayor inconveniente que presenta este estímulo en los sistemas de liberación de fármacos es su baja profundidad de penetración (de aproximadamente 10 mm). Esto se debe a la dispersión de la luz de la región ultravioleta-visible (300-700 nm) en los tejidos blandos. Por eso, son más prometedores los grupos fotosensibles que respondan a longitudes de onda mayores que corresponden al infrarrojo (700-1000 nm). Con esto se consigue una mayor profundidad de penetración en los tejidos, menor dispersión y daños tisulares mínimos [Yang y cols., 2009]. Por ejemplo, el grupo azobenceno y sus derivados sufren una fotoisomerización reversible de *trans* a *cis* cuando la radiación es ultravioleta (300-380 nm) y de *cis* a *trans* cuando es del espectro visible (400-700 nm). El cambio *trans-cis* está asociado a una transición hidrófobo-hidrófilo, por eso se ha utilizado como compuerta de nanopartículas de sílice mesoporosa [Yang y cols., 2012] y en micelas [Liu y cols., 2009]. También se ha probado el grupo orto-nitrobenzoil y sus derivados como enlace fotosensible en nanopartículas de oro para la unión directa de fármacos, en compuertas de nanopartículas de sílice mesoporosa y como enlace de red de polímeros en nanoesferas y dendrímeros. Por ejemplo, se ha diseñado un dendrímero que se une a

la doxorubicina mediante enlaces orto-nitrobenzoil. Cuando se aplica radiación ultravioleta del rango de 254 a 365 nm, se escinden estos enlaces y se libera el fármaco [Wang y cols., 2016].

Existen materiales, especialmente el oro y la plata, capaces de absorber radiación infrarroja para convertir la energía fotónica absorbida en calor. Con esta aplicación destacan las nanopartículas de oro. Cuando éstas se exponen a la luz, la oscilación del campo electromagnético de la luz induce una oscilación colectiva de los electrones libres (los electrones de banda) del oro por su alto valor de resonancia de superficie plasmónica (RSP). La oscilación de los electrones alrededor de la superficie de la partícula produce una separación de cargas con respecto a la red iónica, formando una oscilación dipolar a lo largo de la dirección del campo eléctrico de la luz. La amplitud de la oscilación alcanza un máximo a una frecuencia específica llamada RSP. Esta RSP puede coincidir con la frecuencia de la radiación infrarroja por lo que las nanopartículas absorben la luz incidente y la transforman en calor [Huang y El-Sayed, 2010]. Un ejemplo de nanotransportadores fototérmicos son las nanopartículas de oro unidas covalentemente a ácido arginina-glicina-aspártico (ligando selectivo para tumores) vehiculizadoras de doxorubicina. Al aplicar radiación infrarroja se produce calor que contribuye a la muerte de las células cancerosas junto con la doxorubicina por lo que la eficacia antitumoral aumenta [Tian y cols., 2016].

#### f) Ultrasonidos

El uso de ultrasonidos es atractivo por su naturaleza no invasiva, la ausencia de radiaciones ionizantes y la fácil regulación de la profundidad de penetración en el tejido por el ajuste en la frecuencia, los ciclos de trabajo y el tiempo de exposición. Los ultrasonidos se pueden usar como desencadenantes de la liberación de fármacos por sus efectos térmicos, mecánicos (cavitación) y fuerzas de radiación [Mura y cols., 2013]. Los efectos térmicos se deben a que las ondas de ultrasonidos se propagan por el cuerpo y se atenúan por el contacto con diferentes tejidos a través de los efectos de absorción, que producen un aumento de la temperatura de los tejidos, y dispersión. Para conseguir una hipertermia controlada, la frecuencia debe estar en el rango de

MHz porque en estos límites los efectos térmicos de los ultrasonidos son significativos y no lo son los efectos mecánicos [Rivera y cols., 2010]. Celsion Corporation está estudiando la combinación de los liposomas ThermoDox® con la aplicación de ultrasonidos para tratar el cáncer de hígado metastásico, metástasis óseas dolorosas y cáncer pancreático [Mura y cols., 2013]. Por otro lado, la cavitación es un efecto mecánico. Para que tenga lugar se necesitan los llamados “núcleos de cavitación” que son burbujas de gas encerradas en un sistema (lípido, capa polimérica). Las moléculas de fármaco pueden encapsularse en las burbujas, ser inyectadas a la vez que las burbujas, o ser encapsuladas o unidas covalentemente al lípido o al polímero [Boissenot y cols., 2016]. Hay nanopartículas como liposomas y micelas que encapsulan gases, como el perfluorocarbono, e incorporan fármacos, siendo los antitumorales los más comunes [Mura y cols., 2013; Boissenot y cols., 2016; Rapoport, 2018]. La cavitación se produce porque las ondas de ultrasonidos son una sucesión de picos de presión negativos, que constituyen la fase de depresión donde las burbujas crecen, y positivos, que dan lugar a la fase de compresión donde las burbujas se contraen. Las fuerzas de radiación abarcan una serie de mecanismos que no están totalmente descritos que no son térmicas ni cavitacionales. A altas presiones y frecuencias las ondas de ultrasonidos generan una fuerza unidireccional que da lugar a una fuerza translacional que empuja a las partículas a las paredes de los vasos sanguíneos. Esto se relaciona con una mayor retención del material en el tejido, por ejemplo, tumoral [Hayashi y cols., 2014]. De forma general, se puede decir que el nanosistema transportador llega a la región tumoral gracias al efecto de EPR característico de la masa tumoral que puede estar potenciado por la aplicación de ultrasonidos. Una vez localizado en esta zona, la captación del coloide por las células cancerosas se garantiza mediante la alteración con ultrasonidos de la permeabilidad de la membrana celular. Además, la nanopartícula también se degrada bajo la acción de éstos, liberando el principio activo [Husseini y Pitt, 2008].

#### g) Gradiente de campo magnético

Esta estrategia consiste en el desarrollo de nanopartículas magnéticas constituidas por núcleos de óxido de hierro superparamagnéticos, principalmente magnetita y maghemita, los cuáles responden a un gradiente de campo magnético aplicado para dirigir el fármaco a su lugar de acción [Reddy y cols., 2012]. Generalmente se desarrollan este tipo de nanopartículas de forma mixta debido a que los coloides magnéticos sin recubrimiento presentan una muy limitada capacidad de incorporación de principios activos en matriz, junto con una liberación de éstos excesivamente rápida [Arias, 2008; Durán y cols., 2008; Reddy y cols., 2012]. El núcleo magnético permitirá la acumulación del coloide en el lugar diana en respuesta a gradiente magnético externo aplicado. Mientras que el material de recubrimiento que puede ser de naturaleza inorgánica (sílice) u orgánica (carbono, polímeros o lípidos) mejorará la biodegradabilidad y biocompatibilidad de la nanoplataforma, y permitirá el transporte de los principios activos [Durán y cols., 2008; Reddy y cols., 2012]. Una de las limitaciones más importantes que obstaculizan la introducción definitiva de los coloides magnéticos en clínica es la pobre respuesta a gradientes magnéticos en zonas no tan superficiales del organismo (> 2 cm de profundidad), ya que la fuerza del campo magnético disminuye con la distancia. Para solventar este problema, se postula colocar estratégicamente implantes magnéticos (pequeños imanes) en el interior o en las proximidades del lugar diana mediante cirugía menor [Fernández-Pacheco y cols., 2007; Arias, 2011]. Diversos trabajos han permitido establecer que la utilización de implantes magnéticos combinados con un gradiente de campo magnético externo podría acrecentar aún más si cabe la acumulación de las nanoplataformas magnéticas en el lugar de acción del fármaco vehiculizado [Rosengart y cols., 2005; Fernández-Pacheco y cols., 2007; Chorny y cols., 2012; Janßen y cols., 2018]. Por último, y dentro de las estrategias de transporte de fármacos, también se pueden incorporar en la superficie de los este tipo nanopartículas ligandos específicos de receptores sobreexpresados en la superficie de la célula diana o en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el tejido y órgano diana [Arruebo y cols., 2007; Chorny y cols., 2012; Abedin y cols., 2018]. Una de las ventajas principales que posee el uso de este

tipo coloides está basada en las diferentes vías de respuesta ante el gradiente de campo magnético: además de dirigir el fármaco hacia el tejido diana pueden producir un aumento de temperatura en éste, incluso un mismo coloide puede responder al gradiente de éstas dos formas lo que refuerza la terapia. Además, pueden ser utilizados como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen y, por lo tanto, asociar diagnóstico y terapia dentro de un solo sistema [Yang y cols., 2011; Reddy y cols., 2012; Andrade y cols., 2015].

### **1.3. COLOIDES MAGNÉTICOS EN EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS**

En los últimos años, han sido importantes los avances en el desarrollo de nanopartículas magnéticas, en el estudio de su comportamiento y en la mejora de su aplicabilidad en áreas principalmente biomédicas. El preciso control sobre las condiciones de síntesis y la funcionalización de la superficie de este tipo de coloides es crucial, ya que gobierna sus propiedades fisicoquímicas, su estabilidad y su destino biológico. Para fines farmacéuticos y biomédicos, las nanoplataformas magnéticas deben poseer un tamaño muy pequeño (preferiblemente < 100 nm) junto con altos valores de magnetización. Además, deben combinar una alta susceptibilidad magnética y una pérdida de magnetización después de la retirada del gradiente de campo magnético. Finalmente, es necesario un adecuado revestimiento de su superficie (funcionalización superficial) con el propósito de garantizar su tolerancia y biocompatibilidad, así como su localización específica en el lugar de acción. Las propiedades fisicoquímicas y superficiales de estos sistemas magnéticos permiten su uso como sistemas de vehiculización de fármacos o genes (magnetofección), en hipertermia, agentes de contraste en resonancia magnética de imagen, en ingeniería tisular, en bioanálisis (separación magnética por afinidad de moléculas), en el tratamiento de aguas residuales y la inmovilización enzimática (Reddy y cols., 2012; Santhosh y cols., 2016). Endorem® y Lumirem® son los ejemplos del uso clínico de estos coloides como agentes de contraste (Couvreur y Vauthier, 2006).

A modo de resumen, las nanopartículas magnéticas deben cumplir los siguientes requisitos para poder ser utilizados en Biomedicina (Gupta y Gupta, 2005; Ito y cols., 2005; Durán y cols., 2008; Reddy y cols., 2012):

- Deben ser biocompatibles, no tóxicos, no inmunógenos y capaces de responder a un gradiente de campo magnético adecuado (hasta 8 Teslas).
- Su tamaño debe estar comprendido en un rango de 10 a 200 nm. Las partículas inferiores a 10 nm sufren una extensa extravasación a través de los capilares más finos, mientras que las de tamaño superior a 200 nm son fagocitadas por las células del SRE y eliminados de la circulación sistémica. Además coloides magnéticos con un tamaño superior a 5  $\mu\text{m}$  pueden llegar a taponar vasos sanguíneos grandes (embolización).
- Versatilidad a la hora de transportar diferentes agentes terapéuticos en cantidad suficiente como para permitir el transporte de dosis activas biológicamente, sin hacer que el organismo se cargue demasiado de material magnetizable.
- Velocidad de liberación del fármaco controlable (o activable) en la región diana.
- Fácil y barata producción a gran escala.

Como sistemas transportadores de fármacos, las principales ventajas que aportan los coloides magnéticos radican en la focalización del agente terapéutico en el tejido diana, minimizando los efectos adversos asociados a su extensa biodistribución. Además, se solucionan los problemas de estabilidad del fármaco en los fluidos biológicos. Sin embargo, existen una serie de limitaciones que obstaculizan la introducción definitiva de los coloides magnéticos en clínica. En concreto: *i*) la pobre respuesta a gradientes magnéticos en zonas no tan superficiales del organismo (> 2 cm de profundidad), ya que la fuerza del campo magnético disminuye con la distancia; *ii*) la escasa retención del sistema transportador en el lugar diana cuando se retira el gradiente magnético; y *iii*) la frecuentemente escasa capacidad de carga y liberación controlada del fármaco vehiculizado. Además, para que exista un transporte eficaz del fármaco vehiculizado, el gradiente de campo magnético aplicado debe vencer a la

velocidad de flujo de la sangre en arterias y venas. De ahí que la eficacia de la acumulación de las nanopartículas en el lugar de acción no sólo depende del flujo sanguíneo, sino de la intensidad del gradiente de campo magnético aplicado y de las características superficiales del coloide magnético [Takeda y cols., 2007; Durán y cols., 2008]. No obstante, cada vez hay un mayor número de ensayos clínicos que respaldan la eficacia y las posibilidades de los coloides magnéticos en farmacoterapia [Rudge y cols., 2000; Durán y cols., 2008; Reddy y cols., 2012].

Por otro lado, la exposición del momento magnético de estos nanomateriales a un gradiente de campo electromagnético alterno, produce la vibración de las partículas magnéticas y así un calor que afecta a su estructura (aumento de la permeabilidad o degradación más rápida), lo que facilita la liberación del principio activo vehiculizado [Huber, 2005; Wagner, 2007; Kaur y cols., 2016]. Este comportamiento es característico de sistemas transportadores que presentan en su composición núcleos de óxido de hierro superparamagnéticos. Además, y como consecuencia de la generación de este calor, el tejido dónde se encuentran estas nanopartículas estaría expuesto a un aumento de temperatura que puede incrementar su permeabilidad (aumentando la acumulación del coloide y, así, del fármaco) y, si la temperatura alcanza los 42-45 °C en el caso de una masa tumoral puede provocar daños irreversibles y la destrucción de las células cancerosas [Huber, 2005; Hervault y cols., 2014]. Este es el fenómeno de hipertermia, el cual constituye una interesante aproximación terapéutica al tratamiento del cáncer [Reddy y cols., 2012; Suriyanto y cols., 2017]. La hipertermia es consecuencia de la vibración de los momentos magnéticos de las nanopartículas superparamagnéticas bajo exposición a un gradiente electromagnético alterno que oscila en un rango de frecuencia entre 50 -500 kHz. Se ha descrito que este fenómeno es consecuencia de la pérdida de histéresis magnética de las nanopartículas [Gupta y Gupta, 2005; Huber, 2005].

Finalmente, los coloides magnéticos utilizados para el transporte de fármacos tienen frecuentemente una estructura mixta que facilita una mayor carga de moléculas biológicamente activas, así como su liberación controlada [Reddy y cols., 2012]. Estos coloides mixtos están constituidos por un núcleo magnético (responsable

de la capacidad de respuesta a los gradientes de campo magnético aplicados) y un recubrimiento biodegradable (responsable del transporte y liberación del fármaco). Como núcleos magnéticos se usan principalmente los óxidos de hierro (preferiblemente superparamagnéticos), hierro y aleaciones. Por otro, la matriz puede ser de naturaleza inorgánica (sílice) u orgánica (carbono, polímeros o vesículas liposomales) [Durán y cols., 2008; Reddy y cols., 2012].

En este caso los liposomas magnéticos o magnetoliposomas están constituidos por núcleos magnéticos embebidos en una matriz liposomal. Generalmente, los materiales magnéticos más empleados son los óxidos de hierro, en concreto la magnetita y la maghemita, ya que poseen una adecuada respuesta magnética, biocompatibilidad y biodegradabilidad [Laurent y cols., 2008; Sun y cols., 2008].

Los magnetoliposomas son útiles en diferentes aplicaciones biomédicas, ya que [Sun y cols., 2008; Skouras y cols., 2011; Reddy y cols., 2012]: *i*) se visualizan mediante técnicas de resonancia magnética de imagen (RMI), al ser capaces de reducir los tiempos de relajación  $T_1$  y  $T_2$  [Soenen y cols., 2011]; *ii*) vectorizan fármacos y genes (transfección magnética o magnetofección) bajo exposición a un gradiente de campo magnético [Kulshrestha y cols., 2012; Chen y cols., 2015]; *iii*) generan un efecto de hipertermia en el lugar deseado bajo la influencia de un campo electromagnético alterno [Clares y cols., 2013]; y *iv*) permiten la separación magnética de células (Nakao y cols., 2009).

Para desempeñar todas estas aplicaciones, es preferible que los núcleos magnéticos presenten superparamagnetismo. En concreto, para el transporte y la liberación de fármacos, estos coloides deben cumplir los siguientes requisitos: morfología esférica y tamaño inferior a 200 nm, hidrofilia (alcanzable mediante la incorporación en su superficie de cadenas hidrófilas de polímero) y carga eléctrica superficial nula o prácticamente nula. De esta manera, se asegurará una mayor supervivencia en la circulación sistémica (retraso del reconocimiento por el SER y una extensa extravasación en el destino biológico (masa tumoral, región inflamada...)). La utilización de implantes magnéticos para el guiado *in vivo* de estos materiales puede ser de especial ayuda si la región diana se encuentra en zonas profundas del organismo

[Avilés y cols., 2008; Janßen y cols., 2018]. Por último, y dentro de las estrategias de transporte de fármacos, también se pueden incorporar en la superficie de los magnetoliposomas ligandos específicos de receptores sobreexpresados en la superficie de la célula diana o en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el tejido y órgano diana, como por ejemplo el ácido fólico [Wang y cols., 2018].

Una vez que estos nanosistemas llegan al lugar de acción, la liberación del fármaco vehiculizado puede ocurrir por simple difusión o tras la degradación del magnetoliposoma, por mecanismos enzimáticos o tras cambios en el entorno fisiológico (pH, osmolaridad, temperatura, etc.) [Kumar y cols., 2010; Reddy y cols., 2012].

A pesar de la más que prometedora utilidad de los magnetoliposomas en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades, todavía son precisos importantes avances en su tecnología relacionados con: *i*) nuevas rutas de síntesis para asegurar una geometría y propiedades fisicoquímicas apropiadas, que eviten fenómenos de agregación *in vivo* y embolización tras la eliminación del gradiente de campo magnético; *ii*) el óptimo control de la biodistribución y del tiempo de residencia en el lugar diana; *iii*) control de la cinética de liberación del fármaco (liberación controlada); y, *iv*) la óptima extrapolación de los resultados desde modelos animales a humanos.

Hay que destacar que a pesar de los inconvenientes que aún quedan por resolver sobre el desarrollo de este tipo de nanopartículas, los magnetoliposomas han sido ampliamente investigados para mejorar el tratamiento de enfermedades severas como el cáncer (Viroonchatapan y cols., 1997; Bothun y cols., 2011; Clares y cols., 2013).

**2. OBJETIVOS,**  
**CONTRIBUCIÓN Y PLAN DE**  
**TRABAJO**



## **2.1. OBJETIVOS**

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo central el diseño de un sistema liposomal con capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados y que permita el transporte eficaz del fármaco prednisolona hasta la célula o tejido diana. Con este fin, se realizará un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas biodegradables y biocompatibles constituidas por núcleos magnéticos de óxido de hierro (maghemita,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) embebidos en una matriz vesicular (liposoma, L- $\alpha$ -fosfatidilcolina).

La eficacia del recubrimiento liposomal de los núcleos magnéticos se determinará tras el análisis comparativo de la estructura y composición química de los tres tipos de materiales obtenibles (maghemita, liposoma y magnetoliposoma), así como de las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales. La caracterización de las propiedades magnéticas de los magnetoliposomas debe ser la herramienta que permita definir *a priori* la capacidad de estos nanosistemas para responder a gradientes magnéticos aplicados y el grado de influencia del recubrimiento vesicular sobre estas propiedades. En este sentido, se realizará un análisis *in vitro* a nivel macro y microscópico de una suspensión de magnetoliposomas para entender mejor estas propiedades.

Un aspecto importante de este trabajo de investigación es la estimación de la biocompatibilidad de las nanoplataformas magnéticas desarrolladas. Para ello, se llevaron a cabo estudios de hemocompatibilidad en muestras de sangre. Además, se realizaron estudios de proliferación *in vitro* en fibroblastos de colon humano CCD-18 y en la línea celular de carcinoma de colon humano T-84. Este estudio es posible gracias a la colaboración del grupo de investigación “Nuevas Tecnologías Aplicadas a la Investigación Cardiovascular” (CTS-107) de la Junta de Andalucía.

Otra parte fundamental de la investigación es la determinación de la capacidad de vehiculización (transporte y liberación controlada) de prednisolona que tienen los magnetoliposomas diseñados. Se investigó la incorporación de fármaco en este tipo de

nanosistemas mediante absorción en matriz, utilizando técnicas cuantitativas (espectrofotometría UV-Visible) y cualitativas (electroforesis) para definir la incorporación de prednisolona en las nanopartículas. Además, se evaluará *in vitro* el proceso de liberación de dicho fármaco en condiciones fisiológicas (37 °C y pH 7.4) mediante espectrofotometría UV-Visible.

Este trabajo de investigación ha contado con financiación del Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias, FIS), Ministerio de Ciencia e Innovación: proyecto “Formulación de Nanoplateformas Funcionalizadas con Utilidad Terapéutica en el Cáncer de Colon Avanzado” (PI 11/02571). También ha contado con financiación de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía: proyecto “Suspensiones de Nanopartículas Funcionalizadas. Aplicaciones Biomédicas” (P08-FQM-03993).

## **2.2. CONTRIBUCIÓN**

Dentro del campo de la investigación y el desarrollo de coloides como transportadores de fármacos, la aportación principal de este trabajo de investigación es el diseño de un sistema de vehiculización de fármacos constituido por un núcleo magnético ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y un recubrimiento lipídico (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina). Su desarrollo implica el diseño de un procedimiento de síntesis sencillo y fácilmente reproducible a gran escala. Los magnetoliposomas así formulados permitirán el guiado del fármaco prednisolona hasta el tejido o células diana, y su retención en dicho lugar. Cabe esperar, que la utilización de este nanosistema logre reducir las reacciones adversas derivadas de la extensa distribución sistémica y de la poca especificidad de fármacos por su destino biológico. Así, se necesitarán dosis inferiores para conseguir la misma acción terapéutica. Por otro lado, el carácter superparamagnético de los núcleos de óxido de hierro utilizados podría dotar al magnetoliposoma de utilidad como agente de contraste en resonancia magnética de imagen y como agente de hipertermia.

## **2.3. PLAN DE TRABAJO**

El presente trabajo de investigación consta, principalmente, de las siguientes etapas, muchas veces simultáneas, de trabajo:

1. Síntesis de magnetoliposomas compuestos de núcleos magnéticos (maghemita,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y de una matriz liposomal (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina). Determinaremos el mejor método de síntesis mediante el análisis de las variables implicadas en su formulación.
2. Caracterización de la geometría (forma y tamaño), composición química y estructura de las nanopartículas sintetizadas obtenibles (maghemita, liposomas y magnetoliposoma). Toda esta caracterización fisicoquímica contribuirá a la definición de las condiciones óptimas de síntesis. Las técnicas utilizadas serán: espectroscopía de correlación de fotones, microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, microscopía electrónica de barrido de alta resolución, difracción de rayos X y espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.
3. Estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de nanopartículas obtenibles (maghemita, liposoma y magnetoliposoma) mediante electroforesis. Uso de modelos teóricos para evaluar su carga eléctrica superficial. Control de la misma en función de las características del medio de dispersión.
4. Análisis comparativo de las propiedades termodinámicas superficiales de las nanopartículas obtenibles (maghemita, liposoma y magnetoliposoma) mediante la determinación del ángulo de contacto de líquidos seleccionados (geometría). Uso de modelos teóricos para evaluar dichas propiedades. Estudio de la naturaleza hidrófila/hidrófoba de las nanopartículas.
5. Caracterización de las propiedades magnéticas de los magnetoliposomas mediante el ciclo de histéresis y el estudio *in vitro* del comportamiento de una

dispersión acuosa de magnetoliposomas a nivel macroscópico, mediante observación directa y a través de un microscopio óptico.

6. Estudio reológico de los magnetoliposomas sintetizados.
7. Determinación de la capacidad de incorporación de prednisolona por los magnetoliposomas mediante espectrofotometría UV-Visible. Esta es una contribución esencial de nuestro trabajo, dado que las partículas sintetizadas podrían ser excelentes vehículos de fármaco por su capacidad de respuesta a gradientes de campo magnético, y adecuadas igualmente como sistemas de liberación basados en la descomposición de la matriz liposomal.
8. Evaluación de la cinética de liberación de la prednisolona desde las nanopartículas. Análisis de los mecanismos implicados. Estudio de los factores que afectarán a la liberación *in vivo*: características y composición del medio de liberación, tipo de vehiculización de fármaco y cantidad de fármaco incorporada.
9. Estudio *in vitro* de la hemocompatibilidad de los magnetoliposomas: hemólisis, activación plaquetaria, activación del sistema del complemento y tiempo de coagulación del plasma sanguíneo.
10. Estudio *in vitro* e *in vivo* de la citotoxicidad de los magnetoliposomas en cultivos celulares.
11. Estudio *in vitro* de la migración de células T-84 con magnetoliposomas en respuesta a un gradiente de campo magnético externo aplicado.

**3. FORMULACIÓN DE**  
**MAGNETOLIPOSOMAS**  
**FOSFATIDILCOLOINA/**  
**MAGHEMITA**



### **3.1. NANOPARTÍCULA DE MAGHEMITA**

La maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) constituye, junto a la magnetita, uno de los materiales magnéticos que recibe especial atención en el campo de la Nanomedicina. Esto es debido a su capacidad de respuesta magnética y a sus favorables características de biocompatibilidad y biodegradabilidad. El término maghemita surge por primera vez en 1927 para designar un compuesto intermedio entre la magnetita y la hematita. Químicamente es un óxido de hierro y se caracteriza por una estructura cristalina constituida por átomos de oxígeno formando una red cúbica cerrada en cuyos intersticios se sitúan los átomos de hierro. La estructura cristalina de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  determina su carácter paramagnético. Gracias a esta propiedad, exhibirá una excelente respuesta a gradientes magnéticos, lo que le proporciona la posibilidad de ser utilizada ventajosamente en el control del destino biológico de la nanopartícula, permitiendo la acumulación de la dosis de fármaco en el tejido diana.

Las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  de muy pequeño tamaño (< 20 nm) se consideran superparamagnéticas, no tóxicas y biodegradables. Estas partículas de óxido de hierro superparamagnéticas se eliminan de la sangre mediante endocitosis y son metabolizadas en los compartimentos lisosomales, a pH bajo, mediante enzimas hidrolíticas y proteínas que participan en el metabolismo del hierro. El hierro libre que se origina tras este proceso de metabolización se incorpora a las reservas de hierro del organismo (hemoglobina), o se elimina por vía fecal (Schulze y cols., 1995; Elias y Tsourkas, 2009). Como se verá a continuación, este es el tipo de partícula de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  obtenido en este trabajo de investigación.

#### **3.1.1. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS**

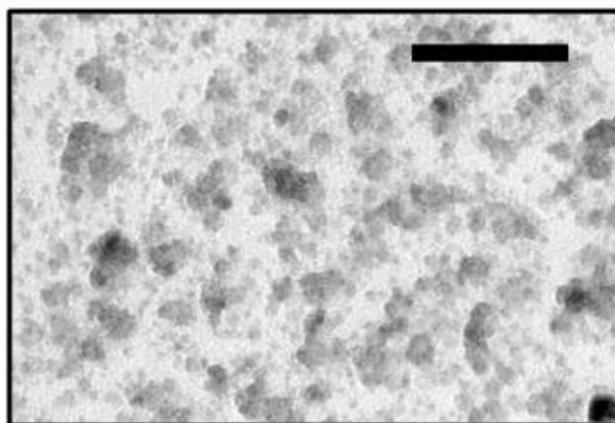
La síntesis de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  se llevó a cabo mediante la oxidación de nanopartículas de magnetita previamente sintetizadas (Bee y cols., 1995). El

procedimiento seguido para la síntesis de los núcleos de magnetita es el de coprecipitación química (Massart, 1981). Salvo que se indique lo contrario (como en el caso de posteriores apartados) los reactivos químicos utilizados tenían calidad analítica (Panreac, España) y el agua utilizada fue doblemente destilada y desionizada en un lecho mixto de intercambio iónico, en cuya salida se encontraba un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  (Milli-Q Academic, Millipore, Francia).

En primer lugar, se añadieron 10 mL de una solución 2 M de cloruro de hierro ( $\text{FeCl}_2$ ) en ácido clorhídrico 2 M y 40 mL de una solución de tricloruro de hierro ( $\text{FeCl}_3$ ) 1 M sobre 500 mL de una solución de amoníaco 0.7 M, bajo agitación mecánica (700 r.p.m.) y a temperatura ambiente, inmediatamente después de la mezcla de estas soluciones acuosas, precipitaron las partículas de magnetita. A continuación, estas partículas de óxido de hierro fueron sometidas a un proceso de decantación magnética (imán 0.4 Teslas) para eliminar los reactivos restantes y subproductos de la reacción. A continuación se pusieron en contacto los núcleos de magnetita con 400 mL de una solución de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 2 M durante un período de 12 horas. La termodinámica de cualquier tipo de partícula de óxido de hierro superparamagnéticas suele garantizarse mediante este período de estabilización. Tras este período de tiempo, se separaron las partículas de magnetita mediante decantación magnética (imán 0.4 Teslas). La etapa final del proceso de síntesis de las partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  implicó la oxidación de los núcleos de magnetita. Para ello, se redispersaron los núcleos de magnetita en 600 mL de una solución de nitrato férrico [ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ] 0,34 M (Sigma-Aldrich, Alemania), bajo agitación mecánica y a una temperatura de 90  $^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Los núcleos de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  se retiraron de la dispersión mediante decantación magnética (imán 0.4 Teslas) y pasaron a conservarse hasta su utilización en agua bidestilada o desecados tras un proceso de desecación en un horno de convección con circulación forzada de aire a  $60.0 \pm 0.5$   $^\circ\text{C}$  (Digitronic, J.P. Selecta, S.A., España).

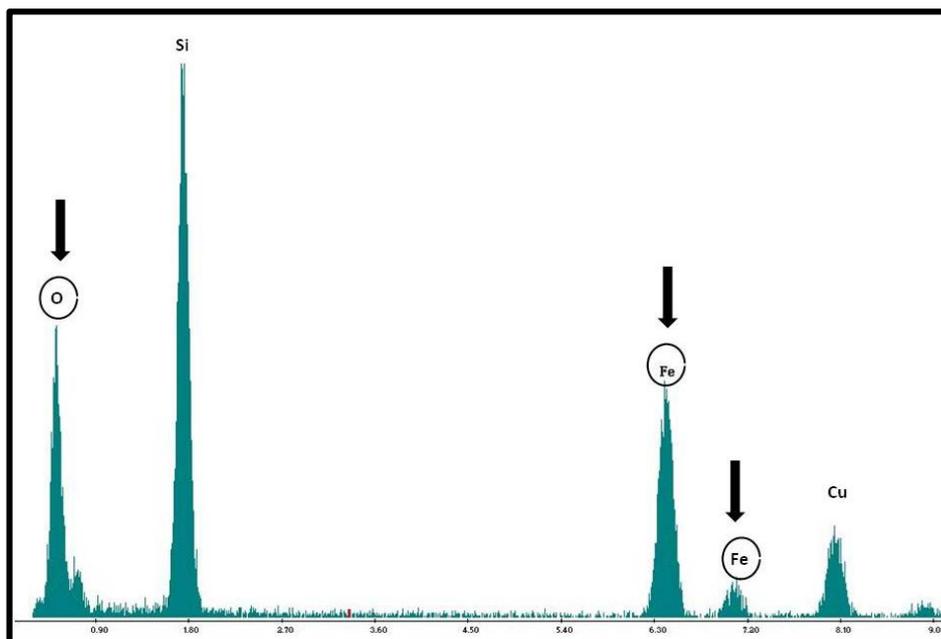
### 3.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: TAMAÑO

La caracterización de la geometría de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  se realizó mediante espectroscopía de correlación de fotones (*PCS*, Malvern 4700 analyzer, Malvern Instruments, Inglaterra) y microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (*HRTEM*, microscopio electrónico STEM Philips CM20, Holanda). Con respecto a la primera técnica, el ángulo de scattering utilizado en la visualización de las partículas fue de  $60^\circ$  y se analizaron suspensiones acuosas diluidas de partículas de maghemita ( $\sim 0.1\%$ , p/v). De esta manera se determinó que el tamaño medio de las partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  era  $11 \pm 2$  nm. Este pequeño tamaño se confirmó mediante el análisis de las microfotografías *HRTEM* también obtenidas. Para ello, se sonicó durante 5 minutos una suspensión acuosa diluida de maghemita ( $\sim 0.1\%$ , p/v) y a continuación se depositaron unas gotas de ésta sobre una rejilla de cobre con película formvar. Por último, estas rejillas se secaron a  $35.0 \pm 0.5$  °C en un horno de convección. Con el fin de lograr que las muestras condujeran fácilmente la electricidad se recubrieron las rejillas con carbono y se sometieron a una presión de  $10^{-5}$  torr para conseguir la sublimación del carbono. Como puede apreciarse en la Figura 3.1., las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  presentan un tamaño muy pequeño, en concreto, un diámetro de  $9 \pm 2$  nm, tal y como se midió en 200 partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .



**Figura 3.1.** Microfotografía *HRTEM* de las nanopartículas de maghemita. Longitud de barra: 200 nm.

En la Figura 3.2. se recoge el espectro obtenido tras el microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDX) de las partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . En éste se aprecian las bandas de los átomos de hierro y oxígeno de este material. El resto de metales identificados (silicio y cobre) corresponden a contaminaciones de la muestra durante su preparación para microscopía.



**Figura 3.2.** Microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDX) de las nanopartículas de maghemita. Las bandas correspondientes a los átomos de hierro y oxígeno de las partículas aparecen resaltadas en la Figura.

### **3.2. LIPOSOMAS**

Los componentes de las preparaciones de liposomas forman dos fases definidas: lipídica y acuosa. La fase acuosa es agua, mientras que la fase lipídica está constituida básicamente por:

- a) Fosfolípidos. Son los componentes fundamentales de la bicapa lipídica de los liposomas. El fosfolípido empleado en este trabajo es la L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (Sigma-

Aldrich, Alemania) (PC) de huevo fresco, en estado sólido y con un contenido base de colina del 60%. La conservación de este producto se lleva a cabo en recipientes herméticamente cerrados a una temperatura inferior a 0 °C y en ausencia de luz.

b) Disolvente de la fase lipídica. Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>). Su volatilidad permite una fácil eliminación durante la primera etapa del método.

### 3.2.1. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS

El procedimiento seguido en la síntesis de los liposomas está basado en el método de hidratación del *film* (*thin layer evaporation technique*) (Bangham y cols., 1965). Se llevó a cabo en un rotavapor Büchi (Büchi Labortechnik AG, Suiza) en el que la temperatura del baño termostático se mantuvo durante todo el proceso a  $37.0 \pm 0.5$  °C, superando la  $T_c$  de los lípidos de la formulación. Dichas condiciones deben favorecer: *i*) la evaporación del disolvente orgánico en la primera etapa de la síntesis; y, *ii*) la incorporación del principio activo en la primera fase de la síntesis (si es liposoluble) y en la segunda fase de la síntesis (si es hidrosoluble).

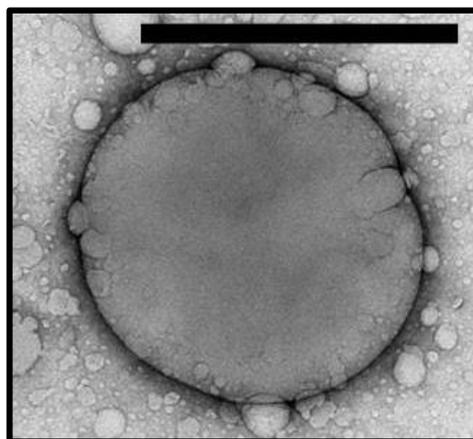
En primer lugar, se preparó la fase lipídica u orgánica. Para ello, se solubilizaron todos los componentes lipídicos (168.96 mg de fosfatidilcolina). Esta primera etapa de la síntesis se centra en la evaporación del disolvente en un rotavapor a vacío y bajo agitación mecánica (500 r.p.m.), prolongándose el proceso hasta total desecación y formación de una película lipídica fina adherida a las paredes del matraz. Se utilizó un volumen elevado (250 mL) de cloroformo para asegurar la uniformidad en la superficie y grosor de la película tras la evaporación.

A continuación, se preparó la fase acuosa (40 mL) constituida por agua bidestilada y se adicionó al matraz que contenía la película lipídica adherida a sus paredes. En esta segunda etapa del proceso, mediante agitación continua (500 r.p.m.), se realizó la hidratación de la película lipídica, el tiempo necesario para que se desprendiera de las paredes del recipiente (aproximadamente, 90 minutos) formándose una suspensión de liposomas de aspecto lechoso. Finalmente, la suspensión se mantuvo en reposo

durante 24 horas a  $4.0 \pm 0.5$  °C, para así favorecer el crecimiento y la formación final de las vesículas liposomales. El pH de las suspensiones de liposomas era próximo a 5.5. Por último, la suspensión de liposomas se sometió a un ciclo de centrifugación (7000 r.p.m., 1 hora) (Centrikon T-124 high-speed centrifuge, Kontron, Francia) y redispersión en agua bidestilada hasta que la conductividad del sobrenadante obtenido era inferior a  $10 \mu\text{S}/\text{cm}$  (Crison microcm 2202, España). Los experimentos de síntesis de liposomas se realizaron por sextuplicado para demostrar su reproducibilidad.

### 3.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: GEOMETRÍA

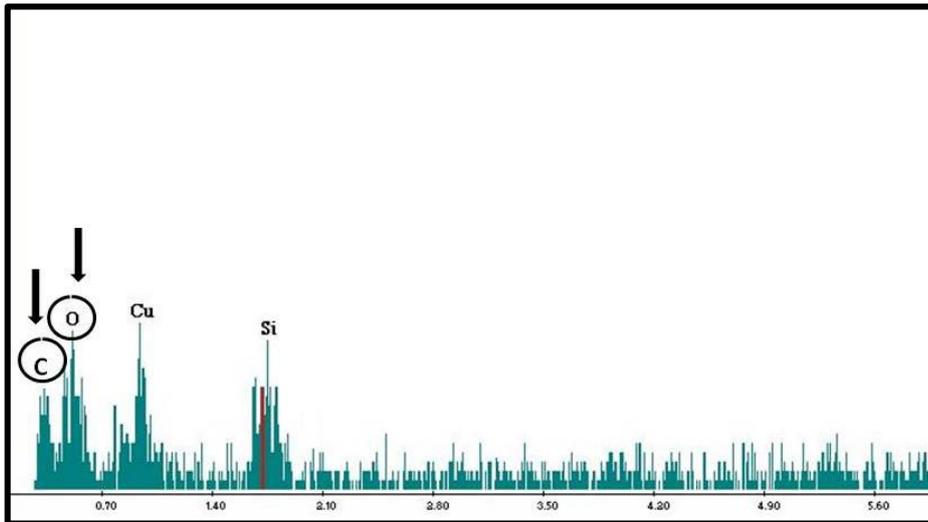
El análisis mediante *PCS* de las suspensiones acuosas de liposomas nos permitió determinar el tamaño medio de partícula:  $452 \pm 60$  nm. Además, el análisis de las microfotografías *HRTEM* (Figura 3.3.) de los liposomas, permitió confirmar este tamaño ( $460 \pm 90$  nm medido en 200 partículas) y apreciar como los liposomas parecen tener una morfología esférica y ser unilaminares.



**Figura 3.3.** Microfotografía *HRTEM* de los liposomas. Longitud de barra: 500 nm.

En la Figura 3.4. se recoge el espectro obtenido tras el microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDX) de los liposomas. En éste se aprecian las bandas de los

átomos de carbono y oxígeno de este material. La banda correspondiente a los átomos de nitrógeno y fósforo no puede apreciarse porque estos átomos son elementos ligeros y el dispositivo EDX utilizado no consigue su visualización. El resto de metales identificados (silicio y cobre) corresponden a contaminaciones de la muestra durante su preparación para microscopía.



**Figura 3.4.** Microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDX) de las nanopartículas de los liposomas. Las bandas correspondientes a los átomos de carbono y oxígeno de las partículas aparecen resaltadas en la Figura.

### **3.3. MAGNETOLIPOSOMAS**

El término magnetoliposoma difiere significativamente del término magnetosoma, si bien ambos términos se refieren a nanopartículas magnéticas embebidas en una matriz liposomal. Los magnetosomas son estructuras celulares u organelas formadas por óxidos de hierro envueltos por fosfolípidos localizadas en algunas especies de bacterias como *Magnetospirillum* (Figura 3.6.) o *Magnetovibrio* [Yan y cols., 2012]. Se forman por biomineralización en organismos vivos (síntesis biológica) con el fin de orientarse en la dirección del campo geomagnético [Lohsse y cols., 2011; Rai y Duran,

2011]. Los magnetosomas constituyen una alternativa de gran interés a los ferrofluidos semisintéticos como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen [Lang y Schüler, 2006].

Por el contrario, los magnetoliposomas o liposomas magnéticos se obtienen a nivel de laboratorio (síntesis artificial) [Arakaki y cols., 2008; Soenen y cols., 2011], y están constituidos por núcleos de óxido de hierro (superparamagnético) embebidos en una matriz biodegradable liposomal. Algunos autores definen estas nanopartículas magnéticas como liposomas constituidos por bicapas fosfolipídicas que encapsulan óxidos de hierro en los compartimentos acuosos [Fracione y cols., 2012]. Se han puesto a punto diferentes métodos para sintetizar magnetoliposomas. Algunos de ellos se utilizaron en la síntesis de liposomas. Por ejemplo, el método de hidratación de la capa lipídica [Clares y cols., 2013], el método de sonicación [Giri y cols., 2005], la técnica de extrusión [Lesieur y cols., 2003] y el procedimiento de evaporación en fase reversa [García-Jimeno y cols., 2011], por citar algunos ejemplos.

### **3.3.1. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS**

El procedimiento seguido en la síntesis de los magnetoliposomas está basado en el mismo método de preparación de liposomas descrito en la sección 3.2.1., con la única variante de la inclusión de núcleos de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  en la fase acuosa utilizada para la rehidratación de la fina capa lipídica. Finalmente, la limpieza de los magnetoliposomas se realizó mediante sedimentación magnética durante 5 minutos de exposición a un imán de 0.4 Teslas, con el fin de eliminar los subproductos de la reacción: fosfolípido que no haya reaccionado, liposomas puros que se hayan formado, la maghemita que haya quedado libre y los magnetoliposomas formados sin suficiente capacidad de respuesta magnética para el transporte de fármacos. Por último, la conservación de los magnetoliposomas hasta su utilización se realizará en un medio de dispersión acuoso o desecados tras un proceso de desecación en un horno de convección con circulación forzada de aire a  $37.0 \pm 0.5$  °C (Digitronic, J.P. Selecta, S.A., España).

Dentro del desarrollo de las condiciones de síntesis de magnetoliposomas que permiten el mayor rendimiento posible, se realizó el análisis del efecto que tiene la proporción  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{:PC}$ . En concreto, se llevaron a cabo por triplicado diferentes síntesis de magnetoliposomas con proporciones  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{:PC}$  desde 4:1 a 1:4, manteniendo invariable el resto de la metodología de formulación. La valoración del rendimiento de cada una de las reacciones de síntesis se realizó tras la desecación (a  $37.0 \pm 0.5$  °C en un horno de desecación con circulación forzada de aire) de los sedimentos de magnetoliposomas obtenidos tras el proceso de sedimentación magnética descrito previamente (0.4 Teslas, 5 minutos). El rendimiento ( $R$ ) de la reacción de síntesis se determinó:  $R (\%) = (\text{masa de magnetoliposomas} / \text{masa de } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \text{ y PC utilizada en la síntesis}) \times 100$ .

La Tabla 3.1. recoge los valores de  $R$  (%) obtenidos. Puede apreciarse cómo los mejores valores de rendimiento se logran cuando la cantidad de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{:PC}$  utilizada se encuentra en exceso con respecto a la cantidad de PC. Puede apreciarse también en la Tabla que no existen diferencias significativas en cuanto a los tamaños obtenidos de los magnetoliposomas para las diferentes relaciones de masas iniciales  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{:PC}$ . Para la síntesis de los magnetoliposomas objeto de nuestro trabajo de investigación se seleccionó la proporción 4:2 como idónea, siendo ésta la utilizada de aquí en adelante.

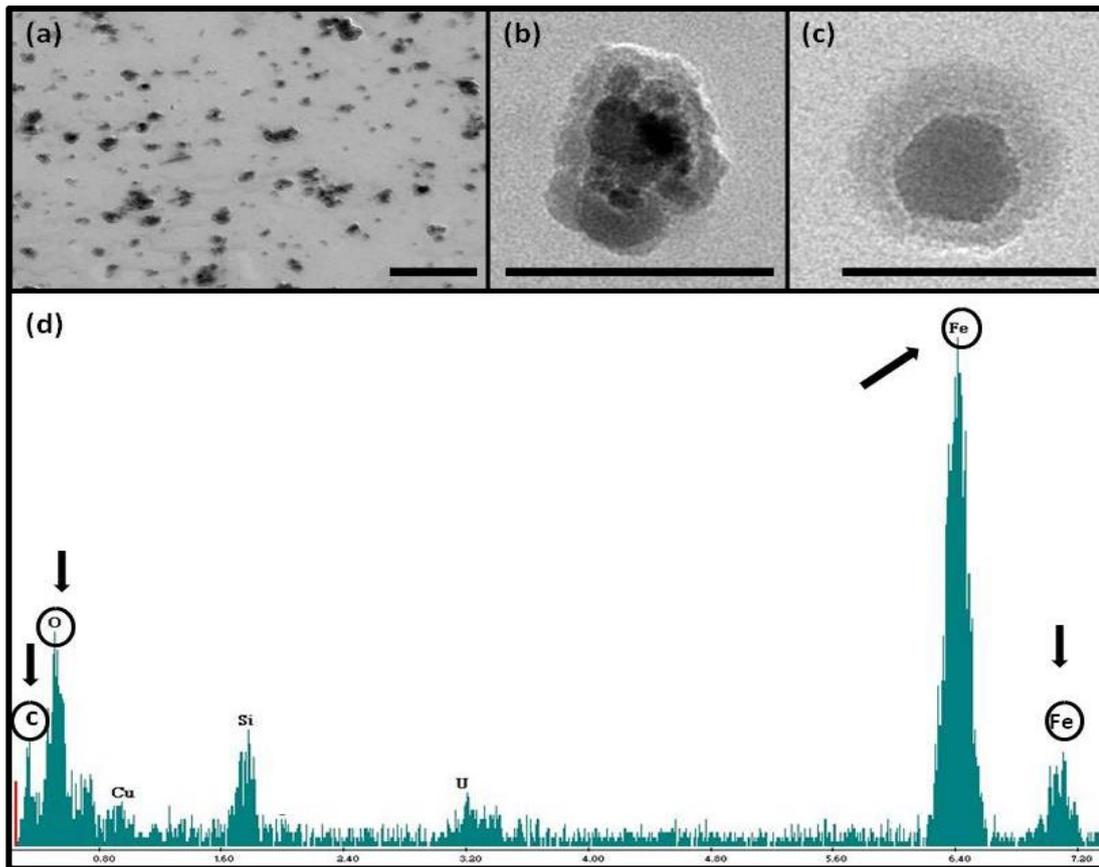
**Tabla 3.1.** Rendimiento  $R$  (%) de la relación de síntesis de magnetoliposomas para cada una de las proporciones de masas iniciales  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:PC, tamaño e índice de polidispersión de los magnetoliposomas así obtenidos.

Proporción de masas iniciales $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :PC	$R$ (%)	Tamaño (nm)	Índice de polidispersión
4:1	22 ± 1	80 ± 6	0.289
<b>4:2</b>	<b>23 ± 3</b>	<b>89 ± 18</b>	<b>0.289</b>
4:3	17 ± 5	84 ± 17	0.210
4:4	14 ± 8	87 ± 46	0.208
3:4	10 ± 8	79 ± 38	0.265
2:4	6 ± 3	84 ± 8	0.233
1:4	3 ± 1	97 ± 16	0.392

### 3.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: TAMAÑO

La caracterización del tamaño de los magnetoliposomas tuvo como primera etapa el análisis de las microfotografías *HRTEM* (Figura 3.5.). Como puede apreciarse en la Figura 3.5.a, existen dos poblaciones de magnetoliposomas, ambas de pequeño tamaño:  $90 \pm 20$  nm y  $45 \pm 10$  nm, tal y como se midió en 200 partículas de ambas poblaciones. Puede apreciarse cómo la población de magnetoliposomas de mayor tamaño se caracteriza por albergar un mayor número de núcleos de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en el compartimento interno acuoso. Quizás con la utilización de un extrusor como etapa final de la síntesis se pueda lograr una mayor uniformidad u homogeneidad de tamaño (población unimodal en cuanto a tamaño de partícula). Finalmente, se realizó el microanálisis por energía dispersiva de rayos X (*EDX*) de magnetoliposomas (Figura

3.5.d). En el espectro obtenido se observaron las bandas características de los átomos de los materiales que constituyen el magnetoliposoma ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y PC). La banda correspondiente a los átomos de nitrógeno y fósforo no puede apreciarse porque estos átomos son elementos ligeros y el dispositivo EDX utilizado no consigue su visualización. El resto de los metales identificados (silicio, cobre y uranio) corresponden a contaminaciones de la muestra durante su preparación.



**Figura 3.5.** (a) Microfotografía *HRTEM* de los magnetoliposomas formulados utilizando una proporción  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ :PC de 4:2, y dónde pueden apreciarse las dos poblaciones obtenidas. (b y c) Detalles de partículas de magnetoliposomas pertenecientes a ambas poblaciones. Longitud de barra: 500 nm (a), 200 nm (b) y 50 nm (c). (d) Microanálisis por energía dispersiva de rayos X (*EDX*) de los magnetoliposomas. Las bandas correspondientes a los átomos de hierro, oxígeno y carbono de las partículas aparecen resaltadas en la Figura.

Finalmente, es importante destacar que los núcleos magnéticos localizados en el espacio acuoso interno parecen ser los responsables de la importante reducción en el tamaño final del nanosistema vesicular mixto. Concretamente, una reducción del tamaño del orden de 4 veces con respecto al tamaño medio del liposoma. Esto puede ser debido a una contracción considerable del volumen acuoso liposomal. Las partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  presentan carga eléctrica superficial positiva y las bicapas fosfolipídicas negativas (a pH 5.5, el característico de la fase acuosa de la síntesis, ver Figura 4.3.), por lo que es de esperar que se produzca una interacción electrostática de tipo atractivo entre ambos materiales. Como consecuencia de este proceso, debe producirse el acercamiento de la bicapa fosfolipídica hacia los núcleos magnéticos, lo que contraerá el volumen del compartimento acuoso interno. Así, el tamaño final de los magnetoliposomas se reduce considerablemente, haciéndolos muy idóneos para la vía de administración parenteral.

# **4. CARACTERIZACIÓN**

## **FISICOQUÍMICA**



## **4.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA**

### **4.1.1. DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X**

La difracción de rayos X permite la identificación de la estructura interna de un cristal y la evaluación del tipo de red que lo caracteriza. Cada sustancia sólida presenta un patrón de difracción de rayos X único que permite su identificación. Además, en una mezcla de polvos cada constituyente produce un patrón independiente del resto. Estas dos propiedades hacen que esta técnica sea muy útil y aplicable a nivel farmacéutico [Billmeyer y cols., 1975; Brittain y cols., 1995]:

#### **a) Análisis cualitativo de materiales sólidos**

La difracción de rayos X se utiliza en la identificación de estructuras sólidas. Gracias a que cada compuesto presenta una forma cristalina única, es posible la identificación de cada una de sus formas polimórficas. Durante el proceso de preformulación de sólidos con fines farmacéuticos, algunas veces se generan estructuras inactivas farmacológicamente. Por este motivo, es importante confirmar las estructuras cristalinas en cada etapa del desarrollo farmacéutico de una formulación. Esta técnica también se utiliza para identificar las formas solvatadas y no solvatadas (anhidas) de un compuesto, si las redes cristalinas de las dos formas son diferentes. Sin embargo, esta técnica tiene una escasa utilidad en la identificación de materiales no cristalinos (amorfo).

#### **b) Análisis cuantitativo de materiales sólidos**

En una mezcla de sólidos cristalinos de interés farmacéutico, cada uno de éstos tiene un patrón de difracción característico e independiente del resto. Tras realizar las correcciones apropiadas, la intensidad de los picos de cada uno de los componentes será proporcional a su fracción de peso en la mezcla total. De esta manera, puede determinarse en qué cantidad se encuentra un determinado producto en una mezcla de

sólidos farmacéuticos. Este tipo de análisis puede realizarse con un estándar interno o sin él.

#### **c) Grado de cristalinidad de sólidos**

Esta aplicación de la difracción de rayos X es especialmente interesante en el caso de los polímeros. Muchos de ellos tienen características típicas de materiales cristalinos (como la evolución con el tiempo del calor latente al enfriar el polímero fundido) y de materiales no cristalinos (como el patrón de rayos X difuso). Este comportamiento tan característico se puede explicar mediante el modelo de los dos estados: los materiales poliméricos están constituidos por pequeñas, aunque perfectas, regiones cristalinas (cristalitos) que están embebidas dentro de una matriz continua. La metodología convencional de la difracción de rayos X asume implícitamente este modelo.

#### **d) Cinética de reacciones en estado sólido**

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

#### **4.1.1.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

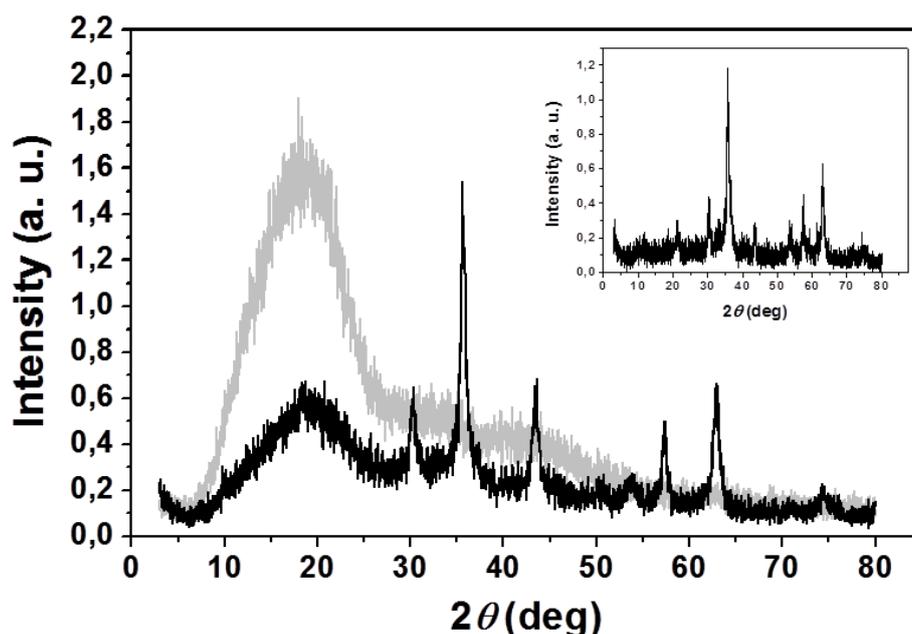
En este trabajo de investigación nos centramos en la utilización de la difracción de rayos X para el análisis cualitativo de materiales sólidos. Para obtener datos reproducibles y fiables, es importante cuidar la preparación de la muestra. Los puntos críticos son el tamaño cristalino, la orientación preferida de la muestra en el soporte y, la coplanaridad entre la muestra y el soporte superficial. Cuando se deposita una muestra pulverizada sobre el soporte de rayos X, la distribución de las orientaciones del cristal puede que no se produzca al azar, ocurriendo lo que se conoce como la distribución preferida de la muestra. Por otro lado, la manera en que la muestra se

deposita sobre el soporte afecta a la orientación de los cristalitos. Los soportes más comúnmente utilizados son platos rectangulares de aluminio y de vidrio, que contienen una ventana rectangular en la que se empaqueta el polvo, lográndose así minimizar este fenómeno.

El difractograma de rayos X de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y de los magnetoliposomas se obtuvo empleando el método de Debye-Scherrer. El dispositivo utilizado fue un difractómetro Philips PW 1710 (Holanda) y la longitud de onda fue 1.5405 Å (Cu-K $\alpha$ ). La masa empleada de los materiales fue 0.5 g en todos los casos. Estas muestras se obtuvieron mediante desecación de las correspondientes suspensiones acuosas a  $35.0 \pm 0.5$  °C en una estufa de desecación con circulación forzada de aire (Digitronic, J.P. Selecta S.A., España).

#### **4.1.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Figura 4.1. se recogen los difractogramas de rayos X obtenidos para la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , los liposomas y los magnetoliposomas. Al comparar los difractogramas de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y de los magnetoliposomas con el difractograma de rayos X de referencia de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (Pérez-Artacho y cols., 2012), se comprueba la perfecta coincidencia de los picos de estos difractogramas con los del patrón, lo que permite identificar las nanopartículas de óxido de hierro como  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y apreciar la elevada cristalinidad de ésta, incluso tras ser embebida en la vesícula liposomal. En este punto, debe tenerse en mente la importancia que tiene la estructura cristalina de un óxido de hierro en sus propiedades magnéticas. Por lo tanto, si ésta no se pierde durante la formulación de los magnetoliposomas, cabe pensar que la capacidad de respuesta magnética del material obtenido estará asegurada. Por otro lado, las características no cristalinas (amorfos) típicas de los liposomas quedan reflejadas ligeramente en el difractograma de los magnetoliposomas si bien no aparece una señal pronunciada. El menor contenido lipídico presente en los magnetoliposomas para la misma masa de muestra que los liposomas puede justificar la escasa contribución al difractograma. Esta técnica constituye una prueba cualitativa de la eficacia de la metodología de síntesis de los magnetoliposomas, pues confirma la presencia de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y PC en la muestra de magnetoliposomas.



**Figura 4.1.** Difractograma de rayos X de los magnetoliposomas (línea negra) y de los liposomas (línea gris) (figura insertada: difractograma de rayos X de referencia de las partículas de maghemita obtenido de Pérez-Artacho y cols., 2012) La intensidad está expresada en unidades normalizadas.

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

La radiación infrarroja se encuentra localizada en el espectro electromagnético entre la zona de la radiación visible y la zona de la radiación del microondas. Como es bien sabido, un gran número de moléculas orgánicas de interés farmacéutico absorben la radiación infrarroja en el intervalo de números de onda entre  $4000$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  en energía de vibración molecular. Esta absorción es cuantificable y el espectro aparece en forma de bandas, ya que un cambio simple de energía vibracional es acompañado por diversos cambios de energía rotacional. Las posiciones de las bandas en un espectro de infrarrojos se suelen presentar en función del número de onda ( $\kappa$ ), mientras que las intensidades de las bandas pueden expresarse como transmitancia ( $T$ ) o como absorbancia ( $A$ ).

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

#### **4.1.2.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Los tres tipos de muestra analizados ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , liposomas y magnetoliposomas) se obtuvieron mediante desecación de las correspondientes suspensiones acuosas a  $35.0 \pm 0.5$  °C en un horno de convección con circulación forzada de aire (Digitronic, J.P. Selecta S.A., España). A continuación, se tomó una pequeña cantidad de cada muestra (1 mg) y se mezcló con 100 mg de bromuro potásico pulverizado y seco. La mezcla se realizó en un mortero de ágata y fue prensada a 15000 kPa para obtener un disco transparente. Como consecuencia de este tratamiento, es de esperar la aparición de bandas en torno a 3450  $\text{cm}^{-1}$  debidas a la humedad que puede captar la muestra (Silverstein y Webster, 1998).

Para la obtención del interferograma se utilizó un espectrómetro de infrarrojos con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$  (Nicolet 20 SXB, EE.UU.). La técnica implica la división de una radiación que contiene todas las longitudes de onda (en nuestro caso, 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) 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. La transformada de Fourier a sucesivos puntos a lo largo de esta variación da lugar a un espectro de infrarrojos completo. El paso de esta radiación a través de una muestra expone al compuesto a una banda amplia de energías, generándose un completo espectro de infrarrojos completo (Silverstein y Webster, 1998).

No hay reglas establecidas para la interpretación de espectros de infrarrojos. Sin embargo, sí existen ciertos requisitos previos a la interpretación de un espectro de infrarrojos. El espectro debe tener una resolución y una intensidad adecuadas, y debe ser el de un compuesto razonablemente puro. El espectrofotómetro debe estar calibrado y el método de manipulación de la muestra debe estar perfectamente definido [Silverstein y Webster, 1998]. La frecuencia o la longitud de onda de absorción dependen de las masas relativas de los átomos, de las constantes de fuerza de los enlaces, de la geometría de los átomos y del entorno molecular. Una molécula por simple que sea puede generar un espectro extremadamente complejo, que es característico de la molécula entera, excepto en el caso de los compuestos enantiómeros. No es posible realizar un tratamiento preciso de las vibraciones de una molécula compleja. Por este motivo, el espectro de infrarrojos debe interpretarse a partir de la comparación empírica y la extrapolación a estudios de moléculas sencillas, ya que determinados grupos de átomos dan lugar a bandas de igual o similar frecuencia independientemente de la estructura del resto de la molécula. La persistencia de estas bandas características permite la obtención de información estructural, mediante simple inspección y referencia a Tablas de la absorción característica de grupos funcionales. Toda conclusión alcanzada tras examinar una banda debe confirmarse cuando sea posible mediante el examen de otras zonas del espectro. De forma general, en un espectro de infrarrojo se distinguen tres zonas características [Silverstein y Webster, 1998]:

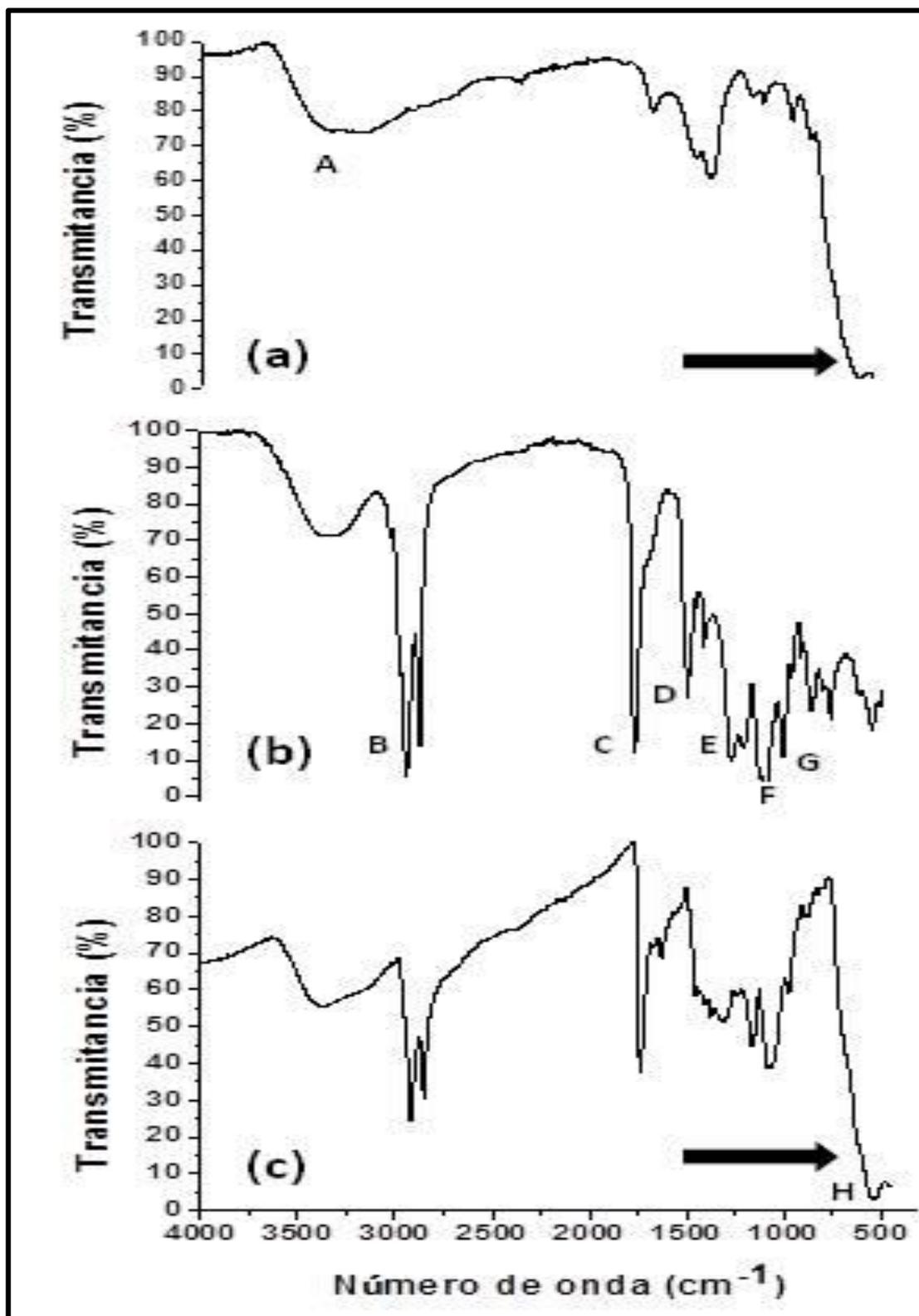
- La región de los grupos funcionales (de  $4000$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$ ). Si no hay absorción en esta zona, la molécula problema carecer de grupos funcionales.
- La zona de la huella dactilar (de  $1300$  a  $900\text{ cm}^{-1}$ ). La absorción en esta región es única y característica para cada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

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

#### 4.1.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 4.2. recoge el espectro de infrarrojos de los tres tipos de partículas. Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia de la metodología de síntesis desarrollada para la obtención de los magnetoliposomas. Es decir, las bandas típicas del liposoma y la característica de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  están presentes en el espectro de los magnetoliposomas. Sin embargo, las bandas son menos intensas en este espectro como consecuencia de la menor cantidad relativa de PC presente en los magnetoliposomas. En concreto, las bandas observadas son:

- A: banda debida a la humedad que adquieren las muestras como consecuencia de su proceso de manipulación. Se localiza a 3356  $\text{cm}^{-1}$ .
- B: grupo de dos bandas que corresponden a la vibración de estiramiento de enlaces C-H. A 2923  $\text{cm}^{-1}$  se localiza la banda característica de la vibración de elongación asimétrica del grupo  $\text{CH}_2$  ( $\nu_{\text{AS}} \text{CH}_2$ ) y a 2853  $\text{cm}^{-1}$  observamos la perteneciente a la vibración de elongación simétrica del  $\text{CH}_2$  ( $\nu_{\text{AS}} \text{CH}_2$ ).
- C: banda que corresponde a la vibración molecular de enlaces C=O en liposomas (aparece a 1738  $\text{cm}^{-1}$ ). En el espectro de magnetoliposomas aparece a 1737  $\text{cm}^{-1}$ .
- D: banda que corresponde a la vibración molecular de enlaces C=C en liposomas (aparece a 1467  $\text{cm}^{-1}$ ). En los magnetoliposomas aparece a 1456  $\text{cm}^{-1}$ .
- E: banda correspondiente a la vibración de flexión de enlaces C-H (1222  $\text{cm}^{-1}$ ).
- F: banda correspondiente a la vibración de tensión de enlaces P=O por la presencia de grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Se localiza a 1085  $\text{cm}^{-1}$  en liposomas y a 1086  $\text{cm}^{-1}$  en magnetoliposomas.
- G: banda correspondiente a la vibración de estiramiento de enlaces C-N (971  $\text{cm}^{-1}$ ).
- H: única banda ausente en el espectro de los liposomas. Aparece a 535  $\text{cm}^{-1}$  y es una banda ancha e intensa característica de los óxidos de hierro (Zussman, 1967).



**Figura 4.2.** Espectro de infrarrojos de las nanopartículas de maghemita (a), liposomas (b) y magnetoliposomas (c). Las flechas resaltan la única banda característica de los óxidos de hierro.

## 4.2. PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES

Si consideramos una partícula sólida esférica de 1 cm de diámetro, su superficie  $S$  y su volumen  $V$  son  $3.14 \times 10^{-4} \text{ m}^2$  y  $5.24 \times 10^{-7} \text{ m}^3$ , respectivamente, y la relación superficie/volumen es  $S/V$  es  $600\text{m}^{-1}$ . La división de la partícula en  $N$  partículas esféricas de radio 100 nm tal que su volumen total sea igual al de la esfera original, sin embargo, provocará que la superficie sea de  $15.7 \text{ m}^2$  y la relación  $S/V \approx 3 \times 10^7\text{m}^{-1}$ . Este sencillo ejemplo explica que la principal contribución a las propiedades de un sistema, formado mediante la dispersión de esas  $N$  partículas en 1 L de agua, vendrá dada por las superficies e interfases de las partículas. En particular, el estado eléctrico de la superficie de las partículas puede ser determinante: si cada una de ellas tiene un potencial superficial de 100 mV (en torno al orden de magnitud típico de las partículas coloidales en medio acuoso), la fuerza electrostática ( $F_{EL}$ ) repulsiva entre dos de estas partículas dispersas en agua y localizadas a una distancia entre superficies de 10 nm es  $F_{EL} \approx 2.12 \times 10^{-12} \text{ N}$ . Esta fuerza tiene que compararse con la fuerza de otras interacciones que deben o pueden existir entre ellas. Así, su atracción gravitatoria ( $F_G$ ) a la misma distancia será  $F_G \approx 6.3 \times 10^{-15} \text{ N}$ , si su densidad es  $103 \text{ Kg/m}^3$ ; y la atracción de van der Waals  $F_{LW} \approx 8 \times 10^{-13} \text{ N}$ , utilizando los valores típicos de la constante de Hamaker (van Oss, 2006). Estos ejemplos muestran que, en la mayoría de los casos, las interacciones electrostáticas son las principales responsables de las propiedades macroscópicas de las suspensiones.

En este contexto, los fenómenos electrocinéticos y las técnicas asociadas a ellos demuestran su importancia. Son manifestaciones de las propiedades eléctricas de la interfase, y de aquí que merezcan atención por sí mismas. Además, son una fuente de información importante (única en muchos casos) de estas propiedades eléctricas, por poder se determinadas experimentalmente. La electroforesis (al igual que los demás fenómenos electrocinéticos) constituye una poderosa técnica para obtener información directa sobre el estado eléctrico de la interfase. En este trabajo hemos estudiado la movilidad electroforética ( $u_e$ ) de los tres tipos de partículas ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , liposomas y magnetoliposomas), como método de evaluación de la calidad y eficiencia de la metodología de síntesis de los magnetoliposomas. Esto es posible dado que las

propiedades eléctricas superficiales de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y del liposoma son claramente diferentes, como veremos.

Por lo tanto, es posible que los núcleos de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  embebidos en una estructura liposomal se puedan diferenciar de los no recubiertos, analizando su comportamiento electroforético. Idealmente, el magnetoliposoma sintetizado debería incluso mostrar una carga eléctrica superficial idéntica al de un liposoma de igual composición lipídica.

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

La mayoría de los sólidos adquieren una carga eléctrica superficial cuando se dispersan en un disolvente polar, en particular, en una disolución de electrolito. Las causas de estas cargas son diversas [Hunter, 1981, 1987; van Olphen, 1977; van Oss, 2006] y se evidencian por diferentes procesos: adsorción/desorción de iones de la red, disociación o ionización de grupos superficiales o sustitución isomórfica.

Cualquiera que sea el electrolito, la carga neta superficial debe estar compensada por iones en torno a la partícula, de modo que se mantenga la electronegatividad del sistema. La carga superficial y la contracarga compensatoria forman una doble capa eléctrica (DCE). Aunque se llame doble capa, puede llegar a ser muy compleja a lo largo de la distancia de la superficie del sólido.

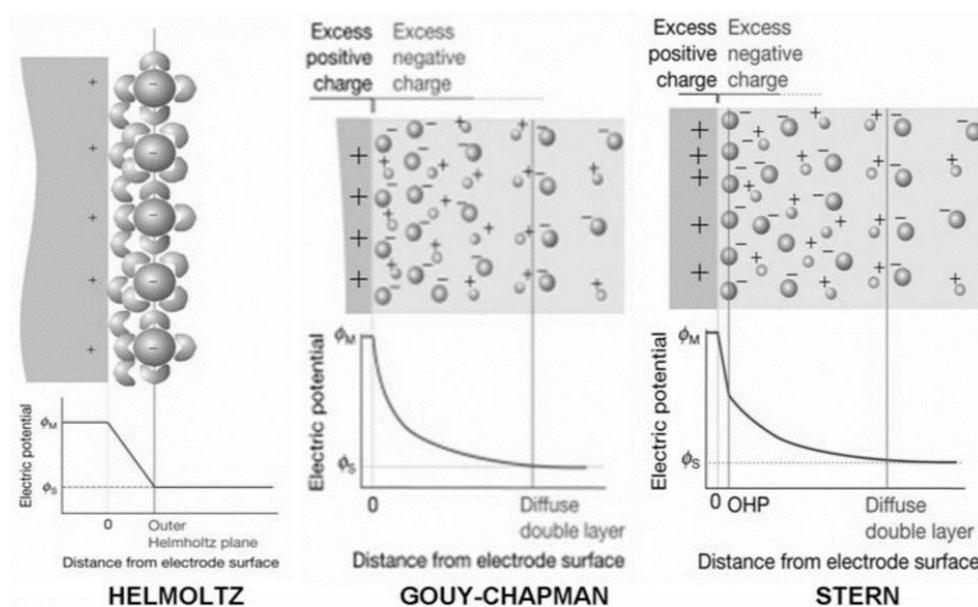
Numerosos estudios han intentado explicar lo que ocurre en la interfase (Figura 4.3.). La distribución de los contraiones en la disolución cerca de la partícula fue estudiada por Helmholtz desde 1879, posteriormente Chapman en 1904 y Stern en 1924.

El modelo de Helmholtz es el más simple, en su teoría considera que la doble capa es como un condensador de placas paralelas donde  $\psi_0$  es el máximo potencial eléctrico existente y que varía linealmente con la distancia a la superficie de la partícula; el exceso de iones en el lado de la solución de la doble capa se encuentra ubicado en el plano de Helmholtz, muy cercano a la superficie del electrodo. En el plano externo de Helmholtz se encuentran los iones solvatados y en el plano interno de Helmholtz se encuentran iones que hayan perdido su capa de solvatación y por tanto pueden aproximarse a la superficie del electrodo. Este modelo de Helmholtz sólo tiene validez cuando la carga

total superficial es pequeña en magnitud absoluta o cuando la concentración del electrolito inerte es grande.

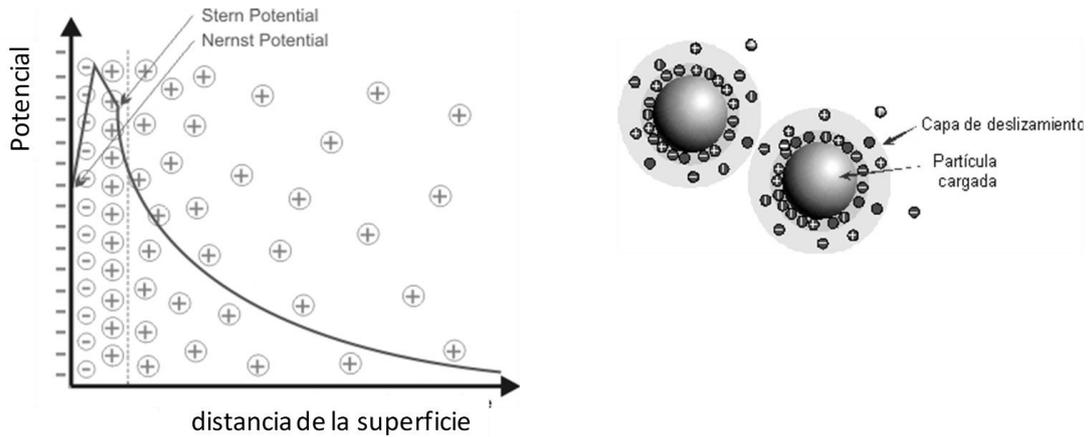
El modelo de Chapman o también conocido como de Gouy-Chapman habla de una capa de cargas en una superficie sólida y una capa difusa de iones con distribución estadística en la solución.

El modelo de Stern habla de una capa de cargas en una superficie sólida y una capa de contraiones constituida por dos subcapas, una subcapa de contraiones absorbida en forma rígida y una subcapa difusa de iones en solución [Jorge NL, 2015].



**Figura 4.3:** Doble capa de iones según diferentes autores [Jorge NL, 2015].

La carga neta de la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones y a la región circundante interfacial, resultando un aumento de concentración de iones, de carga opuesta a la de la partícula. En la capa líquida que rodea la partícula se pueden distinguir dos partes, una región anterior, la capa *Stern*, la cual tiene iones fuertemente ligados y la exterior, región difusa en la que están unidos más débilmente (Figura 4.4.). Así la doble capa eléctrica está alrededor de cada partícula. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico con iones en las partículas de forma estable [Delgado y cols., 2007].



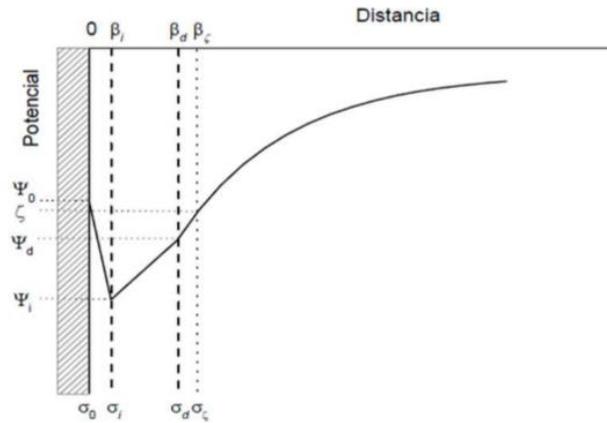
**Figura 4.4.** Representación de la carga eléctrica superficial de un sólido cuando se dispersan en un disolvente polar

Cerca de la superficie del sólido o sobre ella, se pueden encontrar cargas responsables de la carga superficial (densidad superficial,  $\sigma_0$ ). En su proximidad inmediata, podrían localizarse los iones capaces de sufrir adsorción específica: la distancia al sólido será el 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  $\sigma_1$  a la carga superficial en un determinado plano de átomos, localizados a una distancia  $\beta_i$  desde el sólido (Figura 4.5.). Si aceptamos que la interfase tiene una geometría plana y que  $\chi$ , es la distancia externa normal a ésta, podríamos decir que la región entre  $\chi = 0$  y  $\chi = \beta_i$  está libre de carga y podemos identificar un condensador cuyas placas son la superficie y el plano  $\beta_i$ . Si  $C_i$  es su capacidad específica (por unidad de área):

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

donde  $\psi_0$  es el potencial en la superficie del sólido. Los iones responsables del  $\psi_i$  no sólo desarrollarán interacciones electrostáticas con la superficie, sino que, a menudo, superarán la repulsión eléctrica y son capaces, por ejemplo, de aumentar la carga positiva de una superficie de carácter ya positivo. Es habitual decir que las interacciones desconocidas son de naturaleza química, a pesar de no ser este siempre el caso. Hay una amplia variedad de situaciones, desde la formación de uniones químicas (covalentes) a interacciones más débiles como la atracción de van del Waals, los enlaces por puentes de hidrógeno, las fuerzas hidrófobas-hidrófilas, etc [van Oss, 2006]. Debido a la ausencia

habitual de información sobre la parte más interna de la atmósfera iónica, el tratamiento no está exento de hipótesis menos reales.



**Figura 4.5.** Distribución del potencial en una interfase sólido líquido cargada negativamente.

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

Para una interfase plana:

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

Para una fase esférica:

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

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

Debido a la electroneutralidad se cumplirá:

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

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

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

Hay diversos modelos matemáticos para explicar fenómenos de este tipo. A distancias mayores en la capa difusa, las interacciones específicas son despreciables, por lo que la estructura de esta capa se obtiene considerando la fuerza ejercida por el campo medio y las fuerzas difusivas que tienden a restituir a una concentración uniforme.

El modelo más sencillo es el llamado *Gouy-Chapman* donde se considera a la disolución ideal. En condiciones de equilibrio, la concentración iónica sigue la distribución de Boltzman [Delgado y cols., 2002]. Nos permiten conocer el perfil del potencial eléctrico y, por tanto, la concentración iónica. Facilita el estudio de sistemas biológicos complejos.

Existen modelos más realistas para estudiar la doble capa eléctrica en equilibrio, donde se considera que los iones de la capa difusa están hidratados y por tanto ocupan cierto volumen, la repulsión estérica puede ser tenida en cuenta añadiendo al modelo anterior un potencial químico en exceso. Las correcciones al modelo de Poisson-Boltzman son importantes en el caso de concentraciones iónicas para las que la distancia media entre iones es de orden del tamaño iónico (López-García y cols., 2014).

Por tanto, un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de *Stern*, o también llamada fija. Este potencial, conocido como potencial zeta ( $\zeta$ ), es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial  $\zeta$  puede ser una

manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides.

Cuando se mueve, por ejemplo por acción de la gravedad, los iones de dentro de los límites se mueven, pero no más allá del límite pues éstos viajan con la partícula. Éste límite se llama superficie hidrodinámica de deslizamiento plano "*slipping plane*". El potencial que existe en este límite es el potencial  $\zeta$ .

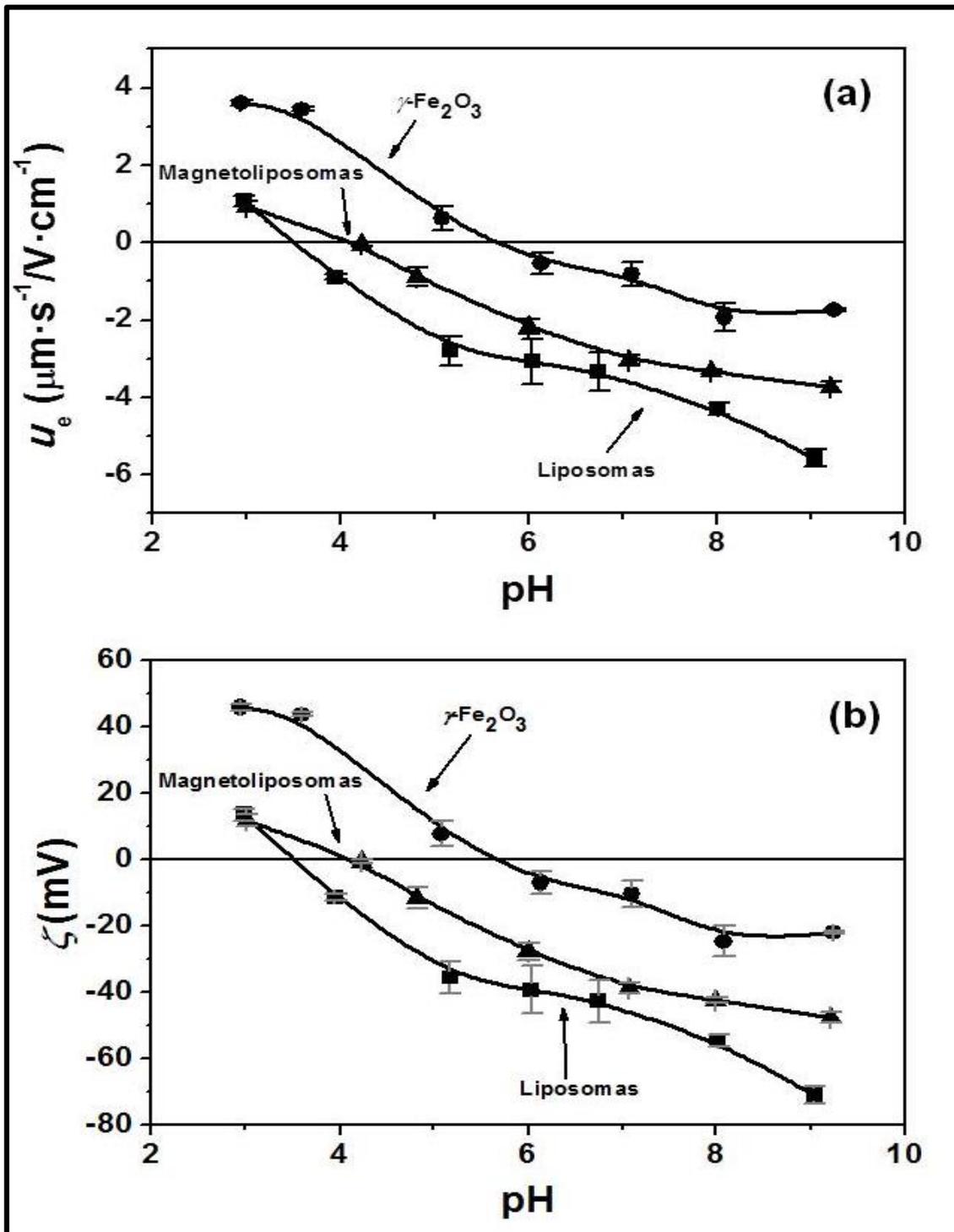
#### **4.2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

La determinación de la movilidad electroforética ( $u_e$ ) de los tres tipos de partículas en dispersión acuosa ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, liposomas y magnetoliposomas) se llevó a cabo a  $25.0 \pm 0.2$  °C, utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Manual Instruments, Inglaterra). Este aparato permite determinar la  $u_e$  con errores del 5% o inferiores. La temperatura fue mantenida constante durante las determinaciones utilizando un módulo Peltier.

Las dispersiones analizadas tenían una concentración de partículas aproximada del 0.1% (p/v). Antes de preparar cada suspensión, se fijó la concentración de electrolito (KNO<sub>3</sub>) deseada y se ajustó, en su caso, el pH (entre 3 y 9) con HNO<sub>3</sub> y NaOH. Debido a la dificultad de ajuste de ciertos pHs, la preparación de las dispersiones se realizó cuando éstos eran estables. De esta forma, las partículas no estuvieron demasiado tiempo en contacto con el medio de dispersión acuoso, lo que podría afectar a la estabilidad de sus propiedades eléctricas superficiales debido a fenómenos de oxidación y de degradación principalmente [Arias y cols., 2001; Plaza y cols., 2002]. Las medidas se realizaron tras 24 horas de contacto de las partículas con el medio de dispersión a  $25.0 \pm 0.5$  °C y bajo agitación mecánica a 50 r.p.m. Antes de cada medida, se comprobó y reajustó el pH si fue necesario. Los datos representados en las Figuras son el promedio de nueve determinaciones, cambiando la muestra analizada cada tres.

### 4.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, analizamos el efecto del pH sobre la movilidad electroforética ( $u_e$ ) y el potencial zeta ( $\zeta$ ) de las partículas. Como es sabido, las propiedades de los óxidos de hierro son extremadamente sensibles a las variaciones de pH (Plaza y cols., 2002). La Figura 4.6. muestra los valores de  $u_e$  y de  $\zeta$  en función del pH del medio de dispersión y en presencia de una fuerza iónica fijada ( $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M). Observamos que los núcleos de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero definido en torno a un valor de de pH 5.7. De forma que a pHs ácidos los valores de  $\zeta$  son positivos y a partir del punto isoeléctrico pasan a ser negativos. Sin embargo, el punto isoeléctrico de los liposomas se encuentra en torno al valor de pH 4. Es interesante ver cómo en el caso de los magnetoliposomas ocurre lo mismo, lo que nos indica que tienen un comportamiento electrocinético similar al de los liposomas. Las propiedades electroforéticas de liposomas y magnetoliposomas son consecuencia de la naturaleza disociable del grupo fosfato de la PC. En el caso de un medio de dispersión de pH básico, el grupo fosfato se encontrará disociado por la presencia de grupos hidroxilo en el medio. El aumento progresivo del número de grupos fosfato disociados conforme se incrementa el pH, determina el incremento de la carga eléctrica superficial negativa de las partículas. Por otro lado, a pHs ligeramente ácidos, el descenso de la carga eléctrica superficial conforme decrece el pH se debe a la disminución progresiva del número de grupos fosfato disociados, consecuencia del aumento de la concentración de hidrogeniones en el medio. Finalmente, los valores positivos de carga eléctrica superficial de estas partículas por debajo del pH 4 podrían ser debidos a la adsorción superficial del exceso de hidrogeniones presentes en el medio de dispersión.

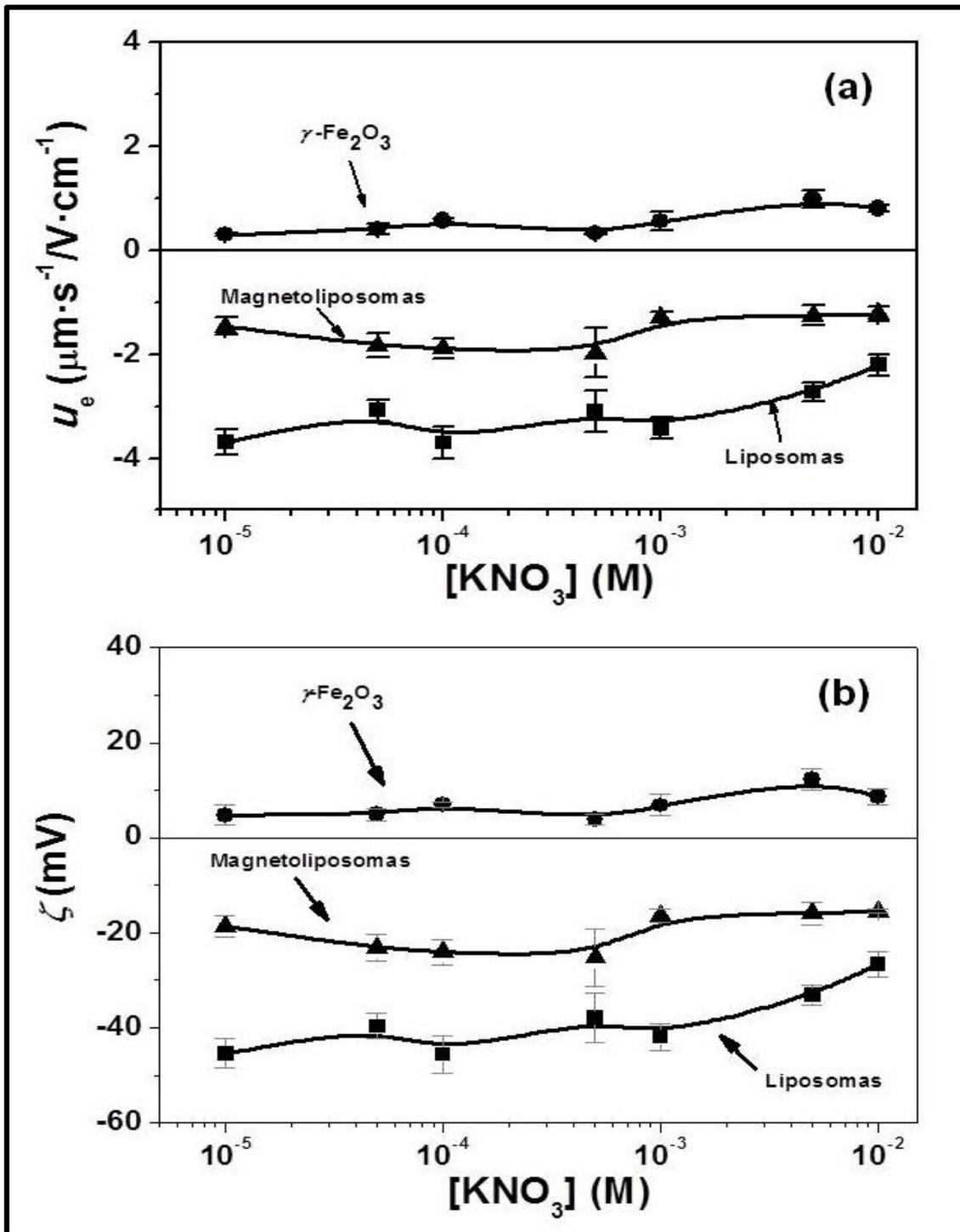


**Figura 4.6.** Movilidad electroforética ( $u_e$ ) (a) y potencial zeta ( $\zeta$ ) (b) de las partículas de maghemita (●), liposomas (■) y magnetoliposomas (▲) en función del pH, en presencia de  $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M.

Por lo tanto, podemos concluir que el recubrimiento lipídico oculta eficazmente los núcleos magnéticos, haciendo que la superficie de los magnetoliposomas sea muy

parecida a la de los liposomas. Además, podemos afirmar que estas diferencias entre el comportamiento de los núcleos de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y los dos tipos de coloides hacen que la electroforesis sea una herramienta muy útil para confirmar cualitativamente la eficacia de la metodología desarrollada para la síntesis de magnetoliposomas.

Para confirmar estos resultados, evaluamos las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de partículas en función de la fuerza iónica (concentración de  $\text{KNO}_3$ ) a pH 5.5 y siguiendo la misma metodología. Los resultados de este análisis representan una evidente electrosimilitud entre los liposomas y los magnetoliposomas, y las diferencias con respecto a los núcleos de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Como puede apreciarse en la Figura 4.7., los valores de  $u_e$  y de  $\zeta$  de los magnetoliposomas son muy similares a los de los liposomas. Sin embargo, la maghemita mantiene valores positivos de carga eléctrica superficial en todo el intervalo fijado de concentraciones de  $\text{KNO}_3$ . Así, se comprueba que este análisis constituye una adecuada prueba cualitativa de la eficacia de la metodología desarrollada para la síntesis de magnetoliposomas.

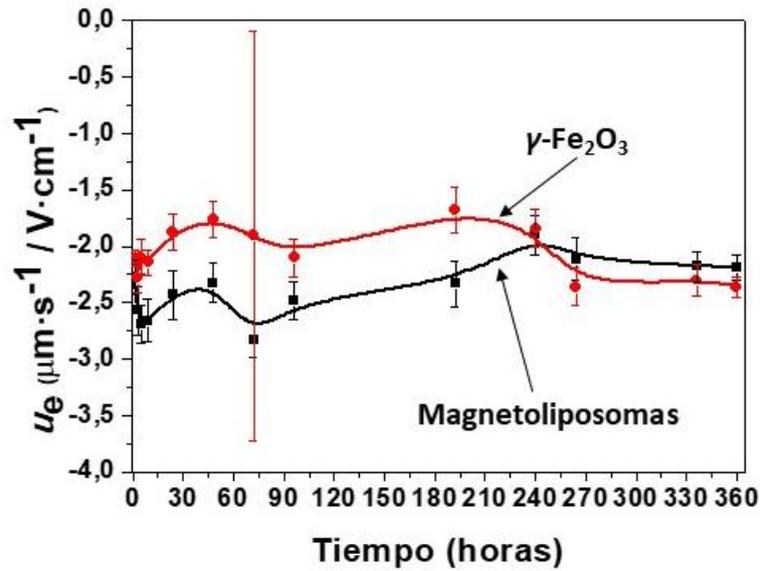


**Figura 4.7.** Movilidad electroforética ( $u_e$ ) (a) y potencial zeta ( $\zeta$ ) (b) de las partículas de maghemita ( $\bullet$ ), liposomas ( $\blacksquare$ ) y magnetoliposomas ( $\blacktriangle$ ) en función de la concentración de  $\text{KNO}_3$  y a pH natural (pH 5.5).

#### 4.2.4. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE LOS MAGNETOLIPOSOMAS

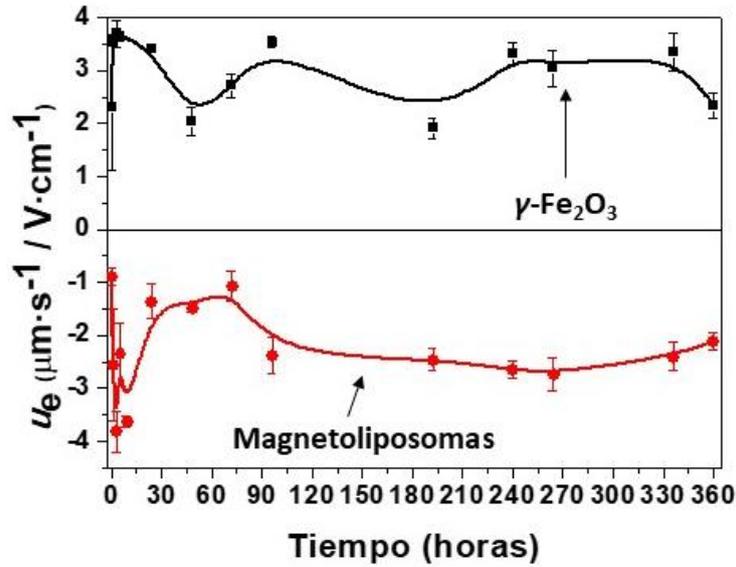
La experiencia adquirida en nuestro grupo de investigación en la caracterización electrocinética de nanopartículas magnéticas compuestas [Arias y cols., 2001, 2005, 2006, 2007a, 2008a, 2009a, 2010a, 2010b; Pérez-Artacho y cols., 2012; Clares y cols., 2013], nos hace pensar que la técnica de electroforesis puede ser muy útil para caracterizar la velocidad a la que la matriz liposomal se degrada y deja zonas cada vez mayores de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  expuestas al medio de dispersión. Las medidas electroforéticas de las dispersiones acuosas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y de los magnetoliposomas (concentración  $\approx 0.1\%$ , m/v) se realizaron reproduciendo las condiciones fisiológicas ( $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$ , y  $37.0 \pm 0.5$  °C) (Malvern Zetasizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Las medidas se tomaron por triplicado durante 16 días.

En la Figura 4.8. se aprecia cómo los valores de  $u_e$  de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  permanecen constantes durante todo el período del estudio ( $u_e \approx -2.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). En el caso de los magnetoliposomas, observamos que los valores también se mantienen durante todo el período de estudio y que son prácticamente iguales a los valores de  $u_e$  de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Por tanto, no podemos demostrar la degradación de la cubierta liposomal, ya que se mantienen la movilidad electroforética durante todo el tiempo de estudio.



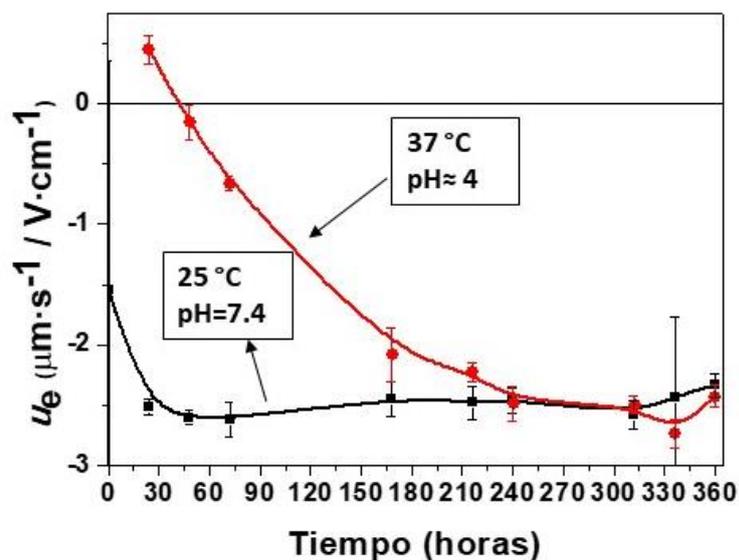
**Figura 4.8.** Evolución de los valores de movilidad electroforética ( $u_e$ ) de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (●) y de los magnetolisosomas (■) en función del tiempo (horas), a  $\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$  y a  $37.0 \pm 0.5$  °C.

Este valor casi igual de movilidad para los dos tipos de partículas nos pone en duda de sí se habrán formado los magnetolisosomas. Por tanto, para demostrar que éstos se han formado se llevó a cabo un estudio control de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y de los magnetolisosomas a temperatura ambiente y utilizando como medio de dispersión el agua durante el mismo período de tiempo. En la figura 4.9. se observa como los valores de  $u_e$  de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  se mantienen positivos durante todo el período de estudio ( $u_e \approx 3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), algo lógico teniendo en cuenta que al añadir las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  el pH de la suspensión alcanza un valor próximo a 4. En cuanto a los magnetolisosomas, se observa que los valores se mantienen negativos durante todo el estudio a pH 5.5. ( $u_e \approx -2.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) lo que confirma que éstos se han formado perfectamente (veáse Fig. 4.6.a).



**Figura 4.9.** Evolución de los valores de movilidad electroforética ( $u_e$ ) de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (●) y de los magnetoliposomas (■) en función del tiempo (horas), a  $\text{pH}\approx 4 \pm 0.1$  y a  $37.0 \pm 0.5$  °C.

Para terminar de completar el estudio, se realizó una curva control de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  en diferentes situaciones: a  $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$  y  $25.0 \pm 0.5$  °C; y  $\text{pH } 4 \pm 0.1$  y  $37.0 \pm 0.5$  °C. Los estudios llevados a cabo nos hacen pensar que a la maghemita le ocurre algo al cambiar la temperatura. En la figura 4.10. se encuentran representadas las dos curvas de maghemita a diferente temperatura y pH del medio de la dispersión. Se observa a 25 °C y  $\text{pH}=7.4$  como se mantienen los valores de movilidad electroforética negativos para la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ( $u_e \approx -2.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Sin embargo, a 37 °C y en agua (al añadir las partículas de maghemita la suspensión adquiere un  $\text{pH}\approx 4$ ) la movilidad electroforética de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  comienza siendo positiva durante las primeras horas de estudio ( $u_e \approx -0.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y después comienzan a obtenerse valores negativos hasta igualarse con los valores de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a  $\text{pH}=7.4$  ( $u_e \approx -2.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 4.10.** Evolución de los valores de movilidad electroforética ( $u_e$ ) de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a  $\text{pH}\approx 4 \pm 0.1$  y a  $37.0 \pm 0.5$  °C. (●) y de los nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a  $\text{pH}=7.4 \pm 0.1$  y a  $25.0 \pm 0.5$  °C. (■) en función del tiempo (horas).

#### **4.3. PROPIEDADES TERMODINÁMICAS SUPERFICIALES**

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

Se estimará así la importancia de las contribuciones no electrostáticas al balance total de la energía de interacción entre las nanopartículas de los sistemas analizados. Para llevar a cabo esta determinación, se utilizaron los datos experimentales de los ángulos de contacto formados por líquidos seleccionados con los tres tipos de sistemas:  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , liposomas y magnetoliposomas. Además, se prestó especial atención al análisis comparativo de la energía libre superficial de estos tres tipos de nanomateriales puros.

A continuación se explica con más detalle los diferentes tipos de interacciones entre las partículas coloidales.

#### **4.3.1. INTERACCIONES SUPERFICIALES**

La principal interacción que existe entre las partículas coloidales cargadas en un medio acuoso es la interacción electrostática (*EL*). Este tipo de interacción nos da idea del alcance e intensidad de la repulsión electrostática. Además de esta, existen otras interacciones que pueden alcanzar valores significativos. Las más significativas son:

- interacciones dispersivas, interacciones electrodinámicas o Lifshitz-van de Waals (*LW*). Se llaman así por su relación con fenómenos de dispersión de luz en el visible y en 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).

#### 4.3.1.1. INTERACCIONES DISPERSIVAS.

Van der Waals fue el primer investigador que sugirió que en los líquidos y gases ideales existe una interacción entre átomos y moléculas de naturaleza diferente de la electrostática (interacción de van der Waals). Más adelante, diversos investigadores analizaron la naturaleza de esta forma de interacción (Debye, 1921; Langbein, 1974; London, 1930). Según estos autores, cuando dos átomos o moléculas se encuentran en el vacío, se pueden considerar tres contribuciones diferentes a la interacción de van der Waals:

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

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

interacciones electrodinámicas, denominadas genéricamente interacciones Lifshitz-van der Waals ( $LW$ ).

Debe recordarse que aunque las interacciones dispersivas son débiles en comparación con las electrostáticas responsables del alcance iónico o del covalente, estas afectan de forma considerable, a un variado conjunto de fenómenos relacionados con los sistemas coloidales, tales como la adhesión, la adsorción, la agregación de partículas en suspensión o la estructura de macromoléculas condensadas, como polímeros o proteínas [Israelachvili, 1987]. Resumiendo, las características esenciales de estas interacciones son:

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

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

#### **4.3.1.2. INTERACCIONES NO-DLVO**

Hay una serie de fenómenos relacionados con la estabilidad coloidal, que no se pueden explicar sólo mediante la interacción electrostática entre dobles capas eléctricas y las fuerzas de van der Waals. Así, por ejemplo, el hinchamiento espontáneo de arcillas secas cuando están en contacto con agua [van Olphen, 1977]. Tampoco puede

explicarse por qué las dispersiones de sílice no coagulan en el punto isoeléctrico (o pH de potencial zeta cero) en el seno de disoluciones salinas concentradas [Allen y Matijević, 1969]. Recientemente, se han encontrado comportamientos similares en suspensiones de sulfuro de zinc [Durán y cols., 1995] o de látex de etilcelulosa [Vera y cols., 1996], entre otros ejemplos [Laskowski y Pugh, 1992]. Por eso ha sido necesario introducir las denominadas fuerzas no-DLVO (cuyo alcance es del orden de pocos nanómetros), entre las que se incluyen la repulsión hidrófila, la atracción hidrófoba, los enlaces de hidrógeno, los enlaces  $\pi$ , o la presión osmótica en suspensiones muy concentradas de polímeros. Las fuerzas más conocidas son las que tienen su origen en la solvatación de las superficies (por lo que se denominan estructurales), pudiendo ser atractivas (efecto hidrófobo), repulsivas (efecto hidrófilo) e incluso oscilatorias. Son interacciones de tipo polar y pueden llegar incluso a alcanzar un valor dos órdenes de magnitud superior a las interacciones  $EL$  y  $LW$ . Analizaremos a continuación los aspectos físicos fundamentales de estas fuerzas no-DLVO.

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

La situación es mucho más compleja en los sistemas físicos reales: en el caso de existir una interacción atractiva entre la superficie y las moléculas de líquido adyacentes, el empaquetamiento molecular descrito será más denso y la fuerza resultante entre las

fases sólidas, aunque oscilatoria, tendrá una componente repulsiva de largo alcance. Si, por el contrario, la interacción superficie-líquido es más débil que la interacción líquido-líquido, la fuerza de solvatación oscilatoria presentará una componente monótona atractiva.

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

#### **4.3.1.3. CONTRIBUCIONES A LA ENERGÍA LIBRE SUPERFICIAL. TEORÍA DE VAN OSS Y COLS.**

Para poder predecir el valor que adquieren las interacciones ya descritas en este capítulo [Lifshitz-van der Waals (*LW*) y ácido-base (*AB*)] es necesario hacer previamente una caracterización termodinámica de la superficie. Para ello, consideraremos el proceso reversible de acercar dos sistemas físicos en el vacío, formados por un sólido o líquido, *1*, hasta formar una fase continua donde entran en contacto superficies iguales unitarias [Good, 1992]. 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 *1* ( $\gamma_1$ ) de la forma:

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

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

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

$$\Delta G_{A,12} = -W_{A,12} = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad (2)$$

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:

$$\Delta G_{123} = \gamma_{13} - \gamma_{12} - \gamma_{23} \quad (3)$$

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

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} \quad (4)$$

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

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

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + \gamma_1^{AB} \quad (5)$$

El siguiente paso es postular una regla de combinación para calcular la contribución del carácter ácido y básico a las energías libres de adhesión a través de la interfase, o a la energía interna de cohesión de una fase. La ecuación 5 se puede hacer extensiva a la energía libre de la interfase 1-2:

$$\gamma_{12} = \gamma_{12}^{LW} + \gamma_{12}^{AB} \quad (6)$$

A continuación, se expresa matemáticamente cada uno de los dos sumandos de la tensión superficial de la ecuación 6. Utilizando la regla de Good-Girifalco [Good y Girifalco, 1960; Overbeek, 1952], el primer término  $\gamma_{12}^{LW}$  queda de la forma:

$$\gamma_{12}^{LW} = \left( \sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}} \right)^2 = \gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW} - 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} \quad (7)$$

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

$$\gamma_{12}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+}\right) = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_2^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_2^-}\right) \quad (8)$$

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 8 para una fase queda de la forma:

$$\gamma_1^{AB} = 2\sqrt{\gamma_1^+\gamma_1^-} \quad (9)$$

Sustituyendo la ecuación 9 en la ecuación 8:

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + 2\sqrt{\gamma_1^+\gamma_1^-} \quad (10)$$

Sustituyendo las ecuaciones 7 y 8 en la ecuación 6, y teniendo en consideración la ecuación 10, se obtiene:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} - 2\sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} - 2\sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+} \quad (11)$$

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

Es usual hacer una clasificación de los materiales en función de los valores que adquieren las componentes ácido y base de Lewis: bipolares, si las moléculas se comportan como ácidos y bases de Lewis simultáneamente; monopolares, cuando

una de esas dos componentes (ácido o base) es despreciable o nula frente a la otra; y apolares, si se anulan ambas componentes. Si un material es monopolar, no existe el término  $\gamma^{AB}$ , y la tensión superficial total ( $\gamma_i$ ) es igual al término  $LW$ . No obstante, tales materiales 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. Sin embargo, cuando estos cuerpos están inmersos en un líquido, puede surgir una interacción repulsiva. Con respecto a la interacción  $LW$ , solamente aquella que tiene lugar entre dos materiales diferentes 1 y 3, inmersos en un líquido 2, puede ser repulsiva [Derjaguin, 1954; Fowkes y Mostafa, 1978; Hamaker, 1937; Visser, 1972] siempre que la componente apolar del líquido ( $\gamma_2^{LW}$ ), cumpla:  $\gamma_1^{LW} < \gamma_2^{LW} < \gamma_3^{LW}$  [Neumann y cols., 1979; van Oss, 2006].

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

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

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

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

. En medio acuoso, la componente  $AB$  de la energía de cohesión del agua, debido a sus enlaces por puentes de hidrógeno es  $102 \text{ mJ/m}^2$ . Este valor es lo suficientemente elevado como para imponer un efecto atractivo neto entre superficies de partículas apolares o débilmente polares (efecto hidrófobo).

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

#### **4.3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

La tensión superficial ( $\gamma$ ) de un líquido y la tensión interfacial entre dos líquidos ( $\gamma_{12}$ ) son dos magnitudes a las que se puede tener acceso experimental de forma directa. Sin embargo, en el caso de los sólidos, es necesario recurrir a medidas de otras magnitudes para poder obtener a partir de ellas los valores de las tensiones superficiales. Junto con la técnica de penetración de líquidos en capa fina, la técnica de medida de ángulos de contacto es la más importante y habitual. Ambas han sido descritas con detalle en trabajos anteriores [Chibowski y cols., 1993; Durán y cols., 1994, 1995; Arias y cols., 2011]. A continuación, realizamos una breve descripción de la técnica de medida de ángulos de contacto, pues es la que hemos utilizado en nuestro trabajo.

El sistema físico al que se aplica esta técnica está constituido por una superficie sólida ( $S$ ), una gota de líquido ( $L$ ) depositada sobre ella y el aire. Mediante la medida del ángulo de contacto ( $\theta$ ) entre la fase líquida y la gaseosa que la rodea (interfase líquido-gas) se obtienen los valores de las componentes de la tensión

superficial del sólido. La aplicación de este método está restringida a los casos en los que la superficie del sólido es plana, homogénea y rígida a escala macroscópica.

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

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_L \cos\theta \quad (13)$$

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 13 se puede escribir de la forma:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos\theta + \pi_e \quad (14)$$

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

$$\pi_e \equiv \gamma_S - \gamma_{SV} \quad (15)$$

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

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos\theta \quad (16)$$

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

Una vez medidos los ángulos de contacto, es posible determinar los componentes de la energía superficial del sólido. Sustituyendo en la Ecuación 16 el valor de  $\gamma_{SL}$  dado por la Ecuación 11 se obtiene:

$$2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} = \gamma_L (1 + \cos \theta) \quad (17)$$

Midiendo los ángulos de contacto formados por tres líquidos diferentes, de los que se conocen las componentes de su tensión superficial, se puede establecer un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas como la Ecuación 17, a partir de la cual se calcularán los valores de las componentes del sólido. Por lo general, se suelen utilizar dos líquidos polares y uno apolar.

El análisis termodinámico superficial se efectuó en los tres tipos de nanopartículas sintetizadas: núcleo magnético ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), liposomas y magnetoliposomas obtenidos utilizando la relación de masas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{:PC}$  seleccionada 4:2. Los líquidos empleados fueron: agua doblemente destilada y

desionizada, formamida (Carlo Erba, Italia) y  $\alpha$ -bromonaftaleno (Merck, Alemania). En la aplicación del modelo de van Oss se utilizaron los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba empleados (Tabla 4.1.) (van Oss, 2006).

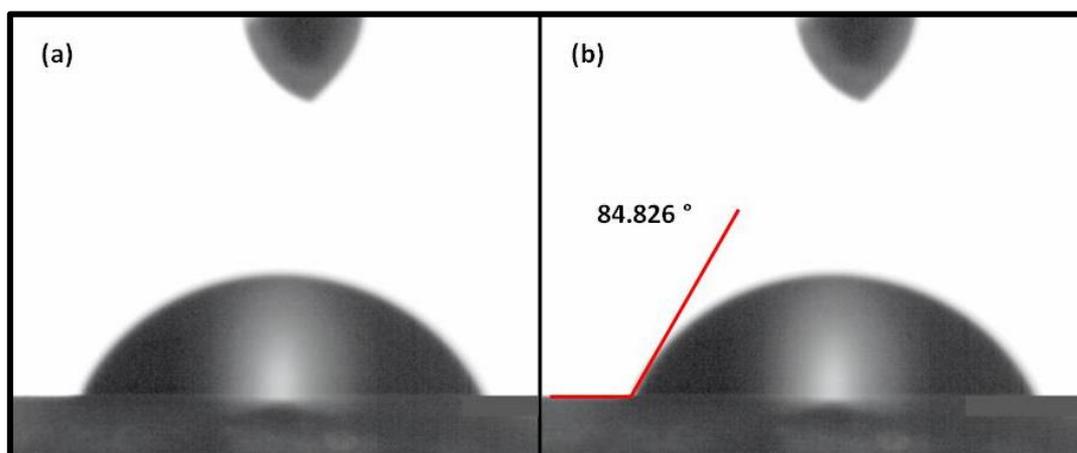
**Tabla 4.1.** Componentes de la tensión superficial ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ ) a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  de los líquidos utilizados en el experimento de medida del ángulo de contacto.  $\gamma_s^{\text{LW}}$ : componente de Lifshitz-van der Waals;  $\gamma_s^+$  ( $\gamma_s^-$ ): componente electrón-aceptor (electrón-donante).

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

La medida de los ángulos de contacto se realizó con un goniómetro Ramé-Hart 100-0.7-00 (Ramé-Hart Instruments, 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 Gilmont (Gilmont Instruments, EE.UU.) permite controlar el volumen de la gota depositada entre 2 y 4  $\mu\text{L}$ . Las medidas se realizaron a  $25.0 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ , utilizando una cámara termostática. La captura de las imágenes de las gotas de los líquidos depositados sobre la superficie de los materiales se obtuvieron mediante una cámara CCD (Pixelink PL-A662, Canada) y un sistema de análisis digital de imágenes.

Los ángulos de contacto de los líquidos seleccionados se determinaron sobre capas delgadas y uniformes de los tres tipos de partículas depositadas sobre portaobjetos de microscopio. Estas superficies lisas se consiguieron tras la adición de una suspensión acuosa de cada tipo de partículas ( $\approx 10\%$ , p/v) sobre la superficie limpia y seca de una placa de vidrio. En la preparación de la muestra se comprobó que con la adición de 10 mL de suspensión acuosa de nanopartículas se obtenía una capa de material

suficientemente gruesa y uniforme. La desecación de los portaobjetos se realizó a  $35.0 \pm 0.5$  °C, en un horno de convección con circulación forzada de aire (Digitronic, J.A. Selecta, S.A., España). De esta manera, se obtuvo una capa de material muy uniforme a nivel macroscópico, que permitió la medida de los ángulos de contacto en gotas muy estables (Figura 4.5.).

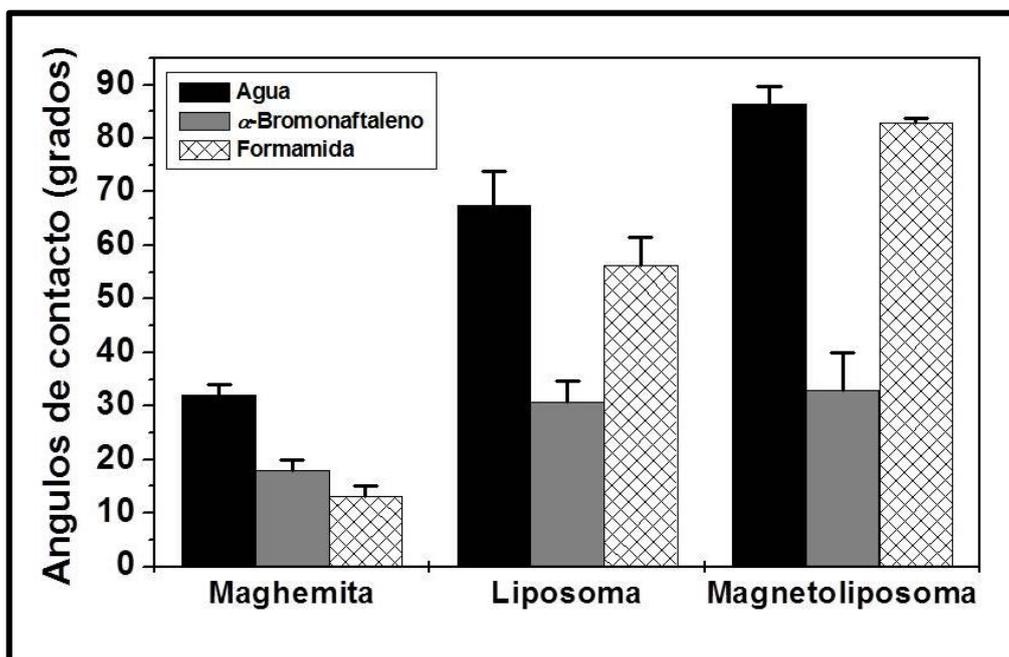


**Figura 4.5.** Ejemplo de la determinación del ángulo de contacto formado por una gota de agua sobre una superficie lisa, gruesa y uniforme de magnetoliposomas. (a) Fotografía de gota formada en las condiciones de medida; y, (b) análisis digital de la imagen que implica el ajuste del perfil de la gota y la evaluación del ángulo del contacto ( $\theta$ ).

### 4.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

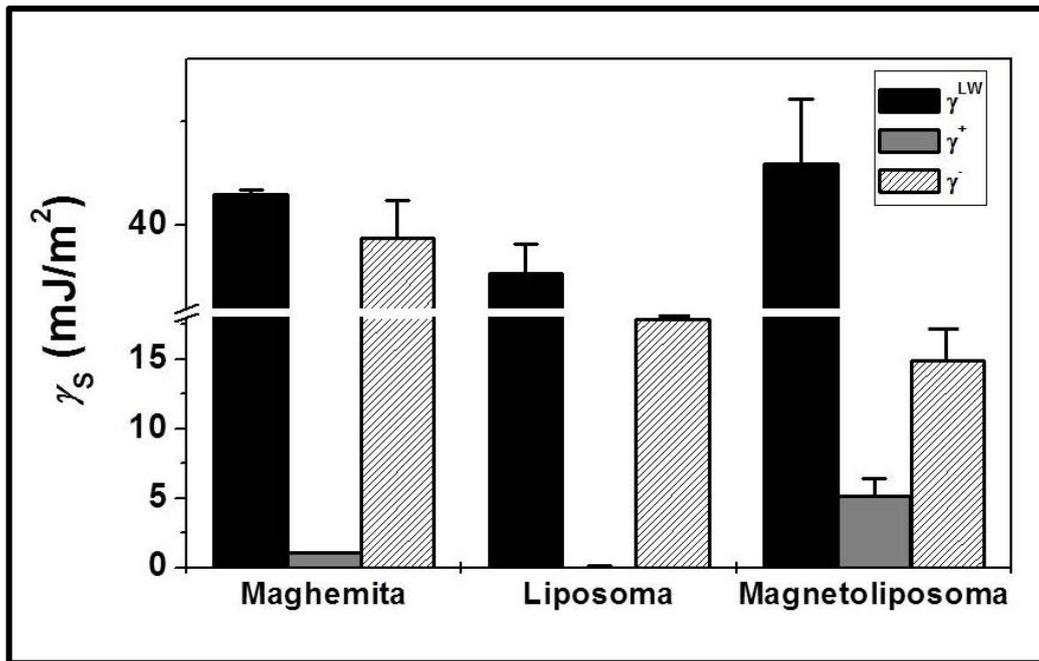
#### 4.3.3.1. Componentes de la energía libre superficial

En la Figura 4.6. se recogen los valores promedio de los ángulos de contacto ( $\theta$ ) obtenidos tras realizar 16 determinaciones midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Los datos obtenidos ponen de manifiesto la existencia de importantes diferencias entre los núcleos de óxido de hierro y los magnetoliposomas. De hecho, estos resultados confirman en gran medida nuestras estimaciones sobre la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos basados en las propiedades electrocinéticas (ver Sección 4.3.2.).



**Figura 4.6.** Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones con nanopartículas de maghemita, liposomas y magnetoliposomas.

Sin embargo, para aportar una información física veraz sobre la termodinámica de los tres tipos de superficies es necesaria la evaluación de las componentes de la  $\gamma_s$  (Figura 4.7.). De forma general, puede decirse que los valores de las componentes de la energía libre superficial de los magnetoliposomas se asemejan más a las de los liposomas. En concreto, la contribución electrón-donante ( $\gamma_s^-$ ) muestra una diferencia mucho más notable entre los núcleos de óxido de hierro y los magnetoliposomas. El elevado valor de esta componente en el caso de la  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  confirma su carácter monopolar electrón-donante (van Oss, 2006; Pérez-Artacho y cols., 2012) lo que quiere decir que puede tener interacciones ácido-base ( $AB$ ) 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 4.7.** Componentes de la energía libre superficial  $\gamma_s$  (mJ/m<sup>2</sup>) de la maghemita, liposomas y magnetoliposomas.  $\gamma_s^{LW}$  es la componente de Lifshitz-van der Waals;  $\gamma_s^+$  ( $\gamma_s^-$ ) es la componente electrón-aceptor (electrón-donante).

#### 4.3.3.2. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba

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

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

$$\Delta G_{121} = \Delta G_{121}^{LW} + \Delta G_{121}^{AB} \quad (18)$$

Haciendo uso de la ecuación 18, pueden obtenerse los valores de  $\Delta G_{121}$  que se muestran en la Figura 4.8. Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en el carácter hidrófobo/hidrófilo de los diferentes materiales estudiados. De hecho, puede utilizarse el siguiente criterio para determinar cuándo un material puede considerarse hidrófilo o hidrófobo (van Oss, 2006): Si  $\Delta G_{121}$  resulta ser negativo, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las nanopartículas, y éstas se consideran hidrófobas. Por el contrario, la hidrofilia se corresponde con valores positivos de  $\Delta G_{121}$ . La figura 4.8. muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de nanomateriales. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila de la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  se pierde al ser recubierta por la vesícula liposomal hidrófoba. Esto puede considerarse un indicio muy claro de que dicho recubrimiento es completo y de que la metodología desarrollada para la síntesis de los magnetoliposomas es eficaz.

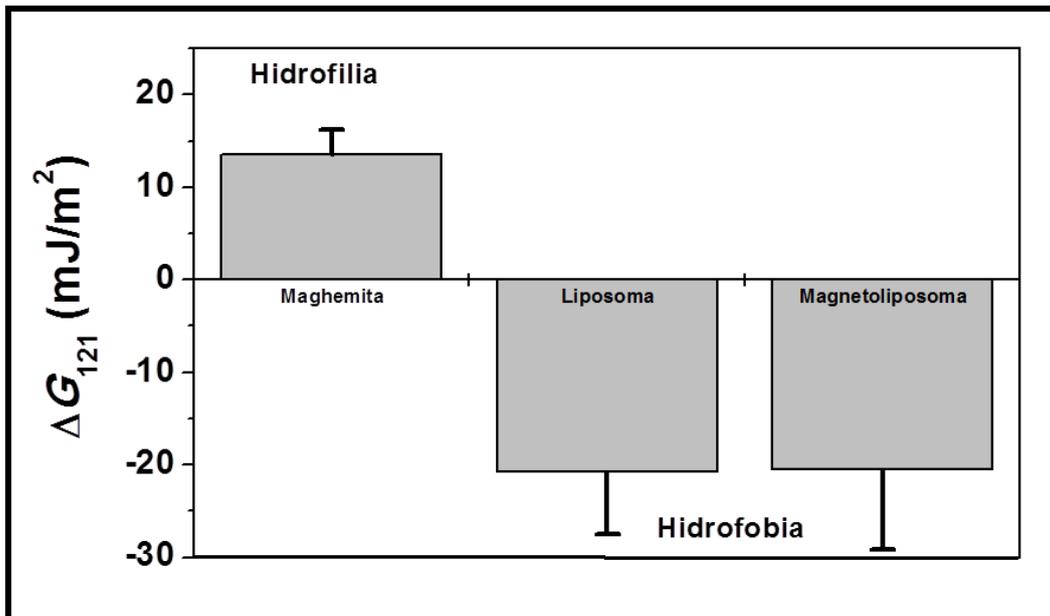


Figura 4.8. Valores de  $\Delta G_{121}$  (mJ/m<sup>2</sup>) y carácter hidrófilo/hidrófobo de la maghemita, liposomas y magnetoliposomas.

#### 4.5. PROPIEDADES MAGNÉTICAS

Las propiedades magnéticas macroscópicas de los materiales son consecuencia de los momentos magnéticos asociados con sus átomos individuales. En un átomo, cada electrón tiene momentos magnéticos que se originan de dos fuentes distintas. Uno de ellos, se origina a partir del movimiento orbital del propio electrón alrededor del núcleo, y el otro, a partir de la rotación (spin) del electrón a lo largo del eje de rotación. Por lo tanto, el momento magnético neto de un átomo es justamente la suma de los momentos magnéticos de cada uno de los electrones constituyentes, incluyendo tanto las contribuciones orbitales como de espín y tomando en consideración la cancelación de los momentos. De forma general, todos los materiales presentan al menos un tipo de magnetismo, dependiendo su comportamiento de la respuesta del electrón y de los dipolos magnéticos atómicos cuando se aplica un gradiente de campo magnético externo. Son varios los tipos de magnetismo que existen (Callister, 1996):

- Diamagnetismo. Es una forma muy débil de magnetismo y persiste sólo cuando un gradiente de campo magnético está presente, produciéndose así un

cambio en el movimiento orbital de los electrones del material. Está asociado a átomos cuyo momento magnético es nulo. La permeabilidad magnética relativa ( $\mu_r$ ) es ligeramente menor que la unidad y la susceptibilidad magnética ( $\chi$ ) 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.

- Paramagnetismo. Es característico de aquellos átomos o moléculas que tienen momentos magnéticos permanentes que no interactúan entre sí y que en ausencia de un gradiente de campo magnético externo están orientados al azar, de modo que una porción cualquiera de material no posee imanación neta permanente. Estos dipolos atómicos son libres para girar y se producirá paramagnetismo cuando, mediante rotación, se alineen de forma preferente con un gradiente de campo magnético externo. La susceptibilidad es positiva y depende de la temperatura, y la permeabilidad será ligeramente mayor que la unidad. Dentro de esta propiedad destaca el superparamagnetismo por sus implicaciones biomédicas. Esta propiedad es debida a un cambio cualitativo en la estructura de los materiales magnéticos nanométricos, la cual pasa de estar constituida por numerosos dominios magnéticos, a estar formada por un único dominio magnético. Esta estructura determina una reducción muy importante de la barrera de anisotropía magnética, lo que provoca la desaparición de la histéresis (Álvarez Paneque y cols., 2008).

- Ferromagnetismo. Consiste en una fuerte interacción entre los momentos dipolares atómicos vecinos que, incluso, persiste tras la supresión del gradiente de campo magnético externo. Es decir, las interacciones de acoplamiento hacen que los momentos magnéticos netos de espín de átomos adyacentes se alineen unos con otros aun en ausencia de gradiente de campo magnético aplicado. Esta alineación mutua de los espines se presenta en volúmenes relativamente grandes del cristal denominados dominios. La máxima imanación posible (magnetización de saturación,  $M$ ) corresponde a la situación en que todos los dipolos magnéticos en una muestra sólida están mutuamente alineados con el

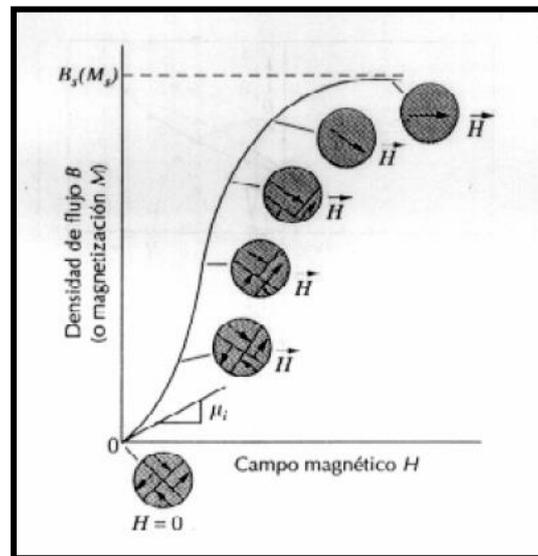
gradiente externo. Estos materiales presentan una permeabilidad magnética relativa en torno a  $10^5$  y una susceptibilidad magnética positiva y muy grande, ambas dependientes del gradiente de campo magnético ( $H$ ) y de la temperatura. Podemos disminuir la efectividad del acoplamiento entre átomos vecinos que causa el ferromagnetismo al sobrepasar la temperatura de Curie, aquella a la cual un material ferromagnético se transforma en paramagnético.

- Antiferromagnetismo. Se produce un alineamiento antiparalelo de los dipolos vecinos con el campo magnético. Esto produce una magnetización nula.
- Ferrimagnetismo. La interacción de intercambio entre momentos magnéticos favorece también la alineación antiparalela, pero los momentos no son idénticos en módulo, por lo que no se cancelan completamente. Por este motivo, su comportamiento será similar al de los ferromagnéticos.

#### 4.5.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

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 que la dirección de imanación cambia gradualmente. La densidad de flujo ( $B$ ) y la intensidad del de campo gradiente magnético ( $H$ ) no son proporcionales en el caso de los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos. Si el material está inicialmente no imanado, entonces  $B$  varía en función de  $H$  según se muestra en la Figura 4.10. La curva empieza en el origen, y a medida que aumenta  $H$ , la inducción  $B$  empieza a aumentar lentamente y después más rápidamente hasta que al final alcanza un nivel determinado y se hace independiente de  $H$ . Este valor máximo de  $B$  es la densidad de flujo de saturación ( $B_s$ ) y la imanación correspondiente es la imanación de saturación ( $M_s$ ). Según la ecuación  $B=\mu \times H$ , la permeabilidad ( $\mu$ ) es la pendiente de la curva  $B$  frente a  $H$ , y se

puede apreciar 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 4.9.

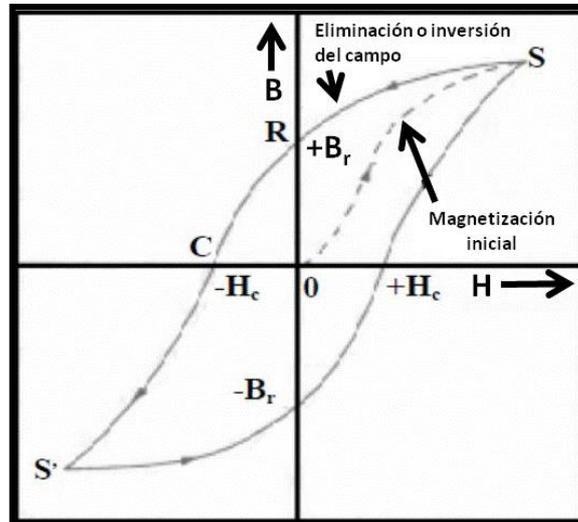


**Figura 4.9.** Comportamiento de  $B$  frente a  $H$  de un material ferromagnético o ferrimagnético que estaba inicialmente desmagnetizado. Se representan las configuraciones de los dominios durante varios estadios de la imanación.

A medida que se aplica el gradiente  $H$ , 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 4.9. Inicialmente, los momentos de los dominios constituyentes están orientados al azar de tal manera que no existe un gradiente de momento neto  $B$  (o  $M$ ). A medida que se aplica el gradiente de campo magnético externo, los dominios que están orientados en direcciones favorables a éste, o casi alineados con él, van creciendo a expensas de aquellos que no están favorablemente orientados. Este proceso continúa al aumentar la intensidad del gradiente hasta que la muestra macroscópica se convierte en un solo dominio, que está casi completamente alineado con  $H$ . La saturación se alcanza cuando este dominio gira y se orienta con  $H$ .

A partir de la saturación, punto S de la Figura 4.10., a medida que  $H$  se reduce, la curva no invierte su cambio original, sino que se produce un efecto de histéresis en el

que  $B$  va retrasado con respecto a  $H$ , es decir, disminuye más lentamente. Cuando  $H$  es cero (punto  $R$  de la curva), existe un campo residual  $B$  que se denomina remanencia, o densidad de flujo remanente,  $B_r$ . En estas condiciones, el material permanece imanado en ausencia de un gradiente de campo magnético externo  $H$ .



**Figura 4.10.** Densidad de flujo magnético ( $B$ ) frente a la intensidad del campo o gradiente magnético ( $H$ ) de un material ferromagnético para la saturación en ambas direcciones (punto  $S$  y  $S'$ ). La curva de histéresis viene representada por la curva sólida y la curva discontinua indica la primera imanación. La remanencia  $B_r$  y la fuerza coercitiva  $H_c$  también se representan.

El comportamiento de histéresis y la imanación permanente pueden explicarse por el movimiento de las paredes de los dominios. Al invertir la dirección del gradiente de campo desde la saturación (punto  $S$  de la Figura 4.10.), el proceso mediante el que cambia la estructura de los dominios se invierte. En primer lugar, existe rotación del dominio único con el gradiente de campo invertido. Más tarde, los dominios con los momentos magnéticos alineados con el nuevo gradiente 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 de  $H$  en la dirección opuesta. Esto explica el desfase entre  $B$  y  $H$ , es decir, la histéresis. Cuando el gradiente 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  $B$  a cero dentro de la muestra (punto C de la Figura 4.10.), se debe aplicar un gradiente  $H$  de magnitud a  $-H_c$  en la dirección opuesta del gradiente original.  $H_c$  se denomina coercitividad, o bien, fuerza coercitiva. Al continuar aplicando el gradiente en la dirección contraria a la original, tal como se indica en la Figura, finalmente se alcanza la saturación en la dirección opuesta, correspondiente al punto  $S'$ . Una segunda inversión del gradiente de campo magnético hasta el punto de la saturación inicial (punto S) completa el ciclo de histéresis simétrico y también produce una remanencia negativa ( $-B_r$ ) y una coercitividad positiva ( $+H_c$ ). La curva  $B$  frente a  $H$  representa un ciclo de histéresis hasta saturación. Desde luego, no es necesario aumentar  $H$  hasta la saturación, antes de invertir su dirección. Además, es posible invertir la dirección del gradiente de campo magnético en cualquier punto a lo largo de la curva y generar otros ciclos de histéresis.

El objetivo principal de este apartado de la investigación es caracterizar las propiedades magnéticas de los núcleos de los magnetoliposomas mediante la caracterización de su ciclo de histéresis. Ésta determinación se realizó a temperatura ambiente utilizando un equipo magnetómetro-susceptibilímetro Manics DSM-8, (Alemania). Al mismo tiempo se realizó un análisis cualitativo de la capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados de las partículas de maghemita y de los magnetoliposomas. Se realizó mediante visualización macroscópica del efecto que ejerce un gradiente de campo magnético aplicado sobre una dispersión acuosa de estas nanopartículas. Con este fin, se prepararon dispersiones acuosas de ambas nanopartículas con una concentración  $< 0.5\%$  (p/v). A continuación, se pusieron en contacto estas dispersiones con un imán de 400 mT a una temperatura de  $25.0 \pm 0.5$  °C, y se observó el comportamiento de las partículas bajo estas condiciones.

## 4.5.2. RESULTADOS

### 4.5.2.1. Ciclo de histéresis

La Figura 4.11. recoge el ciclo de histéresis de los magnetoliposomas a temperatura ambiente. La sensibilidad del aparato de medida utilizado impide ver las ramas ascendente y descendente del ciclo de histéresis. De la región lineal del ciclo de histéresis (zona de campo magnético bajo) puede estimarse la susceptibilidad magnética inicial ( $\chi_{mi}$ ) del material:  $13 \pm 4 \text{ m}^3/\text{Kg}$ , mientras que el valor de magnetización de saturación ( $M_s$ ) es  $34 \pm 4 \text{ emu/g}$ . Este comportamiento magnético es característico de las partículas constituidas por un solo dominio magnético, que se magnetiza a través de la orientación de este dominio en la dirección del campo, hasta la saturación. Al igual que en los átomos paramagnéticos, la magnetización es reversible, sin magnetización remanente. Esto es útil para las aplicaciones diseñadas de estas partículas: se magnetizarán sólo cuando aplicamos el campo externo, obteniendo un control significativo sobre las posibilidades de dirigirlos al sitio de acción y mantenerlos allí durante el tiempo deseado. Los liposomas magnéticos o magnetoliposomas también se magnetizan por la acción del campo, debido a la magnetización de las nanopartículas de magheita, pero, como se observa, la magnetización de saturación ( $34 \pm 4 \text{ emu/g}$ ), es inferior a la de maghemita pura (cerca de  $70 \text{ emu/g}$ ) [Cao y cols., 2016; Shokrollahi y cols., 2017]. Esto es una consecuencia de la presencia de material no magnético (PC). Esto ya se ha observado anteriormente en otras nanopartículas similares [Artacho y cols., 2012; Clares y cols., 2013; Arias y cols., 2007]. Teniendo en cuenta estos datos, los magnetoliposomas cumplen con el requisito perseguido de ser magnetizables, por lo que constituyen nanopartículas ideales para el transporte de fármacos a un órgano, tejido o célula diana. En concreto, los núcleos magnéticos dotan a la nanoestructura de una adecuada capacidad de respuesta a gradientes de campo magnético aplicado y, por este motivo, la direccionabilidad de los magnetoliposomas (y las moléculas de fármaco vehiculizado).

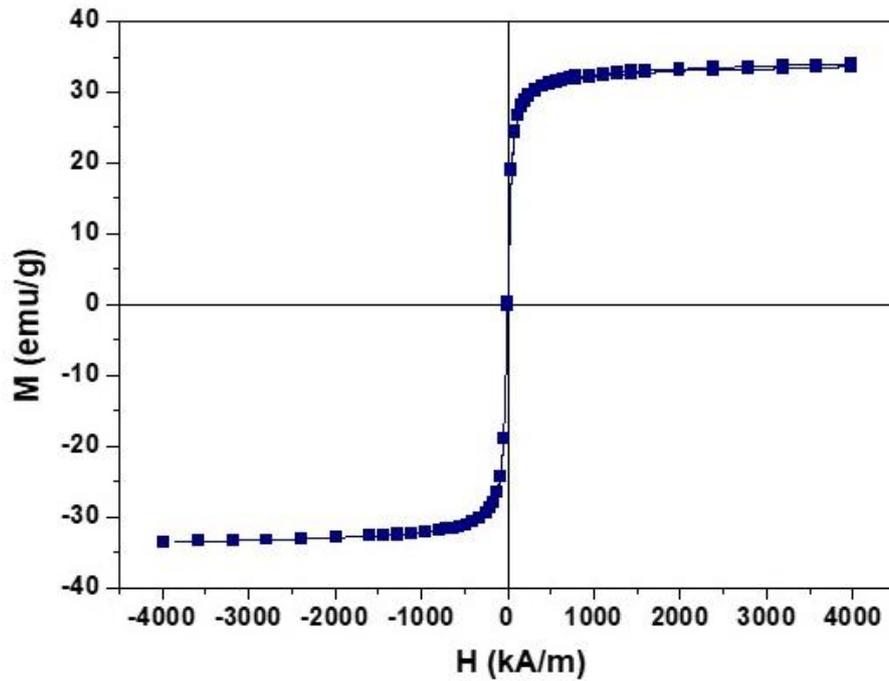
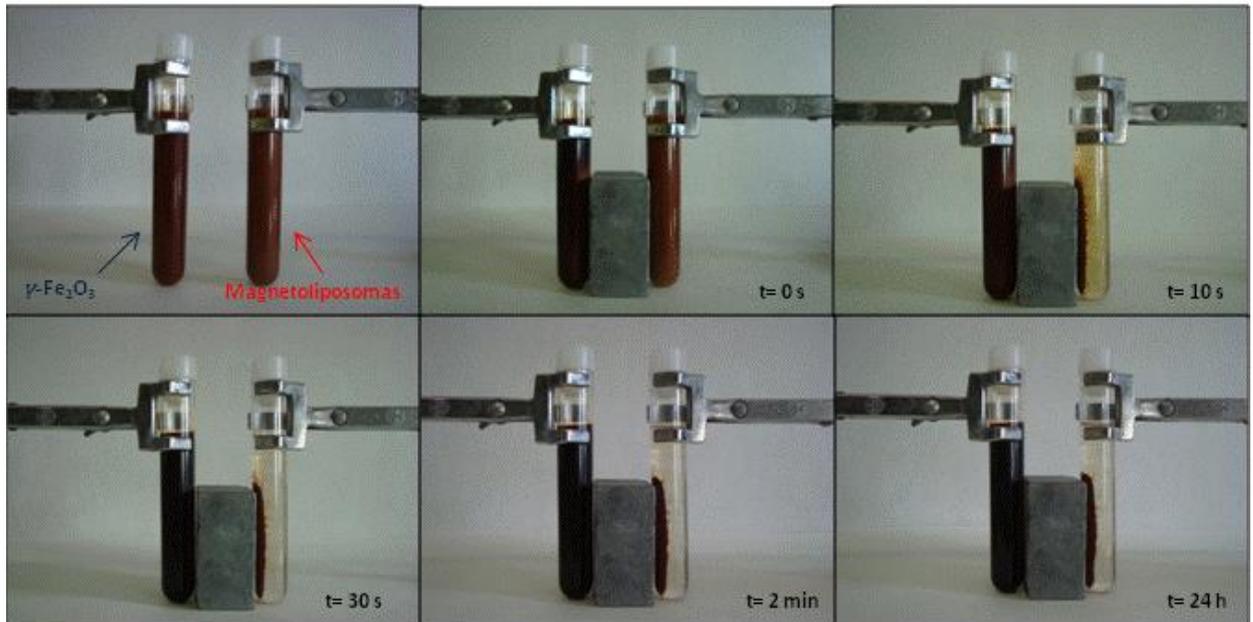


Figura 4.11. Ciclo de histéresis de los magnetoliposomas (■).

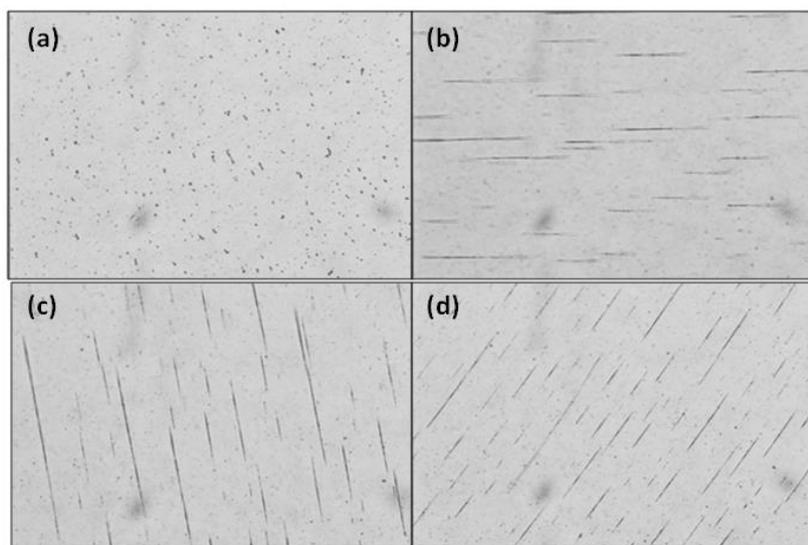
#### 4.5.2.1. Prueba *in vitro* a nivel macroscópico y microscópico

Como puede apreciarse en la Figura 4.12., los magnetoliposomas son atraídos muy rápidamente por el imán, lo que confirma las excelentes propiedades magnéticas del nanosistema diseñado. De hecho, el sobrenadante de la suspensión queda completamente transparente en sólo 2 minutos desde que se somete la dispersión acuosa correspondiente a la acción del imán. Por el contrario, la dispersión acuosa de nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  mantiene su aspecto homogéneo incluso tras 24 horas de exposición al gradiente magnético. El carácter superparamagnético de los núcleos de óxido de hierro podría justificar la ausencia de respuesta magnética observada.



**Figura 4.12.** Comportamiento macroscópico de dispersiones acuosas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y de magnetoliposomas bajo la influencia de un imán permanente de 400 mT localizado en el lateral de estas muestras

Como puede observarse en la Figura 4.13., la dispersión acuosa de magnetoliposomas es muy homogénea en ausencia de un gradiente de campo magnético aplicado. Sin embargo, cuando la gota de dispersión queda bajo la influencia del imán de 400 mT, las nanopartículas tienden a formar agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección del gradiente magnético aplicado. Este comportamiento puede explicarse si se tiene en cuenta que las interacciones magnéticas entre los núcleos de óxido de hierro son de mayor intensidad en comparación con las interacciones coloidales de tipo DLVO (interacciones electrostáticas tipo van der Waals y de hidratación o ácido-base), a pesar de la existencia del recubrimiento liposomal en torno a estos.



**Figura 4.13.** Observación mediante microfotografía óptica (magnificación: 40X) de una dispersión acuosa de magnetoliposomas en ausencia (a) o bajo la influencia de un gradiente de campo magnético aplicado ( $B = 400$  mT) en la dirección de la flecha (b, c, d).

## 4.6. ESTUDIO REOLÓGICO

La reología es la parte de la física que estudia la relación entre el esfuerzo y la deformación en los materiales que son capaces de fluir (también fluyen los sólidos), definiendo como flujo la deformación continua generada por la aplicación de un esfuerzo cortante. Su estudio es esencial en muchas industrias, incluyendo las de plásticos, pinturas, alimentación, tintas de impresión, detergentes o aceites lubricantes, por ejemplo. La homogeneización, dispersión y estabilización de las partículas en un líquido son de gran importancia en el procesado coloidal de síntesis de medicamentos.

El comportamiento reológico de una sustancia viene dado por la respuesta que ofrece a un esfuerzo externo o a una deformación. Por lo tanto, es necesario entender estos dos conceptos.

Las propiedades reológicas se definen a partir de la relación existente entre fuerza o sistema de fuerzas externas y su respuesta, ya sea como deformación o flujo. Todo fluido se va deformar en mayor o menor medida al someterse a un sistema de fuerzas externas. Dicho sistema de fuerzas se representa matemáticamente mediante el

esfuerzo cortante “ $\tau$ ”, mientras que la respuesta dinámica del fluido se cuantifica mediante la velocidad de deformación “ $D$ ”.

El esfuerzo o tensión,  $\tau$ , es una fuerza por unidad de superficie:

$$\tau = (F/A) \quad [N/m^2 = Pa]$$

Si el esfuerzo es producido por una fuerza tangencial o de cizalla, se denomina esfuerzo de cizalla,  $\sigma$ . Es la fuerza por unidad de área que se requiere para el movimiento de un fluido. Según Newton la tensión de cizalla es proporcional al gradiente de velocidad ( $du/dy$ ), o también denominado como  $D$ . Si se duplica la fuerza, se duplica el gradiente de velocidad:

$$\tau = \mu \cdot \frac{du}{dy} = \mu \cdot D$$

Al aplicar un esfuerzo a un sólido se produce una deformación instantánea proporcional al esfuerzo aplicado, de acuerdo con la teoría de elasticidad de Hooke. Cuando desaparece el esfuerzo, el sólido recupera instantáneamente su posición inicial.

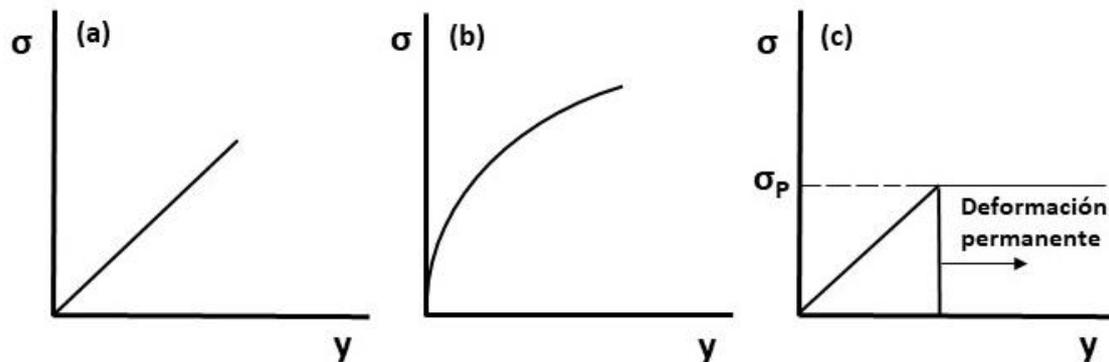
Cuando se aplica una fuerza tangencial  $F$  a un material uniforme de superficie  $A$ , la tensión o esfuerzo de cizalla ( $\sigma$ ) es  $F/A$  y está relacionada con la deformación ( $\gamma$ ) mediante la ley de Hooke:

$$\sigma = G \cdot \gamma$$

donde  $G$  es el módulo de Young o módulo de elasticidad (Pa),  $\sigma$  es el esfuerzo cortante (Pa) y  $\gamma$  es la deformación (%).

Un material con elasticidad lineal (Hooke) se representa como una línea recta que parte del origen (Figura 4.14a). En un material elástico no lineal (Figura 4.14b) la variación del esfuerzo con la deformación no es lineal. Pero hay un tercer caso (Figura 4.14c) en el que la deformación depende de la cizalla aplicada, que da origen al llamado comportamiento elastoplástico. En él, el material sigue un comportamiento lineal hookeniano hasta un cierto valor de esfuerzo, que define el esfuerzo umbral o punto de flujo, pero fluye por encima de ese valor, produciendo una deformación permanente.

Por otra parte, si se supera un cierto límite de esfuerzo, el sólido puede romperse. Si esto ocurre a valores de esfuerzo bajos, se dice que el sólido es frágil.



**Figura 4.14.** Curvas de esfuerzo deformación de materiales elástico lineal (a), elástico no lineal (b) y elastoplástico (c).

La viscosidad se puede definir como una medida de la resistencia de la deformación del fluido. Dicho concepto se introdujo anteriormente en la Ley de Newton, que relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación (gradiente de velocidad):

$$\tau = \mu \cdot D$$

La unidad de viscosidad en el SI es el Pascal segundo (Pa·s).

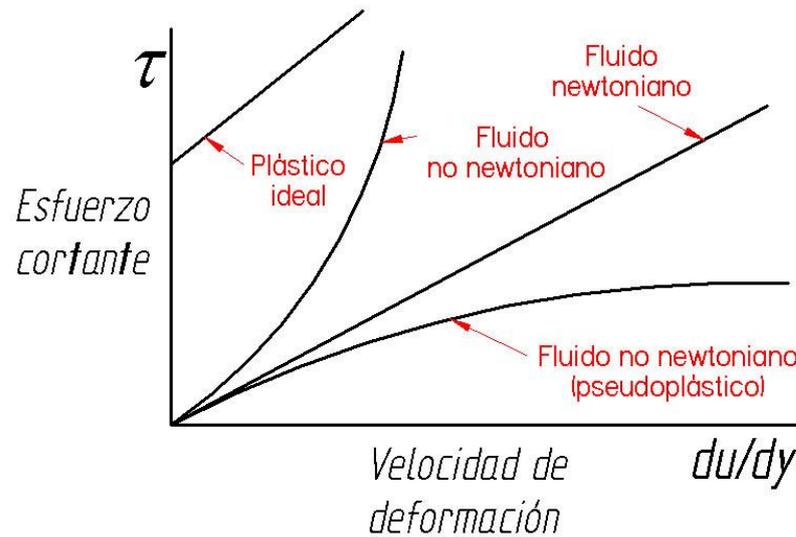
La viscosidad de un fluido Newtoniano se suele representar con la letra griega  $\mu$ , pero para fluidos no Newtonianos la viscosidad aparente se suele representar entonces con la letra griega  $\eta$ .

La viscosidad real de los materiales puede ser afectada significativamente por factores como velocidad de cizalla, temperatura, presión y tiempo de cizalla, aunque de todos ellos, la velocidad de cizalla es el factor más interesante desde el punto de vista reológico.

Existen 3 tipos de fluidos:

- Newtonianos (proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación).
- No Newtonianos (no hay proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación).

- Viscoelásticos (se comportan como líquidos y sólidos, presentando propiedades de ambos).



- **Figura 4.15.** Esfuerzo cortante según la tasa de deformación en diferentes fluidos.

Por tanto, la reología rotacional sirve para caracterizar el comportamiento del flujo y la viscosidad del sistema final que es uno de los criterios esenciales en el desarrollo de los sistemas dispersantes. Se involucra en el diseño de operaciones básicas (bombeo, mezcla y llenado), y las propiedades funcionales del producto final como parámetro crítico para el control de calidad y la estabilidad física [Schramm y cols., 2004].

#### 4.6.1. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS

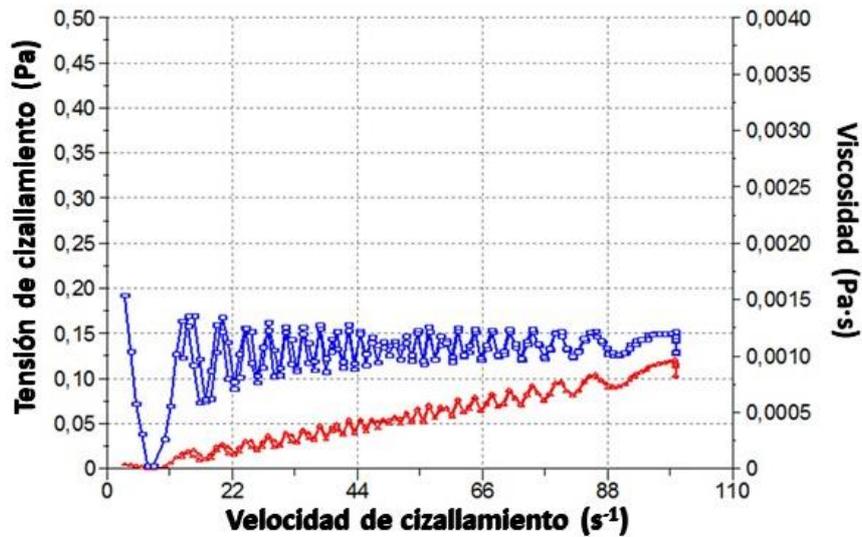
La caracterización reológica de las formulaciones se realizó por triplicado a 25 °C usando un reómetro rotacional (HAAKE Rheostress 1, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Alemania) con una configuración de geometría de placa cónica (Haake PP60 Ti, 6 cm de diámetro). Se probaron diferentes espacios entre placas hasta seleccionar una separación de 0.105 mm.

El dispositivo consta de los siguientes elementos: Viscosímetro Haake VT500 y baño termostático con sistema de recirculación de agua (Haake C25P). El Reómetro se encuentra conectado a un ordenador provisto del software HAAKE RheoWin® Job Manager V. 3.3 para llevar a cabo la prueba y RheoWin® Data Manager V 3.3 (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemania) para llevar a cabo el análisis de los datos obtenidos.

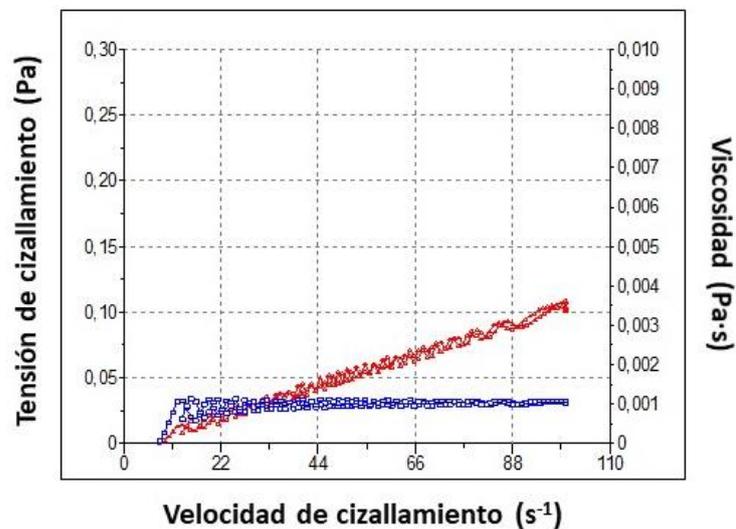
Las curvas de viscosidad y de flujo se registraron durante 3 min durante el periodo de aceleración o ascenso de 0 a 100 s<sup>-1</sup>, 1 min a 100 s<sup>-1</sup> (periodo de velocidad constante) y finalmente 3 min durante el período de descenso de 100 a 0 s<sup>-1</sup>. Los valores de viscosidad a 100 s<sup>-1</sup> se determinaron a  $t_0$  y hasta un máximo de 180 días para las muestras almacenadas a 4 °C.

#### **4.6.3. RESULTADOS**

Las curvas de flujo y viscosidad de los liposomas y magnetoliposomas (tensión de cizallamiento vs velocidad de cizallamiento, y viscosidad vs velocidad de cizallamiento) se muestran en la Figura 4.16. y 4.17. respectivamente. Como se puede observar las curvas presentaron valores de viscosidad casi constantes con una tasa de cizallamiento creciente de 0 a 100 s<sup>-1</sup>, que es claramente indicativo de comportamiento newtoniano. Los resultados de la viscosidad en ambos casos fueron inferiores a la viscosidad del plasma sanguíneo de 1.2 mPas a 37 °C. [Gálvez-Martín y cols., 2014]. En ambos casos este comportamiento facilitará la formulación que se aplicará por vía intravenosa y en el caso de los magnetoliposomas influye positivamente en la focalización de fármacos ya que la viscosidad de las suspensiones magnéticas depende fuertemente de la fuerza del campo magnético [Odenbach y cols., 2015].



**Figura 4.16.** Reograma de una dispersión acuosa de liposomas. La curva de viscosidad en azul representa la viscosidad (PA · s) frente a la velocidad de cizallamiento ( $s^{-1}$ ); la curva de flujo en rojo representa la tensión de cizallamiento (PA) frente a la velocidad de cizallamiento ( $s^{-1}$ ).



**Figura 4.17.** Reograma de una dispersión acuosa de magnetoliposomas. La curva de viscosidad en azul representa la viscosidad (PA · s) frente a la velocidad de cizallamiento ( $s^{-1}$ ); la curva de flujo en rojo representa la tensión de cizallamiento (PA) frente a la velocidad de cizallamiento ( $s^{-1}$ ).

Por último, las propiedades reológicas de los magnetoliposomas se pueden describir utilizando el modelo, es decir,  $\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$ ; donde  $\tau$  es la tensión de cizallamiento,  $K$  es el índice de consistencia (una indicación de la naturaleza viscosa del coloide),  $\dot{\gamma}$  es la tasa de cizallamiento, y  $n$  es el índice de comportamiento de flujo (medida de salida del flujo Newtoniano). Los valores de  $n$  y  $k$  son 1,062 y 0,0007825, respectivamente.

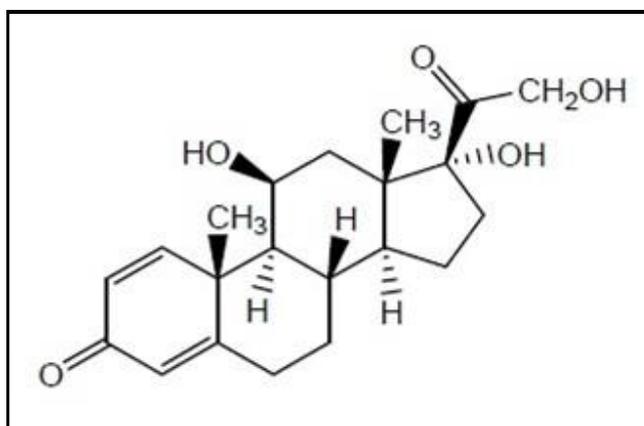


**5. CAPACIDADE DE**  
**VEHICULIZACIÓN DE LA**  
**PREDNISOLONA**



## 5.1. PREDNISOLONA

La prednisolona o 1,2 dehidocortisona es un fármaco corticosteroide predominantemente glucocorticoide y de baja actividad mineralocorticoide, que resulta útil para tratar procesos inflamatorios y trastornos propios de la enfermedad autoinmune, tales como asma, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn (o enteritis regional), esclerosis múltiple, cefalea en racimos y lupus eritematoso sistémico. También, a dosis altas por su gran actividad inmunosupresora resulta útil en el trasplante de órganos.



**Figura 5.1.** Estructura de la prednisolona.

Es la molécula activa de la prednisona y ejerce su mecanismo de acción a través de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, moléculas que median en los procesos vasculares y celulares de la inflamación, así como en la respuesta inmunológica. Esto se traduce en que reducen la vasodilatación, disminuyen el exudado de fluido, la actividad leucocitaria, la agregación y desgranulación de los neutrófilos, la liberación de enzimas hidrolíticos por los lisosomas, la producción de radicales libres de tipo superóxido y el número de vasos sanguíneos (con menor fibrosis) en los procesos crónicos. Las dos acciones se corresponden con un mismo mecanismo que consiste en la inhibición de síntesis de fosfolipasa A<sub>2</sub>, enzima que libera los ácidos grasos poliinsaturados precursores de las prostaglandinas y leucotrienos.

En cuanto a sus propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas, la prednisolona presenta una absorción gastrointestinal del 75%-98% de la dosis administrada de forma oral. Se metaboliza principalmente en el hígado, la cual se reduce a tetrahidroprednisolona y ésta se conjuga con ácido glucorónico y grupos sulfatos para formar compuestos solubles que son excretados en la orina [Florey]. La máxima concentración plasmática la alcanza relativamente rápido, entre 1-3 h después de absorberse tras la administración oral. El tiempo de semivida plasmática ( $t_{1/2}$ ) de este fármaco es aproximadamente 3.5 h. La absorción de prednisolona tras la administración de prednisona es de un 80% frente a la administración de prednisolona. Esta variación en la concentración de prednisolona absorbida se debe a las diferencias de absorción existentes en los individuos. Además, la prednisolona muestra características farmacocinéticas dosis dependiente, donde un aumento de la dosis conduce a un aumento en el volumen de distribución y en el aclaramiento plasmático. La prednisolona también se une a proteínas plasmáticas de una forma no lineal, por lo que el grado de unión determinará la distribución y el aclaramiento de dicho fármaco. La farmacocinética de la prednisolona también depende de la edad, por ejemplo, en niños presenta una corta vida media. Las enfermedades hepáticas también aumentan la semivida plasmática de la prednisolona. En este caso, la prednisolona es el fármaco de elección debido a la pobre conversión de prednisona en prednisolona. La conversión hepática de prednisona en prednisolona es extensa y los dos compuestos son generalmente considerados terapéuticamente equivalentes cuando se usan de forma sistémica. Sin embargo, la dosis oral de prednisona parece mostrar concentraciones plasmáticas más bajas de prednisolona comparado con dosis orales equivalentes de prednisolona. Lo que indica que no hay bioequivalencia entre preparaciones orales de prednisona y prednisolona [Florey].

De forma general, las principales reacciones adversas relacionadas con la administración de este glucocorticoide son hiperglucemia (puede producir diabetes reversible o no tras la finalización del tratamiento), cambios en el metabolismo del colesterol (reducción del HDL, elevación del LDL y triglicéridos) lo que conlleva a un aumento del riesgo cardiovascular, redistribución de la grasa corporal (Síndrome de Cushing), osteoporosis, miopatías, equimosis, estrías purpúreas, úlcera gastroduodenal

y riesgo de cataratas y glaucoma. Y por supuesto, la inmunosupresión y riesgo de infección. Todo esto conlleva a una especial precaución y contraindicación en pacientes con estas patologías o con antecedentes o riesgo de padecerlas.

La inflamación es una característica común en el microambiente tumoral que desempeña un papel muy importante en el crecimiento y propagación del tumor [Coussens y cols., 2002; Mantovani y cols., 2008]. En efecto, la conexión entre inflamación y cáncer consiste en dos vías: una vía extrínseca, impulsada por una infección o inflamación crónica que aumentan el riesgo de cáncer (por ejemplo, la infección por *Helicobacter pylori* se asocia con cáncer de estómago, o la enfermedad inflamatoria intestinal crónica se relaciona con cáncer de colon); y una vía intrínseca, impulsada por alteraciones genéticas que causan procesos inflamatorios y neoplásicos (por ejemplo, los oncogenes) [Mantovani y cols., 2008]. En cualquier caso, dentro del microambiente tumoral diversos mediadores proinflamatorios participan en un complejo de señalización inflamatoria que facilita la extravasación de las células tumorales a través del estroma, fomentando así la progresión tumoral (y metástasis) [Balkwill y cols., 2001; Lu y cols., 2006]. La inflamación actúa como un regulador clave de la promoción y progresión del tumor por varios mecanismos, entre ellos la aceleración de la progresión del ciclo celular y la proliferación celular, la evasión de la muerte celular apoptótica, y la estimulación de la neovascularización tumoral [Surh y cols., 2001; Philip y cols., 2004]. Entre las principales moléculas implicadas en el eje inflamación-cáncer, destacan las citoquinas, quimioquinas, ciclooxigenasa 2 (COX-2), prostaglandinas, receptores de prostanoïdes (EP1-4), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), óxido nítrico (NO) y el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) [Kundo y cols., 2008].

Esta estrecha relación entre cáncer e inflamación ha llevado a la hipótesis del potencial uso clínico de fármacos antiinflamatorios como agentes antitumorales [Folkman y cols., 1983]. La actividad antitumoral de los glucocorticoides ya ha sido demostrada en modelos tumorales de ratón [Penhaligon y cols., 1985; Lee y cols., 1987; Pucci y cols., 1988]. Sin embargo, la eficacia anticancerosa “descansa” en la utilización de elevadas y frecuentes dosis, durante periodos prolongados. Desafortunadamente, la eficacia terapéutica de los corticoides se encuentra seriamente limitada por su pobre

perfil farmacocinético y por el balance beneficio/riesgo asociado a su uso clínico: la imposibilidad de concentrar completamente la dosis de corticoide en la zona inflamada determina la administración de grandes dosis del principio activo (aumentándose así la posibilidad de desarrollo de reacciones adversas). Como consecuencia de su amplia distribución, estas dosis producirán severos efectos adversos en órganos y tejidos que no son dianas del tratamiento, lo que condicionará la eficacia farmacológica y el cumplimiento terapéutico por parte del paciente.

Numerosas investigaciones científicas han postulado que la actividad terapéutica de los glucocorticoides se puede mejorar mediante su vehiculización en sistemas transportadores coloidales que los dirijan al lugar de acción [Banciu y cols., 2008]. Estos sistemas garantizan concentraciones terapéuticamente eficaces en la biofase y una velocidad de liberación constante, o prácticamente constante, durante un período de tiempo prolongado. De esta manera, se podrá focalizar la biodistribución del fármaco hacia la región tumoral diana. Entre los diferentes tipos de nanosistemas transportadores destacan los coloides magnéticos por permitir su guiado magnético hasta el lugar de acción [Arias y cols., 2011; Arias, 2013; Reddy y cols., 2012; Arruebo y cols., 2007; Duran y cols., 2008].

Son diversos los estudios preclínicos que han señalado que la vehiculización de corticosteroides en sistemas coloidales podría mejorar su actividad como agentes antitumorales [Schiffelers y cols., 2005; Greish y cols., 2010; Banciu y cols., 2008; Kluxa y cols., 2011; van den Hoven y cols., 2013]. Teniendo en cuenta la bibliografía consultada y los estudios ya realizados por el grupo de investigación en el que se desarrollará el presente plan de trabajo, el desarrollo de nanoplataformas basadas en magnetoliposomas debe constituir una aportación prometedora al destino biológico (biodistribución y farmacocinética) del fármaco prednisolona.

## 5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PREDNISOLONA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis

### 5.2.1. ABSORBANCIA ÓPTICA DE DISOLUCIONES DE PREDNISOLONA

Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible (UV-Vis) encuentran una enorme aplicación en la identificación y determinación cuantitativa de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas. La espectroscopía de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia  $T$  o de la absorbancia  $A$  de disoluciones depositadas en cubetas transparentes que tienen un camino óptico de  $b$  cm. Normalmente, la concentración de un analito absorbente está relacionada con la absorbancia como se muestra en la siguiente Ecuación:

$$A = -\log T = \log x = \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (5.1)$$

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

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

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1 bc_1 + \epsilon_2 bc_2 + \dots + \epsilon_n bc_n \quad (5.2)$$

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

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

Hay que recordar que la ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene una concentración de analito relativamente baja. A concentraciones altas, generalmente superiores a  $10^{-2}$  M, la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas. Esta interacción, a su vez, puede alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación de una determinada longitud de onda. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración. Aunque, normalmente, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a  $10^{-2}$  M, entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes aparecen algunas excepciones.

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

### 5.2.1.1. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS

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

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

La prednisolona utilizada (Fagron, España) es un polvo cristalino blanco o casi blanco, inodoro, higroscópico, almacenado en condiciones herméticas y en lugar seco. Su fórmula química es  $C_{21}H_{28}O_5$  y su peso molecular 360.44 g/mol. Su punto de fusión se encuentra en 240 °C y es muy soluble en cloroformo, fácilmente soluble en acetona, soluble en etanol, soluble en alcohol absoluto y prácticamente insoluble en agua.

En base a algunas de las características del fármaco, si bien la metodología seguida en la formulación de los magnetoliposomas determina las condiciones de trabajo, un aspecto crucial previo a este estudio es la clarificación de las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de fármaco. En nuestro caso, se investigaron las condiciones óptimas de conservación durante 24 horas según la concentración molar de fármaco y el pH de las disoluciones. No se observó ningún tipo de alteración

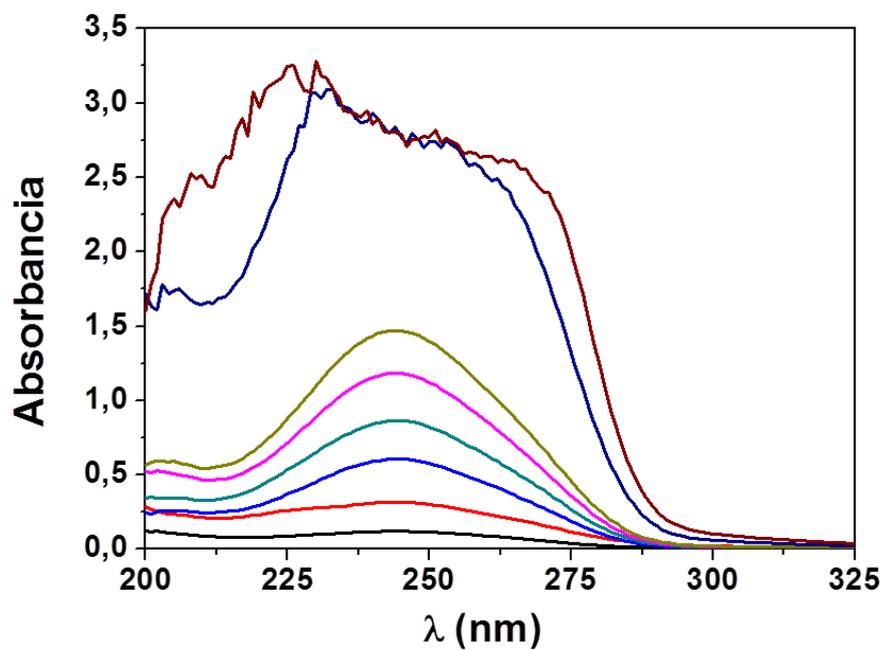
macroscópica de las disoluciones de prednisolona tras el período de conservación de 24 horas. Finalmente, y en referencia a la temperatura de conservación, las disoluciones preparadas se mantuvieron siempre a 4 °C hasta ser utilizadas para así ralentizar los posibles procesos de degradación.

Por lo tanto, antes de abordar la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración de fármaco, hay que indicar que la preparación y manipulación de las disoluciones alcohólicas y en tampón fosfato de prednisolona se realizó a temperatura ambiente, protegiéndolas de la luz ambiental (cubiertas por papel de aluminio), a pH natural (4.9) y pH fisiológico (7.4) y en un rango de concentración comprendido de  $10^{-4}$  hasta  $10^{-5}$  M. Para la disolución de la prednisolona se precisó la utilización de ultrasonidos. No se observó ningún tipo de alteración macroscópica en las disoluciones de este agente antiinflamatorio tras el período de conservación de 24 horas.

La curva de calibrado de las disoluciones alcohólicas de prednisolona se realizó utilizando las concentraciones molares  $10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Transcurridas 24 horas desde su preparación, se determinó el espectro de absorción UV-Vis de cada una de las disoluciones según la metodología ya descrita para la prednisolona.

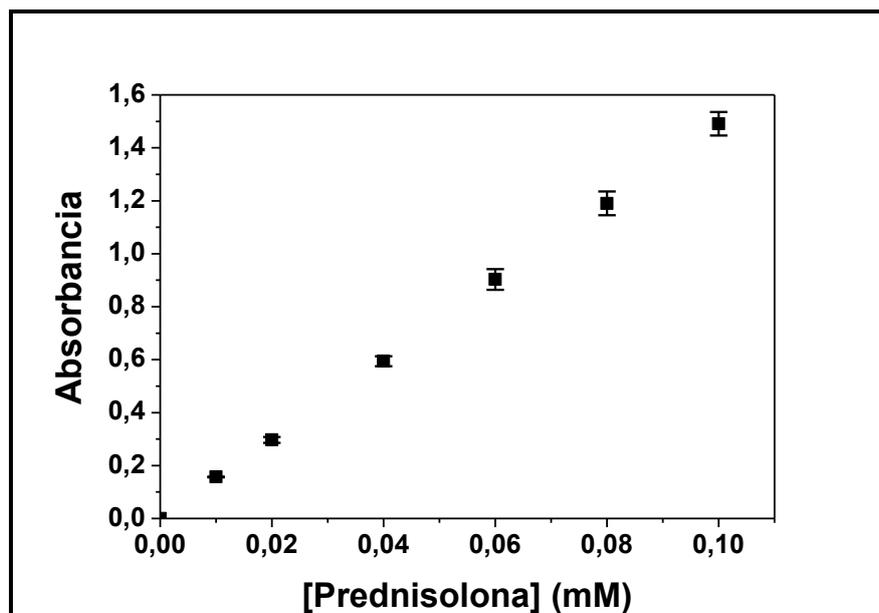
#### **5.2.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados de este estudio se recogen en la Figura 5.2., donde sólo se observa señal a 244 nm y se aprecia cómo la absorción se incrementa al aumentar la concentración de fármaco en el medio. El único máximo que se observa presenta una longitud de onda de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones y es a 244 nm, longitud de onda seleccionada para las medidas que se realicen en este trabajo. A partir de concentraciones superiores a  $10^{-4}$  M se aprecia una irregularidad del espectro. Esta desviación de la ley de Beer impide realizar determinaciones fiables a estas concentraciones, a no ser que se lleve a cabo la dilución apropiada de estas muestras.



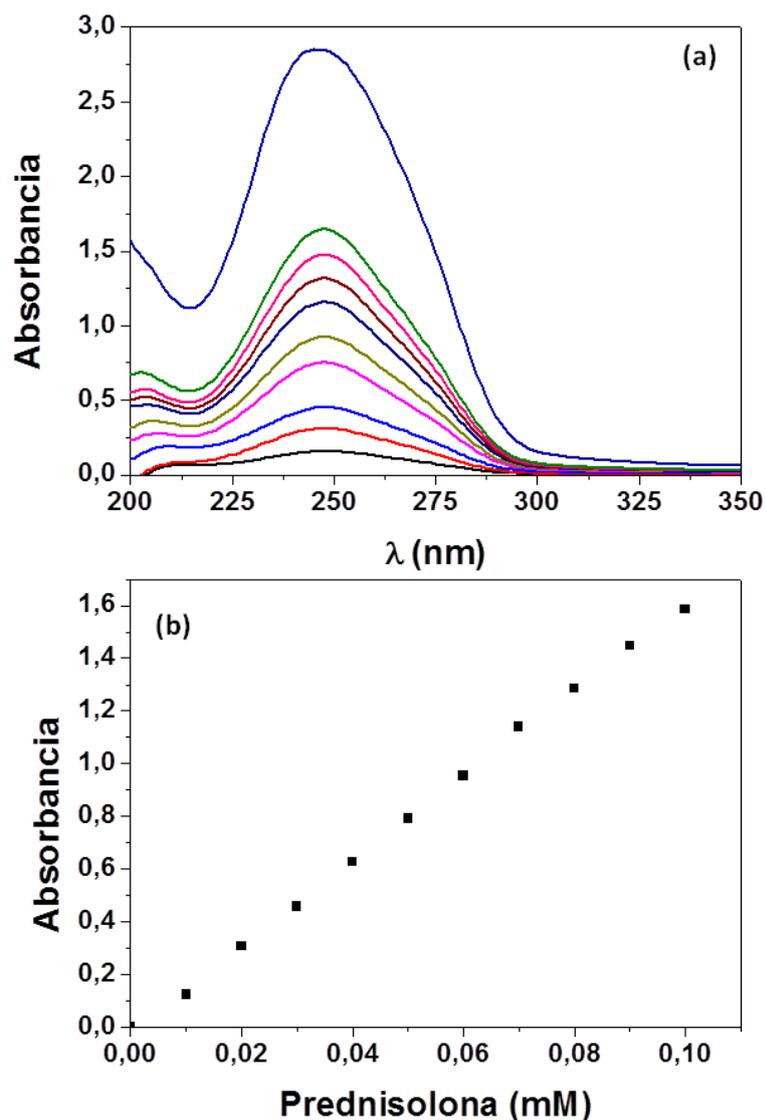
**Figura 5.2.** Espectro de absorbancia de UV-Vis de las disoluciones de prednisolona. Las concentraciones molares del fármaco en orden creciente de absorbancia son:  $10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  M.

La determinación del coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) se realizó según la metodología ya indicada, siendo el resultado obtenido  $\epsilon = 14880 \pm 58 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $r = 0.999$ ). En la Figura 5.3. se muestran los datos y la recta de ajuste. Los valores de absorbancia a diferentes concentraciones obtenidos a 244 nm cumplen la ley de Beer.



**Figura 5.3.** Determinación del coeficiente de absortividad molar de las disoluciones de prednisolona a la longitud de onda de máxima absorbancia (244 nm).

En la Figura 5.4. se muestra la aparición de un máximo a 244 nm, cuya absorbancia crece al aumentar la concentración de fármaco. El único máximo que aparece ( $\lambda = 244$  nm, prácticamente igual que a pH 4.9) será el que utilizemos en la cuantificación de la liberación de fármaco desde los diferentes tipos de partículas desarrolladas. A partir de concentraciones superiores a  $10^{-4}$  M no se cumple la ley de Beer. Esta desviación de la ley de Beer impide realizar determinaciones fiables a estas concentraciones, a no ser que se lleve a cabo la dilución apropiada de estas muestras. En la Figura 5.4.b quedan recogidos los datos experimentales utilizados y la recta de ajuste obtenida en la determinación del coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon = 16592 \pm 160 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $r = 0.999$ )



**Figura 5.4.** Espectro de absorbancia UV-Vis de disoluciones de prednisolona preparadas utilizando un tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) (a). Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son:  $10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $9 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ M. Determinación del coeficiente de absortividad molar de las disoluciones de prednisolona a  $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$  y para la longitud de onda de máxima absorbancia (244 nm).

## 5.2.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTOFOTOMÉTRICO

El método espectrofotométrico UV-Vis que se utilizará para el análisis de la cantidad de fármaco vehiculizado o liberado por las nanoplateformas desarrolladas debe ser validado previamente para verificar su exactitud, precisión y linealidad. Antes de describir la validación del método, conviene recordar qué se entiende por linealidad, precisión y exactitud de una metodología experimental. La linealidad de un método analítico se define como la proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta en el intervalo de concentraciones de producto utilizadas para las cuáles el método es satisfactorio. A la hora de realizar los ajustes lineales se ha recurrido al método de los mínimos cuadrados, de acuerdo con el cual se obtuvieron rectas de la forma  $y = a + bx$ . En referencia a la exactitud del método, se define como el error sistemático que indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor real. Se calcula a partir del error relativo y del coeficiente de variación para cada una de las concentraciones de las rectas. Se acepta un error de un orden de magnitud menor y un coeficiente de variación entre un 5 y un 10%. Finalmente, la precisión es la medida del grado de reproducibilidad de un método analítico o, dicho de otro modo, el grado de dispersión de los datos de los distintos replicados. Por consiguiente, se puede considerar como el error aleatorio y se determina a partir del coeficiente de variación de cada una de las concentraciones de las rectas de calibrado. Los valores obtenidos no pueden ser superiores a un 5 - 10%.

### 5.2.2.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Con este objetivo, se prepararon seis réplicas de disoluciones alcohólicas con concentraciones molares de prednisolona entre  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M, a pH natural (4.9) y a pH 7.4. Como ya se ha comentado, hasta el momento de realizar la medida de las disoluciones de fármaco, éstas se conservaron a 4 °C durante 24 horas y protegidas de la luz con papel de aluminio.

### 5.2.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 5.1. se recogen los valores de absorbancia de las disoluciones alcohólicas de prednisolona en función de su concentración a pH natural. Se muestran los valores medios de absorbancia y las desviaciones estándar (D.E.) para cada una de las concentraciones, así como el coeficiente de variación (C.V.). Los bajos valores de los coeficientes de variación (< 5% en todos los casos) que se han obtenido, indican la adecuada precisión del método. El ajuste lineal de la relación absorbancia (A) – concentración molar (C) [ $A = (0.003 \pm 0.003) + (14880 \pm 58) \cdot C$ ] es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9%.

**Tabla 5.1.** Absorbancia (media  $\pm$  D.E.) de las soluciones alcohólicas de prednisolona para cada una de las concentraciones indicadas a pH 4.9 (natural). El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

CONCENTRACIÓN (M)	ABSORBANCIA	C.V. (%)
$10^{-5}$	$0.157 \pm 0.001$	0.96
$2 \cdot 10^{-5}$	$0.297 \pm 0.011$	3.70
$4 \cdot 10^{-5}$	$0.594 \pm 0.019$	3.20
$6 \cdot 10^{-5}$	$0.903 \pm 0.039$	4.32
$8 \cdot 10^{-5}$	$1.190 \pm 0.045$	3.78
$1 \cdot 10^{-4}$	$1.491 \pm 0.044$	2.95

Con el propósito de comprobar la exactitud del método analítico, se utilizaron los datos de absorbancia de las concentraciones estudiadas o (“concentraciones verdaderas”) para obtener las concentraciones “estimadas” para cada una de las 6 réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas como “estimadas” en la Tabla 5.2. Como antes, los bajos valores de los C.V. y sus errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico.

**Tabla 5.2.** Comparación de las concentraciones “verdaderas” de prednisolona en solución alcohólica con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Los valores “estimados” son la media ( $\pm$  D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(concentración estimada – concentración verdadera)/concentración estimada], también se muestran los C.V.

CONCENTRACIÓN “VERDADERA” (M)	CONCENTRACIÓN “ESTIMADA” (M)	ERROR RELATIVO (%)	C.V. (%)
$10^{-5}$	$(1.06 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	5.9	0.97
$2 \cdot 10^{-5}$	$(1.99 \pm 0.08) \cdot 10^{-5}$	0.15	3.83
$4 \cdot 10^{-5}$	$(3.99 \pm 0.13) \cdot 10^{-5}$	0.25	3.26
$6 \cdot 10^{-5}$	$(6.07 \pm 0.26) \cdot 10^{-5}$	1.14	4.30
$8 \cdot 10^{-5}$	$(7.99 \pm 0.30) \cdot 10^{-5}$	0.02	3.81
$1 \cdot 10^{-4}$	$(9.82 \pm 0.42) \cdot 10^{-5}$	1.8	4.31

De igual forma se procedió para la validación del método espectrofotométrico en el caso de que las disoluciones de prednisolona cuenten con un pH 7.4 (tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Tabla 5.3.). Los bajos valores de los coeficientes de variación (< 5% en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A) - concentración molar (C) [ $A = (0.040 \pm 0.003) + (16592 \pm 160) \cdot C$ ] se confirma estadísticamente, con un error inferior al 0.01%. Finalmente, se procedió de igual forma a la anteriormente descrita para demostrar la exactitud del método analítico (Tabla 5.4.).

**Tabla 5.3.** Absorbancia (media  $\pm$  D.E.) de las soluciones alcohólicas de prednisolona para cada una de las concentraciones indicadas a pH 7.4. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

<b>CONCENTRACIÓN (M)</b>	<b>ABSORBANCIA</b>	<b>C.V. (%)</b>
$10^{-5}$	$0.158 \pm 0.001$	0.71
$2 \cdot 10^{-5}$	$0.308 \pm 0.011$	3.63
$3 \cdot 10^{-5}$	$0.457 \pm 0.021$	2.65
$4 \cdot 10^{-5}$	$0.627 \pm 0.019$	3.44
$5 \cdot 10^{-5}$	$0.793 \pm 0.027$	3.46
$6 \cdot 10^{-5}$	$0.954 \pm 0.025$	2.72
$7 \cdot 10^{-5}$	$1.140 \pm 0.033$	2.91
$8 \cdot 10^{-5}$	$1.287 \pm 0.022$	1.75
$9 \cdot 10^{-5}$	$1.448 \pm 0.021$	1.51
$10^{-4}$	$1.587 \pm 0.037$	2.35

**Tabla 5.4.** Comparación de las concentraciones “verdaderas” de prednisolona en solución acuosa (pH 7.4) con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Los valores “estimados” son la media ( $\pm$  D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(concentración estimada – concentración verdadera)/concentración estimada], también se muestran los C.V.

<b>CONCENTRACIÓN “VERDADERA” (M)</b>	<b>CONCENTRACIÓN “ESTIMADA” (M)</b>	<b>ERROR RELATIVO (%)</b>	<b>C.V. (%)</b>
$10^{-5}$	$(0.95 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	4.91	1.05
$2 \cdot 10^{-5}$	$(1.90 \pm 0.06) \cdot 10^{-5}$	4.90	4.90
$3 \cdot 10^{-5}$	$(2.88 \pm 0.08) \cdot 10^{-5}$	3.94	3.94
$4 \cdot 10^{-5}$	$(3.82 \pm 0.04) \cdot 10^{-5}$	4.40	4.40
$5 \cdot 10^{-5}$	$(4.78 \pm 0.16) \cdot 10^{-5}$	4.60	4.60
$6 \cdot 10^{-5}$	$(5.75 \pm 0.16) \cdot 10^{-5}$	4.10	4.10
$7 \cdot 10^{-5}$	$(6.87 \pm 0.20) \cdot 10^{-5}$	1.85	1.85
$8 \cdot 10^{-5}$	$(7.75 \pm 0.13) \cdot 10^{-5}$	3.10	3.10
$9 \cdot 10^{-5}$	$(8.72 \pm 0.13) \cdot 10^{-5}$	3.06	3.06
$10^{-4}$	$(9.56 \pm 0.22) \cdot 10^{-5}$	4.35	4.35

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

### **5.2.3. METODOLOGÍA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DETERMINAR LA INCORPORACIÓN DE PREDNISOLONA**

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

nanopartículas [Müller y cols., 1991; Fawaz y cols., 1997]. Esta metodología ya ha sido puesta a punto por nuestro grupo de investigación [Arias y cols., 2008; Arias y cols., 2009; Arias y cols., 2008b; Arias y cols.; 2010]. En concreto, la técnica se basa en la aplicación de la ley de Beer a un medio que contenga más de un tipo de sustancias absorbentes. Como es sabido, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por la suma de las absorbancias de cada una de las especies, siempre que no exista interacción entre éstas (ver Ecuación 5.2.). De esta manera, se acepta la contribución de cada una de las sustancias presentes en el medio de dispersión/preparación de las nanopartículas (o de las sustancias que se han generado en el proceso de liberación de los principios activos) a la absorbancia total del sistema. Respecto al proceso de vehiculización de prednisolona se pueden citar como sustancias susceptibles de contribuir a esta absorción total, las moléculas del propio principio activo no incorporados por las nanopartículas, los residuos de la síntesis (y degradación) de estos nanomateriales y los restos de otros componentes del medio. Por lo tanto, puede estimarse la cantidad de fármaco que no ha sido incorporado por las nanoplateformas restando a la absorción total del sistema la correspondiente al resto de sustancias presentes (residuos de la síntesis de las nanopartículas y restos de otros componentes del medio). Por diferencia entre la concentración inicial y final de fármaco en el medio de contacto/síntesis determinaremos la cantidad total de fármaco vehiculizada por las nanopartículas [Arias y cols., 2011; Arias y cols., 2008c; Arias y cols., 2009].

### **5.3. INCORPORACIÓN MATRICIAL DE PREDNISOLONA**

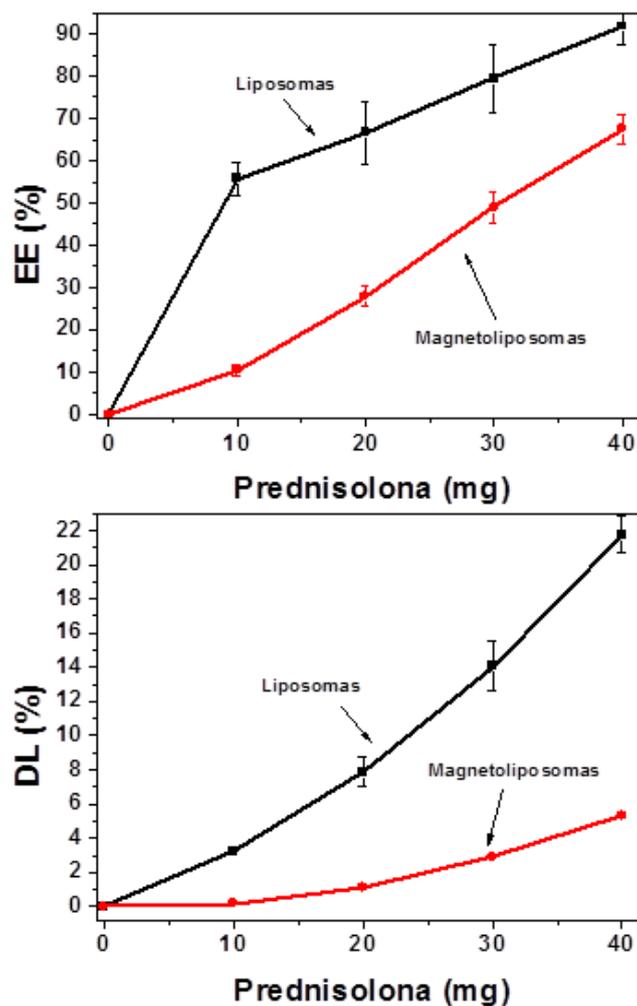
#### **5.3.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Este estudio se centrará en la contribución del principal método de vehiculización de fármacos en sistemas transportadores: la incorporación del principio activo en el momento en que se produce la formación de la nanoplateforma. De esta manera, se pretenden definir las condiciones de vehiculización óptimas para lograr la máxima

incorporación de prednisolona en los magnetoliposomas. El análisis de la influencia de la concentración de prednisolona sobre su absorción en los magnetoliposomas se realizó siguiendo la rutina de síntesis y el procedimiento de determinación espectrofotométrica ya descrito y justificado. Para ello, la única variable que se introdujo en la metodología de síntesis de los liposomas y de los magnetoliposomas fue la concentración de fármaco. Las cantidades utilizadas de prednisolona fueron 40 mg (360,4 M), 30 mg (270.3 M), 20 mg (180.2 M) y 10 mg (90,1 M). Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las cantidades de fármaco. La determinación de la absorción de prednisolona 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 absorción [Arias y cols., 2010b,c]. La cantidad de fármaco incorporado en la matriz de las nanopartículas se ha expresado en términos de *EE* (%) y *DL* (%) [Arias y cols., 2006; Arias y cols., 2008; Brigger y cols., 2002].

### **5.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las cantidades de prednisolona absorbidas por los liposomas y los magnetoliposomas para cada concentración molar de fármaco se recogen en la Figura 5.5. Las moléculas de prednisolona vehiculizadas deben quedar retenidas en las bicapas lipídicas de la matriz liposomal. Como puede apreciarse, la absorción aumenta con la concentración de fármaco presente en el medio de síntesis, sugiriéndose un efecto positivo del aumento de dicha concentración sobre la eficacia de la vehiculización en todos los casos. Este efecto ya se ha descrito ampliamente en diferentes trabajos de investigación sobre sistemas transportadores de fármacos [Arias y cols., 2008a; Arias y cols., 2011; Clares y cols., 2013].



**Figura 5.5.** Valores de *EE* (%) (a) y (b) *DL* (%) de la prednisolona en la matriz de los liposomas (▪) y de los magnetoliposomas (●) en función de la concentración molar de fármaco.

Como se puede observar, los valores obtenidos de *EE* (%) y *DL* (%) para los liposomas son claramente superiores a los magnetoliposomas. Sin embargo, la capacidad de respuesta a gradientes de campos magnéticos aplicados que exhiben los magnetoliposomas debe asegurar la llegada controlada de la dosis transportada hasta el lugar de acción, proceso menos controlable en el caso de los liposomas. Además, resulta interesante destacar que en ambos casos la cantidad vehiculizada es superior a los resultados alcanzados en estructuras lipídicas de similar naturaleza [Clares y cols., 2013].

### **5.3.1. ESTUDIO ELECTROKINÉTICO DE ESTABILIDAD**

#### **5.3.1.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Como prueba adicional de tipo cualitativo de la absorción de fármaco, se estudiaron las modificaciones en los valores de movilidad electroforética ( $u_e$ ) de cada una de las nanopartículas al ponerlas en contacto con el fármaco. La extrema sensibilidad de la técnica de electroforesis debe permitir la identificación de cambios en las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas consecuencia de la adsorción de moléculas de fármaco [Reddy y cols., 2012; Clares y cols., 2013].

La determinación experimental seguida es igual a la descrita para las determinaciones electroforéticas anteriores (ver sección 4.3.). La única diferencia es que se determinaron los valores de  $u_e$  para los liposomas y los magnetoliposomas con la prednisolona vehiculizada.

#### **5.3.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Tabla 5.5. y 5.6. se muestran los valores de  $u_e$  de los liposomas y magnetoliposomas con fármaco y sin fármaco en función del pH y de la fuerza iónica del medio, respectivamente. Como se puede observar, los valores de  $u_e$  para los dos tipos de partículas son muy similares en los dos casos lo que indica que el fármaco se encuentra en el interior de la nanoplateforma.

**Tabla 5.5.** Valores de  $ue$  ( $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1} / \text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) para liposomas y magnetoliposomas con y sin prednisolona en función del pH del medio de dispersión.

pH	Liposomas	Liposomas-prednisolona	Magnetoliposomas	Magnetoliposomas-prednisolona
3	$0.05 \pm 0.23$	$1.13 \pm 0.28$	$0.41 \pm 0.05$	$0.93 \pm 0.15$
4	$-2.09 \pm 0.41$	$-1.80 \pm 0.21$	$0.70 \pm 0.20$	$-0.04 \pm 0.05$
5	$-2.75 \pm 0.21$	$-2.71 \pm 0.25$	$-0.30 \pm 0.08$	$-0.89 \pm 0.25$
6	$-3.54 \pm 0.17$	$-2.76 \pm 0.29$	$-0.76 \pm 0.21$	$-2.17 \pm 0.19$
7	$-3.85 \pm 0.33$	$-2.77 \pm 0.16$	$-2.09 \pm 0.10$	$-3.03 \pm 0.13$
8	$-3.88 \pm 0.14$	$-2.98 \pm 0.45$	$-2.40 \pm 0.09$	$-3.32 \pm 0.05$
9	$-6.08 \pm 0.28$	$-4.66 \pm 0.24$	$-2.14 \pm 0.22$	$-3.73 \pm 0.14$

**Tabla 5.6.** Valores de  $ue$  ( $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1} / \text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) para liposomas y magnetoliposomas con y sin prednisolona en función de la fuerza iónica del medio de dispersión.

[KNO <sub>3</sub> ]M	Liposomas	Liposomas-prednisolona	Magnetoliposomas	Magnetoliposomas-prednisolona
$10^{-5}$	$-3.90 \pm 0.42$	$-3.47 \pm 0.27$	$-1.46 \pm 0.17$	$-0.86 \pm 0.21$
$5\cdot 10^{-5}$	$-3.53 \pm 0.25$	$-4.22 \pm 0.13$	$-1.82 \pm 0.22$	$-2.46 \pm 0.14$
$10^{-4}$	$-3.30 \pm 0.28$	$-3.98 \pm 0.25$	$-1.89 \pm 0.20$	$-2.37 \pm 0.14$
$5\cdot 10^{-4}$	$-3.90 \pm 0.37$	$-4.38 \pm 0.29$	$-1.97 \pm 0.47$	$-2.39 \pm 0.08$
$10^{-3}$	$-3.22 \pm 0.22$	$-4.54 \pm 0.41$	$-1.28 \pm 0.10$	$-2.34 \pm 0.18$
$5\cdot 10^{-3}$	$-2.95 \pm 0.16$	$-3.09 \pm 0.08$	$-1.25 \pm 0.19$	$-0.71 \pm 0.09$
$10^{-2}$	$-2.62 \pm 0.08$	$-3.00 \pm 0.15$	$-1.22 \pm 0.13$	$-1.52 \pm 0.10$

## **5.4. LIBERACIÓN DE PREDNISOLONA**

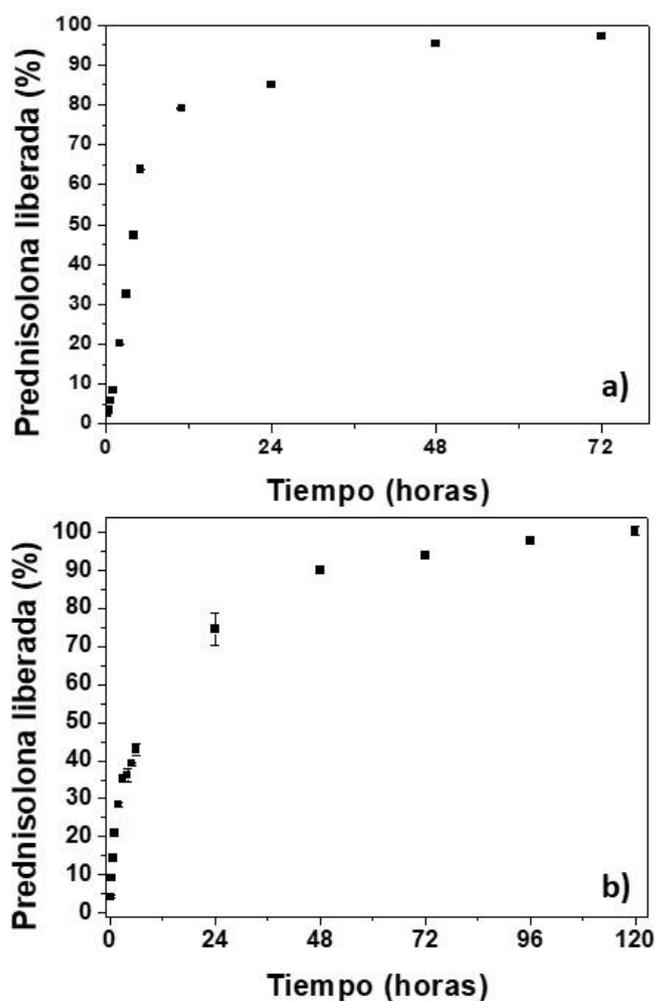
### **5.4.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

En los apartados anteriores se han descrito las condiciones óptimas de vehiculización de prednisolona en los liposomas y magnetoliposomas. El siguiente paso en este trabajo de investigación es caracterizar el proceso de liberación *in vitro* del fármaco desde estas nanoplataformas. En este ensayo se utilizaron aquellos liposomas y magnetoliposomas preparados fijando una concentración de 40 mg de prednisolona en la fase oleosa de la síntesis (partículas con máxima cantidad de fármaco vehiculado mediante absorción).

El ensayo de liberación se realizó por triplicado a  $37.0 \pm 0.5$  °C. Para ello, se utilizó el método de diálisis y un tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH  $7.4 \pm 0.1$ ) como medio de liberación. Las bolsas de diálisis se mantuvieron sumergidas en agua bidestilada 12 horas antes de comenzar el ensayo. Las bolsas de diálisis (cutoff of 2000 Da, Spectrum® Spectra®/Por® dialysis membrane tubing, Estados Unidos) utilizadas se caracterizan por un tamaño de poro de 2000 Da, siendo capaces de retener las nanopartículas en su interior, dejando sólo pasar a su través el fármaco liberado hasta el medio de liberación. Después, se introdujo en el caso de los liposomas 1 mL de la suspensión de éstos (que contenían 5 mg/mL de prednisolona) y 2 mL de la suspensión de magnetoliposomas de prednisolona (que contenían 9 mg/mL de prednisolona) en la bolsa de diálisis cerrada mediante pinzas magnéticas. Las bolsas se introdujeron en un vaso con 0.5 L de medio de disolución bajo agitación (100 r.p.m.). La temperatura se mantuvo a  $37.0 \pm 0.5$  °C durante todo el experimento. A diferentes intervalos de tiempo (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, 72, 96 y 120 horas), se extrajo 1 mL del medio y se determinó por UV-Vis la cantidad de prednisolona liberada (244 nm, siguiendo el mismo procedimiento para cuantificar la cantidad de prednisolona encapsulada). Para asegurar las condiciones *sink*, se añadió el mismo volumen extraído del tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Ambas liberaciones se realizaron por separado.

#### 5.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 5.6. se muestra la liberación de prednisolona en función del tiempo desde los liposomas y los magnetoliposomas. El proceso de liberación es bifásico en ambos casos. Se puede apreciar una primera fase de liberación rápida que probablemente corresponda a la pérdida de fármaco débilmente atrapado (localizado más externamente en el magnetoliposoma). En concreto, en el caso de los liposomas  $\approx$  63% de la prednisolona es liberada en las 6 primeras horas mientras que en los magnetoliposomas se libera  $\approx$ 40% de la prednisolona en el mismo tiempo. Sin embargo, durante la segunda fase del proceso la liberación de prednisolona se hace más lenta: en los liposomas se libera  $\approx$ 37 % restante a lo largo de 3 días mientras que en los magnetoliposomas se libera  $\approx$ 60% restante a lo largo de 5 días. En ambos casos, este proceso de liberación sostenido en el tiempo es muy adecuado para fines terapéuticos, ya que prolonga el tiempo de exposición de las células diana al fármaco. Pero además nos permite observar, que la liberación del fármaco es más retardada aún en el caso de los magnetoliposomas, lo que los hace aún más óptimos para el transporte de fármacos.



**Figura 5.6.** Liberación de prednisolona absorbida desde los liposomas (a) y magnetoliposomas (b) en función del tiempo de incubación en una solución tampón  $\text{NaOH/KH}_2\text{PO}_4$  ( $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$ ) a  $37.0 \pm 0.5$  °C.

Para completar el estudio de la liberación del fármaco desde los liposomas y magnetoliposomas, se realizó el ajuste cinético de los perfiles de liberación utilizando para ello el análisis de varianza de la regresión al modelo (criterio ANOVA) y del coeficiente de determinación,  $r^2$ . Según estos criterios, se seleccionan en primer lugar los ajustes con mayor valor del estadístico  $F$  de Fisher-Snedecor (cociente entre las medias de cuadrados de regresión y residual) y de entre ellos se admite que el que presente un mayor valor de  $r^2$  (una mayor suma de cuadrados de regresión) se corresponderá con la ecuación de la cinética que mejor se ajusta a los resultados obtenidos *in vitro* [Doménech y cols., 2013; Morales y cols., 2004]. Se han ensayado

diferentes modelos matemáticos con la finalidad de elegir el que con mayor fiabilidad sea capaz de explicar el mecanismo de liberación de prednisolona:

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

$$Q_t = K_0 t \quad (5.3.)$$

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

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

$$\begin{aligned} \frac{dQ_t}{dt} &= K_1(Q_\infty - Q_t) \\ Q_t &= Q_\infty(1 - e^{-K_1 t}) \end{aligned} \quad (5.4.)$$

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

c) Cinética de raíz cuadrada (Higuchi): asociada a un proceso de liberación mediante difusión del fármaco.

$$Q_t = A + B \cdot \sqrt{t} \quad (5.5.)$$

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

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = A + B \cdot t \quad (5.6.)$$

La liberación de la prednisolona desde las dos nanopartículas se produce en dos fases. Por lo tanto, el ajuste cinético hay que hacerlo de acuerdo a cada una de las fases

(Figura 5.7. y Figura 5.8.). En la Tabla 5.7. y 5.8. se recogen los valores de  $F$  y  $r^2$  correspondientes a los diferentes ajustes cinéticos de la liberación de prednisolona desde los liposomas y magnetoliposomas respectivamente. Como puede apreciarse, la cinética que mejor describe la primera fase del proceso de liberación de los liposomas es de orden 0. Esto es indicativo de un proceso de liberación de fármaco sostenido y constante a lo largo del tiempo. En el caso de los magnetoliposomas la cinética de la primera fase es la de orden 1. Esto es indicativo de un proceso que depende de la concentración a la que se encuentre el mismo en la parte más superficial de los magnetoliposomas. Sin embargo, la cinética a la que mejor se ajusta el proceso de liberación durante la segunda fase en los dos tipos de nanopartículas se corresponde con la de raíz cuadrada lo que implica una liberación por difusión del fármaco a lo largo del tiempo desde la matriz liposomal hacia el medio. Una posible explicación a este tipo de liberación podría basarse en el hecho de que el fármaco se encuentra originalmente en el interior de la matriz liposomal y difunde a través de ella hacia la superficie. Se requiere para ello una elevada cantidad de fármaco absorbida en la matriz y no fuertemente ligado a ésta. Hay que destacar, que aún teniendo los tipos de nanopartículas una liberación de fármaco sostenida en el tiempo, los magnetoliposomas liberan todo su contenido en prednisolona en 120 h mientras que los liposomas lo hacen en 72 h. Por tanto, los magnetoliposomas logran aumentar la liberación del fármaco aumentada en el tiempo frente a los liposomas y a al fármaco libre, lo que lo hacen aptos como sistemas transportadores de fármacos hasta la célula diana.

**Tabla 5.7.** Valores del estadístico  $F$  y del coeficiente de determinación  $r^2$  obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de prednisolona liberada en función del tiempo desde los liposomas.

		<b>Cinética de orden cero</b>	<b>Cinética de orden uno</b>	<b>Cinética de raíz cuadrada</b>	<b>Cinética de raíz cúbica</b>
<b>1ª Fase de liberación</b>	F	<b>551.24</b>	<b>421.25</b>	94.872	37.33
	$r^2$	<b>0.987</b>	0.982	0.923	0.813
<b>2ª Fase de liberación</b>	F	22.30	144.54	<b>3816.14</b>	<b>307.39</b>
	$r^2$	0.876	-0.5	<b>0.942</b>	0.292

**Tabla 5.8.** Valores del estadístico  $F$  y del coeficiente de determinación  $r^2$  obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de prednisolona liberada en función del tiempo desde los magnetoliposomas.

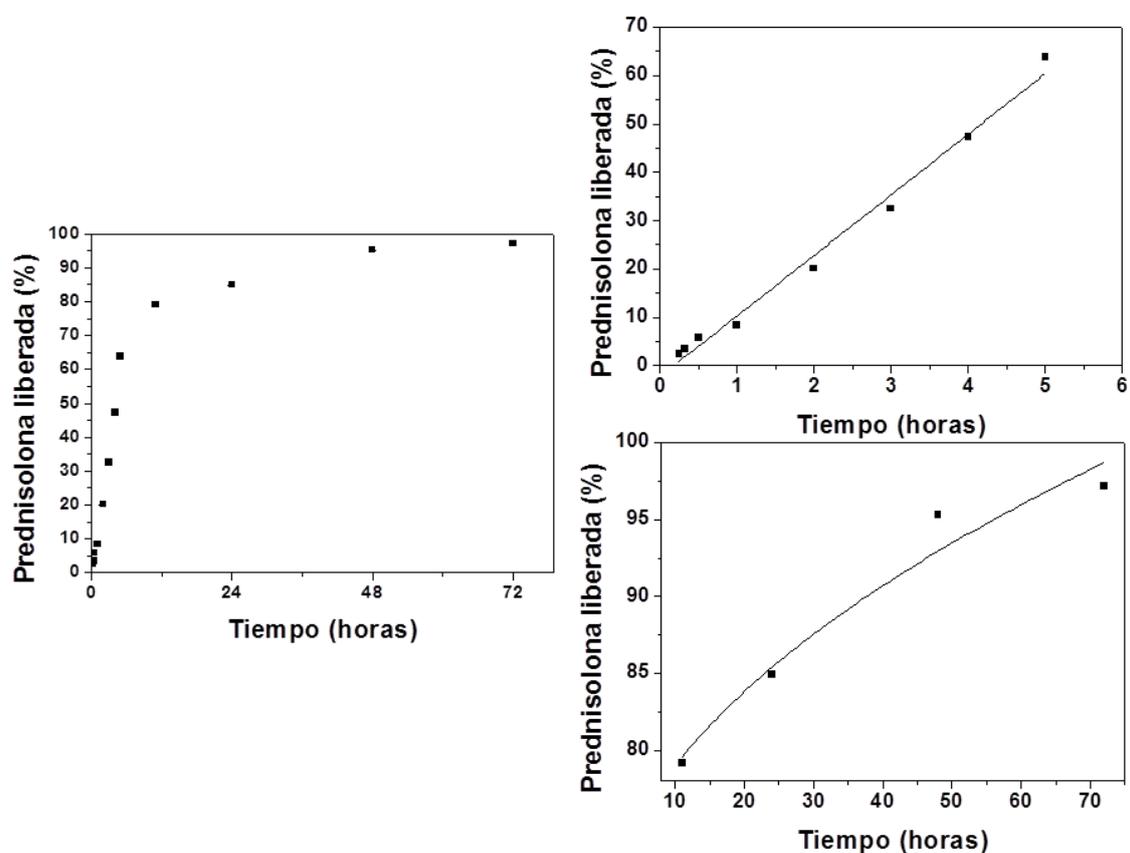
		<b>Cinética de orden cero</b>	<b>Cinética de orden uno</b>	<b>Cinética de raíz cuadrada</b>	<b>Cinética de raíz cúbica</b>
<b>1ª Fase de liberación</b>	$F$	48.99	<b>114.66</b>	<b>393.53</b>	27.65
	$r^2$	0.857	<b>0.986</b>	0.952	0.392
<b>2ª Fase de liberación</b>	$F$	17.09	150.01	<b>1836.11</b>	<b>279.41</b>
	$r^2$	0.800	-0.333	<b>0.890</b>	0.281

**Tabla 5.9.** Coeficientes de ajuste de la Ecuación (5.4) a la cinética de liberación de orden 0 que describe la primera etapa de liberación de los liposomas y de la Ecuación (5.5) a la cinética de liberación de raíz cuadrada que describe la segunda etapa de liberación de la prednisolona desde los liposomas.

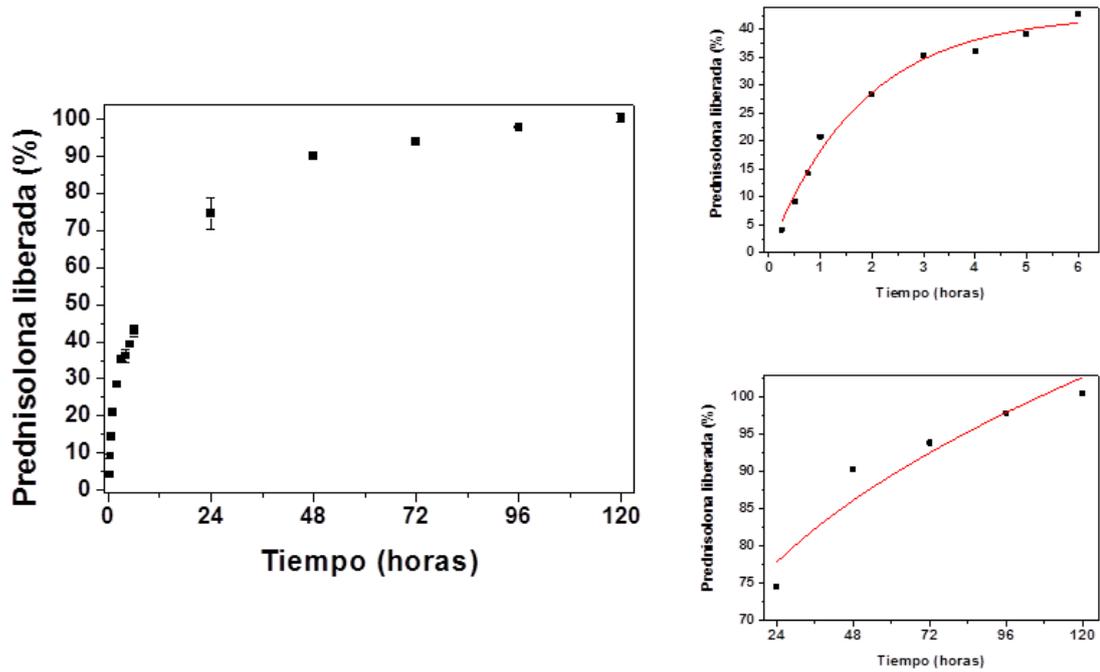
	<b>Coeficiente A</b>	<b>Coeficiente B</b>
1ª Fase de liberación	(-2.20 ± 1.40)	(12.52 ± 0.53)
2ª Fase de liberación	(67.26 ± 3.24)	(3.70 ± 0.52)

**Tabla 5.10.** Coeficientes de ajuste de la Ecuación (5.4) a la cinética de liberación de orden 1 que describe la primera etapa de liberación de los magnetoliposomas y de la Ecuación (5.5) a la cinética de liberación de raíz cuadrada que describe la segunda etapa de liberación de la prednisolona desde los magnetoliposomas.

	<b>Coefficiente A</b>	<b>Coefficiente B</b>
1ª Fase de liberación	(42.63 ± 1.64)	(0.55 ± 0.05)
2ª Fase de liberación	(57.70 ± 6.03)	(4.10 ± 0.71)



**Figura 5.8.** Izquierda: datos experimentales de la cinética de liberación de prednisolona desde los liposomas. Derecha: líneas de mejor ajuste a los datos experimentales según los modelos descritos en el texto, para la fase inicial de liberación (arriba) y para tiempos largos (abajo).



**Figura 5.9.** Izquierda: datos experimentales de la cinética de liberación de prednisolona desde los magnetoliposomas. Derecha: líneas de mejor ajuste a los datos experimentales según los modelos descritos en el texto, para la fase inicial de liberación (arriba) y para tiempos largos (abajo).



## **6. ESTUDIOS *IN VITRO***



Dos de los requisitos que deben cumplir las nanoplataformas como sistemas transportadores de fármacos son ser biodegradables y biocompatibles para ser administrados al paciente y que no produzcan toxicidad [Bender y cols., 2012; Dash y cols., 2010]. Sólo así puede garantizarse la seguridad en la administración del medicamento al paciente. Por tanto, es importante y justificable llevar a cabo, durante el proceso de desarrollo de una nanopartícula, unos estudios básicos de hemocompatibilidad y toxicidad.

## **6.1. HEMOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO***

En el presente trabajo de investigación, los ensayos de hemocompatibilidad *in vitro* pretenden definir el grado de activación plaquetaria que inducen las nanopartículas desarrolladas, junto con la investigación de la activación del complemento, la hemólisis y el tiempo de coagulación en muestras de plasma sanguíneo.

### **6.1.1. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS**

Para evaluar la toxicidad de las nanopartículas sintetizadas con los eritrocitos se siguió el protocolo modificado de Evans y cols. (2013). Las muestras de sangre que se utilizaron procedentes de donantes sanos se recogieron en recipientes que contenían ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La sangre se centrifugó (500 x g) para eliminar el plasma o suero. Los eritrocitos se limpiaron dos veces mediante centrifugación con NaCl (150 mM). El pellet resultante se resuspendió en PBS a pH 7.4 en una concentración 1:50. Para la incubación se utilizó una placa de 96 pocillos y en cada uno de ellos se introdujeron 190  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos junto a 10  $\mu$ L de la suspensión de nanopartículas para alcanzar una concentración final de 5 a 250  $\mu$ g/mL. La incubación se llevó a cabo a  $37 \pm 0.5$  °C durante 1 h y bajo agitación mecánica (15 r.p.m.). Posteriormente se tomó una muestra de 100  $\mu$ L del sobrenadante y colocaron en otra placa de 96 pocillos planos. La liberación de hemoglobina se evaluó midiendo la absorbancia de este sobrenadante a 492 nm (Titertek multiscan colorimeter, Flow,

Irvine, California), y la hemólisis (%) se determinó usando la siguiente ecuación: hemólisis (%) = [(Absorbancia de la muestra de ensayo - absorbancia del control) / Mayor absorbancia del control positivo] × 100. El efecto *in vitro* de las formulaciones sobre la lisis de los eritrocitos se evaluó mediante el uso de PBS como control negativo (0% de lisis), y el agente tensioactivo no iónico Triton®X-100 (1%, w / v) como control positivo (100% de lisis) de hemólisis.

La interacción de las plaquetas con las nanopartículas puede determinar su activación (y agregación) lo cual generará complicaciones trombóticas, revelando, por lo tanto, incompatibilidad sanguínea. Cada muestra fue cuantificada mediante Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) en términos de liberación de P-selectina soluble después de la incubación de las nanopartículas con la sangre. Brevemente, las muestras de sangre se centrifugaron (1000 r.p.m, 20 min) para eliminar el sobrenadante rico en plaquetas. Luego, la sangre se centrifugó de nuevo, y se combina con el plasma extraído anteriormente para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). El plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvo por centrifugación de la sangre restante a 3000 rpm (10 min). El PRP se diluyó (1:100) con una solución de oxalato de amonio al 1% y se ajustó a una solución final de plaquetas ≈ 108 mg/mL. Después, 100 mL de PRP se incubó durante 1 hora con 50 mg de nanopartículas a  $37.0 \pm 0.5$  °C. El sobrenadante se centrifugó a 5.000 rpm (10 min). Tanto PPP como PRP fueron utilizados como control, y PBS como control negativo.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **6.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Tabla 6.1. se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos de compatibilidad sanguínea para los tres tipos de nanopartículas desarrolladas. Los resultados sugieren claramente un amplio margen de seguridad *in vivo* para los tres tipos de partículas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, liposomas y magnetoliposomas) y, por lo tanto, puede asumirse que estos nanosistemas son adecuados para la vía de administración parenteral. De hecho, si comparamos los datos con los obtenidos para el control, se espera que las partículas presenten un efecto insignificante sobre la hemólisis. Además,

cabe asumir que las nanopartículas no activarán la liberación de sP-selectina (parámetro característico de la activación plaquetaria), no activarán el sistema del complemento y tampoco activarán el tiempo de coagulación plasmática. Se han descrito resultados similares en otros tipos de partículas compuestas magnéticas que tienen un amplio margen de seguridad *in vivo* [Perez-Artacho y cols., 2012; Dash y cols., 2010].

**Tabla 6.1.** Compatibilidad sanguínea de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , los liposomas y los magnetoliposomas en términos de hemólisis (%), activación plaquetaria (liberación de SPselectina, ng/mL), activación del complemento (liberación de C3a: C3a desArg, ng/mL), y tiempo de coagulación plasmática ( $T_{1/2}$  máx, minutos).

MUESTRA	HEMÓLISIS (%)	LIBERACIÓN DE SP-SELECTINA (ng/ml)	C3a desArg (ng/ml)	$T_{1/2}$ máx (minutos)
Liposomas	0.8 ± 0.4	94 ± 7	293 ± 6	9.8 ± 0.6
Maghemita	0.6 ± 0.4	98 ± 6	297 ± 7	9.7 ± 0.9
Magnetoliposomas	1.1 ± 0.5	103 ± 4	296 ± 8	10.4 ± 0.7
Control (Solución PBS)	0	102 ± 4	295 ± 7	9.9 ± 0.8

## 6.2. ESTUDIOS *IN VITRO* DE PROLIFERACIÓN

Se estudió la citotoxicidad que pueden ejercer partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , liposomas y magnetoliposomas en fibroblastos de colon humano CCD-18, en líneas celulares de carcinoma de colon humano T-84 y en línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (obtenidos del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, España; y de la American Type Culture Collection, EE.UU., respectivamente).

## 6.2.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 6.2.1.1. Ensayos en líneas células T-84 y CCD-18

Las líneas celulares T-84, CCD-18 y RAW 264.7 se cultivaron en un medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, EE.UU) suplementado con suero fetal bovino (SFB, 10% de riqueza), una solución 15 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1piperazinaetanosulfónico (HEPES), una solución 14 mM de bicarbonato sódico, una solución 2 mM de L-glutamina, una solución 40 µg/mL de gentamicina y una solución de 1% de antibióticos (penicilina-estreptomocina) (Antibióticos S.A., España). Las células se sembraron en cultivos monocapa en 96 pocillos ( $6 \cdot 10^3$  células por pocillo) y se mantuvieron durante 24 horas a  $37.0 \pm 0.5$  °C en una atmósfera de aire controlada con un 5% de riqueza en CO<sub>2</sub> (Incubador de CO<sub>2</sub> con camisa de agua AutoFlow UN-4750; NuAire, EE.UU.).

El análisis de citotoxicidad de los tres tipos de partículas sintetizados se llevó a cabo por triplicado en las líneas celulares T-84 y CCD18 mediante el ensayo de sulforodamina B. La sulforodamina B (SRB) es un colorante de aminoxantano, rosado y brillante el cual posee dos grupos sulfónicos (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas (disuelta en ácido acético 1%), la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular que indicaría el índice de células viable. Brevemente, las células se sembraron en placas de 24 pocillos ( $8 \times 10^3$  células/pocillo para T-84 y  $1 \times 10^4$  células/pocillo para CCD-18) y se incubaron durante la noche. Después se añadieron los diferentes tipos de partículas en concentraciones que oscilaron en un rango de 0.05-100µg/mL. Tras un periodo de incubación de 48 y 72 h, las células se fijaron con 300 µL de ácido tricloroacético (TCA; 10%) durante 20 min a 4 °C, y se tiñeron con 300 µL de sulforodamina B (SRB; 0.4%) durante 20 min. Después de tres lavados con ácido acético (1%), el colorante se resuspendió en 10 mM y pH 10.5 de Trizma® (Sigma-Aldrich). Finalmente, se realizó un ensayo colorimétrico a 492 nm (Colorímetro Titertekmultiscan, Flow, Irvine, CA, EE. UU.). Se consideró que la densidad óptica (OD) del colorante empleado es proporcional

al número de células viables. El porcentaje de células vivas se calculó utilizando la relación entre las densidades ópticas de las células tratadas y la densidad óptica de las células no tratadas (control) multiplicado por 100.

#### **6.2.2.2. Ensayo de proliferación en linfocitos periféricos**

Para determinar específicamente la citotoxicidad de los magnetoliposomas en linfocitos, se llevó a cabo un ensayo de proliferación. La sangre humana se extrajo de un donante sano y se recolectó en tubos con EDTA. Se agregó el mismo volumen de Histopaque® – 1077 (Sigma-Aldrich) y los tubos se centrifugaron (400 x g, 30 min). Después de la centrifugación, la capa superior de plasma sanguíneo se eliminó y se recolectó la capa intermedia que contenía los linfocitos. Estas células se transfirieron a un nuevo tubo de 15 ml y se lavaron en 10 ml de PBS mediante centrifugación (1000 x g, 10 min). El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 1 ml del medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de FBS y un 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina) (Sigma-Aldrich). Las células se contaron y se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de  $20 \times 10^3$  celdas/pozo en un volumen de 90  $\mu$ l. Después se agregó 10  $\mu$ l de la suspensión de magnetoliposomas por pozo para alcanzar una concentración final de 5 a 250  $\mu$ g/ml y la placa se incubó durante 1 y 24 horas a 37 ° C en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>. Después del tiempo de incubación, la viabilidad celular se midió con el kit de conteo celular 8 (CCK-8) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japón). El reactivo CCK-8 se añadió a cada pocillo para alcanzar una concentración final del 10% y las muestras se incubaron durante 4 h en las mismas condiciones. Finalmente, la placa se midió a 450 nm (colorímetro Titertek Multiscan, Flow Laboratories, Irvine, EE.UU.)

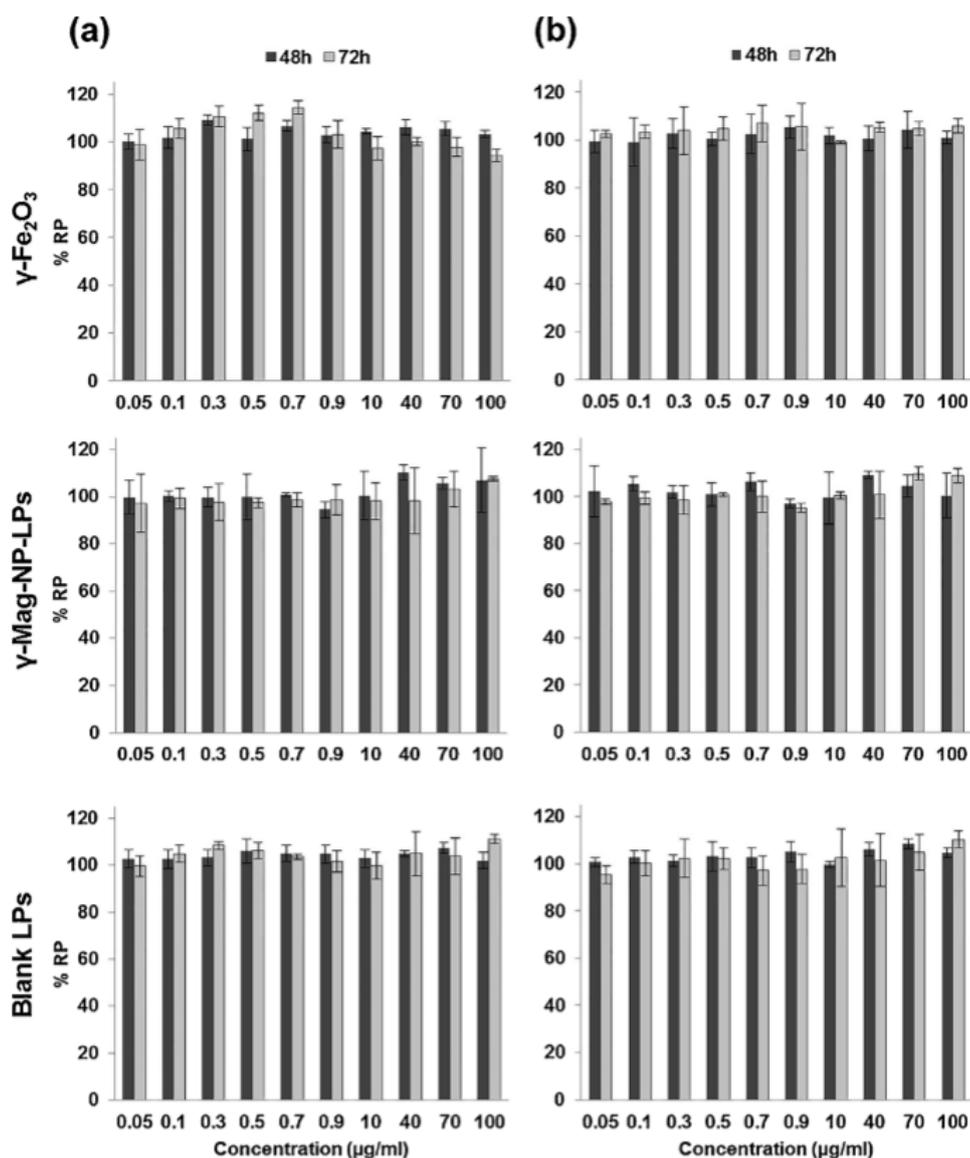
#### **6.2.2.3. Ensayo de proliferación en la línea celular de macrófagos murinos**

La toxicidad de los magnetoliposomas en macrófagos se estudió en la línea celular RAW 264.7. Se añadió una densidad de  $7.5 \times 10^3$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos de 90  $\mu$ l. Después, se añadió 10  $\mu$ l de la suspensión de magnetoliposomas para obtener un rango de concentraciones de 5 a 250  $\mu$ g/ml y se incubaron durante 1 y 24

horas. Posteriormente, se añadió el reactivo CCK-8 a cada pocillo para alcanzar una concentración final del 10%. La absorbancia se midió después de 4 h de incubación en un colorímetro multiscan Titertek (flujo) a 450 nm para determinar la viabilidad celular.

### **6.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

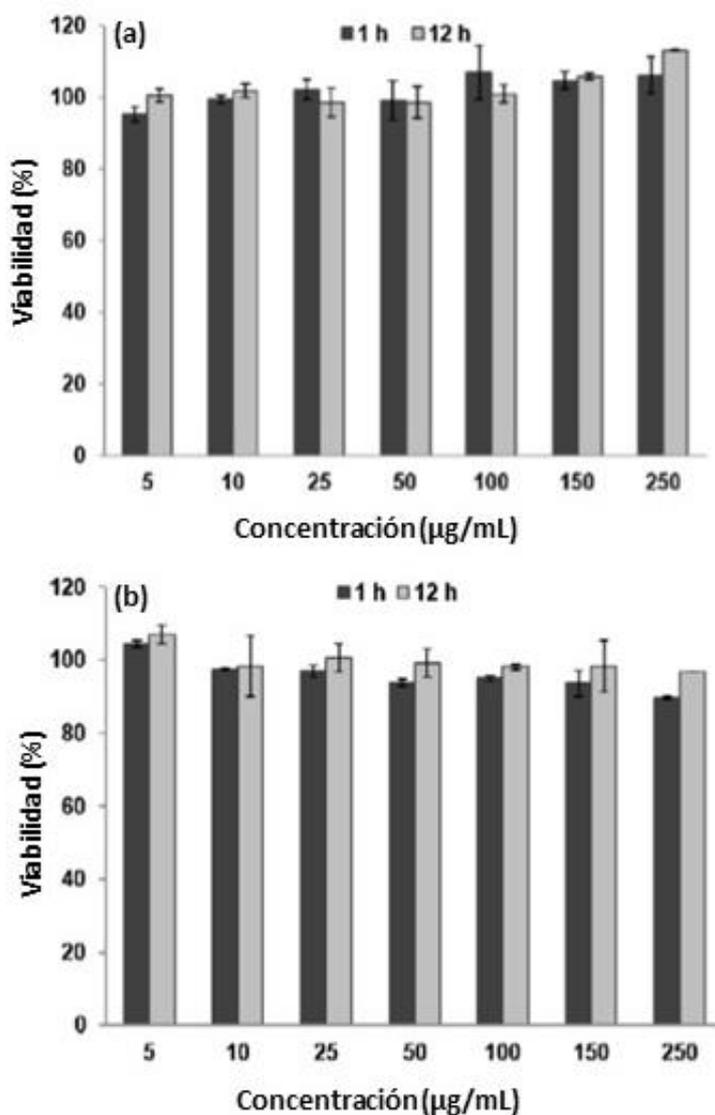
Los datos obtenidos de citotoxicidad de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , los liposomas y los magnetoliposomas en las líneas celulares ensayadas se recogen en la Figura 6.1. Se puede asumir que la citotoxicidad de los diferentes tipos de nanopartículas es insignificante en ambas líneas celulares. Independientemente del tipo y concentración de partícula, y del tiempo de incubación célula-partícula, los resultados del ensayo de SRB muestran que no existen diferencias significativas entre las absorbancias correspondientes a los controles y las absorbancias correspondientes a los pocillos de células tratados con las nanopartículas. Se puede observar en otros estudios como magnetoliposomas constituidos por DMPG, PC, colesterol y magnetita no muestran toxicidad en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Sin embargo, cuando vehiculizan los antitumorales (oxaliplatino o gemcitabina), la muerte celular aumentó significativamente en comparación con el fármaco libre. De hecho, se detectó una reducción significativa en el volumen del tumor (hasta el 85,8%) en comparación con el grupo de control [Ye y cols., 2014; Ye y cols., 2016].



**Figura 6.1.** Citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , los liposomas y los magnetoliposomas sobre líneas celulares de fibroblastos de colon humano (CCD-18) (a) y de carcinoma de colon humano (T-84) (b), tras 48 horas (barra gris) y 72 horas (barra blanca) de incubación. Las concentraciones de nanopartículas ensayadas oscila entre 0.05 y 100  $\mu\text{g/ml}$ . Los valores representados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones.

En la Figura 6.2.a se muestra que el porcentaje de viabilidad en los linfocitos no fue inferior al 100% en ninguna de las dosis probadas, lo que sugiere ausencia de toxicidad de los magnetoliposomas en linfocitos. Finalmente, la línea celular de macrófagos RAW

264.7 se expuso a los magnetoliposomas sintetizados y muestra valores de viabilidad celular cercanos al 100% en todas las dosis administradas (Figura 6.2.b). Por lo tanto, los magnetoliposomas sintetizados mostraron una alta biocompatibilidad en todas las células sanguíneas analizadas.



**Figura 6.2.** Citotoxicidad *in vitro* de los magnetoliposomas sobre los linfocitos tras 1 h y 12 h de incubación (a). Citotoxicidad *in vitro* de los magnetoliposomas sobre la línea celular de macrófagos RAW 264.7. La concentración de nanopartículas ensayadas oscila entre 5 y 250 µg/mL. Los valores representados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones.

## **6.3. INTERNALIZACIÓN CELULAR DE LOS MAGNETOLIPOSOMAS**

Para comprobar que los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación proceden realmente de la internalización de las partículas sintetizadas se llevaron a cabo dos varios ensayos. En primer lugar, se realizó el ensayo de Prussian Blue, el cual nos permite mediante tinción de las células observar que los liposomas magnéticos están dentro de la célula. También se llevará a cabo un ensayo de migración celular, que permite comprobar que las células responden a la respuesta de un campo magnético, y por tanto indica que los magnetoliposomas se encuentra dentro de la célula. El análisis mediante TEM permitirá observar en qué compartimento celular se acumulan las nanopartículas.

### **6.3.1. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS**

#### **6.3.1.1. PRUSSIAN BLUE**

Con el fin de confirmar la presencia de magnetoliposomas en las células tumorales, las células T-84 se sembraron en una placa de 8 pocillos y se incubaron durante la noche. Se añadieron añadieron las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y magnetoliposomas al cultivo celular de forma que hubiera que la concentración final de hierro en el medio de cultivo fue 10 y 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Después de 24 h, las células se visualizaron mediante tinción con azul de Prusia para la detección de hierro. Las células se fijaron durante 10 minutos en formaldehído al 4%, se tiñeron durante 30 minutos con un volumen igual de ácido clorhídrico al 20% y ferrocianuro potásico tihidrato al 10%, y se mantuvieron a contraste durante 15 minutos con una solución Nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich). Las muestras se deshidrataron y se adhirieron a los portaobjetos de vidrio para su observación mediante microscopía óptica (LeicaDMILLED). Se utilizó una modificación en el proceso de tinción que aumenta el tiempo de exposición con la solución Nuclear Fast Red (45 min) para intentar determinar mejor si hay presencia de hierro en el núcleo después de 24 h de exposición.

### **6.3.1.2. INTERNALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN LAS CÉLULAS CANCEROSAS**

La determinación cuantitativa de la internalización del hierro en células T-84 se realizó mediante el ensayo de fereno-s. Brevemente, las células se sembraron a  $1 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 24 pocillos en 0.4 ml de DMEM suplementado. Después de 24 h, las células se trataron con los magnetoliposomas en concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$  y con  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  en concentraciones equivalentes durante diferentes tiempos de exposición (0.5, 2, 6 y 24 h). Después de estos tiempos, las células se lavaron con PBS, se centrifugaron y se separaron. Los pellets obtenidos de estas muestras se lavaron con PBS y, después de la centrifugación, se resuspendieron en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Un volumen de 950  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo (5mM ferene-s, 0.2 M de ácido ascórbico en acetato de amonio 0.4 M, pH 4.3) (Sigma-Aldrich) se agregó a cada muestra y se dejó a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 20 h. También incluimos estándares de hierro  $\text{FeCl}_3$ . Finalmente, las muestras se midieron por triplicado en un colorímetro multiscan de Titertek (flujo) a 570 nm. El método de Bradford se utilizó para la cuantificación de proteínas con el fin de expresar los resultados de acuerdo con la concentración de proteínas celulares.

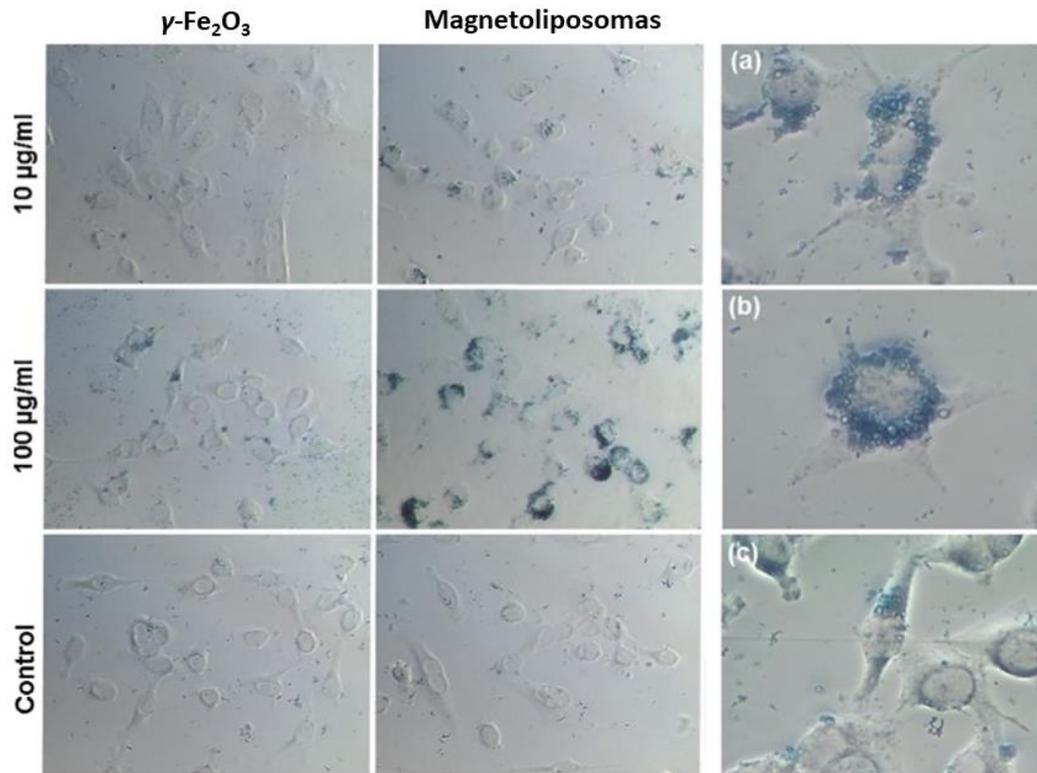
### **6.3.1.3. APLICACIÓN DE UN GRADIENTE MAGNÉTICO *IN VITRO***

Para determinar cualitativamente la movilidad inducida magnéticamente de las células tratadas con  $\gamma\text{-Mag-NP-LP}$ , se sembraron células T-84 en placas de Petri (35  $\times$  10 mm) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células / placa y después de 24 h se trataron con 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y magnetoliposomas. Las células no tratadas se utilizaron como control negativo. Después de 6 horas de exposición, las células se lavaron dos veces con PBS y se tripsinizaron. Las células centrifugadas se resembraron en medio fresco y se colocó un imán debajo de las placas de Petri. Algunos platos quedan sin imán, son el grupo control. Después de 24 h, las células se fijaron con ácido tricloroacético y se tiñeron con SRB para observar cualitativamente la distribución de las células en los platos fotografiados. La confluencia de las células en diferentes regiones de la placa de

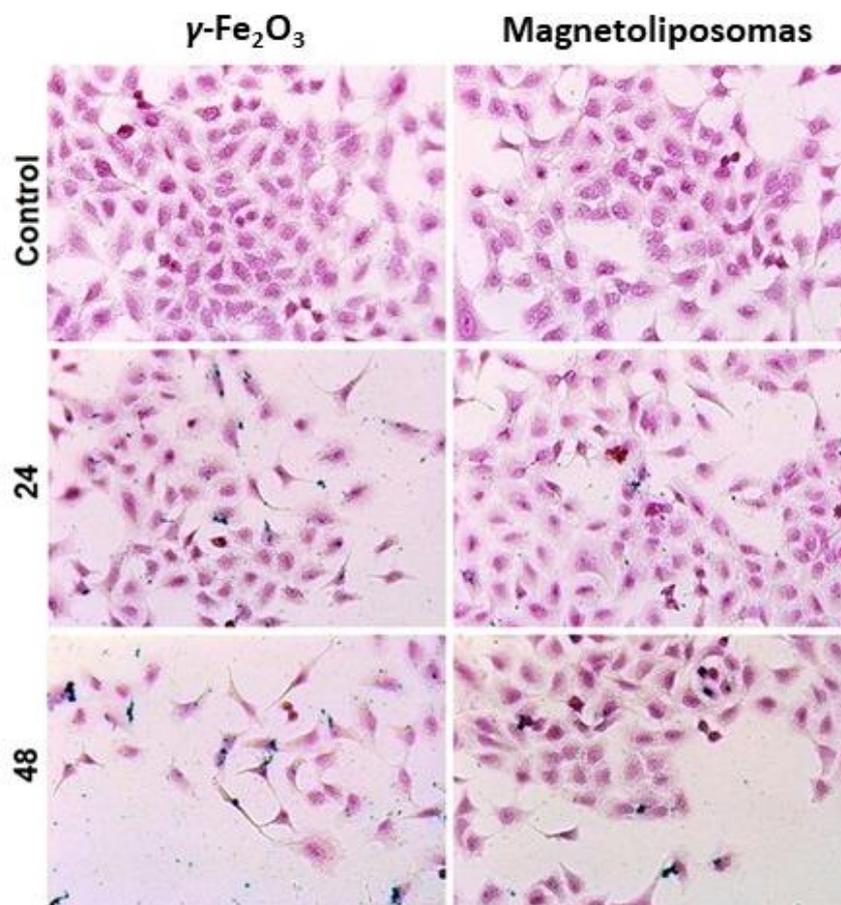
Petri se observó mediante microscopía óptica, específicamente en áreas ubicadas en la periferia y en el centro del imán.

### 6.3.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para observar la internalización y la acumulación de magnetoliposomas en células normales y tumorales se utilizó la tinción de azul de Prusia. Como se muestra en las Figs. 6.3. y 6.4., se detectó una presencia intensa de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  tras 24 horas de exposición. Además, no se observó ningún aumento significativo en la intensidad de la tinción después de alcanzarse el máximo de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  incorporado en la célula a las 24 h. Además, los magnetoliposomas facilitaron la acumulación de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  en las células tumorales, las cuales presentan una tinción más intensa que las que acumulan solo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . De hecho, la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  mostró una baja tasa de internalización. La acumulación de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  fue más intensa en el citoplasma celular, cerca de las estructuras de la membrana celular y en la región perinuclear (Fig. 6.4). Otros autores han obtenido distribuciones intracelulares similares de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  para nanoformulaciones magnéticas probadas en cultivos celulares [Calero y cols., 2015]. Sin embargo, en otros casos, se han observado localizaciones citoplásmicas y nucleares de liposomas magnéticos, por ejemplo para magnetoliposomas funcionalizados con el fragmento de anticuerpo de cadena única del receptor anti-transferrina (TfRscFv) en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB231 [Yang y cols., 2008].



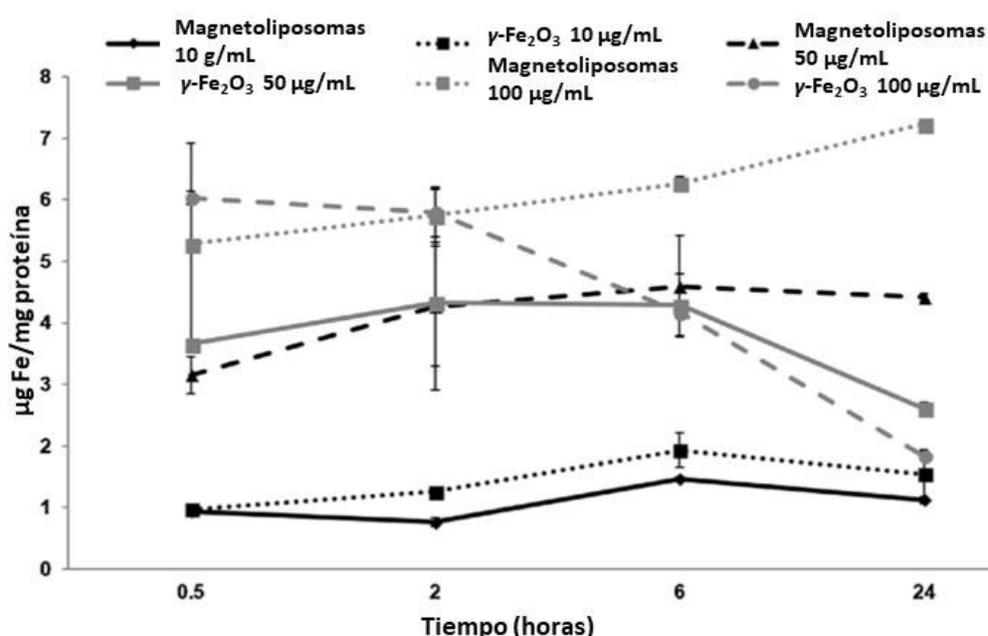
**Fig. 6.3.** Tinción con azul de Prussia de las células T-84 expuestas a los magnetoliposomas. Las células no tratadas se utilizaron como control. Se utilizó concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y magnetoliposomas. La acumulación se observó a las 24 h usando un microscopio de campo brillante equipado con una cámara digital en color (Magnification x40). Detalle de la acumulación celular de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  transportada por los magnetoliposomas (a, b) y  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  libre (c) a 100 $\mu\text{g/ml}$  (Magnificación  $\times$  60).



**Fig. 6.4.** Tinción con azul de Prusia de células T-84 expuestas a magnetoliposomas y  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 y 48 h. Se usó una modificación en el proceso de tinción para determinar la ubicación intracelular del hierro en las células T-84 mediante la intensificación de la tinción del núcleo (ver Métodos). Las células no tratadas se utilizaron como control negativo. Magnificación 20  $\times$ .

La internalización de los magnetoliposomas se estudió mediante el ensayo de ferene-s. Como se muestra en la Fig. 6.5., la presencia de hierro dentro de las células del cáncer de colon humano T-84 puede detectarse después de la exposición tanto a los magnetoliposomas como a la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  en tiempos muy cortos (0.5 h) como se ha demostrado anteriormente por otros autores [Bothun y cols., 2011; Hachani y cols., 2017]. A dosis bajas, se observó una pequeña internalización de las partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y de los magnetoliposomas que aumentó de una manera dependiente de la concentración. Curiosamente, después de 6 h de exposición a los magnetoliposomas, la

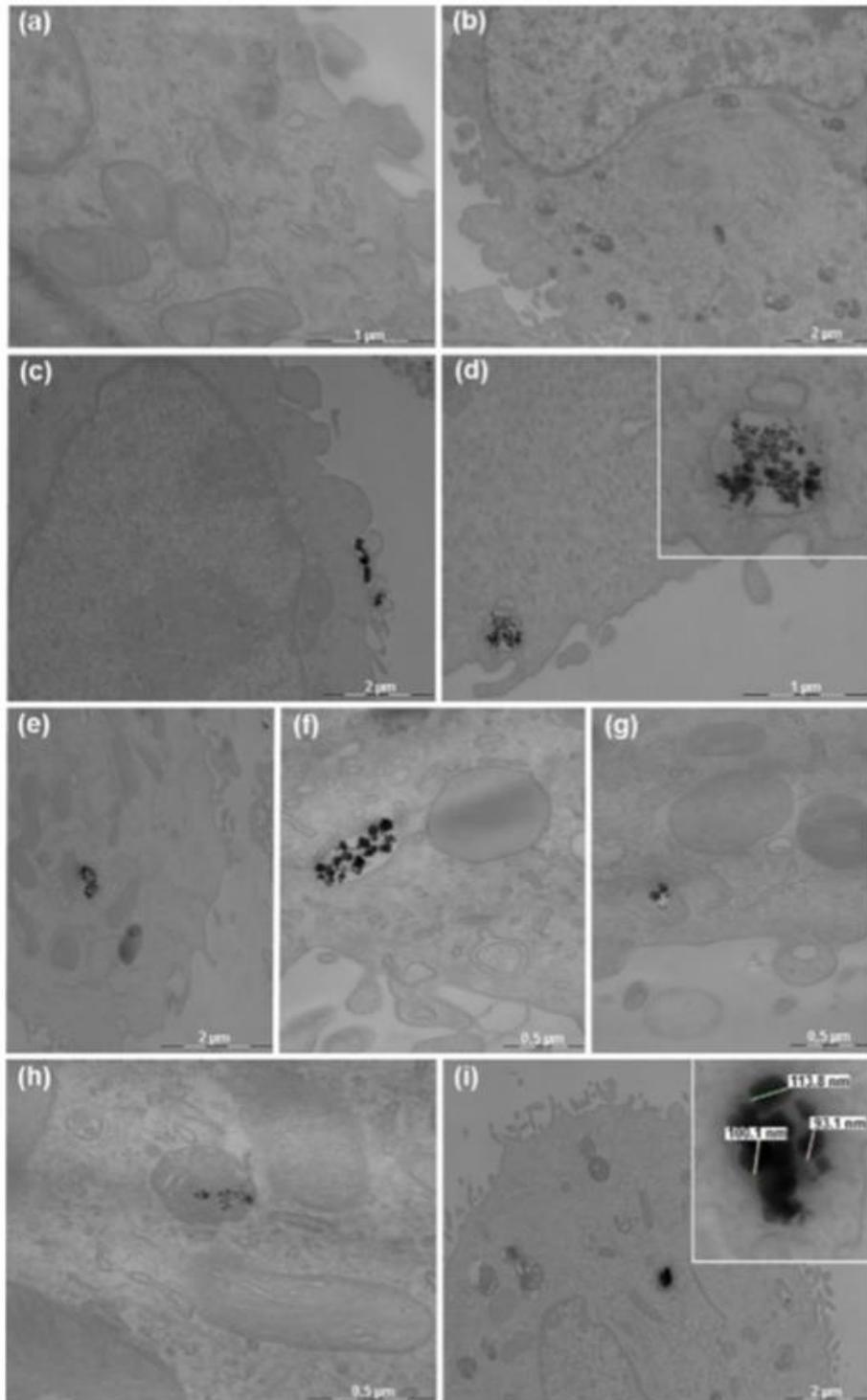
concentración de hierro se mantuvo constante o incluso aumentó. Por el contrario, se observó una disminución en el hierro intracelular a las 6 y 24 h a pesar de la exposición a  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Estos resultados apoyan los obtenidos con tinción con azul de Prusia que muestra una mayor internalización de los MLP a las 24 h.



**Fig. 6.5.** Internalización de las partículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  y magnetoliposomas en células de cáncer de colon humano T-84. El estudio se llevó a cabo en varios tiempos de exposición de 0.5, 2, 6 y 24 h mediante el ensayo de fereno. Los valores representados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones.

Finalmente, para determinar la ubicación celular y la distribución de los magnetoliposomas (Fig. 6.6.), realizamos un ensayo TEM. Las células tratadas mostraron agrupaciones de magnetoliposomas que se localizaban con frecuencia cerca de la membrana celular. La membrana celular envuelve los magnetoliposomas, formando vesículas en la periferia del citoplasma que podríamos llamar endosomas. Por lo tanto, parece que los magnetoliposomas entran en las células a través de una vía de tipo endocítica, algo ya descrito por otros autores [Calero y cols., 2015; Zhang y cols., 2013]. También se observaron áreas periféricas de las células con magnetoliposomas rodeados por extensiones de membrana celular (Fig. 6.6.c), lo que sugiere que la captación celular

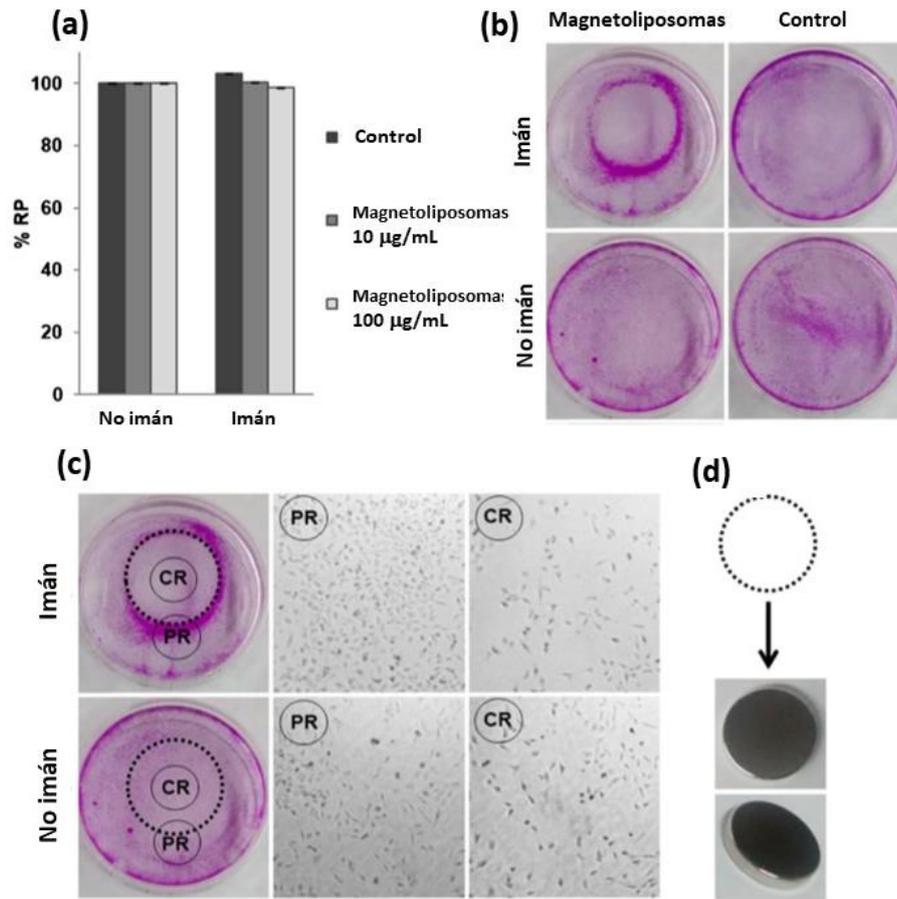
también se produjo a través del mecanismo de macropinocitosis [Cañete y cols., 2010; Kocbek y cols., 2013]. Además, se observaron magnetoliposomas en mitocondrias y regiones internas del citoplasma rodeadas por una membrana. Kocbek y cols. (2013) también observó nanopartículas poliméricas magnéticas dentro de las mitocondrias de las células de cultivo, aunque estos autores atribuyeron esta ubicación a la aplicación de una fuerza magnética. Hay que tener en cuenta que no se observaron magnetoliposomas en el núcleo ni tampoco daños en las demás organelas del citoplasma celular. Del mismo modo, no se registraron grupos de estas nanopartículas en las células T-84 no tratadas (Fig. 6.6.a y b).



**Fig. 6.6.** Análisis TEM de células T-84 incubadas con magnetoliposomas. Las células T-84 no tratadas muestran la morfología típica de las células tumorales (a y b). Imágenes secuenciales de la internalización de los magnetoliposomas en las células T-84; se puede ver los magnetoliposomas en la periferia de la membrana celular (c) y el inicio de su internalización (d). Dentro de las células T-84, pueden verse magnetoliposomas en el citoplasma (e), rodeado de estructuras de membrana (f), o

dentro de las mitocondrias (g y h). Detalle de magnetoliposomas en citoplasma celular (i).

Para demostrar la funcionalidad de los magnetoliposomas después de la internalización celular, las células T-84 tratadas con estas nanopartículas se expusieron a la acción de un campo magnético. Primero se demostró la ausencia de influencia del campo magnético en la proliferación celular (Fig. 6.7.a). Previamente se han descrito otros trabajos en los que la migración celular mediante la internalización de partículas magnéticas indicó una actividad magnética suficiente para, por ejemplo, modificar la dirección y la velocidad de las células migratorias (queratinocitos y fibroblastos) en la terapia celular [Bradshaw y cols., 2015]. En nuestro caso, como se muestra en la Fig. 6.7. (b y d), las células teñidas con SRB migraron y se acumularon en la periferia de un imán ubicado en el centro de las placas de Petri, donde se pudo detectar una gran confluencia celular en relación con otras áreas de la placa. Por lo tanto, las nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  en las células causan su movimiento hacia la ubicación del imán. De hecho, en las células tratadas con magnetoliposomas y que no fueron expuestas al imán no se observó esta distribución. Tampoco en las células no tratadas que obviamente no migraron y mostraron una distribución homogénea en las placas de Petri. Otros autores han obtenido resultados similares, donde las células migran a la periferia de los imanes sin cambios en la viabilidad celular [White y cols., 2015]. Finalmente podemos decir que estos resultados indican que los magnetoliposomas permanecen en funcionamiento después de la internalización celular, lo que significa que podrían utilizarse en diferentes aplicaciones. Por ejemplo, se han usado magnetoliposomas funcionalizados para eliminar células tumorales migratorias de los fluidos peritoneales de ratones mediante filtración magnética [Scarberry y cols., 2011].



**Fig. 6.7.** Migración de las células T-84 después del tratamiento con los magnetoliposomas durante 6 h. Posteriormente se separaron y se volvieron a sembrar en medio fresco con y sin imán. Porcentaje de la viabilidad celular de las células T-84 después de su exposición al campo magnético (a). Se obtuvieron imágenes representativas de los cultivos después de 24 horas en los platos resembrados (b). Las células no tratadas se utilizaron como control. Imágenes representativas de la placa de Petri de la densidad del cultivo de células T-84 (microscopía óptica) tratadas con magnetoliposomas, con y sin imán, destacando las regiones periférica (PR) y central (CR) del imán (Magnificación 10 x)(c). Esta imagen muestra cómo la circunferencia del imán, representada por la línea discontinua, se corresponde con el agrupamiento de celdas visto en la imagen anterior (d).

## **7. CONCLUSIONES**



El presente trabajo de investigación tiene tres objetivos principales. El primero es el diseño y elaboración, bajo condiciones óptimas, de un nanosistema mixto de tipo liposomal con capacidad de respuesta a estímulos magnéticos aplicados. El segundo es la vehiculización del fármaco corticoide prednisolona en el citado sistema transportador. Y el tercero es determinar su biocompatibilidad para ser utilizado en la terapia del cáncer. Las principales aportaciones pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

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

- Se ha puesto a punto un procedimiento reproducible de síntesis de magnetoliposomas, formadas por coloides magnéticos (maghemita) y un recubrimiento vesicular lipídico (liposomas), ambos biodegradables. La metodología de síntesis de los núcleos de óxido de hierro es muy sencilla y permite la obtención de nanopartículas superparamagnéticas. Por otro lado el procedimiento de formulación de las estructuras vesiculares magnéticas se fundamenta en una variación del método de hidratación de capa fina (thin layer evaporation method).

- Para optimizar las condiciones de la síntesis, se analizó el efecto que tenía la proporción inicial de masas maghemita:fosfolípido sobre la síntesis de los magnetoliposomas, y se concluyó que la relación 4:2 era la óptima.

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

- La metodología de síntesis desarrollada permite obtener magnetoliposomas con un tamaño muy apropiado para la vía de administración parenteral.

- Mediante la comparación de los difractogramas de rayos X obtenidos para la maghemita y los magnetoliposomas con el patrón ASTM de este óxido de hierro, se comprobó la perfecta coincidencia de las líneas de estos difractogramas con las del patrón. Esto permite identificar las muestras como maghemita y observar la elevada cristalinidad de ésta, incluso tras quedar incluida en una matriz vesicular lipídica. Con

ello, es de esperar que las propiedades magnéticas persistan tras el recubrimiento de los núcleos magnéticos por la vesícula liposomal.

- El análisis del espectro de infrarrojos constituye una nueva prueba de la eficacia de la metodología de síntesis desarrollada para los magnetoliposomas, ya que permitió la identificación de las bandas características de la estructura liposomal en la muestra de magnetoliposomas, así como la banda propia de la maghemita.

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

- El análisis comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de partículas mediante electroforesis constituye una nueva prueba de la eficacia de la metodología desarrollada de síntesis de magnetoliposomas. Se comprueba cómo la vesícula liposomal oculta eficazmente los núcleos magnéticos, haciendo que la superficie de los magnetoliposomas sea indistinguible de la de los liposomas, desde un punto de vista electrocinético.

La electroforesis, por su gran sensibilidad a pequeños cambios en la superficie de los coloides, puede ser una herramienta eficaz en la caracterización del proceso de degradación de los magnetoliposomas.

Este estudio electrocinético sirve para justificar el mecanismo de formación de los magnetoliposomas. Dicha estructura se genera como consecuencia de la atracción electrostática entre las nanopartículas de magnetita cargadas positivamente y las bicapas lipídicas multilamelares con carga negativa, lo que induce que los núcleos magnéticos queden englobados en la matriz liposomal.

### **4. Sobre las propiedades termodinámicas superficiales**

- Utilizando un modelo termodinámico aplicable a la interfase sólido/líquido ha sido posible llevar a cabo una completa caracterización termodinámica superficial de los magnetoliposomas sintetizados.

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

- Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los diferentes nanomateriales. La naturaleza hidrófila de la maghemita se pierde al ser recubierta por el lípido hidrófobo, lo que se considera una prueba muy significativa de la eficacia de la metodología de síntesis desarrollada para la obtención de magnetoliposomas.

Utilizando la información obtenida en este estudio termodinámico, se puede justificar el mecanismo de formación de los magnetoliposomas, ya que termodinámicamente es más favorable para la matriz liposomal permanecer en contacto con los núcleos de óxido de hierro antes que estar aislada en el agua.

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

- La determinación del ciclo de histéresis de los magnetoliposomas ha resultado muy útil en la caracterización de sus propiedades magnéticas. Al quedar englobados los núcleos de óxido de hierro en el interior de la vesícula liposomal, los magnetoliposomas obtenidos presentan una muy adecuada capacidad de respuesta magnética. De esta manera, es de esperar que sean fácilmente dirigidos hasta el lugar de acción bajo la exposición a un gradiente de campo magnético externo. Esta excelente capacidad de respuesta a gradientes de campos magnéticos se ha corroborado cualitativamente de forma visual y mediante microscopía óptica en dispersiones acuosas de magnetoliposomas.

## **6. Sobre la reología.**

-Las formulaciones presentan un comportamiento newtoniano. La viscosidad es prácticamente constante para cualquier velocidad de deformación aplicada. Este comportamiento se sigue manteniendo a lo largo del tiempo de estudio.

## **7. Sobre la capacidad de vehiculización de prednisolona**

- Se ha desarrollado y validado un procedimiento espectrofotométrico sencillo para la determinación de la incorporación del fármaco en los magnetoliposomas, también aplicable a los ensayos de liberación.

- Se han definido las condiciones óptimas de vehiculización de prednisolona en los magnetoliposomas mediante adición del principio activo en el medio oleoso que quedará englobado en la bicapa lipídica.

- El análisis espectrofotométrico desarrollado pone de manifiesto la vehiculización de prednisolona en el interior de los magnetoliposomas.

- Se logra la liberación sostenida en el tiempo de la dosis de prednisolona vehiculizada. Este proceso es bifásico y apropiado para fines terapéuticos.

## **7. Sobre la hemocompatibilidad y citotoxicidad.**

- La excelente hemocompatibilidad y la ausencia de citotoxicidad comprobada *in vitro*, permite esperar que los magnetoliposomas tengan una buena biocompatibilidad para fines biomédicos.

## **8. Sobre la internalización celular**

- Mediante la técnica azul de Prussia se comprueba que los magnetoliposomas entran en la célula tras la exposición de éstos en un tiempo corto.

- La visualización de los magnetoliposomas en el interior de la célula permitió observar que se introducen en la célula mediante procesos de endocitosis principalmente. Se localizaron en la periferia de la membrana celular rodeados por extensiones de membrana celular, en el interior de las mitocondrias y en el citoplasma celular.

- La migración de las células tras la exposición a un gradiente magnético externo indica la excelente respuesta magnética que presentan los magnetoliposomas una vez internalizados en la célula y, por tanto, su posible utilidad como transportadores del fármaco prednisolona a la masa cancerosa.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**



- Abedin MR, Umapathi S, Mahendrakar H, Laemthong T, Coleman H, Muchangi D, Santra S, Nath M, Barua S. Polymer coated gold-ferric oxide superparamagnetic nanoparticles for theranostic applications. *J. Nanobiotechnology* 13 (2018) 80.
- Abrikossova II, Derjaguin BV. Measurement of molecular attraction between solid bodies of different nature at large distances. *Prog. Surf. Sci.* 40 (1992) 133-140.
- Adamson AW. Physical chemistry of surfaces. Nueva York: John Wiley & Sons, 1982. Ai J, Xu Y, Li D, Liu Z, Wang E. Folic acid as delivery vehicles: targeting folate conjugated fluorescent nanoparticles to tumors imaging. *Talanta* 101 (2012) 32-37.
- Albano JMR, Ribeiro LNM, Couto VM, Barbosa Messias M, Rodrigues da Silva GH, Breitreitz MC, de Paula E, Pickholz M. Rational design of polymer-lipid nanoparticles for docetaxel delivery. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 175 (2019) 56-64.
- Allen LM, Matijević EJ. Stability of colloidal silica: I. Effect of simple electrolytes. *J. Colloid Interface Sci.* 31 (1969) 287-296.
- Álvarez Paneque A, Reguera Ruiz E, Estévez Hernández O, Martínez García R, Canino Ramos C, Díaz Castañón S. Síntesis y caracterización de un sistema de nanopartículas superparamagnéticas basado en la ferrita de manganeso ( $MnFe_2O_4$ ) tipo espinela. *Revista Cubana de Química.* 20 (2008) 70-76.
- Amersi, Agustin M, C.Y. Ko, Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clin. Colon Rectal. Surg.* 18 (3) (2005) 133-140.
- Andrade AL, Fabris JD, Domingues RZ, Pereira MC. Current Status of Magnetite-Based Core@Shell Structures for Diagnosis and Therapy in Oncology Short running title: Biomedical Applications of Magnetite@Shell Structures. *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 5417-5433.
- Arakaki A, Nakazawa H, Nemoto M, Mori T, Matsunaga T. Formation of magnetite by bacteria and its application. *J. R. Soc. Interface* 5 (2008) 977-999.

- 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.* 339 (2007) 237-245.
- Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. *Mini Rev. Med. Chem.* 11 (2011) 1-17.
- Arias JL. Liposomes in drug delivery: a patent review (2007-present). *Expert Opin. Ther. Pat.* 23 (2013) 1399-1414.
- Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate)m(core/shell) nanoparticles as 5-Fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008a) 54-63.
- Arias JL, Ruiz MA, López-Viota M, Delgado AV. Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 62 (2008b) 64-70.
- Arias JL, Harivardhan Reddy L, Couvreur P. Magneto-responsive squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. *Langmuir* 24 (2008c) 7512-7519.
- Arias JL, Linares-Molinero F, Gallardo V, Delgado AV. Study of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) (core/shell) particles as anticancer drug delivery systems: loading and release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 33 (2008d) 252-261.
- Arias JL, Ruiz MA, Gallardo V, Delgado AV. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J. Control. Release* 125 (2008e) 50-58.
- Arias JL, Clares B, Morales ME, Gallardo V, Ruiz MA. Lipid-based drug delivery systems for cancer treatment. *Curr. Drug Targets* 12 (2011a) 1151-1165.

- Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Delgado AV. Engineering of anantitumor (core/shell) magnetic nanoformulation based on the chemotherapy agent ftorafur. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 384 (2011b) 157-163.
- Arias JL, Reddy LH, Othman M, Gillet B, Desmaële D, Zouhiri F, Dosio F, Gref R, Couvreur P. Squalene based nanocomposites: a new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano*. 5 (2011c) 1513-1521.
- Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules* 12 (2011d) 97-104.
- Arias JL, López-Viota M, Gallardo V, Adolfin Ruiz M. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the chemotherapy agent tegafur. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 36 (2010a) 744-750.
- Arias JL, López-Viota M, Delgado AV, Ruiz MA. Iron/ethylcellulose (core/shell) nanoplatform loaded with 5-fluorouracil for cancer targeting. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 77 (2010b) 111-116.
- 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*. 75 (2010c) 204-208.
- Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Release* 77 (2001) 309-321.
- Arias JL, López-Viota M, López-Viota J, Delgado AV. Development of iron/ethylcellulose (core/shell) nanoparticles loaded with diclofenac sodium for arthritis treatment. *Int. J. Pharm.* 382 (2009) 270-276.
- Arruebo M, Fernandez-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery applications. *Nano Today* 2 (2007) 22-32.

- Assaraf YG, Leamon CP, Reddy JA. The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. *Drug Resist. Updat.* 17 (4-6) (2014) 89-95.
- Auguste DT, Furman K, Wong A, Fuller J, Armes SP, Deming TJ, Langer R. Triggered release of siRNA from poly(ethylene glycol)-protected, pH-dependent liposomes. *J. Control. Release* 130 (2008) 266-274.
- Avilés MO, Ebner AD, Ritter JA. In vitro study of magnetic particle seeding for implants assisted-magnetic drug targeting. *J. Magn. Magn. Mater.* 320 (2008) 2640-2646.
- Babu A, Amreddy N, Muralidharan, Pathuri, Gali, Chen, Zhao YD, Munshi A, Ramesh R. Chemodrug delivery using integrin-targeted PLGA-Chitosan nanoparticle for lung cancer therapy. *Sci. Rep.* 7 (2017) 14674.
- Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 50 (1990) 7717-7722.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357 (2001) 539-545.
- Banciu M, Fens MHAM, Storm G, Schiffelers RM. Antitumor activity and tumor localization of liposomal glucocorticoids in B16 melanoma-bearing mice. *J. Control. Release* 127 (2) 131-136.
- Banciu M, Metselaar JM, Schiffelers RM, Storm G. Antitumor activity of liposomal prednisolone phosphate depends on the presence of functional tumor-associated macrophages in tumor tissue. *Neoplasia* 10 (2008) 108-117.
- Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut.* 62 (6) (2015) 933-947.

- Banerjee J, Hanson AJ, Gadam B, Elegbede AI, Tobwala S, Ganguly B, Wagh AV, Muhonen WW, Law B, Shabb JB, Srivastava DK, Mallik S. Release of liposomal contents by cell-secreted matrix metalloproteinase-9. *Bioconjugate Chem.* 20 (2009) 1332-1339.
- Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* 8 (1964) 660-668.
- Bazak R, Hourri M, El Achy S, Kamel S, Refaat T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141 (2015) 769-784.
- Bee A, Massart R. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Magn. Mater.* 149 (1995) 6-9.
- Bender EA, Adorne MD, Colomé LM, Abdalla DS, Guterres SS, Pohlmann AR. Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *Int. J. Pharm.* 426 (2012) 271-279.
- Bernardos A1, Mondragon L, Aznar E, Marcos MD, Martinez-Mañez R, Sancenon F, Soto J, Barat JM, Perez-Paya E, Guillem C, Amoros P. Enzyme-responsive intracellular controlled release using nanometric silica mesoporous supports capped with "saccharides". *ACS Nano* 4 (2010) 6353-6368.
- Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 66 (2014) 2-25.
- Billmeyer FW (Ed.). *Ciencia de los Polímeros*. Barcelona: Reverté, 1975.
- Birt DF, Phillips GJ. Diet, genes, and microbes: complexities of colon cancer prevention. *Toxicol. Pathol.* 42 (2014) 182-188.

- Boissenot T, Bordat A, Fattal E, Tsapis N. Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications. *J. Control. Release.* 241 (2016) 144-163.
- Bothun GD, Lelis A, Chen Y, Scully K, Anderson LE, Stoner MA. Multicomponent folate-targeted magnetoliposomes: design, characterization, and cellular uptake. *Nanomedicine* 7 (2011) 797-805.
- Bradshaw M, Clemons TD, Ho D, Gutiérrez L, Lázaro FJ, House MJ, St Pierre TG, Fear MW, Wood FM, Iyer KS. Manipulating directional cell motility using intracellular superparamagnetic nanoparticles. *Nanoscale* 7 (2015) 4884-4889.
- Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer.* 132 (2013) 1133-1145.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5 (2002) 631-651.
- Brittain HG (Ed.). Physical characterization of pharmaceutical solids. New York: Marcel Dekker Inc., 1995.
- Brittan HG (ED). Analytical profiles of drug substances and excipients. Vol. 21. Nueva York: Academic Press Inc.
- Burt RW. Rare syndromes and genetic testing for colorectal cancer. *Semin. Gastrointest. Dis.* 11 (2000) 147-151.
- Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1615-1626.
- Calero M, Chiappi M, Lazaro-Carrillo A, Rodríguez MJ, Chichón FJ, Crosbie-Staunton K, Prina-Mello A, Volkov Y, Villanueva A, Carrascosa JL. Characterization of interaction of magnetic nanoparticles with breast cancer cells. *J. Nanobiotechnol.* 13 (2015) 16.

- Callister WDJr (Ed.). Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales. Vol. 2. Barcelona: Reverté, 1996.
- Cañete M, Soriano J, Villanueva A, Roca AG, Veintemillas S, Serna CJ, Miranda R, Del Puerto Morales M. The endocytic penetration mechanism of iron oxide magnetic nanoparticles with positively charged cover: a morphological approach. *Int. J. Mol. Med.* 26 (2010) 533-539.
- Cao D, Li H, Pan L, Li J, Wang X, Jing P, Cheng X, Wang W, Wang J, Liu Q. High saturation magnetization of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nano-particles by a facile one step synthesis approach. *Sci. Rep.* 6 (2016) 32360.
- Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 149 (2015) 1177-1190.
- Chang L, Graham P, Hao J, Ni J., Deng J, Bucci J, Malouf D, Gillat D, Li Y. Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance. *Oncotarget* 7(10) (2016) 11002-11017.
- Chaudhury MK, Good RJ. Retarded van der Waals force theory and stability of thick films in systems of three condensed phases. *J. Colloid Interface Sci.* 94 (1983) 292-294.
- Chaudhury MK. Hamaker constant and the dispersion component of the surface tension of liquid mercury. *J. Colloid Interface Sci.* 119 (1987) 174-180.
- Chen H, Liu D, Guo Z. Endogenous Stimuli-responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Chemistry Letters* 45 (2016) 242-249.
- Chen W, Cui H, Zhao X, Cui J, Wang Y, Sun C, Cui B, Lei F. Characterization and Insights Into the Nano Liposomal Magnetic Gene Vector Used for Cell Co-Transfection. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15 (2015) 5530-5536.
- Chibowski E, González-Caballero F. Theory and practice of thin-layer wicking. *Langmuir* 9 (1993) 330-340.

- Christenson HK. Non-DLVO forces between surfaces-solvation, hydration and capillary effects. *J. Disp. Sci. Technol.* 9 (1988) 171-206.
- Chorny M, Alferiev IS, Fishbein I, Tengood JE, Folchman-Wagner Z, Forbes SP, Levy RJ. Formulation and in vitro characterization of composite biodegradable magnetic nanoparticles for magnetically guided cell delivery. *Pharm. Res.* 29 (2012) 1232-1241.
- Chountoulesi M, Kyrili A, Pippa N, Meristoudi A, Pispas S, Demetzos C. The modulation of physicochemical characterization of innovative liposomal platforms: the role of the grafted thermoresponsive polymers. *Pharm. Dev. Technol.* 22 (2017) 330-335.
- Clares B, Biedma-Ortiz RA, Sáez-Fernández E, Prados JC, Melguizo C, Cabeza L, Ortiz R, Arias JL. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 329-338.
- Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M. H., Dubrovskaya, A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin. Cancer. Biol.* 31 (2015) 16-27.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420 (2002) 860-867.
- Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 23 (2006) 1417-1450.
- Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 23 (2006) 1417-1450. Durán JDG, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloids as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2948-2983.
- Crucho C. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Nanomedicine. *Chem. Med. Chem.* 10 (2014) 24-38.

- Cui YN, Xu QX, Davoodi P, Wang DP, Wang CH. Enhanced intracellular delivery and controlled drug release of magnetic PLGA nanoparticles modified with transferrin. *Acta Pharmacol. Sin.* 38(6) (2017) 943-953.
- D'Angelica M, Ammori J, Gonen M, Klimstra DS, Low PS, Murphy L, Weiser MR, Paty PB, Fong Y, Dematteo, RP, Allen P, Jarnagin WR, Shia J. Folate receptor-alpha expression in resectable hepatic colorectal cancer metastases: patterns and significance. *Mod. Pathol.* 24 (2011) 1221-1228.
- Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor microenvironment: Passive & active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release.* 148(2) (2010) 135-146.
- Danhier, F, Breton, AL, Pr at, V. RGD-Based Strategies To Target Alpha (v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol. Pharm.* 9 (2012) 2961-2973.
- Dash BC, R thor  G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials* 31 (2010) 8818-8197.
- Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 771-782.
- de Gracia Lux C, Joshi-Barr S, Nguyen T, Mahmoud E, Schopf E, Fomina N, Almutairi A. Biocompatible polymeric nanoparticles degrade and release cargo in response to biologically relevant levels of hydrogen peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 15758-15764.
- de Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, Griffioen G, Cats A, Menko FH, Kleibeuker JH, Vasen HF. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology.* 126 (2004) 42-48.

- Debye PJW. Molekularkräfte und ihre Elektrische Deutung. *Physik Zeit.* 22 (1921) 302-308.
- Delcea M, Möhwald H, Skirtach AG. Stimuli-responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 730-747.
- Delgado AV, González-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J. Colloid Interface Sci.* 309 (2007) 194-224.
- Delgado AV, Arroyo FJ. Electrokinetic phenomena and their experimental determination: an overview. *Interfacial Electrokinetics and electrophoresis* 106 (2002) 1-54.
- Derjaguin, B.V. A theory of the hetero-coagulation, interaction and adhesion dissimilar particles in solutions of electrolytes. *Discuss. Faraday Soc.* 18 (1954) 85-98.
- Derycke AS, Kamuhabwa A, Gijssens A, Roskams T, De Vos D, Kasran A, Huwyler J, Missiaen L, de Witte PA. Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer ALPcS4 to rat bladder carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (2004) 1620-1630.
- Dolor A, Kierstead P, Dai Z, Szoka FC. Sterol-modified PEG lipids: alteration of the bilayer anchoring moiety has an unexpected effect on liposome circulation. *Chem. Commun (Camb).* 54 (2018) 11949-11952.
- Doll R, Forman D, La Vecchia C, Woutersen R. Alcoholic beverages and cancers of the digestive tract and larynx. *Health Issues Related to Alcohol Consumption.* Macdonald I (ed) 351-393, 2nd ed. Oxford, ILSI Europe, Blackwell Science Ltd.
- Doménech J, Martínez J, Peraire C (Eds.). *Biofarmacia y farmacocinética.* Madrid: Síntesis, 2013.

- Dufort S, Sancey L, Coll JL. Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 179-189.
- Dulai PS, Sandborn WJ, Gupta S. Colorectal Cancer and Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease: A Review of Disease Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Cancer Prev Res.* 9 (2016) 887-894.
- Duncan R. Polymer therapeutics: top 10 selling pharmaceuticals - what next? *J. Control Release.* 190 (2014) 371-380.
- Durán JDG, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloids as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2948-2983.
- Durán JDG, Delgado AV, González-Caballero F, Chibowski E. Surface free energy components of monodisperse zinc sulfide. *Mater. Chem. Phys.* 38 (1994) 42-49.
- Durán JDG, Guindo MC, Delgado AV. Electrophoretic properties of colloidal dispersions of monodisperse zinc sulphide: effects of potential determining ions and surface oxidation. *J. Colloid Interface Sci.* 173 (1995) 436-442.
- Elias A, Tsourkas A. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* (2009) 720-726.
- El-Bolkainy TN, Sakr MA, Nouh AA, Ali El-Din NH. A comparative study of rectal and colonic carcinoma: Demographic, pathologic and TNM staging analysis. *J. Egyptian Nat. Cancer Inst.* 18 (2006) 258-263.
- El-Hammadi MM, Delgado AV, Melguizo C, Prados JC, Arias JL. Folic acid-decorated and PEGylated PLGA nanoparticles for improving the antitumour activity of 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* 516(1-2) (2017) 61-70.

- Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56(8) (2004) 1067-1084.
- Evans BC, Nelson CE, Yu SS, Beavers KR, Kim AJ, Li H, Nelson HM, Giorgio TD, Duvall CL. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J. Vis. Exp.* 73 (2013) e50166.
- Fang Y, Xue J, Gao S, Lu A, Yang D, Jiang H, He Y, Shi K. Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the "PEG dilemma" in efficient drug delivery. *Drug Deliv.* 24 (2017) 22-32
- Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 136-151.
- Fawaz F, Guyot M, Lagueny AM, Devissaguet JPh. Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: preparation and characterization. *Int. J. Pharm.* 154 (1997) 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. Magn. Mater.* 311 (2007) 318-322.
- Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221 (1983) 719-725.
- Fonseca C, Moreira JN, Ciudad CJ, Pedroso de Lima MC, Simoes S. Targeting of sterically stabilised pH-sensitive liposomes to human T-leukaemia cells. *Eur. J Pharm. Biopharm.* 59(2) (2005) 359-366.

- Fowkes FMJ. Additivity of intermolecular forces at interfaces I. Determination of the contribution to surface and interfacial tensions of dispersion forces in various liquids. *Phys. Chem.* 67 (1963) 2538-2541.
- Fowkes FM, Mostafa MA. Acid-base interactions in polymer adsorption. *I.E.C. Prod. Res. Dev.* 17 (1978) 3-7.
- Frascione D, Diwoky C, Almer G, Opriessnig P, Vonach C, Gradauer K, Leitinger G, Mangge H, Stollberger R, Prassl R. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO)-based liposomes as magnetic resonance imaging probes. *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 2349-2359.
- Gabizon A, Tzemach D, Gorin J, Mak L, Amitay Y, Shmeeda H, Zalipsky S. Improved therapeutic activity of folate-targeted liposomal doxorubicin in folate receptor-expressing tumor models. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66(1) (2010) 43-52.
- Gaber MH, Hong K, Huang SK, Papahadjopoulos D. Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. *Pharm. Res.* 12 (10) (1995) 1407-1416.
- Galceran J., Ameijide A., Carulla M., Mateos A., Quirós JR., Rojas D.; Alemán A., Torrella A., Chico M., Vicente M., Díaz JM., Larrañaga N., Marcos-Gragera R., Sánchez MJ. Perucha J. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol.* 19 (2017) 779-825.
- Gálvez-Martín P, Hmadchaa A, Soria B, Calpena A, Clares B. Study of the stability of packaging and storage conditions of human mesenchymal stem cell for intra-arterial clinical application in patient with critical limb ischemia. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2014) 459-468.
- García-Jimeno S, Escribano E, Queralt J, Estelrich J. Magnetoliposomes prepared by reverse-phase followed by sequential extrusion: characterization and possibilities in the treatment of inflammation. *Int. J. Pharm.* 405 (2011) 181-187.

- Giri J, Thakurta SG, Bellare J, Nigam AK, Bahadur DJ. Preparation and characterization of phospholipid stabilized uniform sized magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 62-68.
- Godd RJ. Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review. *J. Adhes. Sci. Technol.* 6 (12) (1992) 1269-1302.
- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res.* 64 (2004) 3014-3021.
- Gong YC, Xiong XY, Ge XJ, Li ZL, Li YP. Effect of the Folate Ligand Density on the Targeting Property of Folated-Conjugated Polymeric Nanoparticles *Macromol. Biosci.* 2019 doi: 10.1002/mabi.201800348.
- Goss KH, Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J. Clin. Oncol.* 18 (2000) 1967-1979.
- Good RJ, Girifalco LA. A theory for estimation of surface and interfacial energies. III. Estimation of surface energies of solids from contact angle data. *J. Phys. Chem.* 64 (1960) 561-565.
- Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 17-31.
- Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol. Biol.* 624 (2010) 25-37.
- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26 (2005) 3995-4021.

- Hachani R, Birchall MA, Lowdell MW, Kasparis G, Tung LD, Manshian BB, Soenen SJ, Gsell W, Himmelreich U, Gharagouzloo CA, Sridhar S, Thanh NTK. Assessing cell-nanoparticle interactions by high content imaging of biocompatible iron oxide nanoparticles as potential contrast agents for magnetic resonance imaging, *Sci. Rep.* 7 (2017) 7850.
- Hahn WC, Weinberg RA. Rules for Making Human Tumor Cells. *N Engl J Med.* 347 (2002) 1593-1603. Malvezzi M., Carioli G., Bertuccio P. Boffetta P, Levi F., La Vecchia C. *Annals of Oncology* 28 (2017) 117-1123.
- Hamaker HC. The London-van der Waals attraction between spherical particles. *Physica* 4 (1937) 1058-1072.
- Hamid A, Wani NA, Kaur J. New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption-association with epigenome stability and cancer development. *FEBS J.* 276 (2009) 2175-2191.
- Han HD, Mangala LS, Lee JW, Shahzad MM, Kim HS, Shen D, Nam EJ, Mora EM, Stone RL, Lu C, Lee SJ, Roh JW, Nick AM, Lopez-Berestein G, Sood AK. Targeted gene silencing using RGD-labeled chitosan nanoparticles. *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 3910-3922.
- Handali S, Moghimipour E, Rezaei M, Ramezani Z, Kouchak M, Amini M, Angali KA, Saremy S, Dorkoosh FA. A novel 5-Fluorouracil targeted delivery to colon cancer using folic acid conjugated liposomes. *Biomed. Pharmacother.* 108 (2018) 1259-1273.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100 (2000) 57-70.
- Haghighi MM, Aghagolzadeh P, Zadeh SM, Molaei M, Zali MR, Radpour R. Telomere shortening: A biological marker of sporadic colorectal cancer with normal expression of p53 and mismatch repair proteins. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 18 (2014) 236-244.

- Hatakeyama H, Akita H, Ito E, Hayashi Y, Oishi M, Nagasaki Y, Danev R, Nagayama K, Kaji N, Kikuchi H, Baba Y, Harashima H. Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Biomaterials* 32 (2011) 4306-4316.
- Haug U, Becker N. Immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer screening: Point-of-care tests are not tenable for a quality-assured program. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 141 (10) (2016) 729-731.
- Hayashi K, Nakamura M, Miki H, Ozaki S, Abe M, Matsumoto T, Sakamoto W, Yogo T, Ishimura K. Magnetically responsive smart nanoparticles for cancer treatment with a combination of magnetic hyperthermia and remote-control drug release. *Theranostics.* 4 (2014) 834-844.
- Hazewinkel Y, Dekker E. Colonoscopy: basic principles and novel techniques. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8 (10) (2011) 554–564.
- Hervault A, Thanh NT. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nano.* 6 (20) (2014) 11553-11573.
- Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell.* 70 (1992) 419-429.
- Hilgenbrink AR, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. *J. Pharm. Sci.* 94(10) (2005) 2135-2146.
- Horn RG, Israelachvili J. Direct measurement of structural forces between two surfaces in a nonpolar liquid. *J. Chem. Phys.* 75 (1981) 1400-1411.
- Hu Q, Katti P, Gu Z. Enzyme-responsive nanomaterials for controlled drug delivery. *Nanoscale* 6 (2014) 12273-12286.

- Huang X, El-Sayed M. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res.* 1 (2010) 13-28.
- Huber DL. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* 1 (2005) 482-501.
- Hunter RJ. Zeta Potential in colloid science. Nueva York: Academic Press, 1981.
- Hunter RJ. Foundations of colloid science. Oxford: Oxford University Press, 1987.
- Husseini GA, Pitt WG. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60 (2008) 1137-1152.
- Islam W, Fang J, Imamura T, Etrych T, Subr V, Ulbrich K, Maeda H. Augmentation of the enhanced permeability and retention effect with nitric oxide-generating agents improves the therapeutic effects of nanomedicines. *Mol. Cancer Ther.* 17 (2018) 2643-2653.
- Israelachvili J. Direct measurements of forces between surfaces in liquids at the molecular level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 4722-4724.
- Israelachvili J. Intermolecular and surface forces. 2<sup>a</sup> Ed., Academic Press, London, 1991.
- Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 1 (2005) 1-11.
- Janßen HC, Warwas DP, Dahlhaus D, Meißner J, Taptimthong P, Kietzmann M, Behrens P, Reifenrath J, Angrisani N. In vitro and in vivo accumulation of magnetic nanoporous silica nanoparticles on implant materials with different magnetic properties. *J. Nanobiotechnology* 16 (2018) 96.

- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T. Interpretation of the contact angle in quartz/organic liquid film-water system. *J. Colloid Interface Sci.* 102 (1984) 533-538.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T. Interpretation of the contact angle in marble/organic liquid film-water system. *Mater. Chem. Phys.* 16 (1987) 489-499.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T, González-Caballero F. Surface free energy of celestite and its flotation activity. *Colloids Surf.* 35 (1989) 41-48.
- Janczuk B, Chibowski E, Wójcik W, Guindo MC, González-Caballero F. Surface free energy of some lead compounds compared to galena. *Mater. Chem. Phys.* 37 (1994) 64-67
- Järvinen R, Knekt P, Hakulinen T, Rissanen H, Heliövaara M. Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study, *Br. J. Cancer* 85 (3) (2001) 357-361.
- Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomäki P, De La Chapelle A, Mecklin JP. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 118 (2000) 829-834.
- Jiang W, Xie H, Ghoorah D, Shang Y, Shi H, Liu F, Yang X, Xu H. Conjugation of functionalized SPIONs with transferrin for targeting and imaging brain glial tumors in rat model. *PLoS One* 7 (2012) e37376.
- Johnsson M, Edwards K. Phase behavior and aggregate structure in mixtures of dioleoylphosphatidylethanolamine and poly (ethylene glycol)-lipids. *Biophys. J.* 80 (1) (2001) 313-323.
- Jorge NL, Fenómenos de superficie, disponible en <http://slideplayer.es/slide/5516208/>

- Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2971-3010.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57 (1997) 808-811.
- Karimi M, Ghasemi A, Sahandi Zangabad P, Rahighi R, Moosavi Basri SM, Mirshekari H, Amiri M, Shafaei Pishabad Z, Aslani A, Bozorgomid M, Ghosh D, Beyzavi A, Vaseghi A, Aref AR, Haghani L, Bahrami S, Hamblin MR. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chem Soc Rev.* 45 (2016) 1457-1501.
- Kaur P, Aliru ML, Chadha AS, Asea A, Krishnan S. Hyperthermia using nanoparticles- Promises and pitfalls. *Int. J. Hyperthermia.* 32 (2016) 76-88.
- Kheirelseid EA, Miller N, Chang KH, Nugent M, Kerin MJ. Clinical applications of gene expression in colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* 4 (2013) 144-157.
- Kluza E, Yeo SY, Schmid S, van der Schaft DWJ, Boekhoven RW, Schiffelers RM, Storm G, Strijkers GJ, Nicolay K. Anti-tumor activity of liposomal glucocorticoids: The relevance of liposome-mediated drug delivery, intratumoral localization and systemic activity. *J. Control. Release* 151 (2011) 10-17.
- Kocbek P, Kralj S, Kreft ME, Kristl J. Targeting intracellular compartments by magnetic polymeric nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50 (2013) 130-138.
- Kolishetti N, Dhar S, Valencia PM, Lin LQ, Karnik R, Lippard SJ, Langer R, Farokhzad OC. Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(42) (2010) 17939-17944.

- Koo H, Huh MS, Sun I-C, Yuk SH, Choi K, Kim K, Kwon IC. In vivo targeted delivery of nanoparticles for theranosis. *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 1018-1028.
- Kopansky E, Shamay Y, David A. Peptide-directed HPMA copolymer-doxorubicin conjugates as targeted therapeutics for colorectal cancer. *J. Drug Target.* 19 (2011) 933-943.
- Koshkaryev A, Sawant R, Deshpande M, Torchilin V. Immunoconjugates and long circulating systems: origins, current state of the art and future directions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 24-35.
- Kuipers EJ, Rösch T, Bretthauer M. Colorectal cancer screening-optimizing current strategies and new directions. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10 (3) (2013) 130-142.
- Kulshrestha P, Gogoi M, Bahadur D, Banerjee R. In vitro application of paclitaxel loaded magnetoliposomes for combined chemotherapy and hyperthermia. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 96 (2012) 1-7.
- Kumar GP, Sanganal JS, Phani AR, Manohara C, Tripathi SM, Raghavendra HL, Janardhana PB, Amaresha S, Swamy KB, Prasad RG. Anti-cancerous efficacy and pharmacokinetics of 6-mercaptopurine loaded chitosan nanoparticles. *Pharmacol. Res.* 100 (2015) 47-57.
- Kumar A, Jena PK, Behera S, Lockey RF, Mohapatra S, Mohapatra S. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery. *Nanomedicine* 6 (2010) 64-69.
- Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.* 659 (2008) 15-30.
- Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, Gapstur S, Patel AV, Andrews K, Gansler T; American Cancer Society 2010 Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee. American cancer society guidelines on nutrition and physical activity for Cancer prevention: reducing the risk

of Cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J. Clin.* 62 (2012) 30-67.

Labianca R, Merelli B. Screening and diagnosis for colorectal cancer: present and future, *Tumori.* 96 (6) (2010) 889-901.

Lai WF, Lin MC. Folate-conjugated chitosan-poly(ethylenimine) copolymer as an efficient and safe vector for gene delivery in cancer cells. *Curr. Gene Ther.* 15(5) (2015) 472-80.

Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, Clark S, Johnson V, Bell J, Frayling I, Efstathiou J, Pack K, Payne S, Roylance R, Gorman P, Sheer D, Neale K, Phillips R, Talbot I, Bodmer W, Tomlinson I. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'twohit' hypothesis. *Nat. Med.* 5 (1999) 1071-1075.

Lang C, Schüler D. Biogenic nanoparticles: production, characterization, and application of bacterial magnetosomes. *J. Phys. Condens. Matter.* 18 (2006) 2815-2828.

Langbein D. Theory of Van der Waals attraction. New York: Springer-Verlag, 1974.

Laskowski JS, Ralston J (Eds.). Colloid Chemistry in Mineral Processing. Londres: Elsevier, 1992. stenson HK, Horn RG. Solvation forces measured in non-aqueous liquids. *Chemica Scripta* 25 (1985) 37-41.

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.* 108 (2008) 2064-2110.

Lee KW, Kim DS, Kwon HJ. CG sequence and phosphorothioate backbone modification dependent activation of the NF-kappaB-responsive gene expression by CpG oligodeoxynucleotides in human RPMI 8226 B cells. *Mol. Immunol.* 41 (2004) 955-964.

- Lee JS, Groothuis T, Cusan C, Mink D, Feijen J. Lysosomally cleavable peptide-containing polymersomes modified with anti-EGFR antibody for systemic cancer chemotherapy. *Biomaterials* 32 (2011)9144-9153.
- Lee K, Erturk E, Mayer R, Cockett AT. Efficacy of antitumor chemotherapy in C3H mice enhanced by the antiangiogenesis steroid cortisone acetate. *Cancer Res.* 47 (1987) 5021-5024.
- Leserman LD, Barbet J, Kourilsky F, Weinstein JN. Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein. *Nature* 288 (1980) 602-604.
- Lesieur S, Grabielle-Madelmont C, Ménager C, Cabuil V, Dadhi D, Pierrot P, Edwards K. Evidence of surfactant-induced formation of transient pores in lipid bilayers by using magnetic-fluid-loaded liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5266-5267.
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br.J. Surg.* 89 (2002) 845-860.
- Li J, Huo M, Wang J, Zhou J, Mohammad JM, Zhang Y, Zhu Q, Waddad AY, Zhang Q. Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel. *Biomaterials* 33 (2012) 2310-2320.
- Li Y, Gao GH, Lee DS. Stimulus-sensitive polymeric nanoparticles and their applications as drug and gene carriers. *Adv. Healthc. Mater.* 2 (2013) 388-417.
- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 78-85.

- Lin CW, Lu KY, Wang SY, Sung HW, Mi FL. CD44 specific nanoparticles for redox triggered reactive oxygen species production and doxorubicin release. *Acta Biomater.* 35 (2016) 280-292.
- Lind GE, Thorstensen L, Løvig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M, Lothe RA. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol. Cancer* 3 (2004) 28.
- Liu YS, Hsu HC, Tseng KC, Chen HC, Chen SJ. Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer. *Biomed. Pharmacother.* 67 (2013) 791-799.
- Liu M, Du H, Zhang W, Zhai G. Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: design strategies and applications. *Mater Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.* 71 (2017) 1267-1280.
- Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics* 6 (2016) 1306-1323.
- Liu YC, Le Ny AL, Schmidt J, Talmon Y, Chmelka BF, Lee CT Jr. Photo-assisted gene delivery using light-responsive cationic vesicles. *Langmuir* 25 (2009) 5713-5724.
- Lohsse A, Ullrich S, Katzmann E, Borg S, Wanner G, Richter M, Voigt B, Schweder T, Schüler D. Functional analysis of the magnetosome island in *Magnetospirillum gryphiswaldense*: the mamAB operon is sufficient for magnetite biomineralization. *PLoS One* 6 (2011) 25561.
- London F. Zur Theorie und systematic der molekularkräfte. *Physik Zeit.* 63 (1930) 245-279.
- López-García JJ, Horno J, Grosse C. Influence of the finite size and effective permittivity of ions on the equilibrium double layer around colloidal particles in aqueous electrolyte solution. *J. Colloid. Interface Sci.* 428 (2014) 308-315.

- Lorente C, Arias JL, Cabeza L, Ortiz R, Prados JC, Melguizo C, Delgado ÁV, Clares Naveros B. Nano-engineering of biomedical prednisolone liposomes: evaluation of the cytotoxic effect on human colon carcinoma cell lines. *J. Pharm. Pharmacol.* 70 (2018) 488-497.
- Lorente C, Cabeza L, Clares B, Ortiz R, Halbaut L, Delgado ÁV, Perazzoli G, Prados J, Arias JL, Melguizo C. Formulation and in vitro evaluation of magnetoliposomes as a potential nanotool in colorectal cancer therapy. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 171 (2018) 553-565.
- Lu C, Xing MM, Zhong W. Shell cross-linked and hepatocytetargeting nanoparticles containing doxorubicin via acid-cleavable linkage. *Nanomedicine* 7 (2011) 80-7.
- Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol. Cancer Res.* 4 (2006) 221-233.
- Luciakova K, Kollarovic G, Kretova M, Sabova L, Nelson BD. TGF- $\beta$  signals the formation of a unique NF1/Smad4-dependent transcription repressor-complex in human diploid fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411 (2011) 648-653.
- Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, AttardT. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 7 (2008) 27-39.
- Maeda H. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 88 (2012) 53-71.
- Maeda H, Tsukigawa K, Fang J. A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy-Problems, Solutions, and Prospects. *Microcirculation* 23 (2016) 173-82.

- Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 91 (2015) 3-6.
- Maeda H. Emergence of EPR effect theory and development of clinical applications for cancer therapy. *Ther. Deliv.* 5 (2014) 627-630.
- Malkhosyan S, McCarty A, Sawai H, Perucho M. Differences in the spectrum of spontaneous mutations in the hprt gene between tumor cells of the microsatellite mutator phenotype. *Mutat Res.* 316 (1996) 249-259.
- Malvezzi M., Carioli G., Bertuccio P, Boffetta P, Levi F., La Vecchia C. *Annals of Oncology* 28 (2017) 117-1123.
- Manchun S, Dass CR, Sriamornsak P. Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems. *Life Sci.* 90 (2012) 381-387.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer related inflammation. *Nature* 454 (2008) 436-444.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268 (1995) 1336-1338.
- Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Mag. Mag.* 17 (1981) 1247-1248.
- Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46 (1986) 6387-6392.
- Matsumura Y, Gotoh M, Muro K, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, Okuwa M, Matsumoto S, Miyata Y, Ohkura H, Chin K, Baba S, Yamao T, Kannami A, Takamatsu Y, Ito K, Takahashi K. Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR)

encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann. Oncol.* 15 (2004) 517-525.

Mattos AC, Altmeyer C, Tominaga TT, Khalil NM, Mainardes RM. Polymeric nanoparticles for oral delivery of 5-fluorouracil: Formulation optimization, cytotoxicity assay and pre-clinical pharmacokinetics study. *Eur. J. Pharm. Sci.* 84 (2016) 83-91.

May JP, Li SD. Hyperthermia-induced drug targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10 (2013) 511-527.

Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today.* 15 (2010) 842-850.

Momekova D, Rangelov S, Lambov N. Long-Circulating, pH-Sensitive Liposomes. *Methods Mol. Biol.* 1522 (2017) 209-226.

Morales ME, Gallardo V, Calpena AC, Doménech J, Ruiz MA. Comparative study of morphine diffusion from sustained release polymeric suspensions. *J. Control. Release.* 95 (2004) 75-81.

Müller RH, Lherm C, Herbort J, Couvreur P. Propidium-iodide-loaded polyalkylcyanoacrylate particles: Labelling conditions and loading capacity. *Colloid Polymer Sci.* 269 (1991) 147-15

Muñoz de Escalona M1, Sáez-Fernández E1, Prados JC2, Melguizo C2, Arias JL3. Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer. *Int. J. Pharm.* 504 (2016) 11-19.

Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* 12 (2013) 991-1003.

- Nakao R, Matuo Y, Mishima F, Taguchi T, Maenosono S, Nishijima S. Development of magnetic separation system of magnetoliposomes. *Physica. C. Supercond.* 469 (2009) 1840-1844.
- Neumann A, Omenyi SN, van Oss CJ. Negative Hamaker coefficients. II. Phase separation of polymer solutions. *Colloid Polym. Sci.* 257 (1979) 413-419.
- Neumann A, Good RJ. Thermodynamics of contact angles. I. Heterogeneous solid surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 38 (1972) 341-358.
- Ni X, Castanares M, Mukherjee A, Lupold SE. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr. Med. Chem.* 18(27) (2011) 4206-4214.
- 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. *Biophys. J.* 10 (1970) 646-663.
- Nosho K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Schernhammer ES, Hazra A, Hunter DJ, Quackenbush J, Spiegelman D, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large populationbased sample. *PLoS One* 3 (11) (2008) e3698.
- Nyskohus LS, Watson AJ, Margison GP, Leu RK, Kim SW. Repair and removal of azoxymethane-induced O6-methylguanine in rat colon by O6-methylguanine DNA methyltransferase and apoptosis. *Mutat. Res.* 758 (2013) 80-86.
- Odenbach S. Fluid mechanics aspects of magnetic drug targeting. *Biomed. Tech. (Berl.)* 60 (2015) 477-483.
- Overbeek JHG. Theorie der elektroforese. Der relaxationseffekt. *Kolloid Beih.* 54 (1943) 287-364.

- Pang X, Jiang Y, Xiao Q, Leung AW, Hua H, Xu C. pH-responsive polymer-drug conjugates: design and progress. *J. Control. Release* 222 (2016) 116-129.
- Pärnaste L, Arukuusk P, Langel K, Tenson T, Langel U. The formation of nanoparticles between small interfering RNA and amphipathic cell-penetrating peptides. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 7 (2017) 1-10.
- Parsegian VA, Ninham BW. Application of Lifschitz theory to the calcinations of van der Waals forces across thin liquid films. *Nature* 224 (1969) 1197-1198.
- Patel P, Meghani N, Kansara K, Kumar A. Nanotherapeutics for the treatment of cancer and arthritis. *Curr Drug Metab.* 2018 doi: 10.2174/1389200220666181127102720
- Pawłowski KM, Mucha J, Majchrzak K, Motyl T, Król M. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. *BMC Vet. Res.* 9 (2013) 119.
- Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrowska A. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother. Oncol.* 108 (2013) 378-387.
- Peloquin JM, Nguyen DD. The microbiota and inflammatory bowel disease: insights from animal models. *Anaerobe*. 24 (2013) 102-106.
- Penhaligon M, Camplejohn RS. Combination heparin plus cortisone treatment of two transplanted tumors in C3H/He mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 74 (1985) 869-873.
- Pérez-Artacho B, Gallardo V, Ruiz MA, Arias JL. Maghemite/poly(D,L-lactide-coglycolide) composite nanoplatform for therapeutic applications. *J. Nanopart. Res.* 14 (2012) 768.
- Phillips D, Gibson M. Redox-Sensitive Materials for Drug Delivery: targeting the correct intracellular environment, tuning release rates, and appropriate predictive systems. *Antioxid. Redox. Signal.* 21 (2014) 786-803.

- Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin. Cancer Biol.* 14 (2004) 433-439.
- Plaza RC, Arias JL, Espín M, Jiménez ML, Delgado AV. Aging effects in electrokinetics of colloidal iron oxides. *J. Colloid Interface Sci.* 245 (2002) 86-90.
- Prasad R, Agawane SB, Chauhan DS, Srivastava R, Selvaraj K. In Vivo Examination of Folic Acid-Conjugated Gold-Silica Nanohybrids as Contrast Agents for Localized Tumor Diagnosis and Biodistribution. *Bioconjug. Chem.* 29(12) (2018) 4012-4019.
- Pucci M, Lotti T, Tuci F, Brunetti L, Rindi L, Fibbi G, Pasquali F, Chiarugi VP. Modulation of growth of melanoma. *Int. J. Dermatol.* 27 (1988) 167-169.
- Rabanel JM, Hildgen P, Banquy X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *J. Control. Release.* 10 (2014) 71-87.
- Radvanyi, L. Immunotherapy exposes cancer stem cell resistance and a new synthetic lethality. *Mol. Ther.* 21(8) (2013) 1472–1474.
- Rai M, Duran N (Eds.). Metal nanoparticles in microbiology. Berlin: Springer-Verlag, 2011.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418 (2002) 934.
- Rapoport N. Drug-Loaded perfluorocarbon nanodroplets for ultrasound-mediated drug delivery. *Adv. Exp. Med. Biol.* 880 (2016) 221-241.
- Reddy LH. Drug delivery to tumors: recent strategies. *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (2005) 1231-1242.

- Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem. Rev.* 112 (2012) 5818-5878.
- Rivera Gil P, Hühn D, del Mercato L, Sasse D, Parak W. Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacol. Res.* 62 (2010) 115-125.
- Rosengart AJ, Kaminski MD, Chen H, Caviness PL, Ebner AD, Ritter JA. Magnetizable implants and functionalized magnetic carriers: a novel approach for noninvasive yet targeted drug delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* 293 (2005) 633-638.
- Rozen P, Comaneshter D, Levi Z, Hazazi R, Vilkin A, Maoz E, Birkenfeld S, Niv Y. Cumulative evaluation of a quantitative immunochemical fecal occult blood test to determine its optimal clinical use. *Cancer* 116 (2010) 2115-2125.
- Rudge SR, Kurtz TL, Vessely CR, Catterall LG, Williamson DL. Preparation, characterization, and performance of magnetic iron-carbon composite microparticles for chemotherapy. *Biomaterials* 14 (2000) 1411-1420.
- Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Arias JL. Drug delivery systems base on poly( $\epsilon$ - caprolactone) for cancer treatment. *Ars Pharm.* 50 (2009) 83-96.
- Saito M, Yamaguchi A, Goi T, Tsuchiyama T, Nakagawara G, Urano T, Shiku H, Furukawa K. Expression of DCC protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis. *Oncology* 56 (2) (1999) 134-141.
- Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res.* 65 (2005) 6063-6069.
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 304 (2004) 554.

- Santhosh C, Velmurugan V, Jacob G, Jeong SK, Grace AN, Bhatnagar A. Role of nanomaterials in water treatment applications: A review. *Chem. Eng. J.* 306 (2016) 1116-1137.
- Sarebo M, Skjelbred CF, Breistein R, Lothe IM, Hagen PC, Bock G, Hansteen IL, Kure EH. Association between cigarette smoking, APC mutations and the risk of developing sporadic colorectal adenomas and carcinomas. *BMC Cancer* 6 (2006) 71.
- Sawant RR, Sriraman SK, Navarro G, Biswas S, Dalvi RA, Torchilin VP. Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. *Biomaterials* 33 (2012) 3942-3951.
- Scarberry KE, Mezencev R, McDonald JF. Targeted removal of migratory tumor cells by functionalized magnetic nanoparticles impedes metastasis and tumor progression. *Nanomedicine* 6 (2011) 69-78.
- Schiffelers RM, Metselaar JM, Fens MHAM, Janssen APCA, Molema G, Storm G. Liposome-encapsulated prednisolone phosphate inhibits growth of established tumors in mice. *Neoplasia* 7 (2005) 118-127.
- Schreuders EH, Grobbee EJ, Spaander MC, Kuipers EJ. Advances in fecal tests for colorectal cancer screening. *Curr. Treat. Opt. Gastroenterol.* 14 (1) (2016) 152-162.
- Shokrollahi H. A review of the magnetic properties, synthesis methods and applications of maghemite. *J. Magn. Magn. Mater.* 426 (2017) 74-81.
- Schramm G. A Practical Approach to Rheology and Rheometry, 2nd ed., Thermo Electron, Karlsruhe, 2004.
- Senzer N, Nemunaitis J, Nemunaitis D, Bedell C, Edelman G, Barve M, Nunan R, Pirollo KF, Rait A, Chang EH. Phase I study of a systemically delivered p53 nanoparticle in advanced solid tumors. *Mol. Ther.* 21 (2013) 1096-1103.

- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366 (1993) 704-707.
- Shan D, Li J, Cai P, Prasad P, Liu F, Rauth AM, Wu XY. RGD-conjugated solid lipid nanoparticles inhibit adhesion and invasion of  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin-overexpressing breast cancer cells. *Drug Deliv. Transl. Res.* 5 (2015) 15-26.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31 (2010) 27-36.
- Shi J, Xiao Z, Kamaly N, Farokhzad OC. Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 1123-1134.
- Schiffelers RM, de Visser KE. Inflammation as target for pharmaceutical intervention in cancer. *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009) 1822-1824.
- Schulze E, Ferrucci JT Jr, Poss K, Lapointe L, Bogdanova A, Weissleder R. Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro. *Invest. Radiol.* 30 (1995) 604-610.
- Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G Jr., Summerhayes IC. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 335 (23) (1996) 1727-1732.
- Shmeeda H, Mak L, Tzemach D, Astrahan P, Tarshish M, Gabizon A. Intracellular liposomes in a mouse lymphoma model with upregulated folate receptors. *Mol. Cancer Ther.* 5(4) (2006) 818-824.
- Silverstein R, Webster FX (Eds.). Spectrometry identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons Inc., 1998.

Singh N, Karambelkar A, Gu L, Lin K, Miller JS, Chen CS, Sailor MJ, Bhatia SN. Bioresponsive mesoporous silica nanoparticles for triggered drug release. *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 19582-19585.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314 (2006) 268-274.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principios de análisis instrumental*. Madrid: Mc Graw Hill, 2001.

Skouras A, Mourtas S, Markoutsas E, De Goltstein MC, Wallon C, Catoen S, Antimisiaris SG. Magnetoliposomes with high USPIO entrapping efficiency, stability and magnetic properties. *Nanomedicine* 7 (2011) 572-579.

Soenen SJ, Velde GV, Ketkar-Atre A, Himmelreich U, De Cuyper M. Magnetoliposomes as magnetic resonance imaging contrast agents. *Nanomed. Nanobiotechnol.* 3 (2011) 197-211.

Somasundaram K. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Frontiers in Bioscience.* 5 (2000) 424-437.

Sriraman SK, Salzano G, Sarisozen C, Torchilin V. Anti-cancer activity of doxorubicin-loaded liposomes co-modified with transferrin and folic acid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 105 (2016) 40-49..

Strum WB. Colorectal adenomas. *N Engl J Med.* 374 (2016) 1065-1075.

Sun C, Lee JS, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1252-1965.

- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS., Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kB activation. *Mutat. Res.* 480-481 (2001) 243-268.
- Suriyanto, Ng EY, Kumar SD. Physical mechanism and modeling of heat generation and transfer in magnetic fluid hyperthermia through Néelian and Brownian relaxation: a review. *Biomed. Eng. Online.* 16 (2017) 36.
- Tagami T, May JP, Ernsting MJ, Li SD. A thermosensitive liposome prepared with a Cu<sup>2+</sup> gradient demonstrates improved pharmacokinetics, drug delivery and antitumor efficacy. *J. Control. Release* 161 (2012) 142-309.
- Taghizadeh B, Taranejoo S, Monemian SA, Salehi Moghaddam Z, Daliri K, Derakhshankhah H, Derakhshani Z. Classification of stimuli-responsive polymers as anticancer drug delivery systems. *Drug Deliv.* 22 (2015) 145-55.
- Takeda S, Mishima F, Fujimoto S, Izumi Y, Nishijima S. Development of magnetically targeted drug delivery system using superconducting magnet. *J. Magn. Magn. Mater.* 311 (2007) 367-371.
- Talekar M, Kendall J, Denny W, Garg S. Targeting of nanoparticles in cancer: drug delivery and diagnostics. *Anticancer Drugs* 22(10) (2011) 949-962.
- Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 3153-3162.
- Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J. Gastroenterol.* 41 (2006) 185-192.
- Tayo LL. Stimuli-responsive nanocarriers for intracellular delivery. *Biophys Rev.* 9 (2017) 931-940.

- Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV, Farr GH Jr, O'Connell MJ. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res.* 58 (1998) 1713-1718.
- Tian L, Lu L, Qiao Y, Ravi S, Salatan F, Melancon M. Stimuli-Responsive gold nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. *J. Funct. Biomater.* 7 (2016) 19.
- Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 131-135.
- Van den Hoven JM, Nemes R, Metselaar JM, Nuijen B, Beijnen JH, Storm G, Szebeni J. Complement activation by PEGylated liposomes containing prednisolone. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49 (2013) 265-271.
- van Olphen HJ. An introduction to clay colloidal chemistry. Nueva York: Wiley, 1977.
- van Oss CJ. Interfacial forces in aqueous media. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 111 (1986) 378-390.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology.* 116 (1999) 1453-1456.
- Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 979-987.

- Venkatasubbu GD, Ramasamy S, Avadhani GS, Ramakrishnan V, Kumar J. Surface modification and paclitaxel drug delivery of folic acid modified polyethylene glycol functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Powder Technol.* 325 (2013) 437-442.
- Vera P, Gallardo V, Salcedo J, Delgado AV. Colloidal stability of a pharmaceutical latex: Experimental determinations and theoretical predictions. *J. Colloid Interface Sci.* 177 (1996) 553-560.
- Viroonchatapan E, Sato H, Ueno M, Adachi I, Tazawa K, Horikoshi I. Release of 5-fluorouracil from thermosensitive magnetoliposomes induced by an electromagnetic field. *J. Control. Release* 46 (1997) 263-271.
- Visser J. On Hamaker constants: a comparison between Hamaker constants and Lifshitz-van der Waals constants. *Adv. Colloid Interface Sci.* 4 (1972) 331-363.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319 (1988) 525-532.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 339 (2013) 1546-1558.
- Wagner E. Programmed drug delivery: Nanosystems for tumor targeting. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 7 (2007) 587-593.
- Wang X, Yang R, Yuan C, An Y, Tang Q, Chen D. Preparation of folic acid-targeted temperature-sensitive magnetoliposomes and their antitumor effects in vitro and in vivo. *Target Oncol.* 13 (2018) 481-494.
- Wang H, Huang Q, Chang H, Xiao J, Cheng Y. Stimuli-responsive dendrimers in drug delivery. *Biomater Sci.* 4 (2016) 375-390.

- Wei PL, Kuo LJ, Huang MT, Ting WC, Ho YS, Wang W, An J, et al. Nicotine enhances colon cancer cell migration by induction of fibronectin. *Ann. Surg. Oncol.* 118 (2011) 1782-1790.
- White EE, Pai A, Weng Y, Suresh AK, Van Haute D, Pailevanian T, Alizadeh D, Hajimiri A, Badie B, Berlin JM. Functionalized iron oxide nanoparticles for controlling the movement of immune cells. *Nanoscale* 7 (2015) 7780-7789.
- Winter ND, Murphy RK, O'Halloran TV, Schatz GC. Development and modeling of arsenic-trioxide-loaded thermosensitive liposomes for anticancer drug delivery. *J. Liposome Res.* 21 (2011) 106-115.
- Wong HP, Yu L, Lam EK, Tai EK, Wu WK, Cho CH. Nicotine promotes cell proliferation via alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 221 (2007) 261-267.
- Wu J, Akaike T, Hayashida K, Okamoto T, Okuyama A, Maeda H. Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxy nitrite and matrix metalloproteinase. *Jpn J. Cancer Res.* 92 (2001) 439-451.
- Wust P, Cho CH, Hildebrandt B, Gellermann J. Thermal monitoring: invasive, minimal invasive and non-invasive approaches. *Int. J. Hyperthermia* 22 (2006) 255-262.
- Xiong MH, Bao Y, Yang XZ, Wang YC, Sun B, Wang J. Lipase-sensitive polymeric triple-layered nanogel for "on-demand" drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 4355-4362.
- Xu S, Olenyuk BZ, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 121-138.

- Yan L, Zhang S, Chen P, Liu H, Yin H, Li H. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. *Microbiol. Res.* 167 (2012) 507-519.
- Yan H, Teh C, Sreejith S, Zhu L, Kwok A, Fang W, Ma X, Nguyen KT, Korzh V, Zhao Y. Functional mesoporous silica nanoparticles for photothermal-controlled drug delivery in vivo. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (2012) 8373-8377.
- Yang C, Rait A, Pirolo KF, Dagata JA, Farkas N, Chang EH., Nanoimmunoliposome delivery of superparamagnetic iron oxide markedly enhances targeting and uptake in human cancer cells in vitro and in vivo. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 4 (2008) 318-329.
- Yang J, Lee J, Kang J, Oh SJ, Ko HJ, Son JH, Lee K, Suh JS, Huh YM, Haam S. Smart drug-loaded polymer gold nanoshells for systemic and localized therapy of human epithelial cancer. *Adv. Mater.* 21 (2009) 4339-4342.
- Yang HW, Hua MY, Liu HL, Huang CY, Tsai RY, Lu YJ, Chen JY, Tang HJ, Hsien HY, Chang YS, Yen TC, Chen PY, Wei KC. Self-protecting core-shell magnetic nanoparticles for targeted, traceable, long half-life delivery of BCNU to gliomas. *Biomaterials* 32 (2011) 6523-6532.
- Ye YN, Liu ES, Shin VY, Wu WK, Luo JC, Cho CH. Nicotine promoted colon cancer growth via epidermal growth factor receptor, c-Src, and 5-lipoxygenase mediated signal pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308 (2004) 66-72.
- Ye H, Tong J, Wu J, Xu X, Wu S, Tan B, Shi M, Wang J, Zhao W, Jiang H, Jin S. Preclinical evaluation of recombinant human IFN $\alpha$ 2b-containing magnetoliposomes for treating hepatocellular carcinoma. *Int. J. Nanomed.* 9 (2014) 4533-4550.
- Ye H, Tong J, Liu J, Lin W, Zhang C, Chen K, Zhao J, Zhu W. Combination of gemcitabine-containing magnetoliposome and oxaliplatin-containing magnetoliposome in breast cancer treatment: a possible mechanism with potential for clinical application. *Oncotarget* 7 (2016) 43762-43778.

- Yokoyama M. Polymeric micelles as drug carriers: Their lights and shadow. *Journal of Drug Targeting* 22 (2014) 576-583.
- Yoshida, GJ, Saya, H. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. *Cancer Science* 107(1) (2016) 5-11.
- Yu M, Zheng J. Clearance pathways and tumor targeting of imaging nanoparticles. *ACS Nano*. 9 (2015) 6655-6674.
- Yu B, Tai HC, Xue W, Lee LJ, Lee RJ. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Mol. Membr. Biol.* 27(7) (2010) 286-298.
- Yu MK, Kim D, Lee IH, So JS, Jeong YY, Jon S. Image guided prostate cancer therapy using aptamer-functionalized thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Small* 7(15) (2011) 2241-2249.
- Zhang Y, Hong H, Cai W. Tumor-targeted drug delivery with aptamers. *Curr. Med. Chem.* 18 (27) (2011) 4185-4194.
- Zhang Z, Wang J, Tacha DE, Li P, Bremer RE, Chen H, Wei B, Xiao X, Da J, Skinner K, Hicks DG, Bu H, Tang P. Folate receptor  $\alpha$  associated with triple-negative breast cancer and poor prognosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 138 (2014) 890-895.
- Zhang L, Wang Y, Tang Y, Jiao Z, Xie C, Zhang H, Gu P, Wei X, Yang GY, Gu H, Zhang C. High MRI performance fluorescent mesoporous silica-coated magnetic nanoparticles for tracking neural progenitor cells in an ischemic mouse model. *Nanoscale* 5 (2013) 4506-4016.
- Zhao M, Biswas A, Hu B, Joo KI, Wang P, Gu Z, Tang Y. Redox-responsive nanocapsules for intracellular protein delivery. *Biomaterials*. 32 (2011) 5223-5230.
- Zhao X, Li H, Lee RJ. Targeted drug delivery via folate receptors. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5 (2008) 309-319.

Zhao, J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacol. Ther.* 160 (2016) 145-158.

Zheng WE, Chen H, Yuan SF, Wu LL, Zhang W, Sun HY, Chen WJ. Overexpression of betaIII-tubulin and survivin associated with drug resistance to docetaxel-based chemotherapy in advanced gastric cancer. *J. BUON* 17 (2012) 284-290.

Zhou M, Gu L, Findley HW, Jiang R, Woods WG. PTEN reverses MDM2-mediated chemotherapy resistance by interacting with p53 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res.* 63 (2003) 6357-6362.

Zhu L, Kate P, Torchilin VP. Matrix metalloprotease 2-responsive multifunctional liposomal nanocarrier for enhanced tumor targeting. *ACS Nano* 6 (2012) 3491-3498.



