

**DESARROLLO DE NANOPLATAFORMAS  
MULTIFUNCIONALES COMO AGENTES  
TERANÓSTICOS ÚTILES  
EN CÁNCER DE COLON**



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

**Tesis Doctoral**

*María Muñoz de Escalona Jiménez*

**Granada, Marzo de 2016**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: María Muñoz de Escalona Jiménez  
ISBN: 978-84-9163-643-4  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48616>

# ÍNDICE

Abreviaturas.....	i
-------------------	---

## CAPÍTULO 1: Introducción

1.1. Cáncer de colon.....	3
1.1.1. Epidemiología .....	5
1.1.2. Etiología.....	8
1.1.3. Detección y estadiaje .....	10
1.1.4. Base molecular .....	16
1.1.5. Tratamiento.....	24
1.1.6. Resistencia y cáncer de colon: <i>Cancer Stem Cells</i> .....	28
1.2. Estrategias para el transporte selectivo de fármacos al lugar de acción ...	29
1.2.1. Estrategias de transporte pasivo de fármacos.....	32
1.2.2. Estrategias de transporte activo de fármacos.....	36
1.2.3. Estrategias de transporte de fármacos a células tumorales resistentes .....	50
1.3. Nanopartículas lipídicas sólidas .....	53
1.3.1. Metodología de síntesis.....	62
1.3.2. Separación y purificación .....	70
1.3.3. Toxicidad .....	71
1.3.4. Estabilidad .....	72
1.3.5. Nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas .....	78

## CAPÍTULO 2: Objetivos y contribución del trabajo de investigación

2.1. Objetivos .....	83
2.2. Contribución .....	85

## CAPÍTULO 3: Formulación de nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas

3.1. Síntesis.....	87
3.1.1. Nanopartículas de magnetita.....	87
3.1.2. Trimiristato de glicerol.....	95
3.1.3. Nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas .....	98

## CAPÍTULO 4: Caracterización fisicoquímica

4.1. Estudio geométrico.....	101
4.2. Estructura y composición química .....	107
4.2.1. Difractometría de rayos X.....	107
4.2.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.....	113
4.2.3. Análisis térmico .....	119
4.3. Propiedades eléctricas superficiales.....	129
4.3.1. Metodología experimental.....	132
4.3.2. Efecto del pH y de la fuerza iónica sobre las propiedades eléctricas superficiales.....	133
4.3.3. Análisis electrocinético de la estabilidad de la nanopartícula lipídica .....	137
4.4. Termodinámica superficial .....	139
4.4.1. Metodología experimental .....	142
4.4.2. Componentes de la energía libre superficial de las nanopartículas.....	147
4.4.3. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba.....	148
4.5. Mecanismo de formación de las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas.....	151
4.6. Propiedades magnéticas .....	153
4.6.1. Ciclo de histéresis .....	157
4.6.2. Prueba <i>in vitro</i> a nivel macroscópico y microscópico .....	163



## **CAPÍTULO 5: Capacidad de vehiculización de 5-fluorouracilo**

5.1. Principales características del 5-fluorouracilo .....	169
5.2. Espectrofotometría UV-Vis de las disoluciones de 5-fluorouracilo.....	178
5.2.1. Absorbancia óptica de las disoluciones.....	178
5.2.2. Factores experimentales condicionantes.....	182
5.2.3. Validación del método espectrofotométrico .....	186
5.3. Determinación de la incorporación de fármaco en las nanopartículas.....	191
5.3.1. Estudio de la estabilidad de las nanopartículas preparadas.....	194
5.4. Liberación de fármaco .....	196

## **CAPÍTULO 6: Citotoxicidad, proliferación celular y capacidad de vehiculización**

6.1. Principales características de la rodamina .....	205
6.2. Espectrometría de fluorescencia de las disoluciones de rodamina .....	207
6.2.1. Determinación de la longitud de onda máxima de excitación de las disoluciones .....	208
6.2.2. Espectro de emisión de las disoluciones.....	209
6.2.3. Validación del método fluorimétrico .....	211
6.2.4. Determinación de la incorporación de fluoróforo en las nanopartículas.....	214
6.3. Caracterización de las nanopartículas cargadas de fluoróforo .....	214
6.3.1. Tamaño y potencial zeta.....	214
6.3.2. Liberación de fármaco .....	215
6.4. Estudios <i>in vitro</i> .....	215
6.4.1. Líneas celulares .....	215
6.4.2. Estudio de citotoxicidad <i>in vitro</i> .....	216
6.4.3. Estudio de incorporación de nanopartículas al interior celular... ..	220

## **CAPÍTULO 7: Conclusiones**

7. Conclusiones .....	225
-----------------------	-----

## **CAPÍTULO 8: Bibliografía**

8. Bibliografía .....	230
-----------------------	-----

$\lambda$ : longitud de onda

$\theta$ : ángulo de contacto

$\theta_a$ : ángulo de contacto de avance

$\theta_r$ : ángulo de contacto de retroceso

$\gamma$ : componente de la energía libre superficial

$\kappa$ : número de onda

$v_{AS}$ : vibración de elongación simétrica

$\rho$ : vibración de oscilación

$\zeta$ : potencial zeta

$u_e$ : movilidad electroforética

$\epsilon$ : absortividad molar

$\gamma_S^{LW}$ : componente de la energía libre superficial Lifshitz-van der Waals

$\gamma_S^+$ : aceptor de electrones

$\gamma_S^-$ : donante de electrones

$\gamma^{AB}$ : componente de la tensión superficial asociada interacciones ácido-base

$\gamma_{sv}$ : tensión interfacial sólido-vapor

$\gamma_{sl}$ : tensión interfacial sólido-líquido

$\gamma_L$ : tensión superficial del líquido

$\gamma_s$ : tensión superficial del sólido

$\pi_e$ : presión superficial

$\mu$ : permeabilidad magnética

$\mu_r$ : permeabilidad magnética relativa

## Abreviaturas

---

$\chi$  : susceptibilidad magnética

$\mu_0$ : permeabilidad magnética del vacío

$\mu_r$  :permeabilidad relativa del material

$\Delta G_A$ : energía libre de adhesión

$\Delta G$ : variación de energía libre

$\Delta H$ : entalpía

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ : maghemita

**5-FU**: 5-fluorouracilo

**5-FUR**: fluorouridina

**8D3**: anticuerpo 8D3

$\text{\AA}$ : amstrong

**A**: absorbancia

**ABC**: ATP-binding cassette

**ACE**: antígeno carcinoembrionario

**ACS**: American Cancer Society

**ADN**: ácido desoxirribonucleico

**AMB-1**: Magnetospirillum magneticum

**ARN**: ácido ribonucleico

**AECC**: Asociación Española Contra el Cáncer

**APC**: Adenomatous Poliposis Coli

**ATCC**: American Type Culture Collection

**ATP**: adenosina trifosfato

**B**: densidad de flujo

**B<sub>r</sub>**: remanencia

**B<sub>s</sub>**: densidad de flujo de saturación

**Bcl-2**: B-cell lymphoma 2

**BCRP**: ATP binding cassette subfamily G member 2

**BRAF**: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

**C**: concentración molar

**c-myc**: avian myelocytomatosis virus

**CA 19-9**: antígeno carbohidrato 19-9

**CCR**: Cáncer colorrectal

**CDKN2**: cyclin-dependent kinase inhibitor 2

**CDK4**: cyclin-dependent kinase 4

**CDK4I**: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

**CDK6**: cyclin-dependent kinase 6

**CEA**: antígeno carcinoembrionario

**CpG**: short interspersed DNA sequences that deviate significantly from the average genomic pattern by being GC-rich, CpG-rich

**CRBP1**: Cellular retinol-binding protein

**CREKA**: tumor-homing peptide

**CSC**: cancer stem cell

**C.V.**: coeficiente de variación

**DCC**: Deleted in Colon Carcinoma, Deleted in Colorectal Cancer

**DHF**: Dihidrofolato

**DL**: drug loading

## Abreviaturas

---

**DL<sub>50</sub>**: dosis letal 50

**DLVO**: Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek

**DMEM**: Dulbecco's modified Eagle

**DPC4**: Deleted in Pancreatic Cancer locus 4

**dq/dt**: flujo de calor

**DSC**: Differential Scanning Calorimetry

**DTA**: Análisis térmico diferencial

**dTDP**: desoxitimidina 5' difosfato

**dTMP**: desoxitimidina 5' monofosfato

**dTTP**: desoxitimidina 5' trifosfato

**dUMP**: 2'-deoxi-uridina 5'-monofosfato (uridilato)

**EE**: eficacia de atrapamiento

**EGFR**: epidermal growth factor receptor

**EL**: interacción eletroestática

**EPR**: efecto de permeabilidad y retención aumentada

**ESEM**: microscopía electrónica ambiental de barrido

**eV**:

**F**: intensidad de la radiación fluorescente

**FAP**: poliposis adenomatosa familiar

**FDA**: Food and Drug Administration

**FdUDP**: 5 fluoro 2' deoxiuridina 5' difosfato;

**FdUMP**: 5' fluoro 2' deoxiuridina monofosfato;

**FdUTP**: 5 fluoro 2' deoxiuridina 5' trifosfato;

**Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>**: magnetita

**FOLFIRI**: FOL (folinic acid), F (fluorouracil), IRI (irinotecan)

**FOLFOX**: FOL (leucovorin calcium (folinic acid)) F (fluorouracil) OX (oxaliplatin)

**FR- $\alpha$** : receptor de membrana para el ácido fólico

**FR- $\beta$** : receptor de membrana para el ácido fólico

**FTIR**: espectro de infrarrojos por transformada de Fourier (

**FUDP**: Fluorouridina-5' difosfato;

**FUdR**: Fluordeoxiuridina;

**FUMP**: Fluorouridina-5' monofosfato;

**FUTP**: Fluorouridina-5' trifosfato;

**GDP**: guanosín difosfato

**GI**: growth inhibition

**GRAS**: generally recognized as safe

**GTP**: guanosín trifosfato

**H**: gradiente magnético

**H<sub>c</sub>**: coercitividad

**HCl**: ácido clorhídrico

**HCT-15**: línea celular que deriva de un adenocarcinoma colorrectal humano

**HER-2**: factor de crecimiento epidérmico-2

**hMLH1**: mismatch repair genes human mutL homolog 1

**HNPCC**: cáncer colorrectal hereditario no polipoideo

**HPH**: High Pressure Homogenization

**HRAS**: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

## Abreviaturas

---

**HRTEM:** microscopía electrónica de transmisión de alta resolución

**IARC:** International Agency for Research on Cancer

**I:** intensidad después de atravesar una longitud  $b$  del medio

**$I_0$ :** intensidad de la radiación incidente

**IMMA:** inmulina-multi-metacrilato

**INK4 $\alpha$ :** CDK inhibitor p16

**$K_0$ :** constante de liberación

**$K'$ :** constante proporcional al rendimiento cuántico de fluorescencia

**KRAS:** Kirsten retrovirus associated sequence

**keV:**

**kV:**

**L:**

**L/h:**

**$L_c$ :** límite de cuatificación

**$L_D$ :** límite de detección

**LKB1:** serine/threonine kinase 11

**LOH:** loss of heterozygosity

**LW:** Lifshitz-van der Waals

**M:** molar

**M:** imanación

**$M_s$ :** imanación de saturación

**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinases

**MDR:** multidrug resistance



- meq/L:** miliequivalentes por litro
- mg/Kg:** miligramos por kilo
- MGMT:** O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase
- MLH1:** mutL homolog 1
- MMR:** mismatch repair
- MRK-16:** P-glycoprotein 1
- MRP1:** Multidrug resistance protein 1
- MRP3:** Multidrug resistance protein 3
- MS-1:** magnetotacticum
- mSEPT9:** forma metilada del gen Septina 9
- MSH2:** mutS homolog 2
- MSH6:** mutS homolog 6
- MSI:** inestabilidad de microsatélites
- mT:**
- MTS1:** cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
- MV-1:** Magnetovibrio
- MYH:** mutY homolog E.Coli
- NLC:** nanostructured lipid carriers
- NLS:** nanopartículas lipídicas sólidas
- NLSM:** nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas
- nm:** nanómetro
- NRAS:** neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
- OMS:** Organización Mundial de la Salud

## Abreviaturas

---

**OPRT:** Ácido-orótico-fosforibosiltransferasa

**p14ARF:** cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

**p16INK4 $\alpha$ :** cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

**PBS:** Phosphate buffered saline

**PCS:** espectroscopía de correlación de fotones

**PEG:** polietilenglicol

**P-gp:** P-glicoproteína

**PIGF:** placental growth factor

**PI3K:** fosfatidilinositol- 3-kinasa

**PIK3CA:** phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

**PLGA:** poli(D,L-lactida-co-glicolida)

**PH1:** alanine-glyoxylate aminotransferase

**PMS1:** MS1 homolog 1, mismatch repair system component

**PMS2:** PMS1 homolog 2, mismatch repair system component

**PR\_b:** Fibronectin-Mimetic Peptide

**PRPP:** Fosforibosil pirofosfato

**PSMA:** proteasome subunit alpha

**PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

**$Q_t$ :** cantidad acumulada de fármaco a tiempo  $t$

**RAF:** Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

**RAS:** sarcoma viral oncogene homolog

**RasSF1 $\alpha$ :** Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1

**Rb:** retinoblastoma

**RESS:** Rapid Expansion Supercritical Solution

**RGD:** secuencia arginina - glicina - ácido aspártico

**Rho-123:** rodamina 123

**RNR:** Ribonucleótido reductasa

**rpm:** revoluciones por minuto

**RSC:** recuento sanguíneo completo

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**SEOM:** Sociedad Española de Oncología Médica

**SMAD4:** Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4

**S<sub>n</sub>:** desviación estándar

**SRB:** sulforodamina B

**SRE:** sistema reticuloendotelial

**T:** transmitancia

**t<sub>1/2</sub>:** semivida o vida media

**T-84:** línea celular que procede de un carcinoma colorrectal de origen humano

**Tie2:** Endothelial Tyrosine Kinase

**TG:** trimistato de glycerol

**TGA:** Análisis termogravimétrico

**TGF-β:** transforming growth factor, beta

**TGFβR2:** transforming growth factor, beta receptor II

**THF:** Tetrahidrofolato

**TK:** Timidina quinasa

**TP:** Timidina fosforilasa

## Abreviaturas

---

**TP53:** tumor protein p53

**TS:** Timidilato sintasa

**UK:** Uridina quinasa

**UP:** Uridina fosforilasa

**VEGF:** vascular endotelial growth factor

**W<sub>A</sub>:** trabajo de adhesión

**Y<sub>n</sub>:** cantidad promedio de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco

# **Capítulo 1.**

## **Introducción**



## 1.1. CÁNCER DE COLON

El cáncer se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular [Willingham y cols., 2004].

La acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que permiten a ciertas células evadir mecanismos reguladores de apoptosis y proliferación se encuentran en el origen de las células tumorales malignas [Willingham y cols., 2004]. Estas células poseen características especiales [Hanahan y Weinberg, 2000]:

- ☞ Crecen y se dividen sin la necesidad de las señales apropiadas y/o en presencia de señales inhibitorias.
- ☞ Pueden poseer cambios en el citoesqueleto y alteraciones en la matriz extracelular del tejido que alteran su capacidad de adhesión celular, movimiento, apariencia o interacción con células vecinas.
- ☞ No muestran inhibición del crecimiento por contacto con otras células, dando lugar a una pérdida de la organización del tejido normal.
- ☞ Presentan alteraciones en el tamaño y forma de los núcleos y pueden secretar enzimas que digieren las barreras celulares lo que les permite invadir y destruir tejidos normales adyacentes.

El resultado de la aparición de estas alteraciones celulares en las células epiteliales del intestino grueso (colon) o en el recto es el denominado cáncer colorrectal (CCR), 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 o intestino grueso forma parte del aparato digestivo. Comienza en el lugar donde desemboca el intestino delgado y asciende hasta la zona del hígado (colon ascendente), atraviesa el abdomen (colon transversal) y desciende (colon descendente) desembocando en el recto y finalmente en el ano (Figura 1).

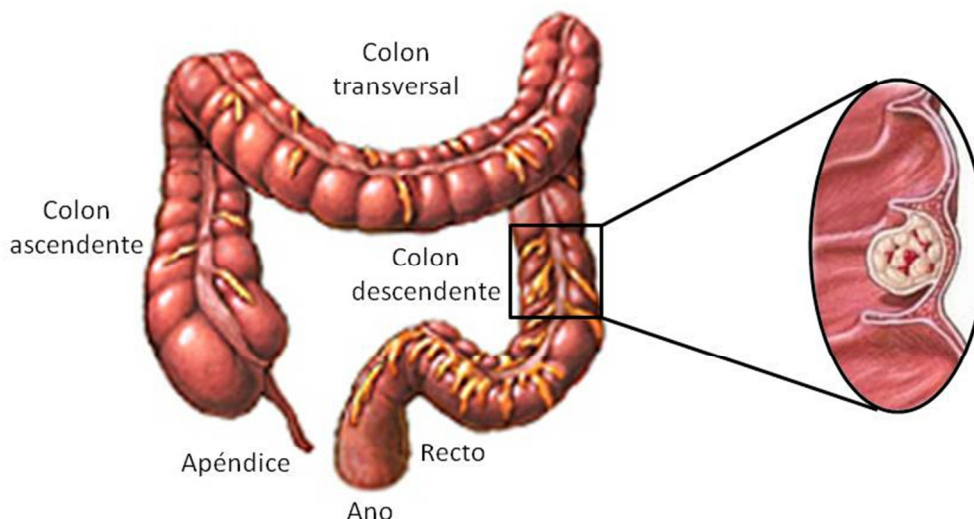


Figura 1. Imagen del colon. Figura insertada: imagen de un pólipo en la cara interna del tubo digestivo.

Tanto el colon como el recto están constituidos por varias capas de tejido, la más interna es la mucosa, donde existen glándulas. Esta se encuentra rodeada por la submucosa, más externamente se sitúa la capa muscular que a su vez está recubierta por la serosa (capa más externa). En la mucosa existen glándulas donde se producen con mayor frecuencia los tumores malignos (Figura 2).

La función del colon es la de eliminar y procesar nutrientes de los alimentos y ayudar a eliminar los desechos del cuerpo.



La tumoración vegetante o infiltrativa originada tiene tendencia a crecer y diseminarse paso a paso a través de los conductos linfáticos (ganglios), o bien a distancia vía sanguínea (metástasis).



Figura 2. Imagen radiográfica (radiología con contraste). Muestra la presencia de un cáncer de colon (flecha).

### 1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

En España, el cáncer colorrectal representa el tercero en frecuencia en varones, detrás del cáncer de pulmón y próstata, siendo el segundo en mortalidad (el primero es el de pulmón). En las mujeres, representa el segundo en frecuencia y en mortalidad detrás del de mama. Sin embargo, si se tienen en cuenta ambos sexos, el cáncer con mayor incidencia es el colorrectal (15%), el que produce una más alta mortalidad es el cáncer de pulmón (20.6%), y el que tiene una prevalencia a cinco años más alta es el cáncer de mama (17.9%) (Tablas 1 y 2). Según datos de la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica), se calcula una incidencia de 32.240 pacientes al año en España, siendo responsable de 14.700 fallecimientos y una prevalencia a cinco años de 89.705 casos [International Agency for Research on Cancer (IARC); SEOM].

Incidencia del cáncer en España			
Hombres		Mujeres	
Próstata	17.32 %	Mama	28.35 %
Pulmón	16.56 %	Colon	13.76 %
Colon	12.81 %	Útero	9.29 %
Vejiga urinaria	10.63 %	Ovario	4.22 %
Cavidad oral y faringe	5.77 %	Estómago	4.21 %
Estómago	4.81 %	Linfoma no Hodgkin	4.06 %
Laringe	3.91 %	Pulmón	3.09 %
Linfoma no Hodgkin	3.04 %	Melanoma de piel	2.75 %
Hígado	2.75 %	Vejiga urinaria	2.72 %
Riñón	2.24 %	Páncreas	2.69 %

Tabla 1. Incidencia del cáncer en España en hombres y mujeres.

Mortalidad por cáncer en España			
Hombres		Mujeres	
Pulmón	27.10 %	Mama	16.49 %
Colon	11.63 %	Colon	15.09 %
Próstata	9.41 %	Estómago	6.48 %
Estómago	6.11 %	Pulmón	6.05 %
Vejiga	5.81 %	Páncreas	5.68 %
Páncreas	3.84 %	Útero	5.08 %
Cavidad oral y faringe	3.04 %	Leucemia	3.69 %
Laringe	2.79 %	Linfoma no Hodgkin	3.25 %
Leucemia	2.79 %	Sistema nervioso central	3.01 %
Esófago	2.61 %	Vesícula biliar	2.46 %

Tabla 2. Mortalidad por cáncer en España en hombres y mujeres.

A nivel internacional y según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común en hombres (663.000 casos al año) y el segundo en mujeres (571.000 casos al año), siendo la cuarta causa más frecuente de muerte por cáncer con 608.000 defunciones/año. Este ratio es más elevado en hombres que en mujeres. La previsión de la OMS indica que cada año el número de personas diagnosticadas de CCR será más elevado, siendo esta la causa de defunción en aproximadamente la mitad de los pacientes (Figura 3 y Tabla 3).

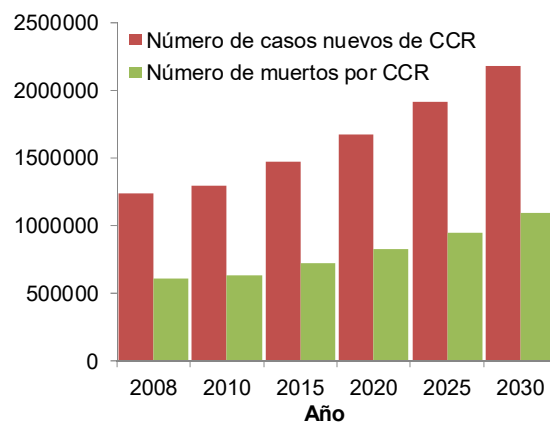


Figura 3. Evolución global de la incidencia y mortalidad del CCR según la OMS. Previsión de datos hasta el año 2030

Año	Nº de casos nuevos de CCR	Nº muertes por CCR
2008	1235108	609051
2010	1293629	638018
2015	1471808	726028
2020	1676442	826846
2025	1916051	951158
2030	2179711	1093700

Tabla 3. Evolución global de la incidencia y mortalidad del CCR según la OMS. Previsión de datos hasta el año 2030

La mayoría de los casos de cáncer colorrectal se diagnostican entre los 65 y los 75 años, aunque se registran casos desde los 35-40 años. Los casos que aparecen a edades tempranas suelen tener una predisposición genética [Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)]. En general, el riesgo de cáncer colorrectal durante la vida es aproximadamente del 5%. El riesgo es ligeramente menor en las mujeres que en los hombres.

La tasa de mortalidad debida a cáncer colorrectal ha disminuido tanto en hombres como en mujeres en los últimos años, probablemente debido a su detección precoz mediante distintas pruebas acompañado de un tratamiento quirúrgico radical. El tratamiento quimioterapéutico del cáncer colorrectal avanzado también se ha beneficiado del desarrollo de nuevos fármacos, especialmente de los de carácter biológico, aunque son estos estadios tumoral los que necesitan el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces que mejoren el pronóstico de estos pacientes [American Cancer Society (ACS)].

### 1.1.2. ETIOLOGÍA

No hay una causa única para el cáncer de colon. Generalmente comienza como pólipos no cancerosos (benignos), que lentamente se van convirtiendo en cáncer. Además, existen enfermedades premalignas que predisponen al cáncer de colon, como la poliposis colónica, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn [Babbs, 1990; Willet, 1989].

Su epidemiología se atribuye a factores genéticos asociados a factores ambientales de gran influencia en esta patología.

**Factores ambientales**

a) Consumo de alcohol

Se ha demostrado mediante experimentación animal, que el consumo de alcohol no es un carcinógeno en si, pero potencia el efecto de sustancias carcinógenas. Además, el consumo de alcohol en personas con niveles inadecuados de folato y metionina incrementa el riesgo de sufrir cáncer de colon y adenomas [Giovannucci y cols., 1995]. Por último, estudios amplios correlacionan un incremento del cáncer de colon en individuos que consumen altas cantidades de alcohol [Cho y cols., 2004].

b) Tabaquismo

Está ampliamente aceptado el papel activo que juega el tabaco en el proceso de la carcinogénesis en CCR debido a su efecto mutagénico y a que incrementa los niveles de radicales libres de oxígeno [ACS, 2013].

c) Edad

El CCR aumenta su incidencia a partir de los 50 años [ACS, 2013, El-Bolkainy y cols., 2006], motivo por el que se está potenciando su detección precoz mediante pruebas de *screening* (sangre oculta en heces) [ACS, 2013].

d) Dieta: grasa y fibra

La obesidad y el sobrepeso poblacional [ACS, 2013] adquiridos en las últimas décadas debido al sedentarismo y las dietas hipercalóricas, están asociados con un mayor riesgo de CCR [Bergström y cols., 2001, Berrino y cols., 2003].

### e) Otros componentes

Varios estudios apuntan hacia la importancia del selenio, micronutriente presente en cereales, pescado, etc., como un antioxidante que previene los procesos de carcinogénesis y que se ha asociado con una reducida prevalencia de adenomas colorrectales [Connelly-Frost y cols., 2006].

Por otra parte, el calcio y la vitamina D se han vinculado a la ruta de la  $\beta$ -catenina/E-cadherina, la cual se ve alterada en la mayoría de CCRs. Algunos autores afirman que el Mg inhibe la inflamación relacionada con la carcinogénesis en ratones, indicando su posible valor quimiopreventivo en CCR [Qu y cols., 2013], mientras que otros rechazan esta asociación [Kuno y cols., 2013].

### **Factores genéticos**

La gran mayoría de los CCRs (80%) aparecen en la población por adquisición de mutaciones espontáneas como consecuencia de los factores ambientales a los cuales nos vemos sometidos a diario. Sin embargo, el 20% de los CCRs se han relacionado con factores genéticos y el 5% del total con factores genéticos familiares (mutaciones en la línea germinal de genes supresores) (ver apartado “Base Molecular”).

### **1.1.3. DETECCIÓN Y ESTADIAJE**

Las pruebas utilizadas en la detección del cáncer de colon y recto son:

☞ Examen físico: examen del cuerpo para revisar los signos generales de salud, y verificar si hay signos de enfermedad, como masas o cualquier otra cosa que parezca anormal.

☞ Antecedentes familiares: se evalúan los antecedentes médicos familiares de las 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 la materia fecal: para verificar la presencia de sangre en las heces (residuos sólidos), que solo se puede ver al microscopio.

☞ Tacto rectal: exploración digital del ano y parte del recto, buscando posibles alteraciones existentes en las paredes del recto.

☞ Radiografía: exámen de rayos X del intestino grueso. 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. Se introduce un sigmoidoscopio que puede tener una herramienta para extraer pólipos o muestras de tejido, lo cuales se observan al microscopio para verificar si hay signos de cáncer.

☞ Colonoscopia: es una prueba con la que se puede observar la mucosa de todo el colon y el recto a través de un endoscopio que se introduce por el ano permitiendo visualizar cualquier patología existente.

☞ Biopsia: si se observa una lesión sospechosa durante la realización de la colonoscopia, se procederá a extraer una pequeña muestra.

Para poder determinar el tratamiento más adecuado que aseguren el control adecuado del tumor con la mejor calidad de vida posible es importante clasificar el tumor, es decir, determinar en qué estadio o fase se encuentra. Para ello, una vez que se ha diagnosticado el cáncer de colon, 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 afecta a esa porción del tubo digestivo. Las pruebas que suelen realizarse son:

☞ Tomografía computarizada (TAC): procedimiento mediante el cual se toman imágenes del interior del cuerpo desde ángulos diferentes. Se inyecta un tinte en una vena o se ingiere, y se crean las imágenes en un ordenador conectado a una máquina de rayos X.

☞ Imágenes por resonancia magnética (IRM): procedimiento en el cual 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 de áreas internas del colon.

☞ Tomografía por emisión de positrones (TEP): procedimiento en el cual se administra una pequeña cantidad de glucosa radiactiva a través de una inyección intravenosa con el fin de medir la actividad metabólica del organismo. El explorador TEP rota alrededor del cuerpo y toma una imagen de los lugares que absorben la glucosa. Las células de tumores malignos tienen un aspecto más brillante en la imagen porque son más activas y absorben más glucosa que las células normales.

☞ Radiografía: técnica utilizada en la detección.

☞ Ecografía: técnica que se basa en emitir ultrasonidos, que rebotan al chocar con las diferentes estructuras a las que llegan y, a través de un ordenador forman una



imagen que se visualiza en una pantalla. En el cáncer colorrectal se pueden realizar una ecografía abdominal para valorar el estado del hígado, o una ecografía endorrectal cuando las lesiones están a nivel del recto, introduciendo una sonda a través del ano. Permite visualizar el tamaño, la afectación en profundidad y la posible extensión del tumor a otros órganos próximos.

✎ Cirugía: procedimiento para extirpar el tumor y determinar a qué distancia se diseminó por el colon.

✎ Biopsia de ganglios linfáticos: extracción de todo un ganglio linfático o una parte de este y posterior observación al microscopio para determinar si hay células cancerosas.

✎ Hemograma o recuento sanguíneo completo (RSC): procedimiento por el cual se toma una muestra de sangre para verificar la cantidad de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, hemoglobina y hematocrito (porcentaje del volumen total de sangre compuesta por glóbulos rojos).

✎ Marcadores tumorales: sustancias que aparecen en cantidades superiores a lo normal en el torrente sanguíneo de los pacientes que padecen algún tipo de cáncer. Los marcadores 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 ACE se libera en el torrente sanguíneo tanto por las células cancerosas como por las células normales, pero cuando se encuentra en cantidades más altas de lo normal, puede ser un signo de cáncer de colon u otras afecciones. El CA 19-9 es una glucoproteína producida por las células tumorales y liberadas a la circulación sanguínea. Y por último, el mSEPT9 se encuentra en más del 90% de los tumores de colon, pasando a la sangre en forma de ADN libre, indicando su presencia la posibilidad de que exista una neoformación relacionada con cáncer de colon. Este marcador se encuentra en otro tipo de tumores con muy

poca frecuencia. Se emplean como pruebas que ayudan al seguimiento del tumor tras los tratamientos y para detectar recidivas, pero no son válidas 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:

☞ Tejido: el cáncer se disemina desde donde comenzó y se extiende hacia las áreas cercanas.

☞ Sistema linfático: el cáncer se disemina desde donde comenzó 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 se disemina desde donde comenzó y entra en la sangre, desplazándose a través de los vasos sanguíneos a otras partes del cuerpo. Forma un tumor (tumor metastásico) en otra parte del cuerpo.

El tumor metastásico es el mismo tipo de cáncer que el tumor primario.

Existen dos sistemas de clasificación que se utilizan con igual frecuencia en el cáncer de colon y recto: la clasificación TNM y la de Astler y Coller [Astler y Coller, 1954]. Nos centramos en la clasificación TNM por ser más completa.

Las siglas TNM hacen referencia a tres aspectos del cáncer. La T se refiere al nivel de extensión del tumor primario en las paredes del intestino (Tis, T1, T2, T3 y T4), 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, N1 y N2) y la M se refiere a la presencia confirmada de metástasis a distancia (M0 y M1). Es en la clasificación en la

que nos centraremos para abordar las distintas etapas del cáncer de colon [American Joint Committee on Cancer] (Figura 4):

☞ Estadio 0 o carcinoma in situ: es la fase más temprana del cáncer de colon o recto. Se encuentran células anormales en la parte más superficial de la mucosa de la pared del colon que pueden volverse cancerosas y diseminarse. En ningún caso la traspasa. No afecta a ganglios linfáticos.

☞ Estadio I: el tumor afecta a la submucosa sin traspasar la capa muscular. No existe afectación de ganglios linfáticos.

☞ Estadio II: el tumor ha infiltrado todas las capas de la pared del colon o recto. Puede invadir los órganos de alrededor. No se aprecia afectación ganglionar. Se divide a su vez en tres etapas: IIA (el cáncer se disemina a través de la capa muscular de la pared del colon a la serosa), IIB (el cáncer atraviesa la serosa de la pared del colon, pero no se disemina a órganos cercanos) y IIC (el cáncer se disemina a través de la serosa a órganos cercanos).

☞ Estadio III: el cáncer ha invadido los órganos más próximos y afecta a los ganglios linfáticos. Se divide en estadio IIIA (el cáncer se ha diseminado hasta las capas intermedias y se ha diseminado hasta tres ganglios linfáticos), IIIB (el cáncer se ha diseminado hasta tres ganglios linfáticos cercanos y se ha diseminado más allá de las capas de tejido del colon o; a los tejidos cercanos alrededor del colon o el recto; o más allá de la pared del colon hasta órganos cercanos o a través del peritoneo) y IIIC (el cáncer se ha diseminado hasta cuatro o más ganglios linfáticos circundantes y se ha diseminado hasta las capas de tejido de la pared del colon o más allá del mismo; o hasta los tejidos cercanos alrededor del colon o el recto; o hasta los órganos cercanos o a través del peritoneo).

➤ **Estadio IV:** el cáncer se ha diseminado afectando a órganos alejados del colon o recto como hígado, pulmón o huesos. Se divide en estadio IVA (el cáncer se ha diseminado a un órgano que no está cerca 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).

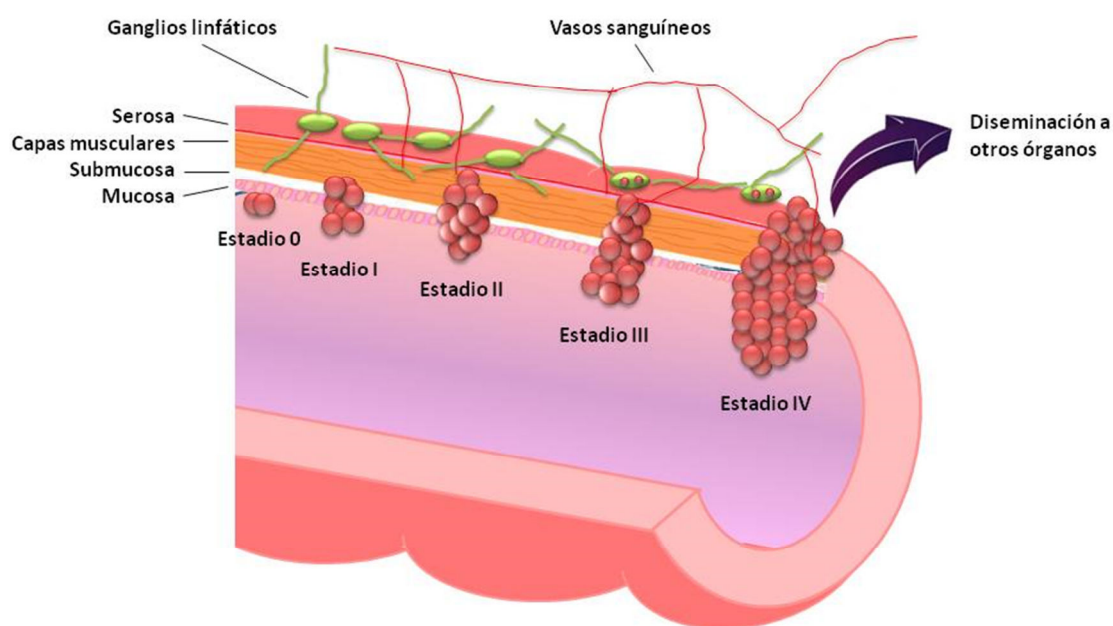


Figura 4. Imagen de las distintas etapas del cáncer colorrectal.

### 1.1.4. BASE MOLECULAR

El cáncer colorrectal puede presentarse de forma esporádica o tener un carácter hereditario. La forma esporádica es la mayoritaria, sin ningún factor familiar o hereditario asociado. La forma hereditaria, dependiendo de los factores afectados puede clasificarse en cáncer colorrectal hereditario no polipoideo (HNPCC) o síndrome de Lynch y poliposis adenomatosa familiar (FAP) [Burt, 2000].

El cáncer colorrectal implica una cascada de fallos genéticos que afectan a genes reparadores del ADN, a oncogenes y a genes supresores de tumores. Vogelstein propuso un modelo que comienza en la displasia del epitelio previamente normal, 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 edad avanzada [Kheirelseid y cols., 2013; Leslie y cols., 2002] (Figura 5):

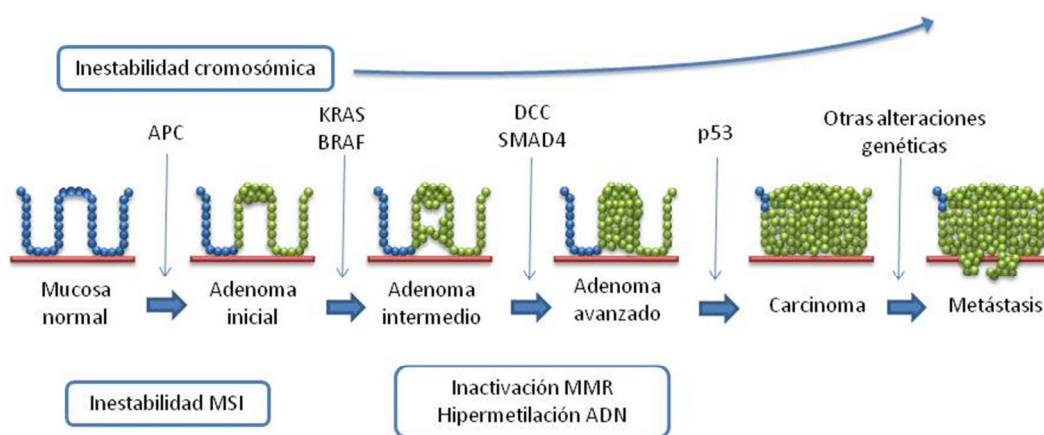


Figura 5. Cascada de mutaciones del cáncer de colon.

La primera mutación en el epitelio normal es la delección de un fragmento del brazo largo del cromosoma 5 que incluye el gen APC (*Adenomatous Poliposis Coli*). La proteína APC regula el crecimiento normal de las células de colon. Una mutación en esta proteína induce la expresión génica que implica la proliferación celular dando lugar a adenomas pequeños (<1 cm). 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, mayores de 1 cm, aparece hasta en un 50% de casos una mutación en el gen KRAS (Kirsten retrovirus associated sequence). La mutación en este gen 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 (Figura 5).

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 (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 (avian myelocytomatosis virus) confieren malignidad. Por tanto, el comportamiento clínico del cáncer colorectal resulta de interacciones a muchos niveles.

La mayoría de los casos de cáncer colorectal esporádico se deben a la inestabilidad cromosómica mediante cambios en el número de copias y en la estructura de los cromosomas.

### **Inestabilidad genómica**

#### a) Defecto de genes reparadores

Los genes involucrados en la reparación de errores de apareamiento (*mismatch repair* - MMR) 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).

El HNPCC supone el 5-10% de todos los casos de carcinoma colorrectal, en el cual se observan defectos en la línea germinal en MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 y PMS2. El 50% de estos casos tienen mutaciones en estos genes y las mutaciones están localizadas mayoritariamente en los genes MLH1 y MSH2; el resto de las mutaciones

representan el 1% del total de las mutaciones encontradas. 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. Tiene un patrón hereditario autosómico dominante. Para el desarrollo tumoral es preciso además de la mutación germinal una segunda mutación somática, del tipo de inestabilidad de microsatélites (MSI), que conduce a la inactivación de genes implicados en el control del crecimiento tumoral como TGF- $\beta$ , de la apoptosis como la proteína X asociada a Bcl-2 (BAX – BCL2-associated X protein) o los genes reparadores.

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 cáncer colorectal del 100% a los 60 años [Järvinen y cols. 2000].

### b) Inestabilidad de microsatélites

Expansión o contracción de secuencias cortas repetidas de ADN, debido a inserción o delección de nucleótidos repetidos (adenina, citosina).

La MSI es una característica de los tumores de pacientes con HNPCC, y su presencia sugiere un defecto en los genes MMR [De Jong y cols., 2004]. También es causante del 15% de los cánceres esporádicos, habitualmente por hipermetilación bialélica y consiguiente silenciamiento de la región promotora del gen MLH1 a nivel somático. Se asocian con edad elevada y sexo femenino. Su comportamiento clínico es menos agresivo.

### c) Metilación aberrante de ADN

Las ADN metilasas añaden un grupo metilo a la citosina en su carbono 5 con lo que define una quinta base de ADN, la 5-metilcitosina. En tejidos normales, la metilación

ocurre en regiones fuera de los exones, pero en el cáncer colorectal es frecuente en las islas CpG de ciertas regiones promotoras. En el fenotipo esporádico con inestabilidad de microsatélites, la silenciación epigenética bloquea la expresión de MLH1. 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, RarB2.

### **Inactivación de genes supresores**

#### a) APC

Como propuso Vogelstein en el 90, la mutación del APC es crítica en la carcinogénesis de colon. La proteína APC regula los niveles de  $\beta$ -catenina a través de la vía de señalización Wnt estimulando su fosforilación. Una mutación en la proteína APC hace que la fosforilación no se produzca y la  $\beta$ -catenina se acumule activando la ruta Wnt. La  $\beta$ -catenina migra al núcleo interaccionando con los factores de transcripción e induciendo la expresión génica, lo que supone un aumento de proliferación y evasión de apoptosis.

Las mutaciones en línea germinal de APC tienen lugar en etapas tempranas de la carcinogénesis estando presentes en el 80% de los adenomas y carcinomas colorectales. Además, son responsables del síndrome FAP tanto de herencia autosómica dominante como de herencia autosómica recesiva presentándose como poliposis atenuadas con alteraciones en el gen MYH (mutY homolog E.Coli) [Lamlum y cols., 1999, 2000; Powell y cols., 1992; Takahashi-Yanaga y Kahn, 2010].

Se caracteriza por la presencia de cientos, incluso miles de adenomas o pólipos adenomatosos entre la segunda y tercera década de la vida con alta tasa de



transformación maligna, de tal manera que a los 40 años todos los portadores han desarrollado un cáncer. La localización más frecuente es en el colon izquierdo, con histopatología similar a la de los esporádicos [Tinat y cols., 2008].

### b) TP53

El gen TP53 codifica para la fosfoproteína p53, que actúa como supresora del crecimiento celular provocando la parada del ciclo celular que conduce a apoptosis; se activa por múltiples mecanismos de estrés celular [Sengupta y Harris, 2005]. En la mayoría de los tumores los dos alelos de p53 se encuentran inactivados, normalmente por una mutación en uno de ellos y por delección del segundo alelo 17p [Somasundaram y El-Deiry, 2000]. La mutación de p53 junto con la pérdida de heterocigosidad (loss of heterozygosity - LOH) del alelo opuesto al alelo mutante suele coincidir con la transformación de adenomas en carcinomas [Kikuchi-Yanoshita y cols., 1992; Ohue y cols., 1994; Vogelstein y cols., 1988].

### c) TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  es una citoquina implicada en la detención del ciclo celular en el final de la fase G1 mediante la represión de c-myc (factor transcripcional mitogénico) así como la inducción de inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas (cyclin dependent kinases – cdk) [Massagué, 2000]. La cascada de señalización de TGF- $\beta$  se origina por la unión a uno de sus tres receptores. En pacientes con HNPCC se han detectado mutaciones somáticas que afectan al dominio quinasa inactivando el gen TGF $\beta$ R2 (transforming growth factor, beta receptor II) por defectos los genes reparadores de bases desapareadas (mismatch repair - MMR) o por mutaciones o delecciones que inactivan el componente SMAD4 (Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4) u otros factores de esta familia que forman parte de esta ruta. La inactivación de esta ruta coincide con la transición de adenoma a displasia de alto grado o carcinoma [Markowitz y cols., 1995].

### d) Pérdidas alélicas en el cromosoma 18

En la región cromosómica 18q21 existen varios genes implicados en la carcinogénesis entre los que destacan: DCC (Deleted in Colorectal Cancer) y SMAD4 también conocido como DPC4 (Deleted in Pancreatic Cancer locus 4).

La proteína DCC es una proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Aproximadamente el 70% de los cánceres colorectales primarios presentan pérdida de heterocigosidad en la mencionada región del cromosoma 18, y este porcentaje se incrementa en cánceres avanzados. 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].

La proteína SMAD4 está implicada en la regulación de la señal de transducción TGF- $\beta$  como se ha visto en el apartado anterior [Luciakova y cols., 2001].

### e) P16

El gen p16 también se conoce como CDKN2, MTS1, INK4 $\alpha$  y CDK4I. Está implicado en la regulación del ciclo celular actuando como un gen supresor de tumores. Codifica una proteína que inactiva los complejos ciclinaquinasa 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 la función represora [Herman y cols., 1995; Lee y cols., 2004; Liggett y cols., 1998; Lind y cols., 2004].

### Activación de oncogenes

#### a) KRAS

Los oncogenes Ras (HRAS, NRAS, KRAS) codifican GTPasas localizadas en la cara interna de la membrana plasmática. Las mutaciones impiden la hidrólisis de GTP a GDP, lo que conlleva una permanente activación de la proteína que envía de forma continua señales a BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B). Esto supone la activación de la ruta de señalización de la proteína quinasa mitógeno activada (MAPK- Mitogen Activated Protein Kinases), resultando en la proliferación celular y evasión de apoptosis de las células cancerígenas.

Las mutaciones de KRAS aparecen en un 37% de los carcinomas de colon. En adenomas grandes, mayores de 1 cm, aparece hasta en un 58% de los casos mutaciones en el gen KRAS [Vogelstein, 1988] que ocurren a continuación de las mutaciones de APC y están asociadas a lesiones adenomatosas avanzadas [Powell y cols., 1992; Tsao y Shibata, 1994]. Alteraciones de KRAS parecen estimular la formación del adenocarcinoma temprano en la secuencia adenoma-carcinoma mediando en el crecimiento del adenoma.

#### b) BRAF

La mutación que se produce con mayor frecuencia en el gen BRAF es la que afecta al dominio quinasa, lo que se traduce en una proteína 10 veces más activa que la normal, implicando una mayor activación de la ruta MAPK, con los resultados descritos en el apartado anterior.

La mutación se encuentra en un 12-15% de los cánceres colorrectales esporádicos, así como en lesiones premalignas como los adenomas, pólipos hiperplásicos y primeras etapas de desarrollo de cáncer colorrectal. Aparecen en pólipos más pequeños que las

KRAS, y se asocian al síndrome de poliposis hiperplásica con un riesgo elevado de desarrollar cáncer colorrectal. En ausencia de antecedentes familiares, las mutaciones se asocian a inestabilidad de MSI [Rajagopalan y cols., 2002; Samowitz y cols., 2005]

### c) PI3K

La vía de señalización del fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) es crucial en numerosos aspectos celulares involucrados en el crecimiento y la supervivencia celular. Un tercio de los cánceres colorrectales portan mutaciones somáticas en esta ruta [Hiles y cols., 1992]. En un 8-10% de los tumores colorectales se detectan mutaciones activadoras de la tirosina quinasa en ausencia de adhesión a sustrato [Samuels y cols., 2004]

PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) es una proteína que regula la señal de supervivencia celular inhibiendo la ruta PI3K [Zhou y cols., 2003]. La pérdida de función de PTEN debida a la metilación de su promotor, resulta en la estimulación de la ruta [Goel y cols., 2004].

### 1.1.5. TRATAMIENTO

El objetivo último de la terapia anticancerosa es la eliminación completa de toda célula cancerosa mediante métodos quirúrgicos, radioterapéuticos o farmacológicos. Si no es posible la erradicación por motivos diversos, el objetivo de la terapia es paliativo: reducir el tamaño o el número de células, aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia con una calidad de vida aceptable.

☞ Cirugía: la extirpación del cáncer en una operación es el tratamiento más común para todos los estadios de cáncer de colon. Incluso si el médico extirpa todo el cáncer visible en el momento de la cirugía, el paciente se puede someter a quimioterapia o radioterapia después para destruir toda célula cancerosa que

haya quedado. El tratamiento administrado después de la cirugía para disminuir el riesgo de reincidencia se denomina terapia adyuvante.

☞ Ablación por radiofrecuencia: es en el uso de un catéter especial con electrodos pequeños que destruyen células cancerosas.

☞ Criocirugía: se congela y destruye el tejido anormal.

☞ Quimioterapia: uso de medicamentos para interrumpir el crecimiento de células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación. Por vía intravenosa u oral los medicamentos alcanzan el torrente sanguíneo y pueden llegar a las células cancerosas de todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se coloca 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 administración de la quimioterapia: i) Quimioterapia de inducción: en una situación de enfermedad avanzada, el objetivo es conseguir su remisión, con una intención curativa o meramente paliativa; ii) Quimioterapia adyuvante: se realiza después de efectuar un tratamiento locorregional quirúrgico o radiológico. Su objetivo es eliminar la enfermedad residual micrometastásica; iii) Quimioterapia neoadyuvante: se emplea como tratamiento primario del tumor en estadio clínico locorregional antes de cirugía, en asociación o no con radioterapia concomitante; iv) Quimioterapia regional: se realiza por vía intraarterial, intraperitoneal o intratecal, para aumentar la concentración del fármaco en un lugar determinado.

☞ Radioterapia: uso de rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir que crezcan. Puede administrarse radioterapia externa mediante el uso de una máquina fuera del cuerpo que envía

la radiación hacia el cáncer; o bien radioterapia interna en la cual se utiliza una sustancia radiactiva sellada en agujas, semillas, cables o catéteres, que se coloca directamente en el cáncer o cerca del mismo. La forma de administración de la radioterapia depende del tipo y del estadio del cáncer que se está tratando.

☞ Terapia dirigida: se utilizan medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar células cancerosas específicas sin dañar las células normales. Para el tratamiento del cáncer de colon se utilizan anticuerpos monoclonales, los cuales se producen en el laboratorio a partir de un tipo único de células del sistema inmunitario. Estos anticuerpos pueden identificar sustancias en las células cancerosas o sustancias normales en el cuerpo que pueden ayudar a la formación de células cancerosas. Se adhieren a las sustancias y destruyen las células cancerosas, bloquean su crecimiento o impiden que se diseminen. Se administran por infusión. Se pueden utilizar solos o para llevar medicamentos, toxinas o material radiactivo directamente a las células cancerosas.

También se usan inhibidores de la angiogénesis, los cuales detienen la formación de nuevos vasos sanguíneos que los tumores necesitan para crecer. Los más destacados hasta la fecha son

- Cetuximab: Cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico tipo IgG1 que se une al epidermal growth factor receptor (EGFR). Existen evidencias de que mejora el efecto de terapias como FOLFOX y FOLFIRI en CCR metastásico. La búsqueda de nuevos biomarcadores ha demostrado que mutaciones en KRAS, BRAF, NRAS y PIK3CA afectan directamente la respuesta al tratamiento. Esto es debido a que KRAS es una proteína citoplasmática que se une a GTP. Esta unión promueve el retraso de la señalización celular de proliferación e inhibe la apoptosis actuando como un oncogén. Las mutaciones en 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 como muestra la Figura 6. Por esta razón, las terapias con cetuximab, que bloquean el EGFR, pasan a ser inocuas para el tumor.

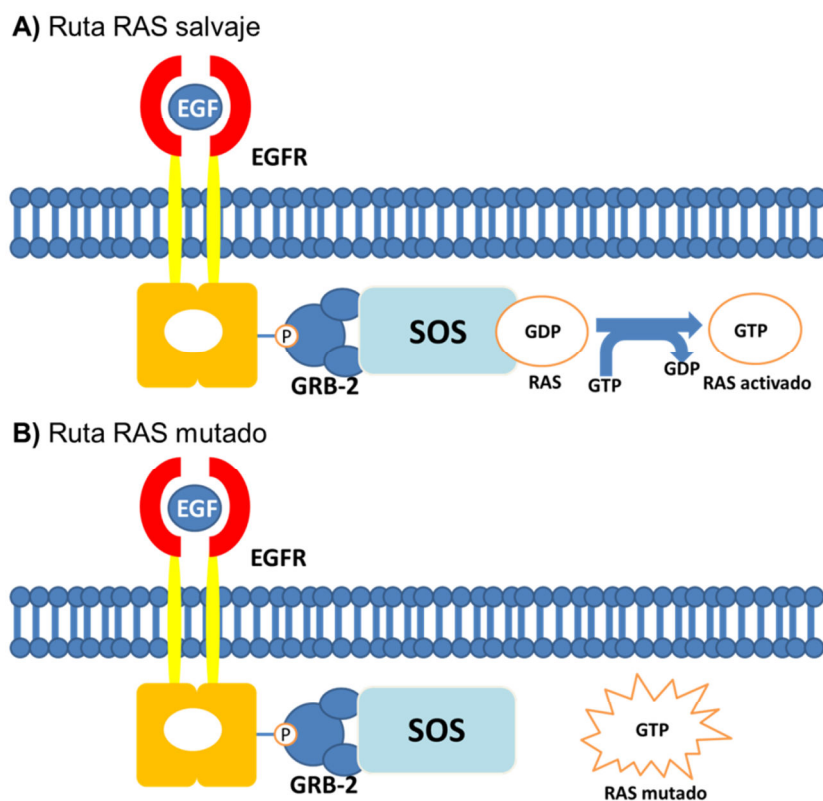


Figura 6. (A) Ruta con RAS salvaje. (B) Ruta con RAS mutado. Las mutaciones en KRAS bloquean la actividad GTPasa y promueven la conformación KRAS-GTP. De este modo, está activada de forma constitutiva la ruta RAS/RAF/MAPK que se encuentra por debajo de EGFR, dejando de depender de su ligando (EGF).

- Bevacizumab: Este anticuerpo tiene como principal función la inhibición de la angiogénesis mediante unión al vascular endothelial growth factor (VEGF).

VEGF es un elemento clave de la angiogénesis durante la embriogénesis, pero también en el crecimiento de tumores. VEGF interactúa con dos receptores con actividad tirosina quinasa, VEGFR-1 y 2.

- Ziv-aflibercept y regorafenib: Ambos fármacos han sido aprobados recientemente por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de CCR avanzado. El Ziv-aflibercept actúa uniéndose a VEGF-A, VEGF-B y placentar growth factor (PlGF) y se ha añadido a regímenes como FOLFIRI, lo que ha mejorado la respuesta al tratamiento. Por otro lado, regorafenib es un inhibidor de múltiples tirosinas quinasas incluyendo entre ellas los receptores de VEGF.

### 1.1.6. RESISTENCIA Y CANCER DE COLON: CANCER STEM CELLS

Cada vez existen más evidencias de la importancia de las *cancer stem cells* (CSCs) en el fracaso terapéutico del cáncer de colon. Estas células se han asociado a múltiples mecanismos de resistencia incluyendo la quimio [Liu y cols., 2013] y radiorresistencia [Peitzsch y cols., 2013], lo que las convierte en una población que promueve la progresión, metástasis y reaparición de la enfermedad. Considerando la carcinogénesis como una organogénesis aberrante, las CSCs conservarían propiedades de las células madre, aumentando las posibilidades de autoconservación del material genético [Boman y cols., 2008; Siddique y cols., 2012; Wang y cols., 2013]. De este modo, los principales mecanismos de resistencia asociados a esta población son:

- ☞ Resistencia a la apoptosis mediante inhibidores de las caspasas o moléculas antiapoptóticas como la survivina [Shen y cols., 2012] y livina [Ding y cols., 2013].
- ☞ MDR o multidrug resistance [Ling, 1997] asociada con las proteínas como P-glicoproteína (P-gp), BCRP, MRP1 y MRP3 [Pawłowski y cols., 2013], entre otras,



que pertenecen a la familia ABC [Liu y cols., 2013]. Estas 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 [Nyskohus y cols., 2013] o el sistema MMR [Haghighi y cols., 2014].

En base a esto, las CSC se han convertido en uno de los principales objetivos de las nuevas estrategias terapéuticas.

## **1.2. ESTRATEGIAS PARA EL TRANSPORTE SELECTIVO DE FÁRMACOS AL LUGAR DE ACCIÓN**

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

Además, las células tumorales presentan diferencias en cuanto a la fase del ciclo celular en que se encuentran; mientras unas están en fases de elevado crecimiento o proliferación otras pueden estar en fase de reposo. Generalmente muchas neoplasias se diagnostican en etapas de crecimiento desacelerado, debido a problemas de vascularización, competencia entre células para conseguir elementos nutritivos, problemas de espacio, etc. Puesto que muchos de los antitumorales son más eficaces frente a células en división rápida, podría decirse que, en principio, gran parte de la población celular tumoral puede ser resistente al agente antineoplásico. En estas

circunstancias, una reducción inicial del número de células (por métodos quirúrgicos, radioterapia y acción de fármacos que actúen con independencia de la fase del ciclo celular) puede modificar el equilibrio intratumoral y estimular a las células que se dividían lentamente para que lo hagan con más rapidez, convirtiéndose en células más sensibles a los fármacos que actúan en las fases de crecimiento rápido.

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

De todo esto deducimos que el tratamiento farmacológico de un tumor rara vez va a responder a un único agente. Si se quiere que su actividad terapéutica se prolongue en el tiempo será necesaria la acción conjunta de varios fármacos, unas veces podrá hacerse al mismo tiempo pero a menudo se hará en fases o de forma sucesiva según las modificaciones bioquímicas y cinéticas que sufran las células tumorales. De hecho, la eficacia de la terapia anticancerosa 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 una población tumoral; *ii)* además, han de actuar por mecanismos bioquímicos diferentes o en fases celulares distintas; *iii)* estas moléculas han de poseer toxicidad orgánica diferente o manifestarse con una secuencia temporal distinta; *iv)* el efecto óptimo se alcanzará cuando sus actividades respectivas se sumen, pero es preferible que presenten sinergia o potenciación.

Para que un fármaco antineoplásico actúe eficientemente es condición indispensable que pueda acceder en concentración suficiente a todas las células sensibles a él. Es por esto que este trabajo de investigación podría aportar una

solución a este problema al centrarse en el estudio de un sistema transportador específico y selectivo de la dosis de fármaco antitumoral hasta llegar al lugar de acción.

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

☞ Antimetabolitos: antagonistas del folato (metotrexato), análogos pirimidínicos (gemcitabina), análogos púricos (6-mercaptopurina).

☞ Antibióticos: actinomicina D, antraciclinas (doxorrubicina y daunorrubicina), bleomicina, mitomicina C.

☞ Agentes alquilantes: mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida, estramustina, melfalán), nitrosoureas (carmustina, lomustina).

☞ Inhibidores de los microtúbulos: alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina), taxanos (paclitaxel o taxol).

☞ Hormonas esteroideas y sus antagonistas (cortisol o megestrol).

Para dar solución a los problemas de la ineficacia de los fármacos en la masa tumoral, se han asociado antitumorales con sistemas coloidales para el tratamiento del cáncer [Arias, 2011; Reddy, 2005], lo que pretende aumentar la acumulación específica del fármaco en la zona tumoral e incrementar el tiempo de exposición de las células cancerosas a estos principios activos. Otros beneficios asociados son la mejora de su perfil farmacocinético y la disminución de la toxicidad asociada a éstos por inespecificidad de acción, pudiendo lograr una protección adecuada de estas moléculas *in vitro* (en almacenamiento) e *in vivo* (frente a fenómenos de biodegradación), lo que reducirá la formación de productos de degradación potencialmente tóxicos [Arias, 2008; Davis y cols., 2008]. Es por ello que se están concentrando numerosos esfuerzos en el desarrollo de coloides, basados principalmente en sistemas vesiculares (liposomas y niosomas) o polímeros, para

conseguir el transporte eficaz de cualquier antitumoral a la zona diana [Arias, 2011a; Cho y cols., 2008]. Sin embargo, recientes investigaciones han probado que esta simple asociación no siempre resulta suficiente para lograr dirigir específicamente un fármaco a cualquier zona del organismo, más allá de los órganos pertenecientes al sistema retículo-endotelial [Couvreur y Vauthier, 2006; Reddy, 2005].

### 1.2.1 ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE PASIVO DE FÁRMACOS

El transporte pasivo es el intercambio simple de moléculas a través de la membrana plasmática. La célula no gasta energía, ya que se produce a favor del gradiente de concentración o a favor de gradiente de carga eléctrica.

La administración de un sistema coloidal provoca una intensa interacción con el SRE, dando lugar a su retirada de la circulación sanguínea a una velocidad dependiente de su tamaño y características superficiales (carga e hidrofobicidad). Los órganos del SRE son generalmente desfavorables para la acción de los antitumorales, pudiendo provocar reacciones de citotoxicidad severa [Moghimi y cols., 2001]. El perfil de seguridad de un fármaco vehiculizado en un coloide suele ser mucho mayor que el correspondiente a su administración en solución intravenosa [Blagoeva y cols., 1992].

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

Con el fin de lograr la acumulación específica en el tumor, puede controlarse el destino biológico de los sistemas coloidales ajustando su tamaño, que debe ser lo suficientemente grande para que no haya extravasación en capilares sanos, pero lo suficientemente pequeño para que escape del SRE, permitiendo así la llegada del coloide al tejido tumoral. Y por otro lado, ajustando las características superficiales del coloide ya que cualquier transportador de principio activo debe tener una superficie lo más hidrófila posible para retrasar el reconocimiento por el SRE mediante procesos de opsonización [Maeda y cols., 2009; Mitra y cols., 2001], con la consecuente captura por los macrófagos. Esto se consigue mediante [Cho y cols., 2008; Couvreur y Vauthier, 2006; Patil y cols., 2009a] el recubrimiento de la superficie del coloide hidrófobo con un polímero hidrófilo, (principalmente polietilenglicol, PEG), con el diseño de un sistema transportador constituido por copolímeros con dominios hidrófilos e hidrófobos.

Los sistemas transportadores que poseen ambas propiedades (tamaño nanométrico e hidrofilia), presentan un elevado valor de  $t_{1/2}$ , lo que les permite sufrir un proceso de extravasación selectivo o específico en zonas del organismo alteradas por una inflamación, una infección o un fenómeno de crecimiento tumoral. Esto permitirá dirigir el fármaco directamente a los tumores localizados fuera de las regiones del SRE, fenómeno conocido como efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR), y se basa, en el caso del cáncer, en la mayor permeabilidad de los capilares sanguíneos que irrigan el tumor, consecuencia de un crecimiento acelerado y defectuoso (Figura 7) [Cho y cols., 2008; Decuzzi y cols., 2009; Maeda y cols., 2009; Moghimi y cols., 2001; Rapoport, 2007].

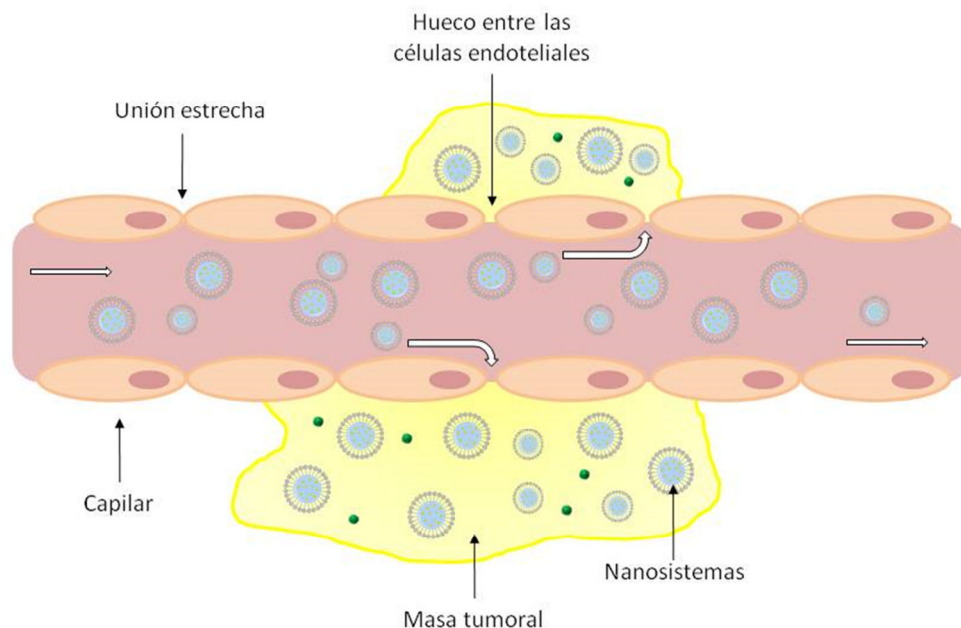


Figura 7. Esquema del efecto incrementado de permeabilidad y retención (Efecto EPR), donde se observa que el nanosistema sólo abandona la circulación sanguínea cuando alcanza la zona vascular alterada a través de los defectos existentes en la microvasculatura tumoral.

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

Los defectos en la anatomía y las anomalías funcionales provocan una mayor permeabilidad de los capilares frente a los componentes del plasma y coloides hacia el tejido tumoral. Además, el lento retomo venoso y el pobre aclaramiento linfático

favorecen que las macromoléculas queden retenidas en el tumor durante un prolongado periodo de tiempo. De esta manera, pueden alcanzarse concentraciones locales de fármaco muy superiores. Este fenómeno se está usando para el diseño de nanopartículas poliméricas liposomales como sistemas transportadores de fármacos anticancerosos [Iyer y cols., 2006; Lee y cols., 2006].

Cabe afirmar por tanto que los sistemas transportadores de fármacos, con una superficie recubierta de cadenas hidrófilas presentarán una marcada acumulación en la zona tumoral. Estas cadenas se disponen por adsorción física o conjugación química en la superficie de las partículas y son capaces de repeler las opsoninas, retrasando el proceso de opsonización [Cho y cols., 2008; Decuzzi y cols., 2009; Moghimi y Szebeni, 2003; Park, 2002; Shenoy y Amiji, 2005].

La incorporación de restos de cadenas de PEG-2000 en la superficie de nanopartículas lipídicas sólidas cargadas con doxorrubicina (diámetro  $\approx$  100 nm) permite incrementar notablemente la  $t_{1/2}$  del antitumoral, en comparación con este fármaco administrado libre y su vehiculización en nanopartículas que carecen de PEG-2000 en su superficie [Zara y cols., 2002]. El incremento de la  $t_{1/2}$  también puede lograrse mediante el uso de fosfolípidos sintéticos (conjugados con gangliósidos) [Huwylar y cols., 2008]. Los liposomas que presentan cadenas de PEG en su superficie tienen un aclaramiento plasmático significativamente inferior a los convencionales (0.1 L/h frente a 22 L/h), una mayor área bajo la curva, casi 100 veces más, y, debido a su escasa interacción con tejidos sanos tras su administración sistémica, un volumen de distribución 50 veces menor (de 200 L a 4.5 L) [Allen, 1994]. Esta estrategia de transporte de fármacos ha permitido incluso optimizar claramente la biodistribución y las propiedades farmacocinéticas de la doxorrubicina en pacientes con gliomas [Hau y cols., 2004].

### 1.2.2 ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE ACTIVO DE FÁRMACOS

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

☞ Elección de ligandos específicos que se expresan en las células o vasculatura tumoral y no en las células sanas, y son incorporados en la superficie de los nanotransportadores para ser captados por los receptores de las células tumorales. Los nanotransportadores permanecen durante más tiempo en la circulación sanguínea, lo que permite un transporte muy eficaz hacia el tumor, pudiendo aumentar su captación por endocitosis, aumentando así el efecto terapéutico [Iinuma y cols., 2002; Kiipotin y cols., 2006; Lopes de Menezes y cols., 1998].

☞ Diseño de nanopartículas de diferente naturaleza con capacidad para responder a estímulos externos aplicados en el lugar de acción exclusivamente.

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

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

Los nanotransportadores diseñados según esta estrategia cuentan con biomoléculas en su superficie que permiten su unión a la célula diana, para posteriormente introducirse en su interior, consiguiendo de esta manera una liberación selectiva del fármaco en la región deseada [Arias, 2011a]. La unión



específica del sistema a la célula diana se logra mediante reconocimiento molecular (interacción ligando-receptor o antígeno-anticuerpo) (Figura 8) [Brigger y cols., 2002; Decuzzi y cols., 2009]. Entre estos destacan los anticuerpos monoclonales, péptidos, aptámeros, ácido fólico y transferrina.

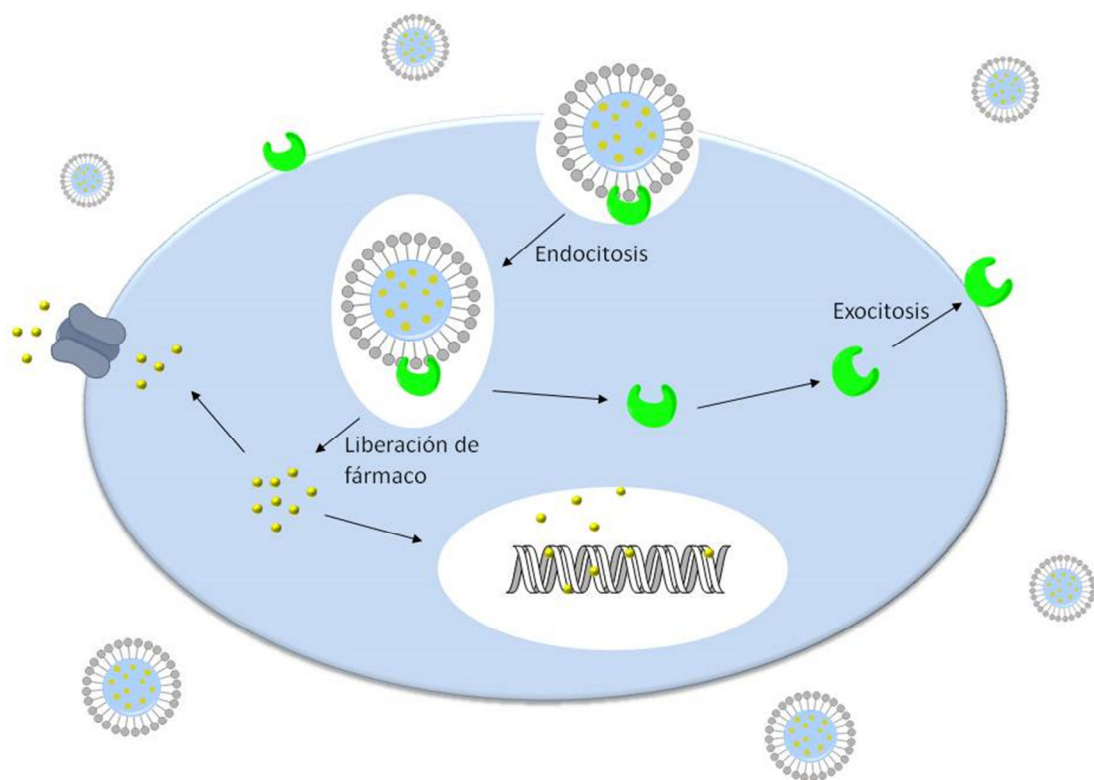


Figura 8. Internalización de nanopartículas conjugadas con ligandos o anticuerpos específicos de la célula tumoral.

a) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son moléculas diseñadas para una interacción y unión específica con antígenos y receptores de las células cancerosas [Imai y Takaoka, 2006]. Éstos se usan como vehículos específicos de agentes citotóxicos [Adams y cols., 2001; Chari y cols., 1995], dado que al unirse a las células tumorales inducen la entrada

del coloide en la célula por endocitosis mediada por ligandos, con la posterior liberación intracelular del fármaco que recupera su actividad original.

Un ejemplo característico de este tipo de estrategia son los inmunoliposomas, liposomas conjugados químicamente con anticuerpos monoclonales [Maruyama y cols., 1995; Sapa y Allen, 2003], Estudios recientes proponen la síntesis de inmunoliposomas específicos del factor de crecimiento epidérmico-2 (HER-2), presente en la superficie de muchas líneas de células tumorales. El uso de estos liposomas permite el transporte eficaz de fármacos antitumorales, mejorando la eficacia terapéutica en diferentes tipos de cáncer en comparación con los tratamientos control o de referencia (fármaco en solución y liposomas con cadenas de PEG en su superficie) [Gao y cols., 2009; Park y cols., 2001, 2002].

Otro tipo de anticuerpo monoclonal ensayado es el 8D3, específico de los receptores de transferrina que algunas células tumorales presentan en su superficie, y que se encuentra en gran cantidad a nivel de la barrera hematoencefálica. Los liposomas diseñados con este tipo de anticuerpo han sido utilizados para el transporte de plásmido de ADN capaz de silenciar la expresión del gen oncogénico que codifica la síntesis del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) [Zhang y cols., 2003].

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

### b) Péptidos

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

La clase de integrina presente en la superficie de la línea de células tumorales será la que determine el péptido a usar. Un reciente estudio ha demostrado que puede acrecentarse significativamente la actividad antitumoral de la doxorrubicina mediante su vehiculización en nanopartículas del polímero inmulina-multi-metacrilato (IMMA) cuya superficie está modificada con péptidos de secuencia arginina-glicina-ácido aspártico- D-fenilalanina-cisteína [Bibby y cols., 2005]. Otros estudios demuestran que una modificación superficial de nanopartículas de albúmina con péptidos CREKA y Lyp-1 permite obtener una mejora en la actividad anticancerosa de paclitaxel en ratones [Karmali y cols., 2009]. Por otro lado, se han diseñado liposomas con cadenas de PEG y la secuencia peptídica PR\_b a nivel superficial para transportar 5-fluorouracilo. Esta secuencia facilita la acumulación selectiva del coloide en las células de cáncer de colon, dado que imita el dominio de adhesión de la fibronectina que se une a la integrina  $\alpha_3\beta_1$  expresada por estas células. Al producirse la interacción, se produce una endocitosis de la nanopartícula y con ésta un aumento de la acción citotóxica del principio activo [Garg y cols., 2009]. El diseño de nanopartículas de ácido poliglutámico modificadas con H2009.1, una biomolécula que presenta gran afinidad por los receptores de integrinas  $\alpha_3\beta_1$ , permite transportar específicamente la doxorrubicina a las células

cancerosas que presentan este tipo de receptor en su superficie [Guan y cols., 2008], de forma que se minimizan las reacciones adversas asociadas a su administración.

Otro ejemplo es la formulación de liposomas modificados superficialmente con el péptido PH1, el cual presenta una gran especificidad de unión por las integrinas Tie2 [Mai y cols., 2009]. La vehiculización del antitumoral cisplatino en estas estructuras liposomales incrementa la actividad citotóxica del principio activo sobre las células tumorales que presentan en su superficie la biomacromolécula Tie2. Así, estos nanosistemas aumentan claramente la selectividad de la acción antitumoral de la doxorubicina, minimizando las reacciones adversas asociadas a su administración.

Esta estrategia de transporte activo ofrece también grandes posibilidades en la terapia génica contra el cáncer, donde numerosos estudios han demostrado que el uso de nanosistemas modificados superficialmente con macromoléculas peptídicas, conlleva un aumento de la eficiencia del proceso de transfección de genes, oligonucleótidos o porciones de ARN y ADN a células tumorales [Taratula y cols., 2009; Veiseh y cols., 2009]. La transfección del gen mutante RAF en células de nucleosoma (m21), mediante su vehiculización en liposomas poliméricos catiónicos modificados superficialmente con péptidos específicos de las integrinas  $\alpha_v\beta_6$  que presentan estas células cancerosas a nivel superficial, logra la inhibición de los procesos de angiogénesis que incrementan el aporte de nutrientes a la masa tumoral [Önyüksel y cols., 2009].

### c) Aptámeros

Los aptámeros son secuencias pequeñas de ácidos nucleicos, capaces de unirse selectivamente a determinados antígenos que se localizan en la superficie de las células tumorales [Sáez-Fernández y cols., 2010]. Estas biomoléculas pueden ser utilizadas como agentes antitumorales por sí mismos o acoplados a nanosistemas transportadores de fármacos para aumentar su especificidad por células cancerosas [Levy-Nissenbaum y cols., 2008; Willis y cols., 1998].

La eficacia del antitumoral docetaxel mejora significativamente al ser vehiculizado en nanopartículas de PLGA modificadas con cadenas de PEG y con el aptámero A10 2'-fluoropiridina. Este aptámero de ARN es específico del antígeno PSMA muy presente en la superficie de las células de cáncer de próstata. En este estudio se observó un incremento muy significativo de la citotoxicidad inducida en comparación con las nanopartículas que carecían de este aptámero en su superficie, además de la supervivencia de todos los ratones tratados con la formulación desarrollada [Farokhzad y cols., 2006].

### d) Acido fólico

El ácido fólico participa en la biosíntesis de las bases nucleótidas, por lo que es importante en la formación de nuevas células. Existen dos tipos de receptores de membrana para el ácido fólico (FR- $\alpha$  y FR- $\beta$ ) cuya expresión en tejidos normales es muy baja en comparación con las células cancerígenas, como consecuencia del incremento de sus necesidades de ácido fólico para la síntesis de ADN. La interacción entre las moléculas de ácido fólico y su receptor correspondiente desencadena un proceso de endocitosis que implica la acumulación citosólica de esta molécula [Lu y Low, 2002] y la degradación liposomal que permiten la liberación intracelular del fármaco transportado [Kim y cols., 2008a]

Un estudio con radiomarcadores demostró que la unión del ácido fólico en las células tumorales es 20 veces superior que en las células epiteliales normales o fibroblastos [Cho y cols., 2008]. Los liposomas recubiertos de moléculas de folato aumentan la captación de los fármacos quimioterápicos en diferentes células tumorales, de forma que aumenta su citotoxicidad [Esmaeili y cols., 2008; Gabizon y cols., 2004; Kim y cols., 2005; Pan y Lee, 2005; Shmeeda y cols., 2006], e incluso se incrementa la eficacia de esta estrategia ante fenómenos de resistencia desarrollados por las células cancerosas [Goren y cols., 2000]. Por otro lado, el uso de partículas de

modificadas con cadenas de PEG y restos de ácido fólico permite el transporte específico solventando los fenómenos de resistencia a fármacos y los problemas de toxicidad asociados al tratamiento [Kim y cols., 2008a].

Esta estrategia también se ha diseñado para aumentar la eficacia de la fototerapia y la eficiencia de las formulaciones específicas para el diagnóstico del cáncer [Lai y Lee, 2009; Low y Kularatne, 2009; Pan y Feng, 2009]. Incluso, se ha utilizado en el diseño de nanopartículas de poli(etilenimina) para la terapia génica de gliomas [Liang y cols., 2009] y en el diseño de nanopartículas de poli(alquildianoacrilato) con moléculas de folato en superficie para la mejora de actividad antitumoral de los agentes quimioterápicos en el tratamiento de gliomas [Stella y cols., 2000]. Esta estrategia ha permitido una mayor acumulación de esta molécula en la masa tumoral [Park y cols., 2005; Patil y cols., 2009b].

### e) Transferrina

La expresión de los receptores de transferrina en células tumorales puede llegar a ser hasta 100 veces mayor que en células sanas [Daniels y cols., 2006a, b; Minko, 2004]. Esto convierte a los receptores de transferrina en una posibilidad muy interesante para el tratamiento del cáncer si se diseñan nanopartículas modificadas superficialmente con transferrina [Derycke y cols., 2004] o anticuerpos monoclonales específicos de estos receptores [Hwang y cols., 2008]. La transferrina ha demostrado una actividad muy prometedora ante un tipo de mecanismo de resistencia a fármacos desarrollado por muchas células cancerosas y que está relacionado con la glicoproteína-P [Lemieux y Page, 1994]. La transferrina ha sido conjugada directamente con fármacos anticancerosos asegurando una mayor focalización de la acción de éstos [Singh y cols., 1998], y también unida a sistemas coloidales transportadores de fármacos mejora la biodistribución del fármaco transportado,

lográndose así una mayor acumulación de éste en el tumor y su liberación controlada [Pardridge, 2002; Sahoo y cols., 2004; Sahoo y Labhasetwar, 2005].

Han permitido la mejora de la fototerapia antitumoral y el diagnóstico eficaz del cáncer mediante resonancia magnética de imagen [Li y cols., 2009].

### **1.2.2.2 Estrategias basadas en el diseño de coloides sensibles a estímulos**

En los últimos tiempos se han desarrollado sistemas transportadores sensibles a señales biológicas como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, la luz o los metabolitos, con un diseño generalmente polimérico o liposomal. Su estructura se ve afectada frente a pequeñas modificaciones en el entorno fisiológico, lo que provoca su destrucción. Pueden diferenciarse estímulos generados en el interior del organismo (cambios de pH o como consecuencia de procesos patológicos, cambios de temperatura, interacción con determinados sistemas enzimáticos, etc.) o estímulos externos (gradientes magnéticos, luz, campos eléctricos, ultrasonidos, etc.).

La interacción del sistema transportador con el estímulo debe producirse solamente en la región diana, de modo que el fármaco se libere únicamente en dicha zona y consiguiendo la acumulación selectiva de éste y una menor biodistribución, con la consecuente reducción de la aparición y severidad de reacciones adversas. Además, se puede modular la duración e intensidad de la acción farmacológica [Arias 2011; Bawa y cols., 2009; Rapoport, 2007; Ulbrich y Šubr, 2004].

#### a) pH

Se usan materiales extremadamente sensibles a pequeños cambios de pH con respecto al sanguíneo, es una de las más prometedoras para el transporte de fármacos. En un organismo sano, el pH extracelular de tejidos y sangre se mantiene en torno a 7.4, mientras que en el tejido tumoral tiene un pH en torno a 6.6. Estas

variaciones de pH se deben a alteraciones del flujo sanguíneo por el descenso de la presión sanguínea en el intersticio tumoral y la consecuente hipoxia local, y por las alteraciones metabólicas que provocan acumulación de metabolitos ácidos en la zona. El sistema transportador en esta situación, encuentra un entorno ácido al que es muy sensible y se descompone liberando el principio activo vehiculizado. Cabe esperar que este tipo de nanopartículas se distribuyan extensamente por el organismo y que sólo cuando alcancen la región de pH al que son sensibles, se destruyan, controlándose así la liberación de la dosis de fármaco vehiculizado [Hilgenbrink y Low, 2005; Jeong y cols., 2003; Lo y cols., 2005].

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

Los materiales poliméricos que, generalmente, son sensibles a este pH ácido, generalmente contienen grupos carboxílicos o sulfónicos, mientras que los sensibles a pHs básicos contienen en su estructura química sales de amonio. En ambos casos, los grupos químicos son capaces de captar o ceder protones ante cambios de pH, generando cambios conformacionales en la estructura de la nanopartícula que afectan a su solubilidad o provocan el hinchamiento y posterior destrucción de ésta. Los materiales de tipo iónico más ampliamente investigados en el diseño de sistemas transportadores sensibles al pH son polímeros del ácido metacrílico, del metacrilato de dietilaminaetil, del ácido acrílico y del metacrilato de (dimetilamina) etilo [Bawa y cols., 2009; Han y cols., 2003; Na y cols., 2003; Rapoport, 2007].

En un estudio reciente se describe la utilización de polivinilpirrolidona y anhídrido dimetilmaleico para la formulación de un sistema transportador de adriamicina. Al unir ambas estructuras se consigue un sistema muy sensible a ligeros descensos en los



valores de de pH (de 7.4 a 6.6). La utilización del coloide obtenido permite un notable incremento de la actividad antitumoral de la molécula en comparación con la administración del fármaco en solución [Kamada y cols., 2004].

Los sistemas liposomales sensibles a variaciones de pH permiten un mejor transporte de fármacos a la zona diana al compararse con liposomas convencionales o liposomas de liberación prolongada [Cho y cols., 2008; Karanth y Murthy, 2007; Kim y cols., 2008b]. Estas formulaciones (tamaño de partícula ~ 150 nm) pueden modificarse superficialmente con anticuerpos monoclonales [Kim y cols., 2009].

La estructura de los inmunoliposomas sensibles a pequeñas reducciones del pH se encuentra conjugada con cadenas de N-isopropilacrilamida y con anticuerpos monoclonales anti-CD33 específicos de líneas celulares de leucemia [Simard y Leroux, 2009].

### b) Temperatura

El uso de la hipertermia local para el transporte específico de fármacos antitumorales fue propuesto en 1978 por Yatvin [Yatvin y cols., 1978]. Determinados coloides termosensibles, generalmente polímeros o hidrogeles con grupos hidrófobos, sufren un proceso de desestabilización ante ligeros cambios de temperatura, presentando una temperatura crítica de disolución que determina la liberación del fármaco transportado, al destruirse la estructura de la nanopartícula.

La hipertermia implica el calentamiento de la masa tumoral, provocando un aumento del tamaño de poro en el endotelio vascular que irriga la zona y un aumento del flujo sanguíneo a la misma, lo que permite que el sistema transportador extravase selectivamente en esa zona. A 42 °C se obtiene el efecto óptimo con esta estrategia: el tamaño de poro entre las células endoteliales que componen la pared de estos vasos sanguíneos pasa de aproximadamente 7 a 20 nm a más de 400 nm. Trata de conseguir

simultáneamente el aumento de la permeabilidad de la microvasculatura tumoral y la inducción de la liberación del agente quimioterápico por destrucción del coloide [Kong y cols., 2001]. Para ello, es muy importante definir claramente la temperatura a utilizar y el tiempo de calentamiento.

En el tratamiento del cáncer, la hipertermia ha demostrado cierta toxicidad por sí misma sobre las células cancerosas [Skitzki, y cols., 2009] ya que permite aumentar la permeabilidad de la masa tumoral, facilitando de esta manera la absorción de biomacromoléculas y coloides [Gaber y cols., 1996; Hauck y cols., 1997]. La principal limitación de la hipertermia es la focalización de su acción exclusivamente a nivel de la masa tumoral, sobre todo si se desconoce su ubicación [Kong y Dewhirst, 1999].

Para el uso de esta estrategia los sistemas transportadores deben tener una temperatura crítica de disolución en torno a 42 °C. El polímero más utilizado es la poli(N-isopropilacrilamida) ya que su temperatura crítica de disolución está muy próxima a la fisiológica, pudiendo ajustarse a  $\approx 42$  °C con la incorporación de N,N-dimetilacrilamida. Otros polímeros termosensibles son: la poli(N-(1)-1-hidroximetilpropilmetacrilamida), la poli(2-carboxi-isopropilacrilamida), la poli(N-acril-N'-alquilpiperacina), o la poli(N,N'-dietilacrilamida) [Bawa y cols., 2009; Kono, 2001; Purushotham y Ramanujan, 2009; Rapoport, 2007; Shen y cols., 2008].

Se han diseñado liposomas capaces de alterar la estructura de su membrana lipídica ante un ligero incremento de la temperatura, permitiendo la liberación del principio activo vehiculizado de forma controlada y selectiva [Kong y cols., 2000; Needham y Dewhirst, 2001], y aquellos estabilizados con cadenas de PEG provoca una mayor acumulación de principio activo en la zona tumoral, liberando más del 60 % de la dosis vehiculizada si se calienta la zona diana a 42 °C durante 30 minutos [Gaber y cols., 1996].

Los coloides magnéticos presentan importantes aplicaciones en hipertermia ya que su capacidad de respuesta a gradientes de campo electromagnético alterno facilita su acumulación en la región diana. Las nanopartículas magnéticas constituidas por un núcleo de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) recubiertas por dextrano-g-poli(N-isopropilacrilamida-N,N'dimetilacrilamida) consiguen la liberación selectiva de fármaco en el tumor. El calentamiento del material provoca la desorganización de la estructura de la nanopartícula y la consecuente liberación del agente antitumoral en la región tumoral [Steinke y cols., 2007; Zhang y Misra, 2007; Zhu y cols., 2009]. Los geles magnéticos de poli(N-sopropilacrilamida) permiten la acumulación específica y la liberación controlada de fármaco mediante hipertermia [Ang y cols., 2007].

Los óxidos de hierro superparamagnéticos pueden por sí mismos inducir la muerte de las células tumorales al generar calor en el interior del intersticio tumoral [Chan y cols., 1993; Kallumadil y cols., 2009; Tashjian y cols., 2008], Esto se produce al estar bajo un gradiente de campo electromagnético alterno de gran frecuencia ( $\approx 1$  MHz), donde los rápidos cambios de orientación del momento magnético del nanomaterial provocan un fenómeno de calentamiento, que es consecuencia de la pérdida de histéresis magnética de las nanopartículas [Gupta y Gupta, 2005; Huber, 2005; Ito y cols., 2005; Laurent y cols., 2008]. La temperatura del espacio intersticial tumoral aumenta hasta  $\approx 41 - 45$  °C, provocando daños irreversibles en las células cancerosas, lo que induce su destrucción [Glöckl y cols., 2006; Hergt y cols., 2006; Huber, 2005; Tanaka y cols., 2005].

### c) Luz

Se persigue desarrollar sistemas capaces de degradarse ante un estímulo luminoso, que se administren en cantidades definidas y de forma precisa [Bawa y cols., 2009; Bisby y cols., 2000; Rapoport, 2007; Shum y cols., 2001].

### d) Ultrasonidos

Se expone la zona tumoral a ultrasonidos, lo que permite localizar el coloide en la región y liberar totalmente la dosis de fármaco en el espacio intersticial del tumor [Rapoport y cols., 2004], Es una estrategia no invasiva dado que los ultrasonidos tienen una adecuada capacidad de penetración corporal. Al aplicar los ultrasonidos en la región tumoral se logra un aumento de la permeabilidad de los capilares sanguíneos que irrigan la zona tumoral, generándose energía térmica y consiguiendo la alteración de las membranas celulares. [Bawa y cols., 2009],

El sistema transportador llega a la masa cancerosa gracias al efecto de EPR característico de la masa cancerosa (transporte pasivo), donde es captado por las células tumorales gracias a la alteración por los ultrasonidos de la permeabilidad de la membrana celular. Además, la nanopartícula también se degrada bajo la acción de este estímulo, liberando el principio activo [Gao y cols., 2004; Schröder y cols., 2009].

### e) Enzimas

Una de las principales aplicaciones de esta estrategia es el transporte activo de fármacos antitumorales en el cáncer de colon [Bawa y cols., 2009]. La estrategia se basa en la capacidad de las enzimas presentes en la zona tumoral para liberar el fármaco vehiculizado al degradar la nanopartícula que lo contiene [Meers, 2001]. Las nanopartículas de albúmina logran transportar eficientemente el fármaco hasta la masa cancerosa, lugar donde son degradadas por la enzima 2-metaloproteasa, liberando el principio activo [Cho y cols., 2008].

Se ha propuesto también la utilización de liposomas en este tipo de estrategia de transporte activo por su susceptibilidad a la fosfolipasa A2. Esta enzima se encuentra en gran cantidad en el intersticio tumoral y es capaz de hidrolizar los lípidos de la membrana de los liposomas [Andresen y cols., 2004, 2005]. En el momento en que los

liposomas se extravasan desde la circulación sanguínea al espacio intersticial de la zona tumoral, estas enzimas las degradan y activan la liberación específica del fármaco en la región diana. Otras enzimas que han sido propuestas para esta estrategia son la fosfatasa alcalina [Davis y Szoka, 1998], la transglutaminasa [Zhang y cols., 2002] y la fosfatidilinositol-fosfolipasa C [Villar y cols., 2000].

### f) Gradientes magnéticos

La capacidad de respuesta a gradientes de campo magnético proporciona a los coloides magnéticos especificidad a la hora de transportar a los agentes quimioterápicos a su lugar de acción. Por tanto, gracias al uso de un gradiente magnético se logra el transporte del fármaco y la concentración de éste en la región diana durante el tiempo necesario para que toda la dosis sea liberada [Ciofani y cols., 2009].

En la formulación de estos sistemas se incluyen núcleos de óxido de hierro (magnetita o maghemita) en el interior de matrices poliméricas o liposomales biodegradables [Arias, 2008; Arias y cols., 2001; Durán y cols., 2008]. La nanoestructura resultante presenta la capacidad para el transporte de fármacos junto con una liberación lenta y controlable de fármaco gracias a su biodegradación. La mayoría de las investigaciones se centran en el desarrollo de nanoplataformas compuestas por núcleos magnéticos, que facilitan el transporte y la acumulación del sistema transportador en la región diana como respuesta al gradiente magnético aplicado, y un recubrimiento biodegradable polimérico o liposomal que mejora la biodegradabilidad y biocompatibilidad de la nanoplataforma, y que permite el transporte de principios activos [Durán y cols., 2008; Závířová y cols. 2009]. La principal limitación de esta estrategia consiste en definir la intensidad del gradiente magnético para controlar así la permanencia del coloide en el lugar de acción y activar

la liberación del fármaco, sobre todo cuando el lugar diana se encuentra en localizaciones muy profundas del organismo.

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

### **1.2.3. ESTRATEGIAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS A CÉLULAS TUMORALES RESISTENTES**

Uno de los obstáculos principales que limitan la eficacia de los agentes quimioterápicos es el desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia por las células cancerosas, a pesar de las altas dosis utilizadas. Para que la quimioterapia sea eficaz, es preciso que la estrategia de tratamiento sea capaz de sobreponerse a los mecanismos de resistencia de tipo celular y fisiológico característicos de la masa tumoral. No debe olvidarse que todo esto se suma a los problemas farmacocinéticos de la mayoría de los fármacos antitumorales.

La masa cancerosa se caracteriza por un flujo sanguíneo muy irregular y una alta presión hidrostática, factores que dificultan una adecuada difusión de los agentes quimioterápicos en el espacio intersticial. Además, el entorno ligeramente ácido del

intersticio tumoral dificulta la actividad de fármacos eminentemente básicos (los cuales se encontrarían ionizados, impidiéndose su extravasación desde la circulación sanguínea). En cuanto a los mecanismos de resistencia a fármacos desarrollados por las células malignas, éstos son principalmente la inhibición de los fenómenos de apoptosis celular, el aumento de los mecanismos de expulsión de fármaco desde el espacio intracelular, la reducción de la absorción celular de fármacos y el aumento en los mecanismos de reparación del ADN y de desintoxicación celular. Se puede decir que el fenotipo celular de resistencia a fármacos antitumorales es generalmente el resultado sinérgico de la combinación de diferentes mecanismos de resistencia [Brigger y cols., 2002; Gottesman y cols., 2002; Jabr-Milane y cols., 2008].

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

Para vencer los mecanismos de resistencia desarrollados por las células cancerosas se utilizan los copolímeros anfifílicos en la síntesis de nanopartículas. Estos están constituidos por un polímero hidrófilo conjugado con otro hidrófobo, y tienen la

capacidad de interactuar con la membrana celular para alterar diferentes funciones celulares. En concreto, se ha sugerido que estas micelas poliméricas son capaces de alterar la respiración mitocondrial, la síntesis de ATP, los mecanismos de expulsión de fármacos como la glicoproteína-P, la transducción de señales de apoptosis y la expresión génica [Batrakova y Kabanov, 2008]; facilitar el transporte de fármacos anticancerosos a través de la barrera hematoencefálica y de las membranas de absorción intestinales, así como activar los procesos de transcripción durante la expresión génica. El aumento de actividad antitumoral de la doxorubicina puede ser consecuencia de su capacidad para inhibir la glicoproteína-P y de mejorar la señalización proapoptótica en las células cancerosas [Sharma y cols., 2008].

Se han diseñado liposomas modificados superficialmente con moléculas de transferrina y cargados con doxorubicina y el fármaco inhibidor de la glicoproteína-P verapamilo, lo que permite incrementar la concentración de doxorubicina en el interior de células cancerosas resistentes, aumentando así la actividad antitumoral de esta molécula [Wu y cols., 2007]. Otra modificación superficial podría ser la incorporación de cadenas de PEG y biotina, para el transporte de paclitaxel y del inhibidor de tercera generación de la glicoproteína-P tariquidar, incrementando la actividad antitumoral del antineoplásico en células malignas resistentes [Patil y cols., 2009b]. Otra forma de inhibir las bombas de expulsión de fármacos antitumorales (principalmente la glicoproteína-P) es utilizando oligonucleótidos antisentido en el diseño de las nanoplataformas [Pakunlu y cols., 2006].

Los inmunoliposomas permiten dirigir de forma muy eficaz la dosis de principio activo hasta la membrana plasmática de las células cancerosas, y promoviendo la endocitosis celular de la nanopartícula [Suzuki y cols., 1997]. Se ha investigado dirigidos contra la glicoproteína-P [Mamot y cols., 2003; Matsuo y cols., 2001]. Para ello se han formulado incorporándoles superficialmente el anticuerpo monoclonal MRK-16 (específico de la glicoproteína-P), observándose que la citotoxicidad ejercida



por el agente antitumoral era muy superior a la desarrollada cuando el fármaco se vehiculizaba en liposomas sin esta modificación superficial, debido a la inhibición de la glicoproteína-P por el anticuerpo [Matsuo y cols., 2001]. La incorporación superficial de cadenas de PEG y moléculas de transferrina, incrementa marcadamente la acción antitumoral del fármaco en comparación con las mismas nanopartículas sin modificación superficial y a la obtenida con el fármaco en solución [Pulkkinen y cols., 2008]. Lo mismo ocurre cuando se incluye ceramida además de las cadenas de PEG [van Verklen y cols., 2007].

Se han desarrollado coloides sensibles a pHs ligeramente ácidos contra líneas celulares resistentes formulándose con copolímeros de poli(L-histidina)- $\beta$ -PEG-folato y poli(D,L-lactida)- $\beta$ -PEG-folato. Una vez que el coloide se fija a la superficie de la célula cancerosa mediante interacciones entre los restos de folato de su superficie y los receptores de estos ligandos localizados en la membrana celular, se produce la internalización de las micelas y su degradación en el medio ligeramente ácido intracelular (pH = 6.8). Así, los valores de viabilidad celular son mucho menores en comparación con la administración del fármaco en solución [Lee y cols., 2005].

### 1.3. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en la supervisión, el diagnóstico, la prevención, la reparación o la cura de enfermedades y tejidos dañados en sistemas biológicos [Gupta, 2011].

Con el desarrollo de la biotecnología y la farmacia, los nanotransportadores de fármacos se han aplicado extensamente en biomedicina. Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) se desarrollaron a principios de 1990, como una alternativa a sistemas de

fármacos como las emulsiones, los liposomas y las nanopartículas poliméricas. [Wissing y cols., 2004].

La actividad farmacológica de cualquier principio activo depende, ante todo, de la naturaleza de su interacción con el tejido u órgano diana. Para que el efecto farmacológico se produzca, es necesario, en primer lugar, que el fármaco llegue en cantidad suficiente a la región diana. Una adecuada formulación de la sustancia activa podría contribuir a su eficaz acumulación en el lugar de acción con una despreciable circulación sistémica. Los sistemas de liberación modificada de fármacos mejoran la farmacoterapia convencional al permitir controlar la duración del efecto farmacológico, gracias a estas formas de dosificación, el fármaco llega en mayor cantidad y velocidad a la circulación sistémica pero seguimos teniendo una biodistribución sistémica incontrolada. Ésta es la responsable de la aparición de efectos adversos en numerosos tejidos sanos, sin contar con que la concentración final alcanzada por el fármaco en la región diana puede ser tan baja que el efecto terapéutico finalmente conseguido es muy pobre o prácticamente nulo [Arias, 2008].

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

- ☞ Una pobre selectividad por los órganos y tejidos diana.
- ☞ El carácter hidrofóbico de muchos fármacos promueve su precipitación en medios acuosos.

☞ La extensa biodistribución y extravasación de algunos principios activos puede provocar daños en tejidos sanos, consecuencia de una acción inespecífica en estos.

☞ Una rápida biodegradación hace que sea necesario administrar altas dosis para lograr un efecto terapéutico adecuado, lo que incrementa la incidencia de reacciones adversas.

☞ La susceptibilidad de producir resistencias en determinados grupos de células (por ejemplo tumorales).

☞ Unas propiedades fisicoquímicas desfavorables que limiten la llegada del principio activo a tejidos diana localizados en zonas muy internas del organismo.

☞ Las características fisiológicas del tejido u órgano diana pueden condicionar una correcta llegada de las moléculas de fármaco, su extravasación desde la circulación sistémica y su distribución homogénea en la masa de células diana.

Para solventar todos estos problemas, y así mejorar la calidad de vida de los enfermos de cáncer, desde la década de 1980 numerosas investigaciones se han centrado en el desarrollo de sistemas coloidales para el transporte de fármacos [Arias, 2011; Reddy, 2005]. Se pretende con esto lograr la acumulación masiva y específica de la dosis de principio activo en el lugar de acción, junto con una minimización de los problemas de estabilidad y seguridad asociados a su uso [Couvreur y Vauthier, 2006]. Estas investigaciones se centran en la formulación de coloides de carácter vesicular (liposomas y niosomas) o polimérico, para conseguir el transporte eficaz de cualquier antitumoral a la zona diana [Arias, 2011; Cho y cols., 2008]. Aunque esta asociación no siempre resulta suficiente para dirigir el fármaco específicamente a zonas más allá del SRE [Couvreur y Vauthier, 2006; Reddy, 2005], por lo que se están desarrollando

nuevos sistemas transportadores de fármacos antitumorales mediante estrategias de transporte pasivo y activo [Arias, 2011].

El amplio estudio de los sistemas nanotransportadores en biotecnología y farmacia, ha permitido su extensa utilización en biomedicina. Su uso como transportadores de fármacos pretende reducir e incluso eliminar los efectos secundarios que producen.

Las NLS se desarrollaron a principios de 1990, como una alternativa a sistemas de fármacos como las emulsiones, liposomas y a las nanopartículas poliméricas. [Wissing y cols., 2004]

Son una clase de transportadores de fármacos relativamente nuevos. A mediados de los años 1980, Speiser desarrolló las primeras micro y nanopartículas (llamadas *nanopellets*), hechas de lípidos sólidos para la administración oral [Speiser, 1986]. Desde entonces, los lípidos han resultado ser materiales atractivos para la preparación de sistemas de administración de fármacos.

Se caracterizan por ser partículas coloidales sintetizadas con lípidos que permanecen en estado sólido a temperatura ambiente y a la temperatura corporal. Además, generalmente se reconocen como seguros (GRAS – generally recognized as safe) o poseen un estado regulador aceptado. Presentan tamaños de 50 a 500 nm, dependiendo del método y los materiales empleados para el proceso de síntesis. Gasco las introdujo a principios de los años 1990, produciéndolas mediante la dilución de una microemulsión caliente [Gasco, 1993] y por Müller y Lucks [Müller y Lucks, 1993], quienes las sintetizaron mediante un método de homogeneización a alta presión.

Su estructura consiste en un núcleo sólido lipídico que puede solubilizar fármacos lipofílicos. El núcleo se estabiliza con tensoactivos o emulsificantes. Se han incorporado

diferentes tipos de fármacos, tanto lipofílicos como hidrofílicos (Figura 9). La capacidad de incorporación o capacidad de carga de las NLS se expresa como un porcentaje relativo a la fase lipídica (matriz lipídica + fármaco). La capacidad de carga es variable y depende de algunos factores [Yuan y cols., 2009].

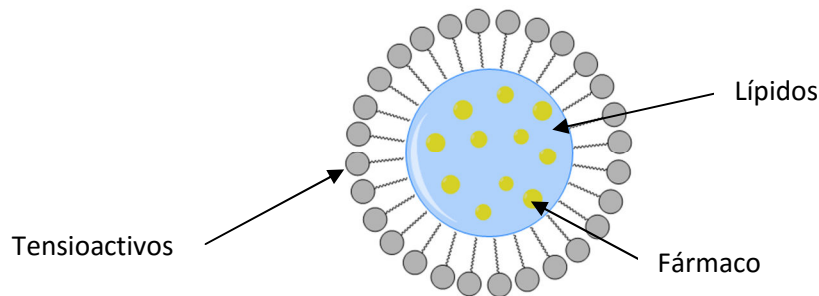


Figura 9. Representación esquemática de NLS.

Las ventajas que presentan este tipo de nanosistemas son varias, entre las que destacan que para su síntesis se utilizan lípidos fisiológicamente biodegradables, se puede evitar el uso de disolventes orgánicos, cuentan con un espectro de utilización amplio ya que se utilizan para la administración sobre la piel, por vía oral y por vía intravenosa; aumentan la biodisponibilidad de las moléculas poco solubles en agua, incrementan la penetración del fármaco a través de la piel tras la administración tópica y protegen las moléculas de fármaco que son susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua, o de la degradación en el intestino y podrían ser de liberación prolongada para sustancias activas poco solubles en agua al ser incorporadas en la matriz lipídica sólida [Fang y cols., 2008; Huo y Zhou, 2007, Mehnert y Mäder, 2001; Müller y cols., 2000; Shidhaye y cols., 2008].

Por otro lado, presentan una serie de desventajas ya que las partículas crecen durante su almacenamiento, pueden gelificar, tener cambios en sus transiciones

polimórficas y baja capacidad de incorporación de los fármacos debido a la estructura cristalina del lípido sólido (Jores y cols., 2004; Manjunath y Venkateswarlu, 2005; Parulekar y cols., 2004).

Los ingredientes que componen las NLS incluyen generalmente lípidos sólidos, tensoactivos o emulsificantes y agua. Los lípidos usados pueden ser triglicéridos, acilgliceroles, ácidos grasos, esteroides y ceras, y deben ser reconocidos como materiales seguros (GRAS) en el caso de que se utilicen con fines farmacéuticos. Los emulsificantes se utilizan para estabilizar la dispersión lipídica, la combinación de varios emulsificantes puede prevenir la aglomeración de las partículas de manera más eficiente. La elección del emulsificante depende de la ruta de administración, siendo más limitado para las administraciones parenterales (Mehnert y Mäder, 2012).

Diferentes agentes de estabilización o surfactantes confieren a los sistemas propiedades interesantes. Por ejemplo, el empleo de estabilizadores estéricos como polisorbatos o poloxámeros dificulta el anclaje de los complejos lipasa/colipasa en el tracto gastrointestinal evitándose así la degradación de la NLS [Olbrich y Müller, 1999]. El empleo de Tween 80 o el dodecilsulfato sódico (SDS) puede permitir a la nanopartícula cruzar la barrera hematoencefálica transportando así el principio activo al cerebro [Chen y cols., 2004; Kaur y cols., 2008; Lockman y cols., 2004; Müller y Keck, 2004].

Algunos ejemplos de cada uno de los componentes son (Tabla 4) [Mehnert y Mäder, 2001, 2012; Yuan y cols., 2009]:

Lípidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Triglicéridos: tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina, triestearina, glicéridos de coco hidrogenado (Softisan 142), dynasan 112, compritol 888 ATO.</li> <li>· Acilgliceroles: monoestearato de glicerol, behenato de glicerol, palmitoestearato de glicerol.</li> <li>· Ácidos grasos: ácidos esteárico, palmítico, decanóico y behénico, witepsol W 35, H 35, H 42, E 85, acidan N12</li> <li>· Ceras: palmitato de cetilo, carnauba wax, ceras de abejas, alcohol cetílico, emulsifying wax NF, colesterol, butirato de colesterol.</li> <li>· Complejos cíclicos: ciclodextrina, para-acil-calixarenos.</li> </ul>
Emulsificantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Fosfolípidos: lecitina de soja, lecitina de huevo y fosfatidilcolina.</li> <li>· Copolímeros de óxido de etileno-óxido de propileno: poloxámero 188, poloxámero 182, poloxámero 407, poloxamina 908.</li> <li>· Copolímeros de óxido de etileno y sorbitan/óxido de propileno: polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80.</li> <li>· Polímeros poliéteres de alcohol alquilarílico: tyloxapol.</li> <li>· Sales biliares: colato de sodio, glicolato de sodio, taurocolato de sodio, taurodeocolato de sodio.</li> <li>· Alcoholes: etanol, butanol.</li> <li>· Ácidos: ácido butírico, dioctil sulfosuccinato sódico, ácido fosfórico monoocil de sodio.</li> </ul>

Tabla 4. Componentes generalmente usados como lípidos o emulsificantes respectivamente en la síntesis de NLS.

Algunas limitaciones a estos sistemas transportadores son la posible expulsión del fármaco encapsulado durante el almacenamiento y la relativa baja carga de fármaco. Este fenómeno de expulsión puede ocurrir a lo largo del proceso de reestructuración dependiente del tiempo ocurrido durante el almacenaje, que cambia el modelo de cristalización del lípido en el cual, el fármaco es integrado. El paso de una red cristalina imperfecta del lípido a una estructura cristalina más perfecta, conduce a la expulsión

del fármaco [Bunjés y cols., 2007; Estella-Hermoso de Mendoza y cols., 2008; Souto y cols., 2006].

Hay que tomar en consideración los lípidos y los emulsificantes que van a componer la nanopartícula. Utilizando lípidos con mayor punto de fusión el tamaño medio de las dispersiones se incrementa [Siekman y Westesen, 1992; zur Mühlen, 1996]. Los parámetros de la formación de las NLS, como la velocidad de la cristalización de los lípidos [Siekman y Westesen, 1992], la hidrofiliidad de los lípidos o la forma de los cristales lipídicos, serán diferentes para diferentes lípidos. Además, la composición podría variar de proveedores diferentes y para lotes diferentes del mismo proveedor. Pequeñas diferencias en la composición de los lípidos, como las impurezas, podrán repercutir en la calidad de la dispersión de las NLS, con cambios en el potencial zeta, retardando los procesos de cristalización, diferentes tamaños de partícula o estabilidad de almacenamiento [Ahlin y cols., 2002]. Incrementar el tamaño de los lípidos en un 5-10% da lugar a partículas mayores y en distribuciones del potencial zeta más amplias [Siekman y Westesen, 1994; zur Mühlen, 1996].

La elección de los emulsificantes y su concentración también influye en la calidad de las dispersiones [Müller y cols. 1995; zur Mühlen, 1996]. Utilizando una concentración menor de emulsificante, se obtienen cantidades mayores de micropartículas [Siekman y Westesen, 1994], también reducen la tensión superficial y facilitan que las nanopartículas se dividan durante la homogeneización. La disminución en el tamaño de partícula se relaciona con un incremento del área superficial. El exceso de partículas de emulsificante puede estar presente de diferentes maneras como monómeros, micelas o liposomas. El tiempo de redistribución del emulsificante entre la superficie de las partículas, los monómeros solubilizados en el agua y las micelas o liposomas son diferentes [Mehnert y Mäder, 2012]. No es recomendable el uso de emulsificantes de rápida distribución, porque además de cubrir las superficies con rapidez, son muy solubles en agua y tóxicos. El uso de mezclas de emulsificantes



da lugar a tamaños de partícula menores y mayor estabilidad de almacenamiento [Siekmann y Westesen, 1994; zur Mühlen, 1996].

La capacidad de incorporación de los fármacos depende de las propiedades físico-químicas del fármaco, de la miscibilidad, la solubilidad en el lípido fundido, el tipo de material de la matriz y el grado de cristalinidad y la forma polimórfica [Manjunath y cols., 2005; Shidhaye y cols., 2008].

Las moléculas de fármaco que no se incorporan en el interior de la red cristalina pueden adsorberse en la superficie de nanopartícula. Hay diferentes modelos descritos en la literatura para explicar los mecanismos de incorporación del fármaco (Figura 10). [Mehnert y Mäder, 2001; zur Mühlen y cols., 1998]. El núcleo enriquecido por el fármaco se forma cuando el enfriamiento de la emulsión oleosa/acuosa (o/a) caliente conduce a la precipitación del fármaco en primer lugar. Esto ocurre principalmente en las disoluciones de lípido y fármaco en su punto de saturación a la temperatura de síntesis. Durante el enfriamiento, se obtiene una súper saturación y la precipitación del fármaco (Figura 10 (a)).

El modelo de concha enriquecida de fármaco se puede explicar como una función de la solubilidad del fármaco en la mezcla de agua-surfactante a temperatura elevada durante el proceso de síntesis (Figura 10 (b)). El fármaco abandona parcialmente la partícula de lípido y se disuelve en la fase acuosa durante la homogeneización caliente. Enfriar la nanoemulsión o/a reduce la solubilidad del fármaco en la fase acuosa, y el fármaco trata de distribuirse en las partículas de lípido, lo que conduce al enriquecimiento en la concha de la partícula si el núcleo de la partícula ya ha comenzado a solidificarse.

En el caso de una solución sólida, el fármaco se dispersa uniformemente en la matriz de partícula (Figura 10 (c)). La liberación del fármaco tiene lugar debido a la

difusión desde la matriz sólida lipídica y además por la degradación de la nanopartícula lipídica [Muchow y cols., 2008].

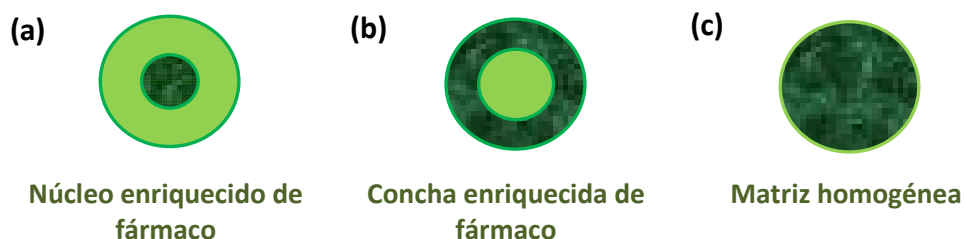


Figura 10. Modelos de incorporación del fármaco en las NLS.

### 1.3.1. METODOLOGÍA DE SÍNTESIS

Hay distintos tipos de síntesis:

#### *a) Homogeneización de alto corte y ultrasonido*

La técnica de homogeneización de alto corte y ultrasonido se usó inicialmente para la síntesis de nanodispersiones lipídicas sólidas [Friedrich y Müller-Goymann, 2005; Schwarz y cols., 1994].

Estas técnicas no requieren la participación de solventes orgánicos o grandes cantidades de surfactantes. El lípido fundido se añade y se dispersa en una solución acuosa mediante homogeneización de alto corte o ultrasonificación. La emulsión obtenida se deja enfriar a temperatura ambiente y se puede concentrar mediante ultrafiltración.

Estas técnicas son fáciles de usar y requieren instrumentos que están disponibles en la mayor parte de laboratorios. Sin embargo, presentan las desventajas de que la calidad de la dispersión puede estar a menudo comprometida por la presencia de un pequeño porcentaje de micropartículas o la contaminación metálica que presenta la ultrasonificación [Gasco, 1993].

Muchos fármacos antineoplásicos como el beta-elemene [Wang y cols., 2005], la campotecina [Huang y cols., 2008], el clorambucil [Sharma y cols., 2008], el docetaxel [Xu y cols., 2009] o el metotrexato [Ruckmani y cols., 2006] han sido incorporados en los nanotransportadores lipídicos mediante esta técnica.

### *b) Dispersión mediante ultrasonido*

Las NLS se pueden sintetizar mediante alta velocidad de agitación o sonicación. Las ventajas que presentan es que el equipo empleado es muy común en los laboratorios. El problema de este método es la amplia distribución del tamaño de las partículas pudiendo llegar al micrómetro, el crecimiento durante el almacenamiento o la contaminación metálica. Así, para hacer una formulación estable, se usa la ultrasonicación junto a alta temperatura [Sjöström y cols., 1993; Yassin y cols., 2010].

### *c) Homogeneización de alta presión*

Müller and Lucks fueron los primeros en sintetizar NLS mediante la técnica de homogeneización de alta presión (HPH - *High Pressure Homogenization*). En esta técnica, el líquido es sometido a una alta presión (100-2000 bar) a través de un hueco estrecho de pocas micras [Lucks y Müller, 1996]. Se obtienen así, partículas con una distribución de tamaño estrecha, con lo que se consigue aumentar la estabilidad física de la dispersión acuosa. Las altas tensiones de corte y las fuerzas de cavitación resultantes disminuyen el tamaño de partícula. Si las partículas localizadas en diferentes posiciones en el volumen de la dispersión experimentan fuerzas diferentes entonces el tamaño de partícula variará. Presenta menos problemas cuando se compara con otras técnicas y es más rentable [zur Mühlen y cols., 1998].

Los dos métodos de producción básicos mediante HPH son en caliente y en frío.

#### · Homogeneización caliente

En este método en primer lugar se disuelve el principio activo en el lípido derretido. Se obtiene una pre-emulsión dispersando el lípido derretido en una solución

de surfactante que se encuentra a la misma temperatura mediante el dispositivo de mezcla de alto corte. La calidad de la pre-emulsión afecta a la calidad del producto final. Seguidamente la pre-emulsión se pasa a través de un homogeneizador de alta presión de 3 a 5 ciclos y aplicando una presión de 500-1500 bar aproximadamente. La homogeneización de alta presión de la pre-emulsión se lleva a cabo por encima del punto de fusión de lípido [Ahlin y cols., 1998; Schwarz y cols., 1994].

La nanoemulsión obtenida se deja enfriar a temperatura ambiente o inferior. Las nanogotas lipídicas solidifican mientras se enfría formándose una dispersión acuosa de NLS. La presión de homogeneización y el número de ciclos no debería ser más alto que la requerida para alcanzar los efectos deseados porque esto aumenta el coste de la producción y las posibilidades de contaminación metálica así como en algunos casos causaría el aumento del tamaño de partícula debido a la agregación como consecuencia de la alta energía libre superficial de las partículas [Mehnert y Mäder, 2001].

Por lo general, se obtienen tamaños de partícula inferiores a temperaturas de tratamiento más elevadas debido a la menor viscosidad de la fase lipídica [Lander y cols., 2000], aunque esto también puede acelerar la degradación tanto del principio activo como del nanotransportador. Se obtienen mejores productos tras varios pases por el homogeneizador de alta presión, en torno a 3-5 pases. El proceso de alta presión siempre aumenta la temperatura de la muestra (aproximadamente 10 °C a 500 bar). El aumento de la homogeneización conduce a un aumento del tamaño de partícula debido a la fusión de partícula, esto ocurre debido a la alta energía cinética de las partículas [Jahnke, 1998].

Esta técnica se realiza a alta temperatura, por lo que no puede ser usada para fármacos sensibles a la temperatura. Los lípidos permanecen como una fusión superenfriada durante varios meses debido a su pequeño tamaño de partícula y a la presencia del

emulsionante. Este método tampoco es conveniente para fármacos hidrófilos [Müller y cols., 2000].

Mediante esta técnica se ha incorporado 5-fluorouracilo [Mao y cols., 2005] o norfloxacin [Wang y cols., 2012].

- Homogeneización fría

El proceso de homogeneización fría se realiza con el lípido en estado sólido y por lo tanto es similar al laminado de una suspensión a una presión elevada. Para asegurar el estado sólido del lípido durante la homogeneización, es necesaria la regulación de la temperatura [Jahnke, 1998].

La homogeneización fría ha sido desarrollada para vencer algunos problemas de la homogeneización caliente tales como: degradación acelerada de la carga útil del fármaco, compartimentación y consecuente pérdida del fármaco en la fase acuosa durante la homogeneización, transiciones polimorfas inciertas del lípido debido a la complejidad del paso de cristalización de la nanoemulsión que conduce a varias modificaciones y/o fusión súper-fría.

El primer paso para su preparación es el mismo que en el procedimiento de homogeneización caliente, por lo que el principio activo se disuelve en el lípido a una temperatura por encima del punto de fusión del lípido. Sin embargo, los pasos posteriores se diferencian. La mezcla se enfría rápidamente con la ayuda de nitrógeno líquido o hielo seco para favorecer la distribución homogénea del fármaco en la matriz del lípido. Esta mezcla solidificada se muele a un tamaño de partícula aproximado de 50-100  $\mu\text{m}$  usando una bola o un mortero. El tratamiento refrigerado facilita la molienda de las partículas incrementando la fragilidad de lípido. [zur Mühlen y cols., 1998].

Las micropartículas lipídicas obtenidas en la molienda se suspenden en una solución de surfactante para obtener una suspensión. Esta suspensión se pasa a través de un homogeneizador de alta presión a temperatura ambiente o por debajo para obtener las NLS. Las nanopartículas preparadas mediante esta técnica poseen un tamaño de partícula y una polidispersión ligeramente más grande comparada con los obtenidos por la técnica de homogeneización caliente, usando el mismo lípido en parámetros de homogeneización similares (presión, temperatura y número de ciclos). Un número más alto de ciclos de homogeneización reduce el tamaño de partícula [Friedrich y Müller-Goymann, 2005; Mehnert y Mäder, 2001; zur Müllen, 1996]. El método de homogeneización fría reduce al mínimo la exposición termal de la muestra, pero no la evita debido a la fusión de la mezcla de lípido/fármaco en el paso inicial. Reduce las posibilidades de degradación del fármaco y así se pueden usar fármacos termosensibles.

Las posibilidades de distribución del fármaco en la fase acuosa son limitadas y así este método puede ser usado tanto para fármacos hidrófilos como lipofílicos. [Friedrich y Müller-Goymann, 2005].

Mediante esta técnica se ha incorporado tamoxifen [ALHaj y cols., 2008].

### *d) Emulsificación-evaporación del solvente*

Sjöström and Bergenståhl fueron los primeros en describir la síntesis de NLS mediante la técnica de emulsificación-evaporación [Sjöström y Bergenståhl, 1992].

El lípido sólido se disuelve en un solvente orgánico inmiscible en agua como ciclohexano, cloroformo, acetato de etilo o cloruro de metileno; y el fármaco se disuelve en la solución [Siekman y Westesen, 1996]. Esta fase orgánica se emulsiona en una solución acuosa de un surfactante mediante un agitador mecánico. El solvente orgánico se quita de la emulsión mediante agitación mecánica o reducción de la

presión (40-60 mbar) [Mehnert y Mäder, 2001; Siekmann y Westesen, 1996]. La dispersión de las nanopartículas lipídicas se forma por la precipitación de la fase lipídica en el medio acuoso con surfactante. La agregación de las partículas se puede evitar quitando el solvente de manera más rápida [Müller y cols., 2000].

Esta técnica se puede usar para incorporar fármacos hidrófilos preparando una doble emulsión acuosa/oleosa/acuosa (a/o/a) y disolviendo el fármaco en la fase acuosa interna [García-Fuentes y cols., 2003; Yassin y cols., 2010].

Los fármacos termosensibles pueden incorporarse mediante esta técnica al evitar el estrés térmico. Las trazas de solvente orgánico que permanece en el producto final pueden crear problemas de toxicidad. Además, si se aumenta el contenido de lípido disminuye la eficacia de homogeneización debido a la alta viscosidad de la fase dispersada y de ahí las dispersiones son muy diluidas y tienen el contenido de partícula de lípido muy bajo (0.1 g/L). Por ello la concentración de partículas se puede incrementar mediante ultrafiltración o evaporación [Mehnert y Mäder, 2001].

Mediante esta técnica se ha incorporado edelfosina [Estella-Hermoso de Mendoza y cols., 2008] y diclofenaco sódico [Liu y cols., 2010].

### *e) Emulsificación-difusión del solvente*

Quintanar-Guerrero y cols. fueron los primeros en describir esta técnica para la preparación de nanopartículas poliméricas [Quintanar-Guerrero y cols., 1999]. Recientemente esta técnica ha sido modificada para la preparación de NLS [Shahgaldian y cols., 2003a, 2003b; Trotta y cols., 2003].

En esta técnica el lípido se disuelve en un solvente parcialmente miscible en agua como el alcohol bencílico, ácido isobutírico, formiato de etilo o tetrahidrofurano; el cual antes es saturado con agua a temperatura ambiente o a una temperatura controlada para que haya un equilibrio termodinámico entre ambos líquidos. Se añade

el lípido a la disolución del solvente y se emulsiona en una solución acuosa de un surfactante mediante agitación mecánica a la temperatura usada para disolver el lípido dando lugar a una emulsión o/a. Esta emulsión se diluye con un exceso de agua (ratio 1:5-1:10) a una temperatura controlada lo que causa la difusión del solvente a la fase externa y las nanopartículas lipídicas precipitan. El solvente se quita por destilación o por ultrafiltración. El tamaño de partícula obtenido es de 100 nm con una estrecha distribución del tamaño. La concentración y la naturaleza del lípido y el surfactante, la velocidad de agitación y la temperatura son variables críticas en esta técnica [Trotta y cols., 2003].

Mediante esta técnica se ha incorporado paclitaxel [Yuan y cols., 2008] o metotrexato [Paliwal y cols., 2009].

### *f) Microemulsión o/a*

Gasco y cols. fueron los primeros en desarrollar NLS basadas en la dilución de microemulsiones [Gasco, 1993]. Las microemulsiones son termodinámicamente estables y claras, y son mezclas isotrópicas compuestas usualmente por un aceite o lípido, un emulsificante y/o un co-emulsificante y agua. Los lípidos usados para preparar las NLS son sólidos a temperatura ambiente y por ello la microemulsión se prepara a una temperatura por encima del punto de fusión del lípido. La fase acuosa y la lipídica contienen el emulsificante, se mezclan en las proporciones adecuadas y se agitan.

Se realizan agitando una mezcla transparente a 65-70 °C, que está compuesta por un ácido graso de baja temperatura de fusión (ácido esteárico), un emulsificante (polisorbato 20, polisorbato 60, fosfatidil colina de soja y taurodeoxicolato sódico), co-emulsificantes (monoetilfosfato sódico) y agua. La microemulsión caliente se dispersa en agua fría (2-30 °C) bajo agitación. Las proporciones de volumen típicas de la microemulsión caliente que se vierte al agua fría están en torno a 1:25 - 1:50. Cuando



la microemulsión se diluye en agua fría, las gotas de lípido solidifican a medida que la temperatura desciende. El proceso de dilución está determinado por la composición de la microemulsión. El gradiente de temperatura y el valor de pH determinan la calidad del producto. De acuerdo con la literatura [Boltri y cols., 1993; Gasco, 1997], la estructura de gota está presente en la microemulsión y por lo tanto, no requiere que ninguna energía para alcanzar pequeños tamaños de partícula. En lo que concierne a las semejanzas del proceso de producción de nanopartículas de polímero descritas por científicos franceses [Cortesi y cols., 2002], se pueden considerar diferentes mecanismos. Fessi produjo partículas poliméricas mediante dilución de soluciones acuosas de polímero. Según De Labouret y cols. [De Labouret y cols., 1995], el tamaño de partícula está determinado por la velocidad de los procesos de distribución. Las nanopartículas se producen sólo con solventes que se distribuyan muy rápidamente en la fase acuosa (acetona), mientras que tamaños de partícula mayores se obtienen con solventes más lipofílicos. Los co-solventes hidrófilos de la microemulsión podrían jugar un papel similar en la formación de nanopartículas lipídicas como la acetona para la formación de nanopartículas poliméricas [Cavalli y cols., 1996].

La mayor limitación de esta técnica es su sensibilidad a pequeños cambios en la composición o en las variables termodinámicas, que pueden llevar a transiciones de fase. La elevada concentración de los surfactantes utilizados, pueden producir toxicidad, por lo que es necesario retirar el exceso mediante ultracentrifugación, ultrafiltración o diálisis [Gasco, 1993].

### *g) Preparación vía doble emulsión a/o/a*

Este método se basa en la emulsificación-evaporación del solvente, obteniendo así NLS hidrofílicas cargadas [Cortesi y cols., 2002]. El fármaco se encapsula con un estabilizador para prevenir la separación del fármaco a la fase externa acuosa durante la evaporación del solvente en la fase externa acuosa de la doble emulsión.

### *h) Fluido supercrítico*

Esta técnica es relativamente nueva para la producción NLS y tiene la ventaja de no usar solventes [Chen y cols., 2006; Kaiser y cols., 2001]. Hay variaciones de esta técnica en cuanto a la preparación del polvo y la nanopartícula. Las NLS se pueden preparar por la rápida expansión de las soluciones de dióxido de carbono supercríticas (RESS – Rapid Expansion Supercritical Solution). El dióxido de carbono (99.99%) es la mejor opción de solvente para este método [Gosselin y cols., 2003].

### *i) Técnica de desplazamiento del solvente*

Fessi fue el primero en describir esta técnica para la preparación de nanopartículas poliméricas mediante polimerización en la solución [Fessi y cols., 1992]. Esta técnica ha sido modificada recientemente y usada para la preparación de NLS [Dubes y cols., 2003; Hu y cols., 2002]. En esta técnica, el lípido y el ingrediente activo se disuelven en un solvente miscible de agua como el etanol, el isopropanol, la acetona o el metanol [Schubert y Müller-Goymann, 2005]. La mezcla se dispersa en una solución acuosa de un surfactante bajo agitación mecánica produciendo una suspensión de nanopartículas lipídicas [Hu y cols., 2002]. El solvente se quita posteriormente mediante destilación. Finalmente, mediante ultracentrifugación, ultrafiltración o liofilización se pueden aislar las nanopartículas de lípido.

### **1.3.2. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN**

Dependiendo del método de preparación utilizado, hay impurezas que resultan potencialmente tóxicas como micelas, surfactante, monómeros residuales, polímeros, impurezas metálicas y solventes orgánicos presentes en la dispersión de NLS. Para obtener un sistema de transporte de fármaco efectivo, la suspensión debería estar libre de cualquier fármaco no encapsulado o impurezas. Las dispersiones se pueden

separar y purificar usando diafiltración, ultracentrifugación, diálisis, filtración de gel y microfiltración de cruce de flujo [Allémann y cols., 1993; Beck y cols., 1990; Krause y cols., 1986; Rolland, 1989; Tishchenko y cols., 2001].

### 1.3.3. TOXICIDAD

Uno de los aspectos más importantes en el diseño de una nanoplataforma antitumoral es garantizar su biocompatibilidad. Para ello, son necesarios numerosos estudios sobre la toxicidad de los materiales empleados en su formulación, la compatibilidad de las partículas con la sangre, y la interacción de los productos de biodegradación de la nanoplataforma con el sistema inmune [Dash y cols., 2010; Kunzmann y cols., 2011; Lynch y Dawson, 2008].

La toxicidad de las preparaciones varía dependiendo del tamaño de la partícula, la forma, la estructura superficial, etc. [Jian y cols., 2012]. Por ello, los sistemas coloidales biocompatibles deben presentar unas propiedades físicoquímicas adecuadas en cuanto a geometría (forma y tamaño), y estructura y composición química [Maaßen y cols., 1993; Schütt y cols., 1997]. La biocompatibilidad de estos nanosistemas depende también de la cantidad administrada (masa por célula o  $\text{cm}^3$ ), de la cantidad interiorizada por las células (masa por célula), de la vía de administración, y de la biodegradabilidad, farmacocinética y biodistribución del coloide [Arias y cols., 2001; Fischer y Chan, 2007; Grainger, 2009; Shubayev y cols., 2009].

Un prerrequisito para el uso en humanos es una baja toxicidad aceptable. En principio todas las sustancias GRAS pueden usarse [Weyhers y cols., 1995]. El surfactante afecta a la velocidad de degradación, pero esto no muestra efecto en la toxicidad [Rainer, 1997].

Los efectos citotóxicos que haya, pueden deberse a la adhesión de partículas a la superficie celular. La citotoxicidad de las NLS es baja en general, especialmente cuando se compara con otras nanoplataformas como polialquilcianocrilatos y PLA/GA [Rainer, 1997].

Los productos de biodegradación deben ser eliminados del organismo en el menor tiempo posible. Debe vigilarse también que estos productos no estimulen la liberación de mediadores de la inflamación en el organismo [Arruebo y cols., 2007; Karlsson y cols., 2009]. La realización de ensayos preclínicos y clínicos debe poner de manifiesto la baja toxicidad de la formulación coloidal [Ibrahim y cols., 1983; Lübbe y cols., 1996; Müller y cols., 1996; Sunderland y cols., 2006].

Sin embargo, la mayoría de los estudios que se realizan tienen como principal objetivo el análisis de la actividad antitumoral de estas nanoplataformas. Muy pocos prestan atención a las reacciones de toxicidad asociadas a estos nanosistemas en el organismo. Por lo tanto, puede afirmarse claramente que son necesarios estudios exhaustivos para poder aclarar la relación existente entre las características físicoquímicas de los nanotransportadores y su comportamiento *in vivo*. Solo así se podría evaluar la respuesta tóxica provocada por las nanopartículas, y establecer modelos experimentales para definir la toxicidad de los coloides transportadores de fármacos [Fischer y Chan, 2007; Grainger, 2009; Lynch y Dawson, 2008; Shubayev y cols., 2009].

### 1.3.4. ESTABILIDAD

Los nanotransportadores diseñados según este tipo de estrategia cuentan en su superficie con biomoléculas que pretenden la unión de las nanopartículas a la célula y su posterior internalización por esta. Así se consigue la liberación selectiva del fármaco

en la región deseada [Arias, 2011]. La unión específica del sistema coloidal a la célula diana se logra eficientemente mediante mecanismos de reconocimiento molecular (unión ligando-receptor, interacción antígeno-anticuerpo) [Brigger y cols., 2002; Decuzzi y cols., 2009]. Para ello, la superficie de la nanopartícula debe ser modificada mediante la adsorción química o física de anticuerpos monoclonales [Park, 2002; Park y cols., 2001], integrinas [Hood y cols., 2002] o restos de folato [Lu y Low, 2002].

La estabilidad de los fármacos y su difusión a través de las NLS son parámetros que determinan la velocidad de disolución. Las nanopartículas estabilizadas con lecitina y colato de sodio muestran una mayor degradación, una degradación intermedia se observa con Tween 80 y se obtiene una menor velocidad de degradación con poloxámero de elevado peso molecular (P-407).

La estabilidad fisicoquímica de los transportadores lipídicos muestra variaciones debidas a sus diferentes composiciones y diferentes estructuras. En las dispersiones de partículas lipídicas con un intervalo de diámetro de nanómetros donde el principal o único componente es un lípido es muy importante la estabilidad fisicoquímica. [Heurtault y cols., 2003].

El tamaño de partícula afecta a la estabilidad física de la formulación, la velocidad de liberación del fármaco y la distribución de las partículas *in vivo*. Se ve afectado por varios parámetros como las propiedades del lípido y el surfactante, la técnica de producción y las condiciones de síntesis (tiempo, temperatura, presión, número de ciclos) [Mehnert y Mäder, 2001].

Se observa una menor velocidad de degradación en partículas de mayor tamaño (800 nm), en comparación con otras de menor tamaño (180-300 nm) [Müller, 2008; Olbrich y cols., 2002].

Se cree que el aumento de la viscosidad de la dispersión junto con el incremento del punto de fusión de los lípidos da lugar a mayores tamaños de partícula. Otros parámetros como la proporción de cristalización, la estructura del lípido y el tamaño variarán para cada tipo de lípido [Mehnert y Mäder, 2001].

La calidad de la dispersión de NLS se ve afectada por la composición del lípido. Además, la mayor parte de los lípidos usados son una mezcla de varios compuestos químicos por lo que su composición varía entre los distintos proveedores y lotes. Una proporción de lípido superior al 5-10 % da lugar a un mayor tamaño de partícula y un mayor índice de polidispersión debido al incremento de la viscosidad de la dispersión lo cual afecta a la eficacia de homogeneización y al aumento de la velocidad de aglomeración de partícula [Mehnert y Mäder, 2001].

Por otro lado, la selección de un tensoactivo adecuado o una mezcla de tensoactivos a concentraciones convenientes, contribuye a la estabilidad de las dispersiones. En los sistemas particulados para aplicación parenteral el sistema estabilizador debe mantener el estado coloidal para evitar la formación de agregados que pudieran llevar a efectos secundarios serios.

En las dispersiones, el tipo de tensoactivo puede influir en la temperatura de cristalización de la dispersión. La temperatura de cristalización y las transiciones polimórficas son parámetros importantes para la preparación de nanopartículas de triglicéridos. La transición hacia un polimorfo más estable de los triglicéridos se acompaña de una reestructuración de las moléculas y de un aumento en la densidad de la celda cristalina. El tipo de cristal que se obtiene así como la cinética de las transiciones pueden tener consecuencias importantes sobre la estabilidad de las dispersiones y sobre su capacidad para cargar fármacos [Bunjes y cols., 2003].

Las propiedades y la concentración del surfactante afectan el tamaño y a la eficacia de las NLS como un sistema transportador de fármacos. Tamaños de partícula

menores dan lugar a un aumento de la superficie de la nanopartícula. Esto conduce a una inestabilidad termodinámica y la consiguiente separación de las fases [Mehnert y Mäder, 2001]. La concentración del surfactante debe de ser el suficiente para cubrir la superficie de las NLS recién formadas. Los surfactantes previenen la separación de las fases disminuyendo la tensión superficial entre el lípido y las fases acuosas. El exceso surfactante da lugar a la aparición de monómeros, micelas o liposomas.

Las NLS estabilizadas con una mezcla de surfactante y cosurfactante poseen un tamaño de partícula inferior y una mejor estabilidad que aquellas con un solo surfactante [Siekman y Westesen, 1996]. Cavalli y cols. demostraron que una dispersión estabilizada por un surfactante iónico daba lugar a un menor tamaño de partícula [Cavalli y cols., 1998].

La incorporación de fármacos en la matriz sólida de las nanopartículas puede protegerlas contra la degradación química.

Durante el almacenamiento de las dispersiones pueden agregarse las partículas. Las partículas individuales difunden en el medio de dispersión, provocando choques que pueden conducir a una floculación pericinética. En dispersiones con concentraciones elevadas de transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC - nanostructured lipid carriers) las partículas forman agregados en forma de redes de "hilos de perlas", que podrían mantener a las partículas en posiciones fijas, evitando los choques y la floculación pericinética. Después de la administración de las partículas y de su dilución en los fluidos biológicos la red se destruiría liberando las partículas individuales. Se ha observado que dispersiones con un 30% o menos de lípido forman agregados durante su almacenamiento. Por otro lado, dispersiones con un 35% de lípido, las cuales forman dispersiones en forma de gel, se mantuvieron estables durante el almacenamiento. Cuando el gel se diluye libera partículas individuales, sin mostrar un incremento en su tamaño original [Radtke y cols., 2005].

Existen tres tipos de dispersiones inestables (Figura 11):

☞ **Floculación:** proceso en el cual las nanopartículas se mantienen unidas mediante fuerzas de van der Waals. La repulsión electrostática y el impedimento estérico entre partículas producidas en presencia de surfactantes inhiben la floculación [Chapman y cols., 2002; Porter, 1994].

☞ **Cremación:** proceso en el cual la fase menos densa migra a la parte superior de la dispersión bajo la influencia de la flotabilidad o la fuerza centrípeta, lo que provoca que las nanopartículas estén cerca las unas de las otras. Las nanopartículas se separan de la dispersión mediante centrifugación. Se puede prevenir haciendo coincidir la densidad del lípido y las fases acuosas.

☞ **Coalescencia:** proceso en el cual las nanopartículas se fusionan para formar partículas más grandes.

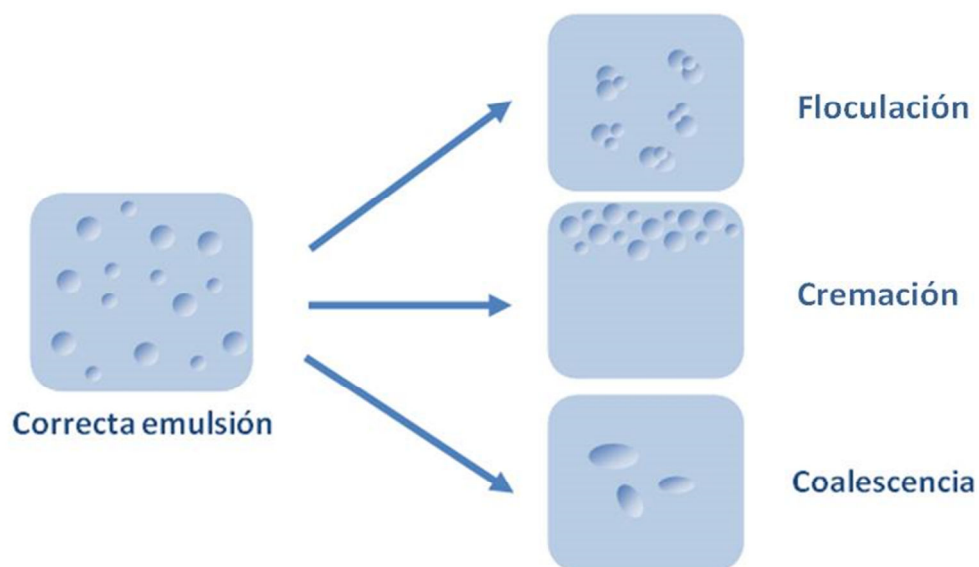


Figura 11. Inestabilidad de las dispersiones de NLS.



La repulsión electrostática produce una doble capa eléctrica alrededor de cada nanopartícula en la dispersión. La doble capa eléctrica está compuesta de dos partes: una región interna en la que los iones están fuertemente unidos, moviéndose con la partícula, y una región externa en la cual los iones están unidos con menor fuerza, el potencial en esta zona se denomina potencial zeta. La magnitud del potencial zeta es un determinante importante de la estabilidad de las dispersiones. A medida que el potencial zeta aumenta, la magnitud de repulsión electrostática entre las partículas se incrementa, por lo tanto las partículas tenderán a repelerse entre sí y no tenderán a flocular. Las dispersiones con un potencial zeta más positivo de +30 mV y más negativo que -30 mV se pueden considerar estables [Hunter, 2013].

Los efectos estéricos juegan también un papel importante en la estabilidad de las dispersiones dificultando que las partículas se acerquen y previniendo así la floculación y la coalescencia. Una concentración óptima de surfactante y con una longitud de cadena lo suficientemente larga dará lugar a un efecto estérico mediado por la estabilidad de la formulación [Chapman y cols., 2002; Porter, 1994]. Para una estabilidad a largo plazo, se debe de obtener un equilibrio entre la repulsión electrostática y el efecto estérico.

La cristalización del lípido es importante para la estabilidad de las nanopartículas. Esto afecta considerablemente a la incorporación del fármaco y a su velocidad de liberación. La transición polimórfica es la capacidad de formar una estructura celular unitaria diferente en cristales debido a diferentes conformaciones moleculares y patrones de empaquetamiento. Las NLS no cristalizan completamente durante su almacenamiento y contienen varias formas polimórficas como  $\alpha$ ,  $\beta'$  y  $\beta$ . La principal diferencia entre las formas polimórficas es la distancia molecular. La forma  $\alpha$  es inestable y se caracteriza por la estructura hexagonal con la distancia molecular más grande. La forma  $\beta$  es estable y se caracteriza por un patrón de empaquetamiento triclinico. La presencia de líquidos residuales promueve la cristalización de la forma

estable porque los cristales inestables pueden redisolverse y recrystalizar a la forma más estable [Mehnert y Mäder, 2001].

El aumento del tamaño de partícula, el cambio de la forma de la partícula, y la expulsión del fármaco sucede cuando los lípidos sufren modificaciones polimórficas. Un aumento en la estabilidad termodinámica y la disminución en la tasa de incorporación de fármaco se observó en el siguiente orden [Müller y cols., 2000]:

Fundido super-frío <modificación- $\alpha$ <modificación- $\beta'$ <modificación- $\beta$ .

La calorimetría diferencial de barrido (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) y la difracción de rayos X se usan para estudiar las transiciones polimórficas del lípido. Diferentes formas del lípido poseen puntos de fusión y entalpías diferentes y así pueden ser detectadas por DSC. La difracción de rayos X se puede usar para detectar la longitud de los espaciados largos y cortos de la red lipídica [Müller y cols., 2000].

### 1.3.5. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MAGNÉTICAS

Los coloides magnéticos están constituidos por un núcleo magnético (principalmente de óxido de hierro) englobado en una matriz orgánica o inorgánica. Sus características pueden modificarse mediante un procedimiento de síntesis adecuado, para así controlar su geometría, capacidad de humectación (hidrofilia/hidrofobia), carga eléctrica superficial, composición química, unión a receptores específicos de la región diana, capacidad para absorber/adsorber fármaco, cinética de liberación del mismo, biodegradación y eliminación, estabilidad *in vitro* e *in vivo*, y capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados.

La tecnología de transportadores magnéticos se originó en los años 40 como método revolucionario en la purificación de aguas residuales. En poco tiempo se

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

El fármaco se vehiculiza en la nanopartícula magnética para, a continuación ser administrado generalmente por vía parenteral. De forma simultánea, se aplica un gradiente magnético selectivamente sobre el lugar de acción. Cuando el coloide magnético alcanza la zona de influencia de este gradiente, es atraído (retenido) por éste. Así se logra acumular toda la dosis de fármaco administrada en el lugar de acción y controlar su liberación (Figura 12) [Durán y cols., 2008].

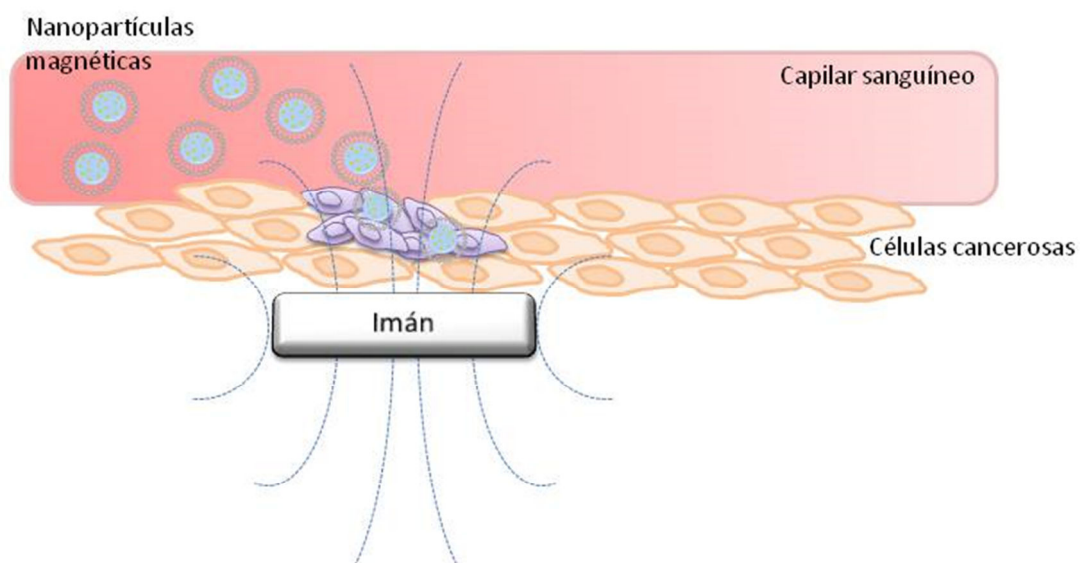


Figura 12. Transporte activo de sustancias activas basado en la utilización de nanopartículas con capacidad de respuesta a estímulos magnéticos.

El fármaco vehiculizado no se encontrará biodisponible mientras siga incorporado en la nanopartícula magnética. Así, cuando el coloide magnético llegue al lugar de acción dirigido por el gradiente magnético aplicado, liberará el fármaco transportado justo en la región donde debe actuar. Por lo tanto, una cinética de liberación demasiado rápida producirá un efecto farmacológico similar al obtenido con una dosis de fármaco en solución, mientras que una cinética de liberación demasiado lenta podría limitar seriamente la actividad farmacológica en el lugar diana. El transporte de fármaco guiado magnéticamente generará siempre una concentración de fármaco en el lugar de acción muy superior a la lograda cuando el principio activo se administra en solución [Durán y cols., 2008].

La biodistribución de los coloides magnéticos puede verse también beneficiada por el efecto EPR de la región tumoral [Allen y Cullis, 2004; Arruebo y cols., 2007; Edens y cols., 2002; Hashizume y cols., 2000; Maeda y cols., 2000; Pankhurst y cols., 2003; Schiffelers y cols., 2001]. Si además el diseño de la nanopartícula contempla las estrategias de transporte activo anteriormente comentadas, la acumulación del coloide y la potencia y especificidad de su acción farmacológica serán mucho mayores. De esta forma, se alcanzará un efecto farmacológico óptimo, sin la necesidad de utilizar grandes dosis de principio activo. Por todo esto, se ha propuesto el diseño de coloides magnéticos con capacidad de respuesta a estímulos físicos de muy diverso origen y con modificaciones a nivel superficial [Bogdanov y cols., 1997; Brigger y cols., 2002; Némati y cols., 1996; Vauthier y cols., 2003].

La utilización de campos magnéticos alternos permite, además de generar el efecto de hipertermia ya comentado y provocar la liberación controlada del principio activo vehiculizado [Guo y Szoka, 2003; LaVan y cols., 2003]. El coloide magnético provocará el calentamiento específico de la masa tumoral hasta una temperatura  $\approx 42$  °C, que de ser mantenida durante  $\approx 30$  minutos inducirá la muerte de las células tumorales [Glöckl y cols., 2006; Hergt y cols., 2006; Hilger y cols., 2006; Moroz y cols.,

2002; Pankhurst y cols., 2003]. Además, este calentamiento alterará/destruirá el recubrimiento de los núcleos magnéticos, permitiendo el comienzo de la liberación del fármaco [Liburdy y cols., 1986; Steinke y cols., 2007; Wagner, 2007].

Si bien algunos estudios apuntan la posibilidad de administrar los coloides magnéticos por vía intratumoral [Brigger y cols., 2002; Fernández-Pacheco y cols., 2007], la mayoría de los trabajos científicos investigan la vía de administración intravenosa. Esta vía de administración determina que las nanopartículas magnéticas entren en contacto rápidamente con fluidos fisiológicos de un pH ligeramente básico (7.4) y con una fuerza iónica relativamente alta (130-150 meq/L). Bajo estas condiciones fisiológicas, las nanopartículas tienden a agregarse para quedar estabilizadas termodinámicamente. Esta agregación se verá aún más acrecentada si el coloide presenta una magnetización remanente tras la retirada del campo magnético aplicado. Para evitar esta inestabilidad *in vivo*, la cual puede comprometer la llegada de las nanopartículas magnéticas hasta el lugar de acción, el sistema transportador debe reunir las siguientes características [Durán y cols., 2008]: *i*) densidad de carga eléctrica superficial suficiente para asegurar una repulsión electrostática entre las partículas que evite su agregación; *ii*) hidrofilia para asegurar la distribución de las nanopartículas en el plasma de forma individualizada y que no aparezcan agregados hidrófobos; y, *iii*) superficie modificada con cadenas poliméricas hidrófilas que retrasan/minimizan los fenómenos de floculación y de opsonización previos a la fagocitosis por macrófagos. En este último caso, las cadenas de polímero generan una protección por impedimento estérico de la nanopartícula magnética, o electro-estérico si la cadena de polímero está cargada. En la actualidad, la introducción en clínica de los coloides magnéticos como sistemas transportadores de fármacos podría considerarse limitada por [Dobson, 2006; Durán y cols., 2008; y cols., 1996]:

- ☞ La necesidad de utilizar intensos campos magnéticos para asegurar la perfecta acumulación del coloide magnético en el lugar diana.

- ✎ No hay suficientes estudios que aseguren su fácil producción a gran escala, su estabilidad y los beneficios económicos asociados a este tipo de terapia.
- ✎ No hay certeza absoluta de que los más que prometedores resultados logrados en animales pequeños (ratones, ratas, conejos, etc.) sean extrapolables al ser humano.
- ✎ El destino biológico del fármaco debe todavía asegurarse completamente mediante el perfecto control de los procesos de liberación.
- ✎ Las nanopartículas magnéticas podrían agregarse en el torrente sanguíneo, generando una embolia y efectos secundarios en los órganos donde quedan atrapadas (principalmente, a nivel hepático). Sin embargo, este fenómeno podría transformarse en una ventaja si se pretende el tratamiento selectivo de tumores localizados en alguno de esos órganos.

## **Capítulo 2.**

# **Objetivos y contribución del trabajo de investigación**





## 2.1. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal el diseño de un nanosistema transportador magnético eficaz con capacidad de respuesta a campos magnéticos externos aplicados que posibilite la liberación específica del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo en la región tumoral. Con ese fin se ha realizado un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas magnéticas constituidas por núcleos magnéticos de óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y un núcleo sólido lipídico. La capacidad de transporte y liberación controlada de fármaco en la región diana también ha sido objeto de estudio.

La eficacia del recubrimiento lipídico de los núcleos magnéticos y las ventajas que aporta a la capacidad de estas nanopartículas para transportar el fármaco objeto de estudio, se determinarán mediante un análisis comparativo de la estructura y composición química de los tres tipos de materiales (magnetita, nanopartícula lipídica sólida y nanopartícula lipídica sólida magnética), así como la caracterización de las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales de estos.

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

Una parte fundamental de la investigación es la determinación de la capacidad de vehiculización (transporte y liberación controlada) de 5-fluorouracilo que tienen las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas diseñadas. Para ello, se investigarán extensamente el método convencional de incorporación de fármaco en este tipo de nanosistemas: absorción en matriz. Se utilizarán técnicas cuantitativas

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

Otro objetivo básico es el análisis *in vitro* del proceso de liberación del agente antitumoral desde las nanopartículas, determinando espectrofotométricamente la cantidad liberada y caracterizando el tipo de vehiculización de fármaco en las nanopartículas.

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

1.- Síntesis de nanopartículas lipídicas sólidas compuestas por un núcleo superparamagnético que les permita transportar de forma direccionada los agentes terapéuticos en células de cáncer de colon y que les permitan actuar como agentes de contraste (RMI), ser sensibles a campos eletromagnéticos alternos (tratamiento mediante hipertermia) y facilitar su acumulación en la masa tumoral.

2.- Caracterización de las nanopartículas en cuanto a geometría (forma y tamaño), propiedades magnéticas y físicoquímicas (estructura química y carga eléctrica superficial).

3.- Determinación de la capacidad de incorporación de 5-fluorouracilo por las nanopartículas compuestas mediante métodos espectrofotométricos y electrocinéticos.

4.- Evaluación de la cinética de liberación del antitumoral desde las partículas. Análisis de los mecanismos implicados.

5.- Determinar la eficacia de las nanopartículas sólidas lipídicas que contienen 5-fluorouracilo, valorando su actividad antitumoral *in vitro* (en las líneas celulares derivadas de cáncer de colon).

## 2.2. CONTRIBUCIÓN

La aportación principal de la presente Tesis Doctoral, en el campo de la investigación y el desarrollo de coloides como sistemas transportadores de fármacos, es el desarrollo y estudio preliminar de una plataforma biodegradable y biocompatible, con potencial aplicación en el transporte dirigido de 5-fluorouracilo combinado con una liberación prolongada para el tratamiento del cáncer. El diseño del nanosistema pretende dirigir toda la dosis de fármaco hacia el lugar de acción y retener el agente quimioterápico en la masa tumoral, mediante la aplicación de un campo magnético externo. El nanosistema estará constituido por núcleos de óxido de hierro superparamagnéticos (magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) embebidos en una matriz lipídica. El resultado de dicha asociación da lugar a un nanosistema denominado nanopartícula lipídica sólida magnética. Su empleo en clínica permitirá minimizar los efectos secundarios derivados de la extensa biodistribución y pobre especificidad de acción de este tipo de principios activos por las células cancerosas. De esta forma, serán precisas dosis de fármaco claramente inferiores para conseguir la misma acción terapéutica. Por otro lado, el carácter superparamagnético de los núcleos de magnetita embebidos en el interior de la matriz lipídica podrá dotar a la nanopartícula lipídica sólida magnética como agente de hipertermia, fenómeno que puede tener gran influencia en el proceso de liberación del fármaco.

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

- Diseño de un procedimiento reproducible, sencillo y económico de síntesis de nanopartículas magnéticas. La modificación introducida es la técnica de la doble emulsión desarrollado por otros autores para la síntesis de nanopartículas lipídicas

sólidas, basada en la existencia de una fase oleosa y dos fases acuosa, en la primera de las cuales se incorporan los núcleos de óxido de hierro.

- ✎ Aplicación de métodos de análisis físico, químico y fisicoquímico de superficies muy sensibles a las transformaciones experimentadas por los núcleos de magnetita al quedar recubiertos por la matriz lipídica. La información obtenida puede ser especialmente útil en la identificación de los mecanismos de formación de las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas.
- ✎ Observación de la respuesta de las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas frente a la aplicación de campos magnéticos externos: de forma cuantitativa mediante la determinación de su ciclo de histéresis, y de forma cualitativa mediante visualización *in vitro* de suspensiones acuosas de las nanoplateformas a nivel macro y microscópico.
- ✎ Evaluación de la biocompatibilidad de las nanoplateformas *in vitro* por medio del estudio de la citotoxicidad en líneas celulares tumorales.
- ✎ Análisis de la capacidad de este nanosistema mixto como sistema transportador de fármacos. En este sentido, la capacidad de vehiculización del coloide se investigó con el agente antitumoral 5-fluorouracilo.

## **Capítulo 3.**

# **Formulación de nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas**



## 3.1. SÍNTESIS

### 3.1.1. NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA

Dentro de los diversos tipos de nanopartículas de óxido de hierro son de especial interés las de naturaleza superparamagnética por su potencial utilidad en la separación y etiquetado celular (detoxificación de fluidos biológicos), reparación de tejidos (ingeniería tisular), transporte de fármacos, resonancia magnética de imagen (como agentes de contraste), hipertermia y magnetofección (transporte y transfección magnética de genes) [Durán y cols., 2008; Reddy y cols., 2012]. Su pequeño tamaño y su gran área superficial específica determinan la gran susceptibilidad magnética y el comportamiento superparamagnético de estas nanopartículas [Gupta y Gupta., 2005; Reddy y cols., 2012]. Por este motivo, el procedimiento de síntesis de los núcleos de óxido de hierro utilizados en el desarrollo de NLS persigue obtener estas propiedades.

La magnetita (óxido ferroso-férrico  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) es un mineral que se encuentra en diversos entornos geológicos y en algunos depósitos en cantidad suficiente como para constituir un mineral de hierro importante [Gaines y cols., 1997]. En organismos vivos como las abejas, los delfines, las palomas o ciertos microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 o *Magnetovibrio* MV-1) también se han encontrado pequeños agregados de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [Arakaki y cols., 2008; Okon y cols., 1994; Yan y cols., 2012]. La magnetita es un ejemplo de material ferrimagnético, cuyo comportamiento está esencialmente asociado a su estructura cristalina (del tipo espinela inversa). En ella, los iones  $\text{Fe}^{3+}$  se acoplan antiferromagnéticamente y no contribuyen a la imanación. Por el contrario, los iones  $\text{Fe}^{2+}$  de cada celda tienen orientación paralela y son responsables del momento magnético de dicha celda y, por tanto, del comportamiento magnético de la magnetita (Figura 13).

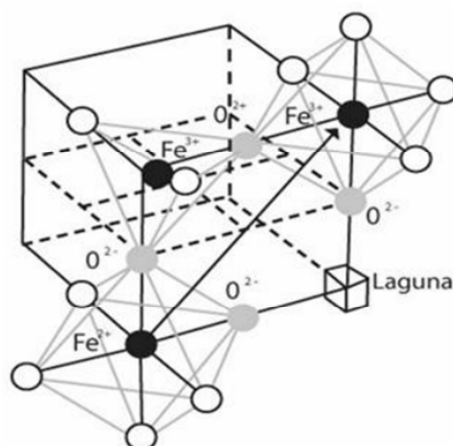


Figura 13. Esquema de la estructura cristalina de la magnetita. Reproducido de Aquino y cols., 2010. Copyright ACI (2010).

La toxicidad de este óxido de hierro es muy baja como se ha comprobado *in vitro* [Petri-Fink y Hoffman, 2007] e *in vivo* [Gu y cols., 2012]. La dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) estudiada en ratas es de 400 mg/Kg [Iannone y cols., 1991], por lo que puede considerarse que el cuerpo humano la tolera bien [Li y cols., 2012; Müller y cols., 1996]. En cuanto a su biodegradabilidad, numerosos estudios han demostrado que en el caso de nanopartículas superparamagnéticas (tamaño < 20 nm), su degradación puede ocurrir en los lisosomas de células del SRE (p. ej., macrófagos). En este proceso de biodegradación se genera hierro libre, el cual puede utilizarse en la síntesis de transferrina y ferritina. Si, por el contrario, las partículas de magnetita presentan un tamaño mayor, su eliminación del organismo suele tener lugar mediante filtración renal [Gu y cols., 2012; Okon y cols., 1994].

Desde mediados del siglo pasado se han desarrollado numerosos métodos para la preparación de partículas de magnetita con tamaño micrométrico [Omer-Mizrahi y Marget, 2009] o nanométrico [Katsnelson y cols., 2012; Laurent y cols., 2008; Sun y Zeng, 2002]. Es muy interesante comprobar cómo muchos de ellos permiten incluso



modificar las características de la superficie de estas partículas en función de la aplicación deseada [Charles, 2003; Elaissari y cols., 2003; Rosenweig, 1997; Tartaj y cols., 2003]. Si bien es muy difícil establecer una clasificación que abarque todos los métodos de formulación desarrollados hasta la fecha, consideramos que podrían establecerse cinco categorías generales [Durán y cols., 2008; Laurent y cols., 2008]:

- ☞ *Método de los polioles.* Método basado en una reducción forzada de iones metálicos en presencia de polioles (de etileno, propileno, etc.). Este método es muy versátil pues permite conseguir una amplia gama de tamaños de partícula (desde 10 nm a 1  $\mu\text{m}$ ) y una composición química muy variable (hierro, aleaciones de cobalto y níquel e, incluso, aleaciones de hierro, cobalto y níquel) (Figura 14). La formación de las partículas se produce por nucleación espontánea o heterogénea [Fiévet, 2000; Toneguzzo y cols., 1998; Toshima y Lu, 1996; Viau y cols., 1996].

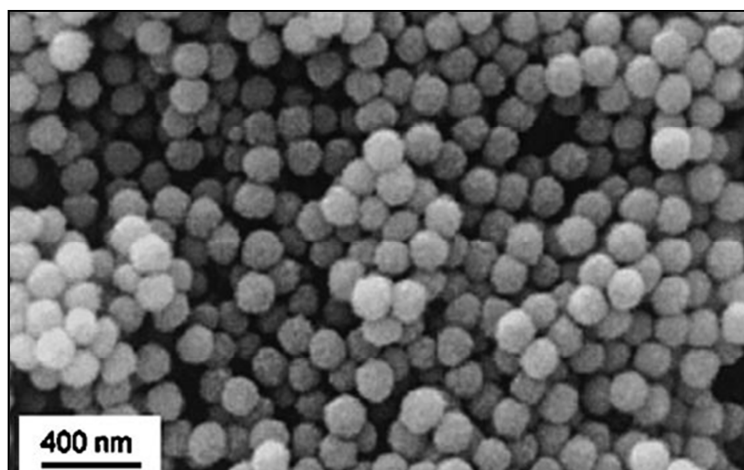


Figura 14. Microfotografía electrónica de barrido de nanopartículas constituidas por una aleación de hierro, cobalto y níquel, y obtenidas mediante el método de los polioles. Reproducido de Toneguzzo y cols., 1998. Copyright Wiley-VCH (1998).

➤ *Método de microemulsión.* Está basado en la formulación de microemulsiones de fase externa oleosa que permite el crecimiento de los núcleos magnéticos. Una modificación de esta técnica permite la preparación de nanopartículas compuestas por aleaciones de hierro [Feltin y Pileni, 1997; Pileni, 1997, 2001], cobalto [Schultz-Sikma y cols., 2011] o níquel [Zhu y cols., 2004] con un tamaño inferior a 10 nm. También se ha usado este método para formular partículas de hierro recubiertas de capas de metales, para ralentizar la oxidación de estos núcleos y facilitar otras modificaciones superficiales con fines biomédicos (Figura 15) [Carpenter, 2001; Iglesias-Silva y cols., 2010; López-Pérez y cols., 1997; Rivas y cols., 1994].

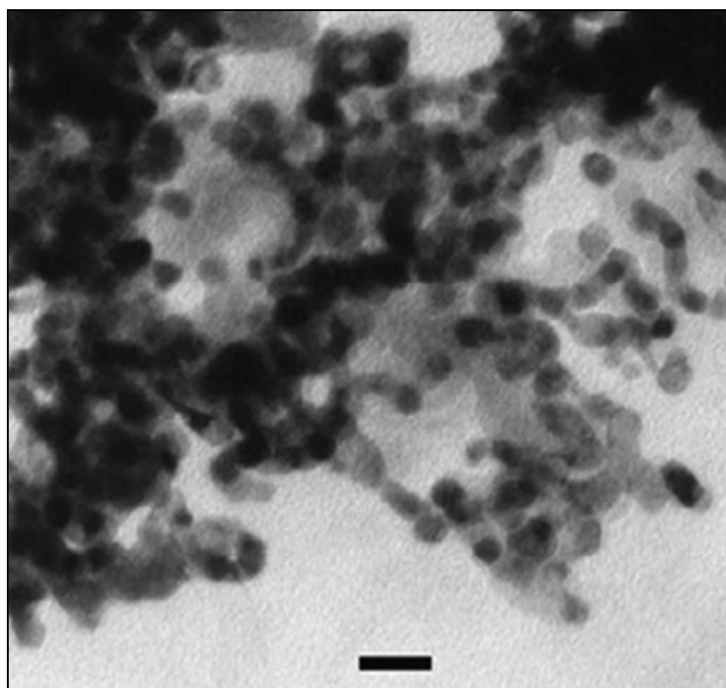


Figura 15. Microfotografía electrónica de transmisión de nanopartículas de hierro recubiertas por oro, obtenidas mediante el método de microemulsión. Longitud de la barra: 25 nm. Reproducido de Carpenter, 2001. Copyright Elsevier (2001).

➤ *Método de descomposición de compuestos organometálicos.* Los óxidos metálicos se preparan mediante descomposición de compuestos organometálicos, empleando altas temperaturas (termólisis) o mediante la utilización de ultrasonidos (sonólisis). La primera técnica se utiliza en la síntesis de partículas superparamagnéticas de hierro, de cobalto y de aleaciones de hierro [Behrens y cols., 2006; Charles, 2003; Hess y Parker, 1966; Puentes y cols., 2001; Rosenweig, 1997; van Worterghem y cols., 1986]. Básicamente el procedimiento consiste en la descomposición térmica de precursores organometálicos de las nanopartículas en una disolución de hidrocarburo. La geometría de las partículas depende de la velocidad de calentamiento, de la temperatura de la reacción y de la composición del medio de síntesis. Las partículas así obtenidas se caracterizan por una distribución de tamaños muy estrecha (Figura 16) [Hyeon y cols., 2001; Rockenberger y cols., 1999; Sun y Zeng, 2002]. La segunda (sonólisis) se utiliza para la obtención de nanopartículas de óxido de hierro por medio de reacciones inducidas por ultrasonidos (reacciones sonoquímicas) [Pinkas y cols., 2008]. Los procesos sonoquímicos se basan en los efectos de cavitación producidos por el colapso que experimentan las gotículas de precursores férricos, por ejemplo,  $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  o  $\text{Fe}(\text{OAc})_2$ , cuando son sometidas a ondas acústicas de 20 kHz (ultrasonidos) [Huang y cols., 2002; Schmidt, 2001; Vijaya Kumar, 2001]. Factores tales como la velocidad de enfriamiento, el nivel de mezcla atómica, el empleo de disolventes orgánicos y la naturaleza de las reacciones sonoquímicas influyen en la composición, la morfología, la cristalinidad y, en definitiva, en el control de la naturaleza química de los fluidos ferromagnéticos obtenidos [Mukh-Qasem y Gedanken, 2005; Pinkas y cols., 2008].

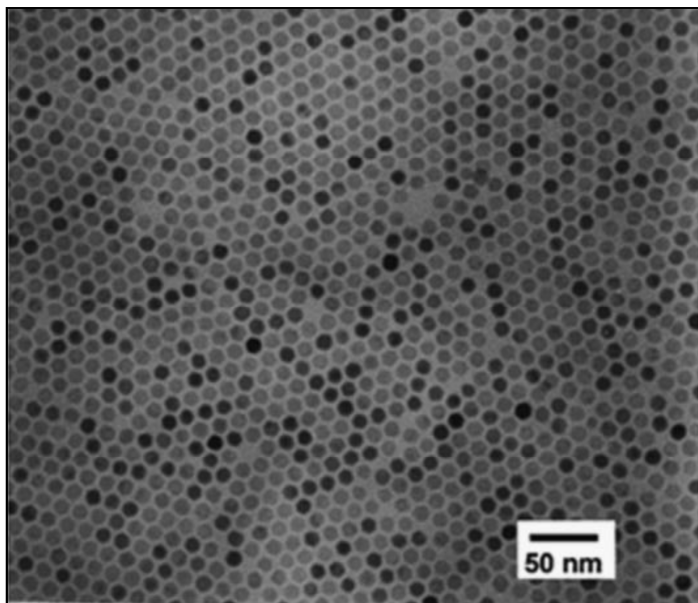


Figura 16. Microfotografía electrónica de transmisión de nanocristales de maghemita obtenidos mediante descomposición térmica de  $\text{Fe}(\text{CO})_5$ . Reproducido de Hyeon y cols., 2001. Copyright American Chemical Society (2001).

- ☞ *Método de los aerosoles.* La reacción química que determina la formación de nanopartículas de óxido de hierro transcurre de forma controlada en las nanogotículas que constituyen la fase interna de este sistema disperso (Figura 17). La geometría de las gotículas determina la forma y el tamaño de las partículas obtenidas. Este método se caracteriza por un gran rendimiento y por una gran versatilidad en la modificación de la superficie del material obtenido con polímeros y compuestos inorgánicos [Matijević y Partch, 2000; Tartaj y cols., 2003]. Se han desarrollado dos variantes a esta técnica: aspersión y pirolisis mediante láser [Cannon y cols., 1982; González-Carreño y cols., 1993; LaMer y Dinegar, 1950; Morales y cols., 1999; Ocaña y cols., 1995].

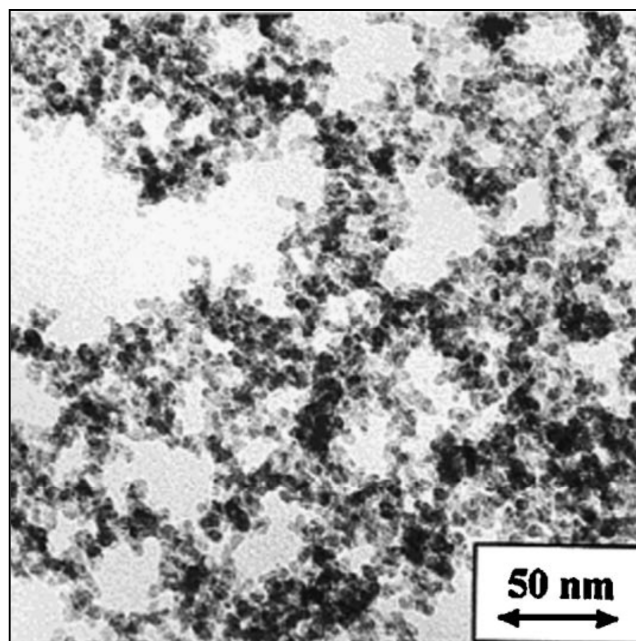


Figura 17. Microfotografía electrónica de transmisión de nanopartículas de maghemita formuladas según el método de los aerosoles con pirolisis mediante láser. Reproducida de Morales y cols., 1999. Copyright American Chemical Society (1999).

➤ *Método de co-precipitación en solución.* Permite la síntesis de coloides inorgánicos de geometría uniforme mediante la precipitación de precursores químicos en disolución [Arias y cols., 2001; Bee y Massart, 1995; LaMer y Dinegar, 1950; Sugimoto y Matijević, 1980]. Es probablemente el método más simple y eficiente para la obtención de partículas magnéticas. Este método se basa en la separación, la nucleación y el crecimiento de partículas de hidróxido de hierro. La nucleación ocurre cuando la concentración de las especies químicas alcanza una supersaturación crítica. A continuación, se produce un crecimiento lento por difusión de los solutos hacia la superficie del cristal. Para producir nanopartículas con homogeneidad de tamaño, la nucleación debe ser independiente del proceso de crecimiento de las

nanopartículas [Reddy y cols., 2012]. El subsiguiente proceso de envejecimiento u oxidación en la solución determina la formación de nanopartículas de magnetita u otras ferritas, como por ejemplo maghemita [Pérez-Artacho y cols., 2012]. La cinética de esta reacción ha sido ampliamente investigada [Matijević y Sapiieszko, 2000; Ocaña y cols., 1995]. La variante más ampliamente utilizada por su versatilidad y sencillez es la propuesta por Massart [Massart, 1981; Viota y cols., 2007].

En este trabajo de investigación hemos seguido el método de co-precipitación en solución [Massart, 1981]. La experiencia de nuestro grupo de investigación en esta metodología nos permite afirmar que pueden obtenerse nanopartículas de magnetita de morfología cúbica y tamaño muy pequeño ( $< 20$  nm) y con una distribución estrecha de tamaños [Arias y cols., 2011a; Clares y cols., 2013; Viota y cols., 2007]. En concreto, la metodología de síntesis comienza con la adición a una solución acuosa de amoníaco (500 mL, 0.7 M), a temperatura ambiente y gota a gota, de una solución acuosa de cloruro férrico (40 mL, 1 M) y una solución acuosa de cloruro ferroso (10 mL, 2 M; que contiene una concentración 2 M de HCl). Bajo estas condiciones, se produce la formación espontánea de las nanopartículas de magnetita, las cuáles son recogidas en el fondo del recipiente de la reacción mediante sedimentación magnética (imán de 400 mT). A continuación, se elimina el medio donde ha transcurrido la reacción. La última fase del procedimiento de síntesis consiste en la estabilización de las nanopartículas de magnetita en una disolución acuosa de ácido perclórico 2 M durante 12 horas. De esta manera, aseguramos que las partículas de este óxido de hierro se mantengan aisladas en el medio de dispersión, no formándose agregados de mayor tamaño por inestabilidad termodinámica. Tras la estabilización se elimina el  $\text{HClO}_4$  mediante decantación y se redispersa en agua bidestilada (Figura 18). En el caso de que estas nanopartículas no se utilicen inmediatamente, se desecan en una estufa de

deseccación [P-Selecta, España] a  $40.0 \pm 0.5$  °C, conservándolas en estado seco hasta su utilización.

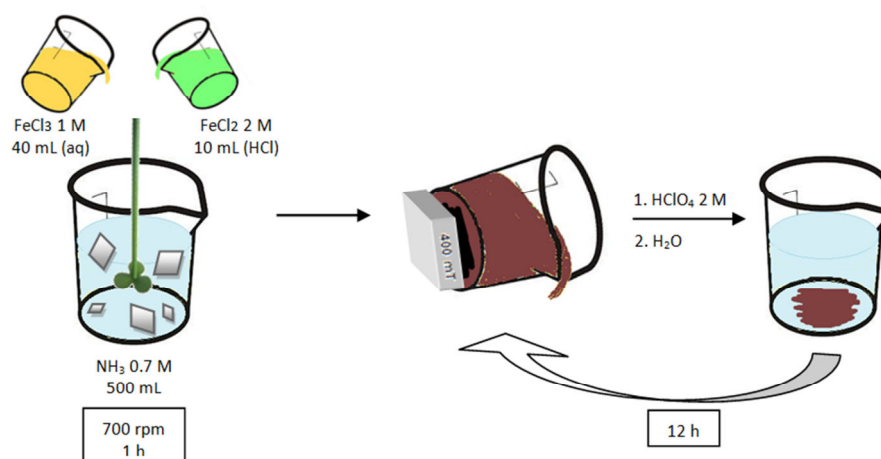


Figura 18. Síntesis de magnetita por el método de co-precipitación.

#### 3.1.2. TRIMIRISTATO DE GLICEROL

El trimiristato de glicerol es un éster con la fórmula química  $\text{C}_{45}\text{H}_{86}\text{O}_6$  (Figura 19). Es un ácido graso saturado cuyo triglicérido es el ácido mirístico. Se encuentra de manera natural en muchas grasas vegetales y aceites. El trimiristato de glicerol es un sólido blanquecino insoluble en agua, pero soluble en etanol, benceno, cloroformo, diclorometano y éter [Richter, 1951].

Tiene un peso molecular de 723.16 g/mol, una densidad de  $0.885 \text{ g/cm}^3$  a una temperatura de 60 °C. Su punto de fusión se encuentra a 56-57 °C y su punto de ebullición a 311 °C.

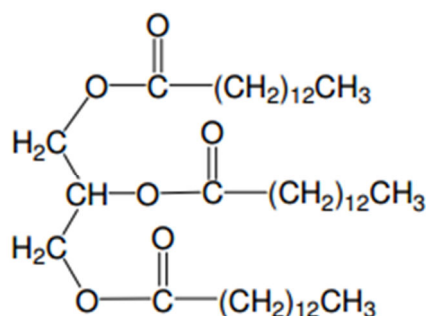


Figura 19. Estructura del trimiristato de glicerol.

El trimiristato de glicerol se aísla de la nuez moscada en polvo (Figura 20). Es una extracción simple, ya que el aceite de nuez moscada generalmente contiene más del ochenta por ciento de trimiristato de glicerol [Dickson, 2010; Lugemwa, 2012]. La separación generalmente se realiza por destilación de vapor, y la purificación se realiza mediante la extracción del éter, seguida de la destilación o la rotaevaporación para quitar el solvente volátil. La extracción de trimiristato de glicerol también se puede realizar con el éter dietílico a temperatura ambiente, debido a su alta solubilidad en el éter.

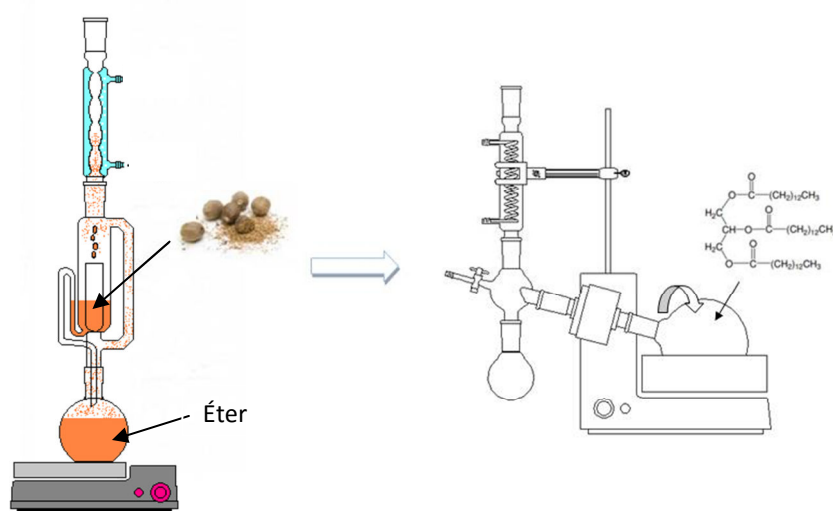


Figura 20. Extracción de trimiristato de glicerol a partir de nuez moscada.



Una vez evaporado el éter, se disuelven los residuos del matraz en acetona y se pone en un baño con hielo para recrystalizar el lípido. Los cristales resultantes se filtran y se dejan secar a temperatura ambiente.

El trimiristato de glicerol se degrada al someterlo a hidrólisis ácida, hidrólisis básica, condiciones oxidativas, calor seco y degradación fotolítica [Bindu y Kumar, 2013].

La preparación de las NLS se ha realizado mediante la técnica de la doble emulsión ( $a_1/o/a_2$ ) con evaporación de disolventes [García-Fuentes y cols., 2003; Nabi-Meibodi y cols., 2013; Qi y cols., 2011] (Figura 21). Las condiciones de trabajo incluían una temperatura de  $4.0 \pm 0.5$  °C, mantenida mediante un baño de hielo.

Brevemente, en primer lugar se preparó la fase lipídica u orgánica, mediante la disolución de 0.75% p/v de lecitina de soja granulada y 0.4% p/v de trimiristato de glicerol en 10 mL de diclorometano [Martins y cols., 2009, Muñoz-Escalona y cols., 2015; Qi y cols., 2011]. Esta fase orgánica se mezcla con una primera fase acuosa, constituida por 4 mL de agua destilada, emulsionadas mediante sonicación (3 x 1 minuto) (Branson Sonifier 450, Estados Unidos) en un baño de hielo.

La emulsión primaria obtenida se vierte seguidamente en 40 mL de la segunda fase acuosa (agua destilada al 0.5% p/v de Pluronic® F-68, preparada con anterioridad), y se mantiene en agitación a 1000 rpm durante 30 minutos sobre un baño de hielo. El disolvente empleado es volátil, a fin de permitir su eliminación, se efectuó su evaporación en un rotavapor (Büchi R-215, Suiza) en vacío y bajo agitación a 300 rpm.

Finalmente, la suspensión de nanopartículas se sometió a repetidos ciclos de centrifugación (11000 rpm, 30 minutos) (Beckman Coulter, Estados Unidos) y redispersión en agua bidestilada hasta que se comprobó que la conductividad del sobrenadante obtenido era inferior a 10  $\mu$ S/cm (Crison microcm 2202, España). Los

experimentos de síntesis de NLS se realizaron por septuplicado para demostrar su reproducibilidad.

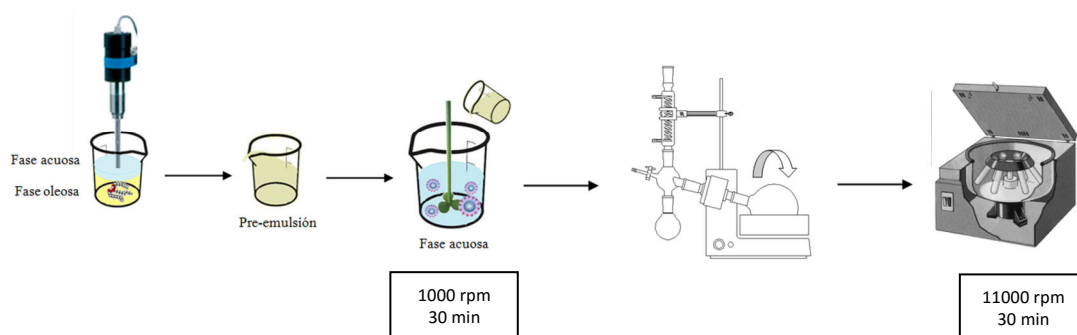


Figura 21. Síntesis de nanopartículas lipídicas sólidas.

#### 3.1.3. NANOPARTICULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MAGNÉTICAS

De forma general, las nanopartículas magnéticas constituidas por un núcleo magnético se sintetizan mediante un proceso que implica la inclusión de los núcleos magnéticos en el interior de la matriz. [Arruebo y cols., 2007; Elaissari y cols., 2003; Pankhurst y cols., 2003; Tartaj y cols., 2003]. Numerosas investigaciones describen estos nanosistemas, su formulación y sus principales características. Como ejemplo, podemos citar:

a) Nanopartículas de magnetita recubiertas por almidón y modificadas superficialmente con iones de fosfato para facilitar la incorporación del fármaco antitumoral [Alexiou y cols., 2000, 2001, 2006; Jurgons y cols., 2006].

b) Nanopartículas de óxido de hierro (magnetita) o hierro embebidas en una matriz polimérica biodegradable, que se forma tras una reacción de polimerización [poli(alquilianocrilato)] [Arias y cols., 2006] o de precipitación (etilcelulosa, PLA) [Arias

y cols., 2007; Gómez-Lopera y cols., 2006]. La incorporación del agente antitumoral en la matriz polimérica se produce eficazmente durante su formación

c) Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por carbono o sílice que permiten el transporte de agentes anticancerosos con la ayuda de pequeños implantes magnéticos localizados en el lugar de acción mediante cirugía menor, o mediante gradientes magnéticos aplicados externamente [Arruebo y cols., 2006a, b; Behrens y cols., 2006; Fernández-Pacheco y cols., 2006; Tartaj y cols., 2001, 2002].

El método de síntesis propuesto se basa en el utilizado para las NLS (método de la doble emulsión). En definitiva, se trata de incluir en la matriz sólida lipídica partículas de magnetita. Brevemente, el proceso de síntesis comenzó con la emulsión de 4 mL de una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita en 10 mL de diclorometano que contiene un 0.4 % (p/v) de lípido y 0.75% p/v de lecitina de soja granulada. Seguidamente, bajo agitación mecánica (1000 rpm, 30 minutos) en un baño de hielo, se adiciona a una segunda fase acuosa (40 mL) al 0.5% p/v de Pluronic® F-68. Finalmente la limpieza de las NLSM se realizó mediante sedimentación magnética, sometiendo la suspensión a dos ciclos consecutivos de exposición a un imán de 400 mT durante 5 minutos, procediendo a continuación a la eliminación del sobrenadante y a la redispersión del precipitado de nanopartículas en agua bidestilada.

## **Capítulo 4.**

# **Caracterización fisicoquímica**



## 4.1. ESTUDIO GEOMÉTRICO

La forma y el tamaño de las nanopartículas afecta directamente a su uso terapéutico, por ello es muy importante controlar los parámetros geométricos en el proceso de producción. Es importante su estudio para determinar las propiedades toxicológicas de las nanopartículas, ya que esto influye en la habilidad de las partículas para penetrar a través de las barreras biológicas [Levin y cols., 2015].

La geometría (forma y tamaño) de las partículas sintetizadas fue estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) (STEM Philips CM20, Holanda) y mediante microscopía electrónica ambiental de barrido (ESEM) (FEI, Quanta 400, Estados Unidos).

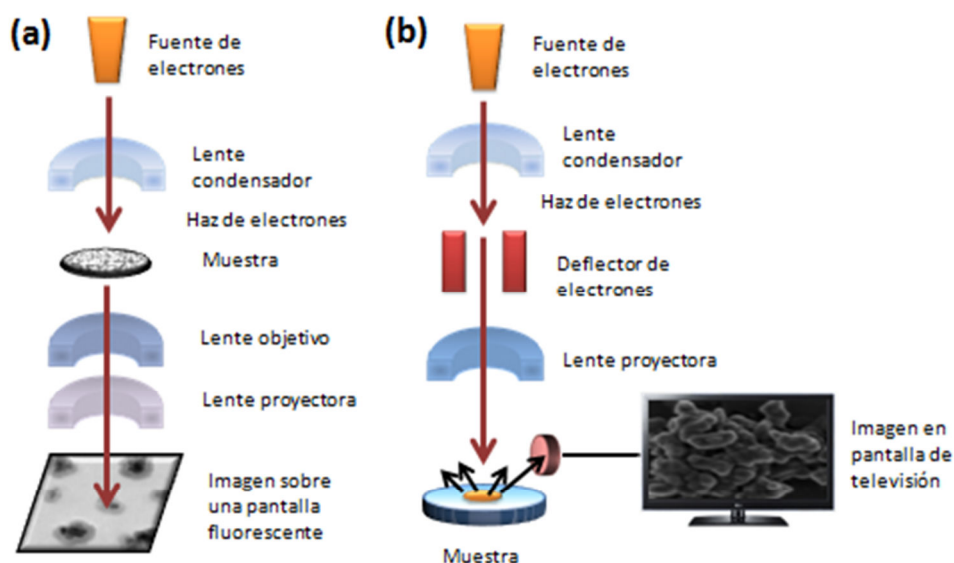


Figura 22. Esquema de la estructura del (a) microscopio electrónico de transmisión de alta resolución y del (b) microscopio electrónico de barrido ambiental.

El microscopio electrónico de transmisión de alta resolución se compone de un sistema de vacío, una pantalla donde se proyecta una imagen aumentada de la muestra y una cámara fotográfica o pantalla de ordenador para registrar la imagen. Dentro del sistema de vacío se encuentran un cañón que produce un haz de electrones y un sistema de lentes electromagnéticas (Figura 22a). La iluminación proviene de un cañón situado dentro del sistema de vacío, que produce un haz de electrones que son acelerados al aplicar un potencial negativo (100 kV – 1000 kV) y dirigidos por las lentes condensadoras sobre la muestra. Una parte de los electrones chocan y rebotan, mientras que otros atraviesan la muestra son recogidos y focalizados por la lente proyectora formando la imagen en una pantalla fluorescente. Gracias a la lente proyectora la imagen podrá ser aumentada aún más [Williams y cols., 2009].

Por otro lado, en el microscopio electrónico de barrido se hace incidir un delgado haz de electrones acelerados sobre una muestra opaca a los electrones (Figura 22b). Este haz se focaliza sobre la superficie de la muestra de forma que realiza un barrido de la misma. La señal emitida por los electrones retrodispersados se recoge mediante un detector y se amplifica para cada posición de la sonda, mostrando la topografía de la muestra.

La determinación del tamaño medio de partícula ( $\pm$  desviación estándar) se obtuvo mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS) (Malvern 4700 analyzer, Malvern Instruments, Inglaterra). Esta técnica se basa en el análisis de la función de autocorrelación de la luz láser dispersada por la suspensión de partículas en movimiento térmico. La determinación es independiente de factores externos, salvo la viscosidad y la temperatura del medio y, como hace que las orientaciones de las partículas sean aleatorias, minimiza cualquier posible efecto de su forma (Figura 25).

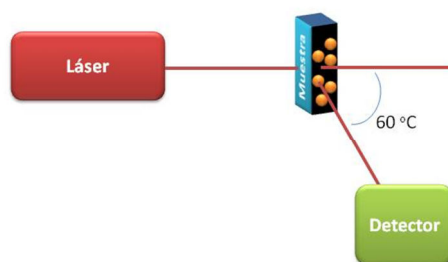


Figura 25. Esquema de la determinación del tamaño mediante espectroscopía de correlación de fotones.

### 4.1.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para visualizar las nanopartículas en el microscopio electrónico de transmisión se prepararon suspensiones diluidas en etanol, mediante ultrasonidos. A continuación, se tomó una gota de esta suspensión con una pipeta Pasteur y se depositó sobre una rejilla de cobre y se dejó evaporar el solvente en condiciones ambientales durante 12 horas. La rejilla así preparada se introdujo en el microscopio.

Para la preparación de las muestras, estas se transfieren a un contenedor poroso y se fija con tetraóxido de osmio, se deshidratan de manera gradual con diluciones de etanol al 10%, 20%, 30%, etc, hasta llegar al etanol 100%. A continuación, las muestras se secan al aire, y seguidamente se procede a adherirlas a una base metálica y se recubre con una aleación de oro-paladio [Hayat, 1974].

Bajo las condiciones de formulación indicadas para cada una de las nanopartículas, se analizaron muestras de suspensiones acuosas diluidas ( $\approx 0.1\%$ , p/v) de cada una de ellas, fijando el ángulo de scattering en  $60^\circ$ .



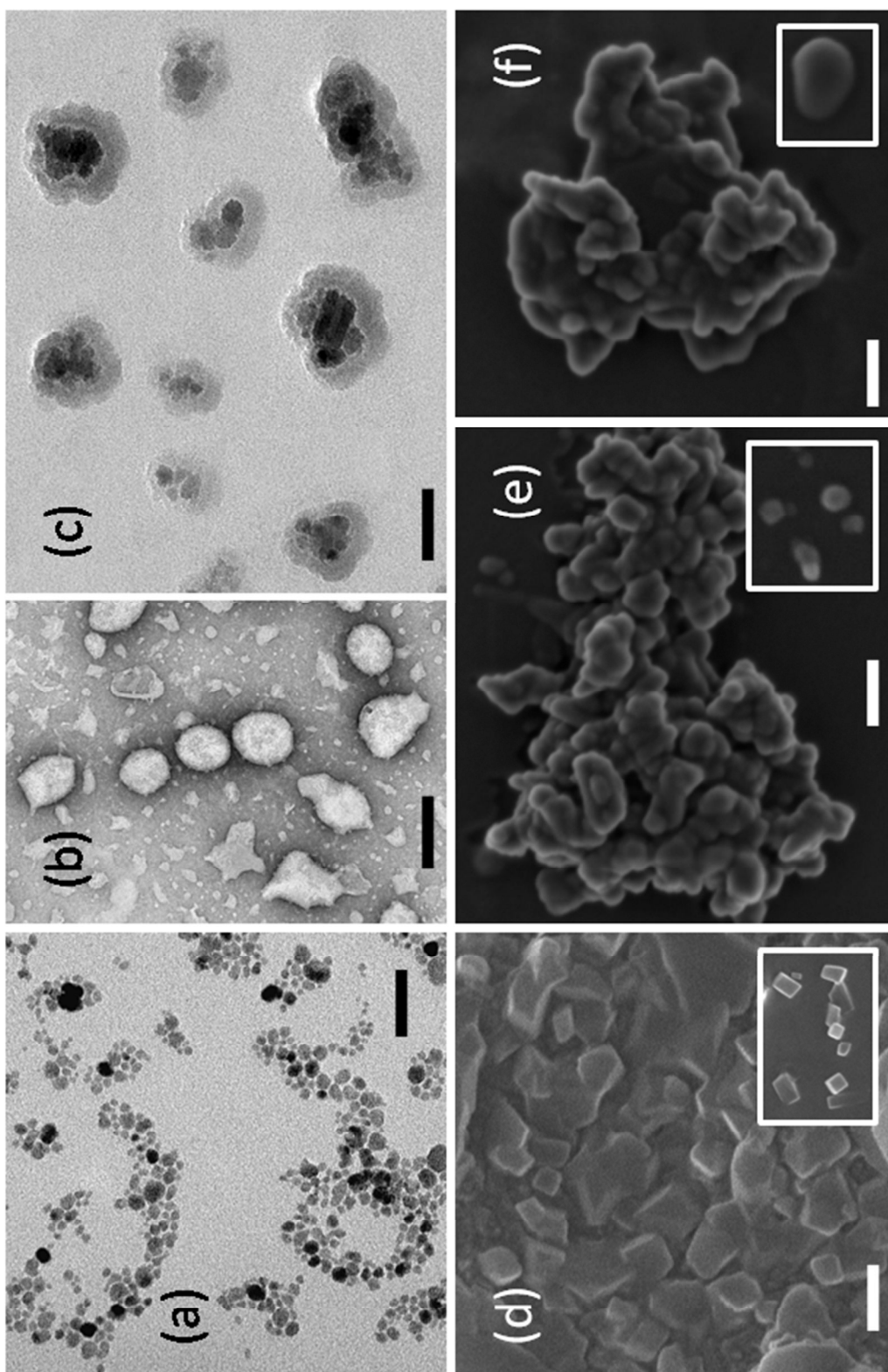


Figura 24. Microfotografías de transmisión de alta resolución (HRTEM) de nanopartículas de (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (b) NLS y (c) NLSM (relación de masas TG: $\text{Fe}_3\text{O}_4$ :2). Microfotografías electrónicas de barrido (ESEM) de nanopartículas de (d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (e) NLS y (f) NLSM (relación de masas TG: $\text{Fe}_3\text{O}_4$ :4:2). Figuras insertadas: microfotografías detalladas de ESEM de las partículas. Longitud de barras: (a, b, c y f) 100 nm, y (e) 200 nm.

En la figura 24 (a y d) puede apreciarse que las partículas de magnetita presentan una morfología cúbica, un tamaño inferior a 20 nm y una superficie aparentemente lisa. Las NLS obtenidas (Figura 24 b y e) presentaron una morfología ovalada con tendencia a esférica y una superficie lisa. En el caso de las NLSM (Figura 24 c y f), se puede observar que la inclusión de las partículas magnéticas en el núcleo es completo y patente. Como puede establecerse por comparación entre la figura 24b y la figura 24c, los núcleos de magnetita quedan embebidos en la matriz lipídica coincidiendo con la morfología de las NLS puras. Es más, las microfotografías de ESEM (Figura 24 d, e y f) muestran cómo externamente las NLS puras y las compuestas son indistinguibles, y claramente diferentes a las partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Estas microfotografías definen la gran eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos por el lípido biodegradable.

La muestra de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, fue sonicada previamente durante 5 minutos. El tamaño medio determinado de estas partículas fue  $12 \pm 2$  nm, por lo que pueden considerarse superparamagnéticas [López-López y cols., 2005].

El tamaño de NLS medio obtenido es de  $114 \pm 12$  nm, muy apropiado para la vía de administración parenteral [Arias y cols, 2010a].

Finalmente, el análisis del tamaño de las NLSM permitió confirmar el pequeño tamaño de éstas observado en microscopía electrónica. El tamaño medio y la desviación estándar determinados es  $171 \pm 20$  nm.

El método de síntesis seguido permite la incorporación de un núcleo magnético sin importar la naturaleza hidrofóbica del fármaco, además de conseguir un tamaño adecuado para la vía de administración parenteral [Igartua y cols., 2002; Müller y cols., 1996].

Si bien las condiciones de síntesis ya descritas son las que posibilitan el mayor rendimiento en la obtención de NLSM, para llegar a esta conclusión fue necesario el

## Capítulo 4. Caracterización fisicoquímica

análisis del efecto que tienen las diferentes proporciones de masas TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sobre el resultado de la síntesis. En concreto, variamos las proporciones de TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> desde 1:4 a 4:1, manteniendo el resto de la metodología como ya se ha indicado.

El rendimiento de la reacción de síntesis fue calculado mediante la ecuación 1:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{masa total obtenida de NLSM (mg)}}{\text{masa total utilizada de material (mg)}} \cdot 100 \quad (1)$$

Proporción de masas iniciales TG:Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Tamaño (nm)	Morfología	Redispersión	Rendimiento (%)
1:4	170 ± 30	Esférica	Muy buena	16 ± 4
2:4	175 ± 35	Esférica	Muy buena	24 ± 3
3:4	160 ± 40	Esférica	Muy buena	40 ± 5
4:4	185 ± 25	Esférica	Muy buena	59 ± 5
4:3	170 ± 40	Esférica	Muy buena	68 ± 4
4:2	180 ± 40	Esférica	Muy buena	93 ± 3
4:1	165 ± 35	Esférica	Razonable	51 ± 6

Tabla 5. Efecto de la proporción de masas iniciales TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en la geometría, redispersión y rendimiento de síntesis (%) de las NLSM.

El análisis de la influencia de esta relación de masas iniciales TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sobre el rendimiento de la síntesis, permitió comprobar que este era máximo para una proporción 4:2 (≈ 93 %), seguido de la proporción 4:3 (≈ 68 %) (Tabla 5).

En estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha puesto de manifiesto que cuando hay un exceso en la cantidad de núcleos magnéticos utilizados con respecto al material de recubrimiento, como ocurre en el caso de las proporciones inferiores, puede esperarse que un gran número de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> no queden englobadas en la matriz que se forma [Arias y cols., 2001, 2006, 2008a]. Así, el rendimiento de la síntesis será menor. Por el contrario, si la relación es 4:1 la cantidad

de lípido será mucho mayor, y por tanto, no se formarán NLSM en cantidad suficiente, consiguiendo un bajo rendimiento. Además, de acuerdo con lo observado en estudios anteriores [Arias y cols., 2001, 2006, 2008a], a medida que se incrementa la cantidad de material de recubrimiento con respecto a la masa de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , el grosor del recubrimiento de los núcleos magnéticos tiende a ser algo mayor. Esto podría tener como consecuencia interesante que la cantidad de fármaco vehiculizada por las NLSM sea mayor, al aumentar el grosor (o, lo que es lo mismo, la cuantía) del lípido que forma parte de éstas. El hecho de que el sobrenadante de las nanopartículas compuestas obtenidas con la relación 4:2 sea totalmente transparente, hace pensar que todo el material utilizado en la formulación de NLSM se ha transformado en estas nanopartículas compuestas. De hecho, el rendimiento es  $\approx 93\%$  (tabla 4). Por último, pensamos que cuando hay un exceso de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sobre el lípido (en concreto, en la relación 3:4) todo el triglicérido utilizado pasa a formar parte de los recubrimientos de los núcleos magnéticos. Sin embargo, este exceso en  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  hace que haya núcleos magnéticos no recubiertos que permanecerán aislados en suspensión, haciendo que el rendimiento de la síntesis sea inferior al obtenido con la relación de masas 4:2. Por ello, estas fueron las condiciones utilizadas en todo el resto del trabajo de síntesis de NLSM.

## 4.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA

### 4.2.1. DIFRACTOMETRÍA DE RAYOS X

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas con energía fotónica entre 100 eV y 100 keV. Si bien, en difracción de rayos X se usan sólo radiaciones de onda (hasta 0.1 Å). Ya que su longitud de onda ( $\lambda$ ) es similar al tamaño de los átomos, estas radiaciones son ideales para ver la disposición de los átomos y moléculas en muchos

materiales. Los rayos X penetran profundamente en la materia, dándonos por tanto importante información sobre su estructura. Los rayos X se generan cuando un haz de electrones acelerados bombardea un campo de alta tensión fijo o estacionario. El haz de electrones choca contra los átomos del material emitiendo un espectro continuo de rayos X. Los átomos altamente energéticos por ionización expulsan electrones a la capa inferior y cuando ésta se llena emite un fotón que informa de las características del material objeto de estudio. Puede decirse, por lo tanto, que la difracción es el fenómeno de dispersión de rayos X en el que participan todos los átomos del material irradiado (Figura 26).

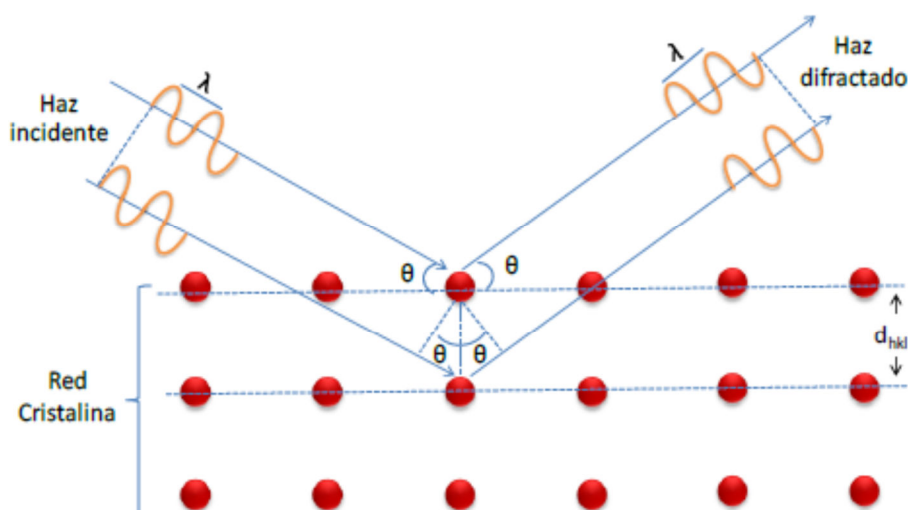


Figura 26. Esquema de la difracción de rayos X por los planos de átomos.

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

Como hemos comentado, los rayos X interactúan con los electrones de los átomos del material. Cuando el fotón generado choca con los rayos X, algunos se desvían generando una [Als-Nielsen y McMorro, 2001; Bowen y Tanner, 1998; Drenth, 2007]:

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

↻ **Dispersión inelástica:** los rayos X transfieren parte de la energía a los electrones, por lo que la longitud de onda cambia.

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

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

Los triglicéridos pueden encontrarse en tres formas polimorfas,  $\alpha$ ,  $\beta'$  y  $\beta$  (Figura 27) [Bunjes y cols., 2007]. La forma  $\beta$  es la más estable termodinámicamente, seguida

de la  $\beta'$  y la  $\alpha$ . Estas se caracterizan por diferentes empaquetamientos de las cadenas lipídicas, diferentes ángulos de inclinación de las cadenas lipídicas, en lo que concierne a las capas moleculares del glicérido, y las diferentes densidades. Los diferentes empaquetamientos conllevan reflexiones de rayos X características permitiendo su identificación. Se observan con frecuencia las formas  $\alpha$  y  $\beta$  en los triglicéridos saturados, tanto en polvo cristalino como en dispersiones coloidales [Bunjes y cols., 2003; Timms, 1984; Westesen y cols. 1993, 1997], donde la forma  $\beta'$  ocurre bajo condiciones especiales [Kellens y cols. 1991].



Figura 27. Representación esquemática de los difractogramas de rayos X de los diferentes polimorfismos de los triglicéridos.

La modificación  $\beta'$  se observa en triglicéridos complejos y en mezclas de triglicéridos, donde a menudo representa la forma estable de almacenamiento [Jenning y cols., 2000; Schubert y Müller-Goymann, 2005; Westesen y cols., 1997].

La difracción de rayos X permite comparar de forma cualitativa los tres tipos de partículas que hemos sintetizado [Billmeyer, 1975; Suryanarayanan, 1995], además de evaluar el tipo de red cristalina que lo caracteriza. Nuestro objetivo es confirmar que el difractograma de rayos X de las NLSM recoge las peculiaridades de los dos tipos de materiales que las componen. Esto sería una prueba evidente de la eficacia del método de formulación desarrollado. Además, pretendemos comprobar que la

estructura cristalina de los núcleos de magnetita no sufre alteración alguna al ser englobada en la matriz de lipídica. Esto es muy importante ya que una alteración de este tipo podría llegar a condicionar las propiedades magnéticas de la NLSM.

### 4.2.1.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este tipo de trabajo experimental debe cuidarse muy bien la preparación de la muestra, para así conseguir datos reproducibles y fiables. Los puntos críticos son el tamaño cristalino, la orientación preferida de la muestra en el soporte y, la coplanaridad de la muestra y el soporte superficial. Al depositar una muestra pulverizada en un soporte de rayos X, la distribución del cristal puede no ser al azar, produciéndose lo que se llama orientación preferida de la muestra. Esto puede afectar a la orientación de los cristales y, de esta forma, ejercer un efecto negativo en el análisis del material. Para minimizar en lo posible la aleatoriedad con la que se produce este fenómeno, los soportes que se utilizan comúnmente son platos rectangulares de aluminio o vidrio, que contienen una ventana rectangular en la que se empaqueta el polvo.

Para la preparación de la muestra, se desecan las nanopartículas recién sintetizadas en una estufa de desecación [P-Selecta, España] a  $40 \pm 0.5$  °C. Se trituran hasta obtener un fino polvo homogéneo y mediante una prensa se compacta el polvo obtenido. La masa utilizada en el análisis ( $\approx 0.5$  g) fue la misma para todos los materiales.

Los difractogramas de rayos X de los tres tipos de materiales ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , NLS y NLSM) se realizaron mediante el método de Debye-Scherrer. El dispositivo empleado fue un difractómetro de monocristal con detector de área Brucker Smart Apex (Estados Unidos), utilizando una longitud de onda de  $1.5405 \text{ \AA}$  ( $\text{Cu-K}_\alpha$ ).



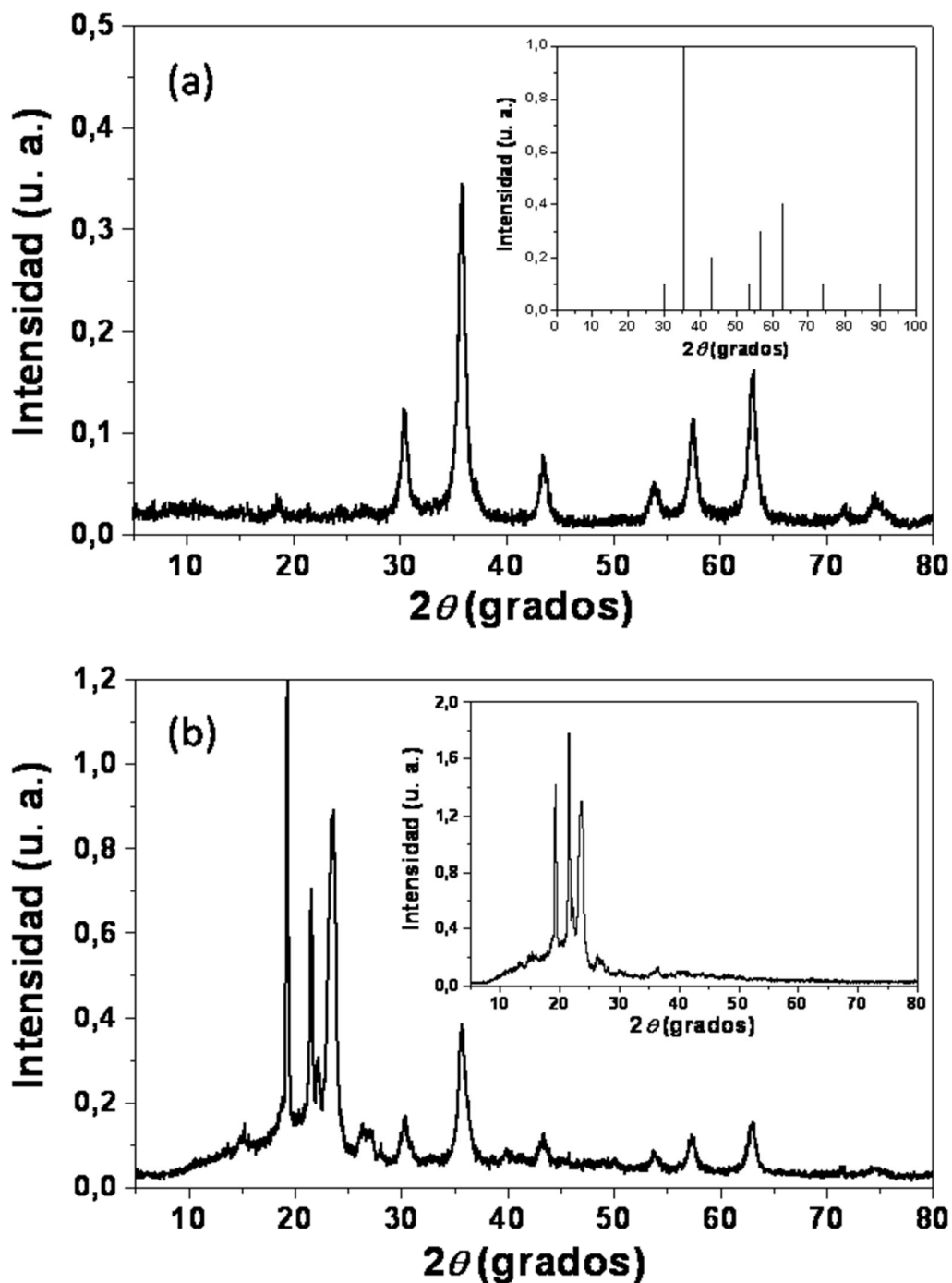


Figura 28. Difractograma de rayos X de (a) las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (figura insertada: patrón ASTM de difracción de rayos X de la Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), y (b) de las NLSM (preparadas partiendo de una relación de masas TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> de 4:2) (figura insertada: difractograma de rayos X de las NLS).

La intensidad se expresa en unidades arbitrarias (u.a.).

En la figura 28 se recogen los difractogramas obtenidos. Al comparar los difractogramas de la magnetita y de las partículas compuestas con el patrón de la *American Society for Testing and Materials* (patrón ASTM) de la magnetita (ver el detalle de la figura 28a), se comprueba la perfecta coincidencia de las líneas del difractograma con las del patrón, lo que permite identificar la muestra como magnetita. Estos picos también se observan en el difractograma de rayos X de las NLSM (Figura 28b), demostrando la elevada cristalinidad del óxido de hierro (tamaño de gramo  $\approx 300 \text{ \AA}$ ), incluso tras ser recubierto por el lípido. El carácter cristalino del trimiristato de glicerol también se observa en los difractogramas (Figura 28b).

Es muy interesante comprobar cómo los picos característicos del trimiristato de glicerol se encuentran presentes en el difractograma de rayos X de las nanopartículas compuestas, aunque con una menor intensidad. Esto es lógico si consideramos que a igualdad de masa utilizada en el análisis, la cantidad de lípido presente en la muestra de NLSM debe ser menor. Consideramos también que los resultados ofrecen una nueva prueba de la eficacia de la metodología de formulación de las NLSM.

### 4.2.2. ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER

El objetivo que pretendemos con el análisis de las nanopartículas en el infrarrojo es conferir a nuestro estudio una nueva prueba de la eficacia de la metodología de síntesis de las NLSM. Estas nanopartículas deben tener un espectro de infrarrojos en el que aparezcan las bandas características del trimiristato de glicerol, junto con la banda propia de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . De esta manera, quedará demostrado que las partículas magnéticas compuestas están constituidas por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y trimiristato de glicerol.

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

La utilización del espectro de infrarrojos por sí mismo debe servir para confirmar cualitativamente la formación de los nanocompuestos. La frecuencia o longitud de onda de absorción depende de las masas relativas de los átomos, las constantes de fuerza de los enlaces, la geometría de los átomos y el entorno. Una molécula simple puede generar un espectro extremadamente complejo, característico de la molécula entera (excepto los enantiómeros). No se puede realizar un tratamiento preciso de las vibraciones de una molécula compleja. Por este motivo, el espectro de infrarrojos debe interpretarse a partir de la comparación empírica y la extrapolación a estudios de moléculas sencillas, ya que hay determinados grupos de átomos que generan bandas de igual o similar frecuencia independientemente de la estructura del resto de la molécula. Estas bandas características permiten obtener información estructural mediante simple inspección y referencia a tablas de absorción característica de grupos funcionales (Tabla 6) [Silverstein y Webster, 1998].

Enlace	Tipo de compuesto	Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )
$\begin{array}{c}   \\ -C-H \\   \end{array}$	Alcanos	2800 – 3000
$\begin{array}{c}   \\ =C-H \end{array}$	Alquenos, aromáticos	3000 – 3100
$\equiv C-H$	Alquinos	3300
$-O-H$	Alcoholes, fenoles	3600 – 3650 (libre) 3200 – 3500 (unión a - H) (extremo)
$\begin{array}{c} O \\ // \\ -C \\ \backslash \\ O-H \end{array}$	Ácidos carboxílicos	2500 – 3300
$\begin{array}{c}   \\ -N-H \end{array}$	Aminas	3300 – 3500 (doble para NH <sub>2</sub> )
$\begin{array}{c} O \\    \\ -C-H \end{array}$	Aldehídos	2720 y 2820
$\begin{array}{c}   \quad   \\ -C=C- \end{array}$	Alquenos	1600 – 1680
$\begin{array}{c}   \quad   \\ -C=C- \end{array}$	Aromáticos	1500 – 1600
$-C\equiv C-H$	Alquinos	2100 – 2270
$\begin{array}{c} O \\    \\ -C- \end{array}$	Aldehidos, cetonas, ácidos carboxílicos	1680 – 1740
$-C\equiv N$	Nitrilos	2220 – 2260
$C-N$	Aminas	1180 – 1360
$-C-H$	Alcanos	1375 (methyl)
$-C-H$	Alcanos	1460 (metilo y metileno)
$-C-H$	Alcanos	1370 y 1385 (rotura de isopropilo)

Tabla 6. Frecuencias de absorción de los enlaces más comunes.

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

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

### 4.2.2.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para el análisis de las muestras, las nanopartículas recién sintetizadas se desecan en una estufa de desecación [P-Selecta, España] a  $40 \pm 0.5$  °C, y se trituran hasta obtener un fino polvo homogéneo, del cual se toma una pequeña cantidad de material (0.5 - 1.0 mg) y se deposita en el instrumento. Con ayuda de la prensa del equipo, se compacta la muestra hasta conseguir ejercer una presión adecuada para la realización del análisis.

Para la obtención del interferograma se utiliza un espectrómetro de infrarrojos con una resolución de 1  $\text{cm}^{-1}$  (SpectrumTwo, Perkin Elmer, Estados Unidos). La técnica implica la división de la radiación que contiene todas las longitudes de onda (en nuestro caso: 4000 – 450  $\text{cm}^{-1}$ ) en dos rayos. Uno tiene un camino óptico fijo y el otro variable (a través de un espejo móvil). La superposición de los rayos dará lugar a un patrón de interferencias que por transformada de Fourier se convierte en un punto en el dominio de la frecuencia. El paso de la radiación a través de una muestra permitirá

obtener un espectro de infrarrojos completo, lo que hace que el material a analizar quede expuesto a una banda amplia de energía [Silverstein y Webster, 1998].

En la figura 29 se recoge el espectro de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de los tres tipos de nanopartículas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , NLS y NLSM). Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento ya que permite la identificación de los grupos funcionales del lípido en las nanopartículas compuestas.

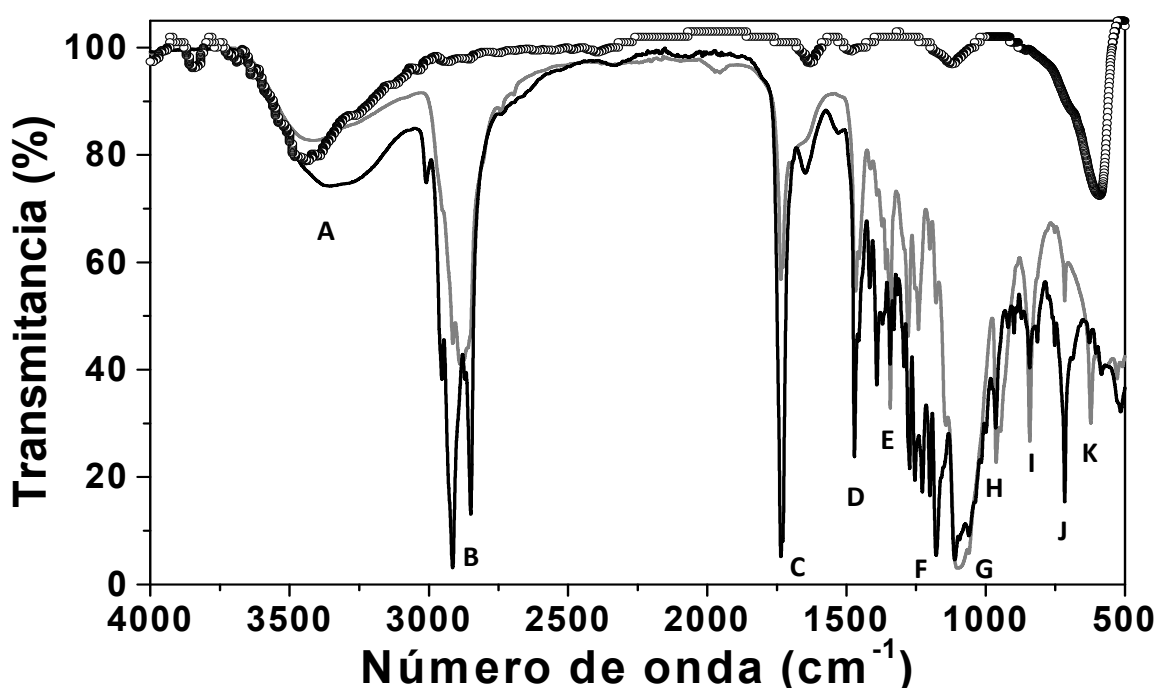


Figura 29. Espectro de infrarrojos por transformada de Fourier de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (-o-), NLS (línea negra), y NLSM (línea gris, preparadas partiendo de una relación de masas TG: $\text{Fe}_3\text{O}_4$  4:2).

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  $3388 \text{ cm}^{-1}$ .

#### Capítulo 4. Caracterización fisicoquímica

---

- B: grupo de dos bandas que corresponden a la vibración de estiramiento del enlace C-H de la molécula. En el lípido, a  $2937\text{ cm}^{-1}$  se localiza la banda característica de la vibración de elongación asimétrica del grupo  $\text{CH}_2$  ( $\nu_{\text{AS}} \text{CH}_2$ ) y a  $2888\text{ cm}^{-1}$  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 del enlace C=O del lípido (aparece a  $1750\text{ cm}^{-1}$ ).

- D: banda que corresponde a la vibración de flexión asimétrica del  $\text{CH}_2$  ( $\nu_{\text{AS}} \text{CH}_2$ ). En las partículas lipídicas se localiza a  $1469\text{ cm}^{-1}$ .

- E: grupo de dos bandas correspondientes a la vibración de flexión del enlace O-H ( $1345\text{ cm}^{-1}$ ) y a la vibración de elongación del enlace C-O ( $1281\text{ cm}^{-1}$ ) del ácido carboxílico de la molécula.

- F: banda correspondiente a la vibración de elongación del enlace C-O del alcohol primario del lípido ( $1242\text{ cm}^{-1}$ ).

- G: grupo de tres bandas que aparecen a  $1150$ ,  $1111$  y  $1061\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a la vibración de elongación y flexión del grupo C-CO-C, y que resulta de la vibración de elongación y flexión de la cadena C-C-C presente en este grupo químico.

- H: a  $961\text{ cm}^{-1}$  aparece una banda media característica de un alcano.

- I: banda perteneciente a la vibración de oscilación del  $\text{CH}_2$  ( $\rho\text{CH}_2$ ), se observa a  $840\text{ cm}^{-1}$  y es propia de una cadena larga de  $\text{CH}_2$ .

- J: a  $750\text{ cm}^{-1}$  aparece una banda característica del triglicérido.

- K: ausente en el espectro de las NLS puras. A  $602\text{ cm}^{-1}$ , aparece una banda ancha e intensa característica de la absorción en la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [Lyon, 1967]. Se trata de la

frecuencia “Restrahl” (o rayo residual), de máxima absorbancia de cristales iónicos (o parcialmente iónico) en el infrarrojo [Gartstein y cols., 1986].

### 4.2.3. ANÁLISIS TÉRMICO

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

En química, el estudio del estado sólido de los fármacos comprende: *i)* la determinación de las propiedades físicas de polimorfos y solvatos, *ii)* las transformaciones físicas entre polimorfos y solvatos, *iii)* las reacciones químicas en estado sólido y *iv)* las reacciones sólido-sólido que se dan en las preparaciones farmacéuticas [Byrn y cols., 1999; Trasi y Byrn, 2012]. Todo esto demuestra que la comprensión de la estructura molecular del estado sólido puede llevarnos a un mejor diseño y control de las preparaciones farmacéuticas, es por esto que la caracterización del estado sólido junto con el estudio de las propiedades fisicoquímicas es imprescindible en la industria farmacéutica [Guo y Huang, 2004; Vippagunta y cols., 2002]. El conocimiento del estado sólido es la primera prioridad ante el diseño de una forma de dosificación ya que estas características influyen en su seguridad y eficacia [Allen, 2008; Aulton, 2002; DiFeo, 2003].

Dentro de las técnicas de análisis térmico podemos encontrar (Tabla 7) [Budrugaec y cols., 2003, 2004; Cucos y cols., 2011]:



Propiedad	Técnica	Abreviatura
Masa	Análisis termogravimétrico	TGA
Temperatura	Análisis térmico diferencial	DTA
Entalpía	Calorimetría diferencial de barrido	DSC
Dimensiones	Termodilatometría	
Propiedades mecánicas	Análisis termomecánico	TMA
Propiedades ópticas	Termomicroscopía	HSM
Propiedades magnéticas	Termomagnetometría	TM
Propiedades eléctricas	Termoelectrometría	
Propiedades acústicas	Termosonometría	TS
Evolución de gas radioactivo	Análisis térmico de emanación	ETA
Evolución de partículas	Análisis de termopartículas	TPA

Tabla 7. Principales técnicas de análisis térmico.

Los fenómenos térmicos que pueden tener lugar con la variación de temperatura se resumen a continuación:

Reacción	Fenómeno térmico
$A (s_1) \rightleftharpoons A (s_2)$	Transición de fase
$A (s_1) \rightleftharpoons A (l)$	Fusión
$A (s_1) \rightleftharpoons A (g)$	Sublimación
$A (s_1) \rightleftharpoons B (s) + \text{gases}$	Descomposición térmica Descomposición radiolítica
$A (s_1) \rightleftharpoons \text{gases}$	
$A (\text{cristal}) \rightleftharpoons A (\text{goma})$	Transición vítrea
$A (s) + B (g) \rightleftharpoons C (s)$	Oxidación
$A (s) + B (g) \rightleftharpoons \text{gases}$	Combustión Volatilización
$A (s) + (\text{gases})_1 \rightleftharpoons A (s) + (\text{gases})_2$	Catálisis heterogénea
$A (s) + B (s) \rightleftharpoons AB (s)$	Adición
$AB (s) + CD (s) \rightleftharpoons AD (s) + CB (s)$	Descomposición doble

Tabla 8. Fenómenos térmicos

Entre las técnicas existentes, se han utilizado la DSC y el TGA.

### 4.2.3.1. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

A fin de caracterizar los posibles cambios estructurales que pueden presentar las nanopartículas con la variación de temperatura, se realizaron los ensayos de DSC de las muestras en polvo de las partículas sintetizadas.

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica termoanalítica que tiene como propósito registrar la diferencia entre el cambio de entalpía que ocurre en una muestra cuando la temperatura aumenta.

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

- No se produce ningún tipo de cambio.
- La muestra experimenta una transformación física. Puede absorber calor al sufrir un proceso endotérmico, o bien, puede eliminar calor al producirse un proceso exotérmico.

La DSC se utiliza para medir el flujo de calor en el interior y exterior de la muestra, y para determinar la temperatura del fenómeno térmico durante una variación controlada de la temperatura.

La variación de temperatura puede medirse por dos técnicas:

- DSC por flujo de calor: el aparato (DTA) mide la diferencia de temperatura y mediante calibración, esta temperatura es convertida en un flujo de calor ( $dq/dt$ ). En

cada caso si la calibración es constante, el área del pico es convertida en energía (Julios) variando el factor térmico con la temperatura.

- DSC por capacidad de compensación: el aparato (DSC) monitoriza la velocidad de calentamiento de 2 fuentes de calor separadas e individualizadas. Un sistema controla la diferencia de temperatura entre la muestra y el patrón. Si se detecta cualquier diferencia, la velocidad de calentamiento individual se corrige de forma que la temperatura se mantenga igual en ambos recipientes. Es decir, cuando se produce un proceso endotérmico o exotérmico el instrumento libera energía de compensación para mantener la misma temperatura en ambos casos.

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

En un termograma DSC se puede distinguir:

- Transiciones de primer orden: fusión, cristalización, sublimación, evaporación. Para estas la integración de la curva da información de la energía implicada en el cambio de fase.

- Transiciones de segundo orden: para las que la señal da información sobre el cambio de calor específico. Por ejemplo, cambios de forma de cristales poliméricos (polimerización).

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

fase o la descomposición pueden ser tanto endotérmicos como exotérmicos [Gaisford, 2010].

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

El principio básico de esta técnica se basa en que cuando la muestra experimenta una transformación física o química, por ejemplo una transición de fase, se necesitará que fluya más (o menos) calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. El que fluya más o menos calor a la muestra depende de si el proceso es exotérmico o endotérmico. Por ejemplo, cuando la muestra experimenta procesos exotérmicos (tales como una cristalización) se requiere menos calor para alcanzar la temperatura de la muestra. Con la diferencia de flujo calorífico entre la muestra y la referencia, los calorímetros DSC pueden determinar la cantidad de calor absorbido o eliminado durante dichas transiciones. El DSC puede ser utilizado también para determinar la presencia de reacciones y contaminación, entre otras.

Los termogramas DSC aportan información sobre el comportamiento de un compuesto en particular cuando es sometido a una variación térmica. En ellos, los fenómenos térmicos quedan registrados como picos endotérmicos y exotérmicos, de los cuales puede obtenerse información cualitativa y cuantitativa. En estos termogramas se registran fenómenos como el punto de fusión, punto de ebullición, presencia de solvatos, formación de cristales líquidos, transiciones vítreas y transiciones polimórficas. Además, se pueden determinar variaciones de entalpía ( $\Delta H$ ) asociadas a una transición, que son función del área del pico y del peso de la muestra analizada. Los picos obtenidos con esta técnica tienen una forma general: el ordenador acoplado al aparato de DSC da el flujo de calor ( $dH/dt$ ) en la ordenada y, en función del

instrumento, los picos de la misma naturaleza serán representados todos en la misma dirección (hacia arriba o hacia abajo).

### 4.2.3.2. TERMOGRAVIMETRÍA

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

En termogravimetría, el cambio de la masa de la muestra puede determinarse en función de la temperatura o el tiempo. El instrumento utilizado es básicamente una termobalanza que pesa la muestra constantemente durante el análisis. El instrumento es capaz de registrar la pérdida o ganancia de masa en función de la temperatura y el peso que registra la balanza.

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

Con el fin de controlar la estabilidad del sistema, se debe establecer una línea de base en el punto de sensibilidad mayor para todas las velocidades de calentamiento en

el intervalo de la temperatura de análisis. La temperatura en los distintos puntos depende de la velocidad de calentamiento, la cantidad de material, el tipo de recipiente y el flujo de gas.

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

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

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

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

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

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

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

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

### 4.2.3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para la preparación de las muestras, las nanopartículas recién sintetizadas se desecan en una estufa de desecación [P-Selecta, España] a  $40 \pm 0.5$  °C, y se trituran hasta obtener un fino polvo homogéneo. Se utiliza una cantidad de muestra entre 5 y 10 mg, que se deposita y encapsula en un crisol de aluminio de 50  $\mu\text{L}$  de volumen, y se sella con una tapa de aluminio con un orificio central.

Generalmente, el programa de temperaturas para un análisis DSC se diseña con una rampa de calentamiento constante de tal modo que la temperatura del portador de muestra aumenta linealmente como función del tiempo. Para la caracterización de las nanopartículas sintetizadas se utilizó el DSC Diamond, Perkin Elmer, con rango de operación habitual de 30 °C a 350 °C y rampa de calentamiento de 5 °C/min.

Los análisis termogravimétricos se llevaron a cabo en un analizador termogravimétrico (TGA) SHIMADZU mod. TGA-50H (Japón). Los barridos de temperatura se realizaron desde una temperatura inicial de 30 °C hasta una temperatura final de 350 °C con rampas de calentamiento típicas de 5 °C/min.

Los termogramas obtenidos son (Figura 30):

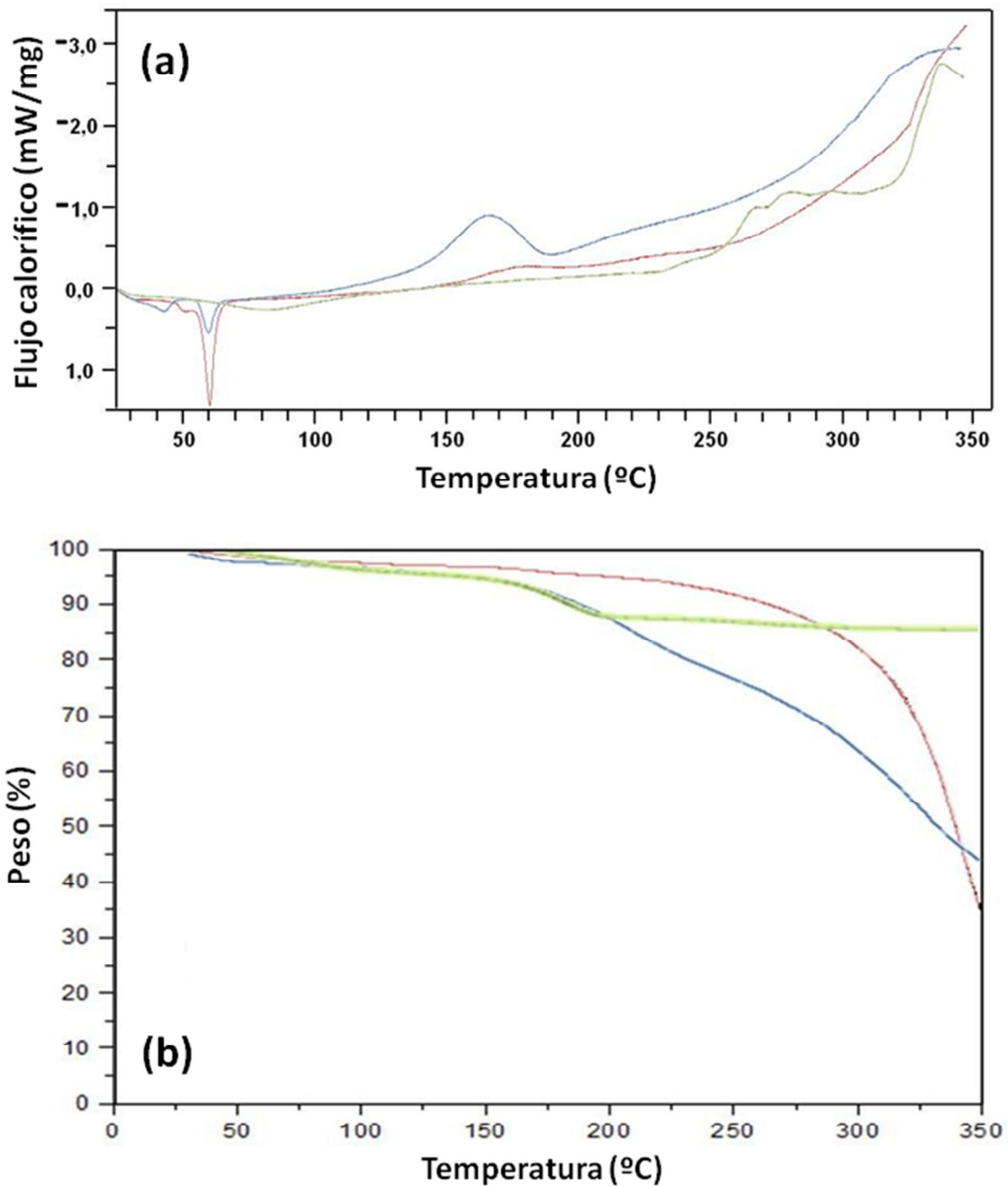


Figura 30. Termogramas DSC (a) y TGA (b) superpuestos de NLS (línea roja), NLSM (línea azul, de la relación de masas TG: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 4:2) y de las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (línea verde).



En el termograma de las NLS (Figura 30a) aparece un pico a 50.3 °C correspondiente a la transición vítrea de la partícula. Se trata de una región de cambios drásticos y rápidos en las propiedades de esta nanopartícula. Es crítica para el procesamiento, almacenamiento y uso.

En el caso de las NLSM (Figura 30a) aparece un pico a 42.3 °C correspondiente a la transición vítrea de la partícula. Esta temperatura es menor que en el caso de la nanopartícula sola.

Tanto en el termograma de las NLS como en el de las NLSM, a 59.4 °C aparece una endoterma de fusión que corresponde con el punto de fusión del trimiristato de glicerol. Supone la transición del estado cristalino al estado amorfo del lípido, lo que confirma el estado sólido cristalino del lípido en el interior de la nanopartícula.

La transformación en la forma  $\beta$  estable del triglicérido, no sólo es inducida por calentamiento del sistema hasta el punto de fusión de la forma  $\alpha$ , sino que también ocurre por debajo de esta temperatura con el transcurso del periodo de almacenamiento desde su síntesis [Bunjés y cols. 2007].

Por otro lado, en el termograma de las NLSM, a 168.0 °C se observa un pico de cristalización, lo que significa que a esta temperatura pasan del estado amorfo al estado cristalino de nuevo, debido a la presencia de la magnetita. Por último se observa un pico exotérmico de oxidación o descomposición a 342.0 °C, el cual se atribuye a la difusión de oxígeno en el núcleo de las partículas y la transformación completa a  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Como se puede observar (Figura 30b), las NLS no presentan particularidades importantes en su termograma. El perfil termogravimétrico indica una drástica pérdida de peso del 60% entre 250 y 350 °C debido a su combustión [Heiati y cols., 1998].

En el caso de las NLSM, la pérdida de peso se da lentamente a medida que aumenta la temperatura.

Por último la magnetita, a partir de 120 °C, sufre una ganancia experimental de masa. Este proceso tiene asociado un efecto exotérmico (Figura 30b). A esta etapa se le atribuye a la oxidación superficial del Fe(II) con la fase de formación de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) [Sanders y Gallagher, 2003].

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

### 4.3. PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES

La mayoría de los sólidos adquieren carga eléctrica superficial (doble capa eléctrica) cuando se dispersan en un disolvente polar (Figura 31) [Hunter, 1981, 1987; Lyklema, 1987, 1995; van Olphen; 1977], por lo que la principal contribución a las propiedades de un sistema formado por la dispersión de  $N$  partículas en 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: cada una de las partículas tiene un potencial superficial, por lo que se produce una fuerza electrostática repulsiva entre las partículas. Esta fuerza tiene que compararse con la fuerza de otras interacciones que deben o pueden existir entre ellas [Hunter, 1987]. En la mayoría de los casos, las interacciones electrostáticas son las principales responsables de las propiedades macroscópicas de las suspensiones.

La partícula atrae iones de signo opuesto, solo una parte de estos iones quedan firmemente adheridos a su superficie formando una capa de contraiones llamada capa de Stern o capa fija. Los demás iones se distribuyen en distintos niveles de acuerdo a la carga de la partícula formando la capa difusa o de Gouy-Chapman. Hay un punto de la capa difusa donde se iguala la carga, se denomina punto de neutralidad [Dukhin, 1974; López-García y cols., 1996; Lyklema, 1995; Russel y cols., 1989].

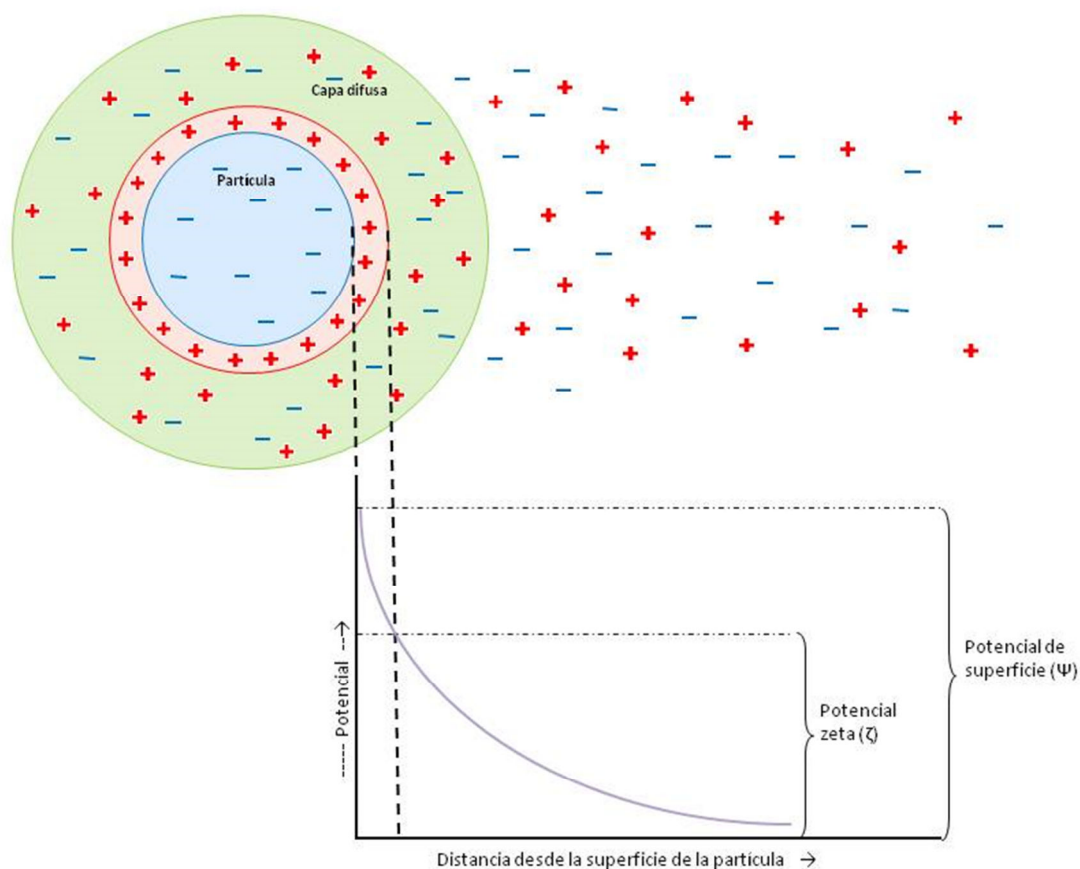


Figura 31. Descripción de la doble capa eléctrica.

Los fenómenos electrocinéticos y las técnicas asociadas a ellos demuestran su importancia. Son manifestaciones de las propiedades eléctricas de la interfase, y de aquí que merezcan atención por sí mismas. Además, son una fuente de información

importante, única en muchos casos, de estas propiedades eléctricas por poder ser determinadas experimentalmente.

Como no se puede medir la carga de la partícula, se mide la diferencia de potencial que hay entre la zona de separación de la capa fija y de la capa difusa, y el punto de electroneutralidad. A ese potencial se le denomina potencial zeta ( $\zeta$ ), y es la verdadera estimación de la carga de la partícula [Dukhin, 1974; López García y cols., 1996; Lyklema, 1977].

La electroforesis (como los demás fenómenos electrocinéticos) constituye una poderosa técnica para obtener información directa sobre el estado eléctrico de la interfase [Delgado, 2002]. En este trabajo hemos investigado la movilidad electroforética ( $u_e$ ) de los tres tipos de nanopartículas, como método de evaluación de la calidad y eficiencia del recubrimiento para las diferentes proporciones de masa iniciales TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (1:4 a 4:1). Esto es posible dado que los comportamientos eléctricos superficiales de la magnetita y del lípido trimiristato de glicerol son claramente diferentes, como veremos. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que los núcleos de óxido de hierro adecuadamente incluidos en la matriz lipídica se puedan diferenciar de los no incluidos, analizando su comportamiento electroforético. Idealmente, la nanopartícula compuesta debería incluso mostrar un potencial zeta idéntico a la de la nanopartícula lipídica sólida pura.

Dada la sensibilidad de la electroforesis a las características de la interfase, esta técnica puede ser útil para analizar el proceso de degradación del lípido que recubre a la magnetita en las nanopartículas compuestas sintetizadas [Arias y cols., 2001; Delgado, 2002]. Para ello, analizaremos la evolución temporal de la movilidad electroforética de éstas últimas, como método de seguimiento de la degradación de la nanopartícula compuesta.

### 4.3.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

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

Las suspensiones estudiadas tenían una concentración de nanopartículas de aproximadamente el 0.1 % (p/v). Antes de preparar la suspensión se fijaba la concentración de electrolito ( $\text{KNO}_3$ ) deseada y se ajustaba, en su caso, el pH con  $\text{HNO}_3$  o KOH. Debido a la dificultad que presentaba el ajuste de ciertos pH, la preparación de las suspensiones se realizó cuando estos eran estables. De esta manera, evitamos que las nanopartículas estén demasiado tiempo en disolución antes de medirlas, lo que podría comprometer la estabilidad de sus propiedades eléctricas superficiales, al favorecerse fenómenos de oxidación y de degradación [Arias y cols., 2001; Plaza y cols., 2002]. Las medidas se realizaron tras 24 horas de contacto de las nanopartículas con el medio de dispersión a  $25.0 \pm 0.5$  °C y bajo agitación mecánica (50 rpm). Los datos presentados son el promedio de 12 determinaciones.

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

### 4.3.2. EFECTO DEL PH Y DE LA FUERZA IÓNICA SOBRE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES

Las propiedades superficiales de los óxidos de hierro son extremadamente sensibles a las variaciones del pH [Plaza y cols., 2002], lo cual no es predecible en el caso del trimiristato de glicerol debido a la naturaleza de los grupos responsables de su carga (ácidos carboxílicos libres) [Fattal y cols., 1997; Lince y cols., 2008; Sinha y cols., 2004]. Por ello, centraremos en primer lugar nuestro estudio en el efecto del pH sobre el potencial zeta de las nanopartículas.

La figura 32a muestra el potencial zeta en función del pH bajo una fuerza iónica moderada constante ( $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M). Como puede observarse, las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero bien definido en torno a 7, resultado que concuerda con investigaciones previamente realizadas [Arias y cols., 2001; Matijevic, 2002; Plaza y cols., 2002; Regazzoni y cols., 1983]. El potencial zeta de las NLS, a lo largo de todo el intervalo de pH, se encuentra por debajo de cero. Puede observarse un punto de inflexión en torno a  $\text{pH} \approx 6$ . Esta diferencia entre el comportamiento electrocinético de los núcleos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y las NLS convierten a la electroforesis en una herramienta muy útil para comprobar cualitativamente la eficacia del recubrimiento confirmando de esta manera la obtención de NLSM. De hecho, la figura 32 muestra claramente cómo las NLSM (relación de masas iniciales TG: $\text{Fe}_3\text{O}_4$  4:2) presentan un comportamiento casi idéntico al de las NLS. Por lo tanto, podemos concluir que el óxido de hierro se encuentra en la matriz lipídica, haciendo que la superficie de las nanopartículas compuestas sea indistinguible a las de las NLS.

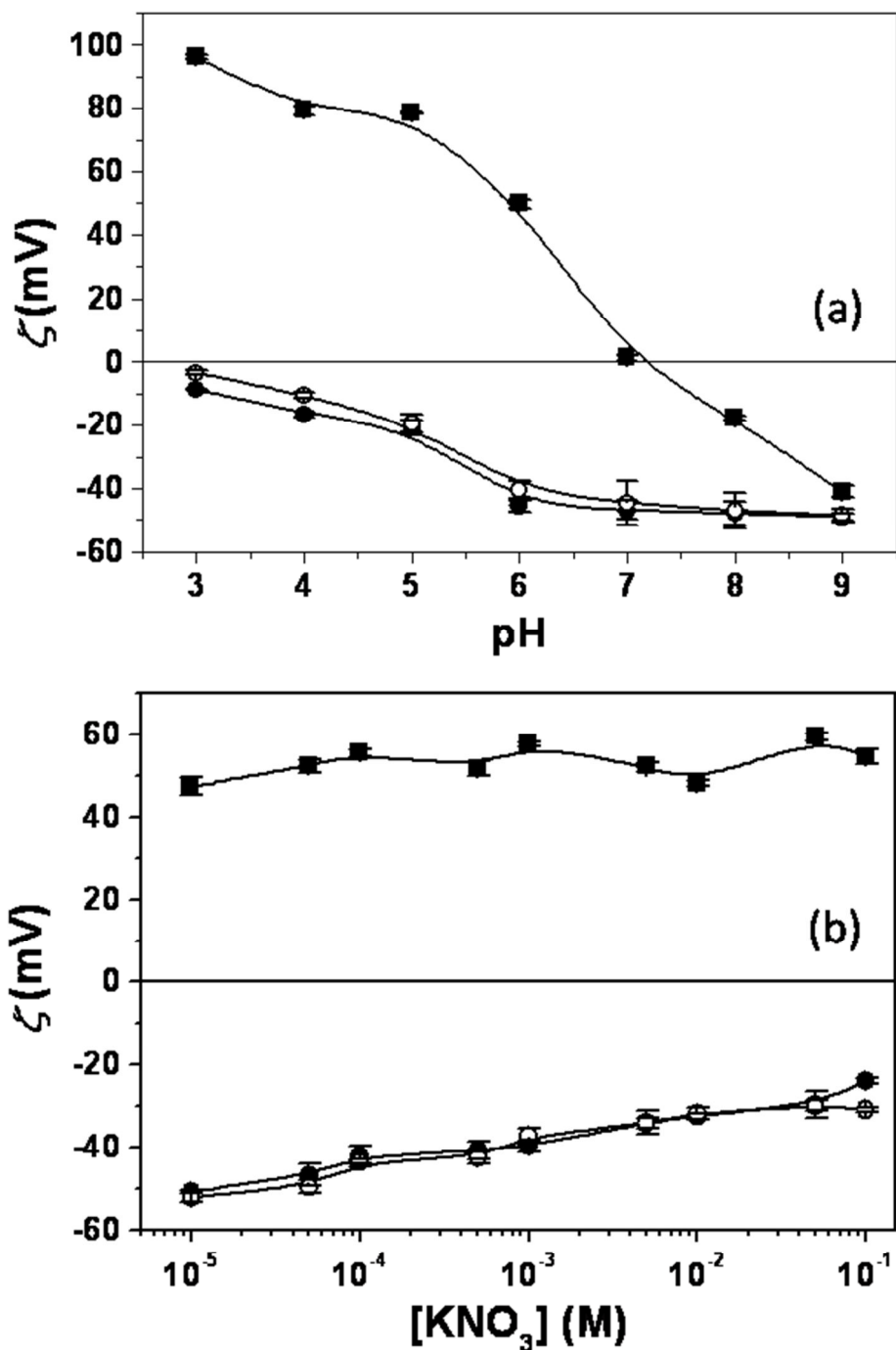


Figura 32. Potencial zeta ( $\zeta$ , mV) de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (■), NLS (●), y NLSM (○), de la relación de masas TG: $\text{Fe}_3\text{O}_4$  4:2) en función del: (a) pH en presencia de  $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M, y (b) la concentración molar de  $\text{KNO}_3$  a pH 6. Las líneas son una guía visual y no tienen otra importancia.

Los resultados obtenidos pueden explicarse bajo el marco teórico de que una disminución en el pH comprime la bicapa eléctrica e incrementa la adsorción de protones, traduciéndose en una disminución de la carga y la estabilidad superficial [Freitas y Müller, 1999; Kuo y Chen, 2007; Zimmermann y Müller, 2001]. Por lo tanto, un incremento en el valor de pH conlleva un incremento de la cantidad de carga negativa en la superficie de las NLS. A medida que el pH desciende se electroneutraliza de grupo  $-\text{PO}_4^-$ , dando lugar a una disminución de la carga eléctrica de las NLS.

Un pH alto causa la saturación de la carga eléctrica superficial por lo que no hay diferencias en los valores de movilidad electroforética o de pH.

Para confirmar estos interesantes resultados determinamos el potencial zeta de los tres tipos de coloides en función de la concentración de  $\text{KNO}_3$  a  $\text{pH} = 6$ , siguiendo la misma metodología. Los resultados de este análisis se representan en la figura 30b. De nuevo se observa de forma muy clara la similitud entre la electrocinética de las NLS y de las NLSM, y las diferencias con respecto a la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Parece que la fuerza iónica del medio condiciona en menor medida el valor de movilidad electroforética, ya que los valores aumentan ligeramente a lo largo de todo el intervalo. Como se muestra en la figura 30b, a medida que la fuerza iónica disminuye, el potencial zeta aumenta.

La técnica de electroforesis también fue utilizada, siguiendo la misma técnica y rutina, para analizar las características y la eficacia de la incorporación en la matriz cuando cambia la relación de masas iniciales  $\text{TG}:\text{Fe}_3\text{O}_4$  utilizada en la formulación de las NLSM.



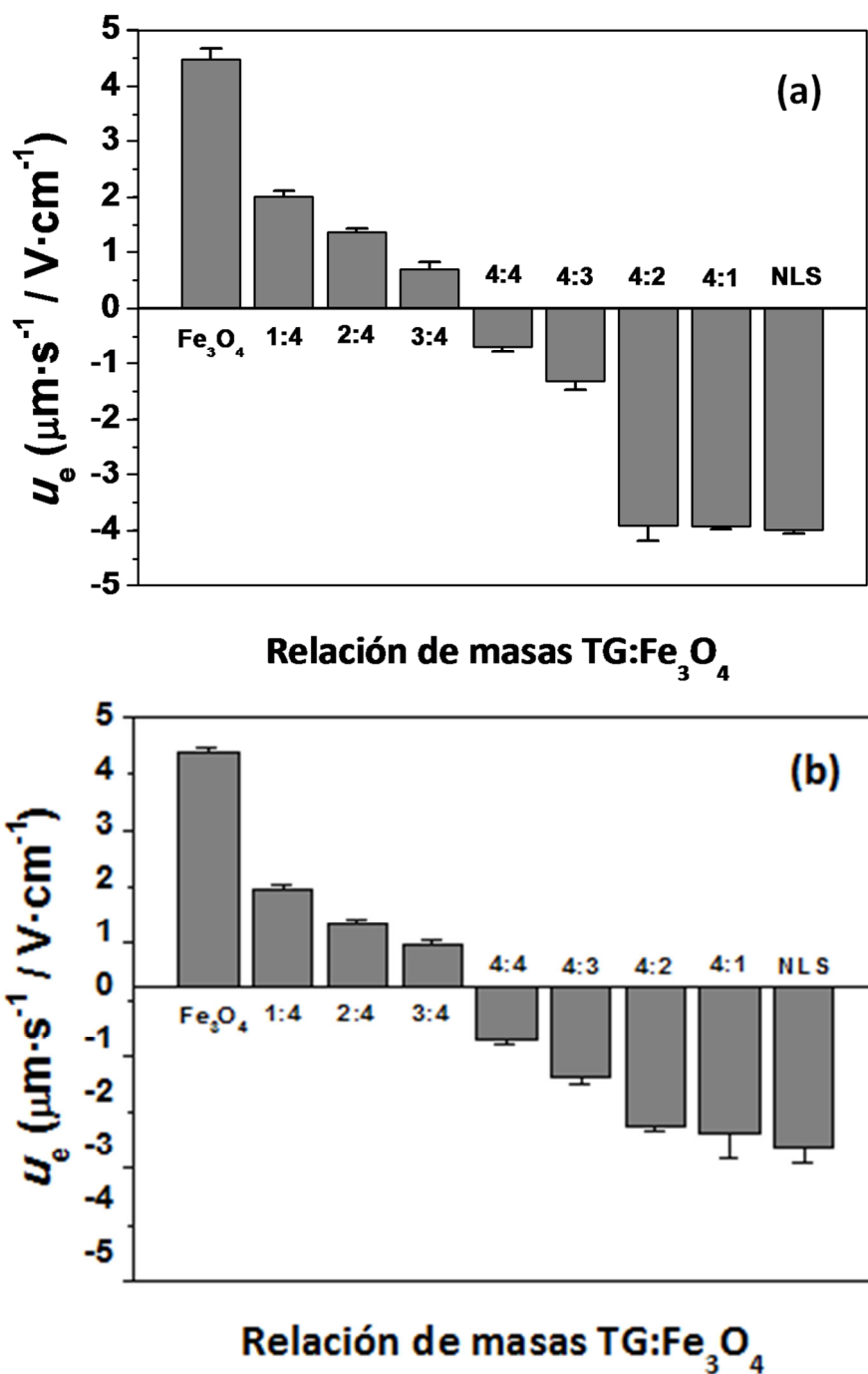


Figura 33. Histograma de valores de movilidad electroforética ( $u_e$ ,  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) de las NLSMs formuladas según diferentes relaciones de masa TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, en agua (a) y (b) en presencia de KNO<sub>3</sub> 10<sup>-3</sup> M. También se incluyen los valores de  $u_e$  de las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y de las NLS bajo ambas condiciones experimentales.

La figura 33 muestra los valores de movilidad ( $u_e$ ) de las nanopartículas compuestas en un medio de dispersión acuoso, en ausencia (Figura 33a) o en presencia (Figura 33b) de una fuerza iónica moderada constante ( $\text{KNO}_3$   $10^{-3}$  M). De forma muy patente, puede apreciarse cómo los valores de  $u_e$  característicos de los núcleos magnéticos conducen hacia los de las NLS al aumentar la cantidad de lípido utilizado en la relación de masas iniciales TG: $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , principalmente por encima de 4:3. Por lo tanto, desde un punto de vista electroforético podemos justificar la utilización de una relación de masas iniciales 4:2 para la formulación de las nanopartículas compuestas. Sólo así los valores de  $u_e$  de las NLSM son indistinguibles de las NLS y, por lo tanto, la inclusión de los núcleos magnéticos en la matriz será óptima y eficaz.

### 4.3.3. ANÁLISIS ELECTROKINÉTICO DE LA ESTABILIDAD DE LA NANOPARTÍCULA LIPÍDICA

La experiencia adquirida en nuestro grupo de investigación en la caracterización electrocinética de nanopartículas magnéticas compuestas, nos hace pensar que la técnica de electroforesis puede ser muy útil para caracterizar la velocidad a la que la NLSM se degrada y va dejando a la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  expuesta a la disolución [Arias y cols., 2001, 2005, 2006, 2007, 2008a, 2009a, 2010a, 2010b; Pérez-Artacho y cols., 2012]. Las medidas electroforéticas de las suspensiones acuosas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y de nanocompuestos magnéticos (concentración  $\approx 0.1$  %, m/v) se realizaron reproduciendo las condiciones fisiológicas (pH  $7.4 \pm 0.1$ , y  $37.0 \pm 0.5$  °C) (Malvern Zetasizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). El experimento se consideró finalizado cuando los valores de movilidad electroforética ( $u_e$ ) de las NLSM coincidían con los de la magnetita, señal inequívoca de la pérdida del recubrimiento lipídico.

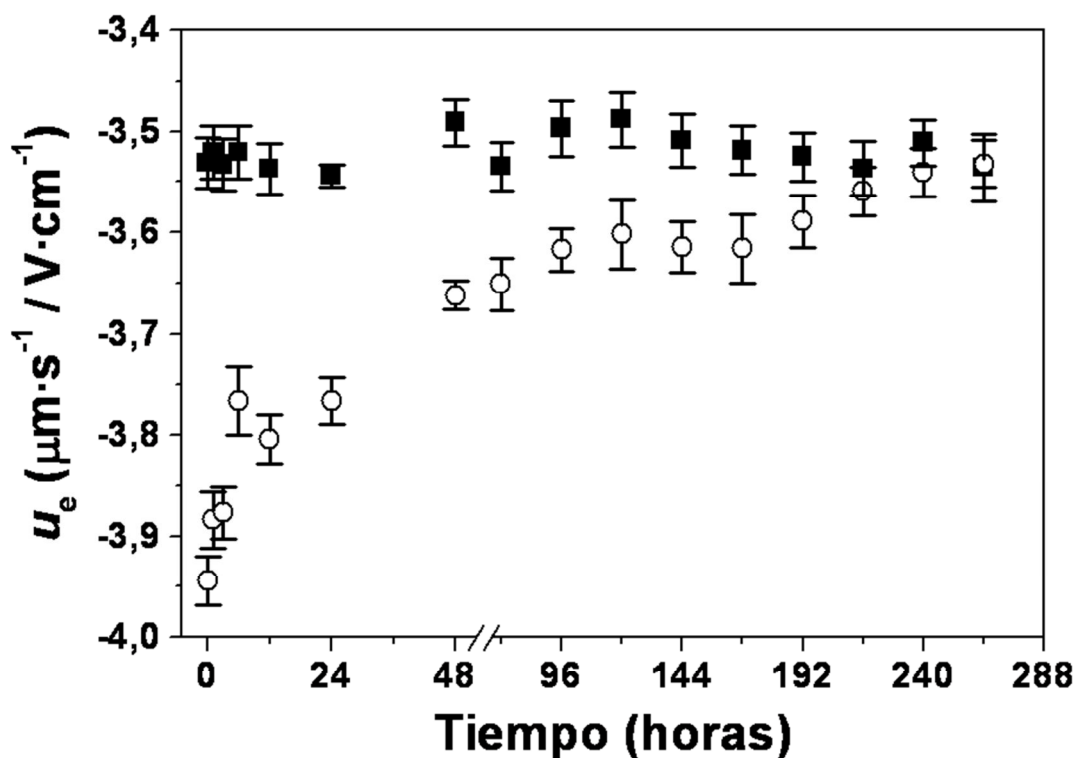


Figura 34. Evolución de los valores de movilidad electroforética ( $u_e$ ,  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (■) y las NLSM (○), preparadas partiendo de una relación de masas TG: $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 4:2) en función del tiempo (horas) a  $\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$  y a  $37.0 \pm 0.5$  °C.

En la figura 34, se aprecia cómo los valores de  $u_e$  de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  permanecen constantes durante todo el período del estudio ( $u_e \approx -3.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Este valor negativo de  $u_e$  tan elevado podría atribuirse a la formación en la superficie de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de una fina capa de oxidación (maghemita, un estado más oxidado de ésta), como se ha descrito en medios acuosos [Plaza y cols., 2002]. De hecho, los valores de  $u_e$  de nanopartículas de maghemita (de igual tamaño a la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y bajo las mismas condiciones experimentales) eran muy similares a los de nuestros núcleos de óxido de hierro ( $u_e \approx -3.6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

Es muy interesante comprobar en esta figura cómo los valores de  $u_e$  de las NLSM se aproximan progresivamente a los característicos de los núcleos magnéticos. En concreto, se hacen iguales tras 11 días aproximadamente. A partir de entonces, no se observan diferencias significativas entre la  $u_e$  de ambos materiales. Por tanto, podría decirse que la superficie de los núcleos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de los nanocompuestos queda cada vez más expuesta al medio de dispersión (de ahí los valores cada vez más negativos de  $u_e$ ), por la degradación progresiva del recubrimiento. Así, cuando la cubierta de lípido se pierde completamente, ambos valores de  $u_e$  son indistinguibles.

Esta evolución progresiva de  $u_e$  hacia los valores típicos de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , pone de manifiesto cualitativamente que la velocidad de degradación del lípido es lenta, lo que ha sido asociado al alto grado de cristalinidad del núcleo lipídico y a la gran hidrofobia de este lípido. En el caso de que el mecanismo de liberación de un fármaco vehiculizado en esta matriz sea consecuencia del proceso de degradación de ésta, la electroforesis se convierte en una herramienta cualitativa indirecta para caracterizar ese proceso de liberación.

### 4.4. TERMODINÁMICA SUPERFICIAL

La metodología seguida para la identificación y la cuantificación de las interacciones no electrostáticas en la interfase nanopartícula/medio acuoso, utiliza la teoría termodinámica de la tensión superficial o energía libre de los sólidos. Con este fin, usaremos un modelo termodinámico que incluye las interacciones de van der Waals y ácido-base entre las nanopartículas, o entre ellas y el medio de dispersión. El modelo permite caracterizar el sólido mediante tres componentes de su energía libre superficial:  $\gamma_S^{LW}$  (Lifshitz-van der Waals, representativa de las interacciones no polares o dispersivas de la interfase),  $\gamma_S^+$  (aceptor de electrones o ácido de Lewis) y  $\gamma_S^-$

(donante de electrones o base de Lewis). Estas dos últimas contribuciones (polares) contienen información sobre interacciones de corto alcance, a las que se suele llamar fuerzas de solvatación, estructurales o, en caso de un medio acuoso, fuerzas de hidratación.

De esta manera, estimaremos 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 utilizarán los datos experimentales de los ángulos de contacto formados por líquidos seleccionados con nuestros tres tipos de sistemas: nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , NLS y NLSM. Además, se prestará especial atención al análisis comparativo de la energía libre superficial de estos materiales.

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

- Interacciones dispersivas. Se conocen también como interacciones electrodinámicas o de Lifshitz-van der Waals (*LW*). Se denominan así por su relación con fenómenos de dispersión de luz en el visible y el ultravioleta. Están siempre presentes, al igual que sucede con la interacción gravitatoria. El modelo clásico DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) las considera, junto con la interacción electrostática, responsables de la energía total de interacción entre partículas.
- Interacciones no dispersivas. Se las denomina también interacciones no-DLVO. (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, 2006; van Oss y cols., 1986].

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

De esta manera, podemos estimar la importancia de las contribuciones no electrostáticas al balance total de la energía de interacción entre las nanopartículas de los sistemas analizados.

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 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 ( $\gamma^{AB}$ ).

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.

### 4.4.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

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

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

La definición termodinámica del ángulo de contacto viene dada por la ecuación de Young. Para una superficie sólida 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 (Figura 35) [Neumann y Good, 1972]:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_L \cos\theta \quad (3)$$

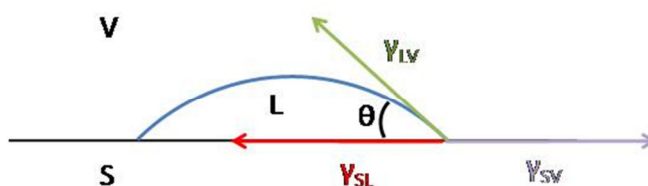


Figura 35. Tensiones superficiales que aparecen en una gota de líquido sobre una superficie sólida.

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 3 se puede escribir de la forma:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos\theta + \pi_e \quad (4)$$

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

$$\pi_e \equiv \gamma_S - \gamma_{SV} \quad (5)$$

esto es, la presión bidimensional que ejerce el vapor adsorbido sobre la superficie sólida. En el caso de que  $\gamma_S$  sea superior a  $\gamma_L$ , esta adsorción provoca una disminución de la tensión superficial del sólido hasta alcanzar, en caso de saturación, el valor de la tensión superficial del líquido [Janczuk y cols., 1984, 1987]. Bajo estas condiciones



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

$$\gamma_s = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos\theta \quad (6)$$

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. Un trabajo reciente explica los valores de los ángulos de retroceso como consecuencia de la disminución de la energía superficial del sólido causada por la presión superficial asociada a la adsorción del vapor del líquido utilizado [Chibowski y González-Caballero, 1993].

Una vez medidos los ángulos de contacto, es posible determinar los componentes de la energía superficial del sólido. La tensión interfacial entre dos fases, 1 y 2, se expresa:

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

Sustituyendo en la ecuación 7 el valor de  $\gamma_{SL}$  dado por la ecuación 3, se obtiene:

$$2\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+} = \gamma_L(1 + \cos\theta) \quad (8)$$

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 8, 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: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NLS y NLSM utilizando la relación de masas iniciales TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 4:2. Los líquidos empleados fueron: agua filtrada y desionizada con un sistema Milli-Q Academic (Millipore, Francia), formamida (Carlo Erba, Italia) y α-bromonaftaleno (Merck, Alemania). En la aplicación del modelo de van Oss se utilizaron los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba utilizados (Tabla 9) [van Oss, 2006].

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

Tabla 9. Componentes de la tensión superficial ( $\gamma$ , mJ/m<sup>2</sup>) a 20 °C de los líquidos utilizados en el experimento de medida del ángulo de contacto.

La medida de los ángulos de contacto se realizó con un goniómetro Ramé-Hart 100-0.7-00 (USA), que permite observar las gotas de líquido depositadas sobre un sólido. Este aparato dispone de un conjunto de tornillos micrométricos que permiten

los desplazamientos verticales y horizontales del sustrato, así como de un limbo graduado para la medida del ángulo con una precisión de  $\pm 1^\circ$ . El uso de una microjeringa Gimont (EE.UU.) permite controlar el volumen de la gota depositada entre 2 y 4  $\mu\text{L}$ . Las medidas se realizaron a  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , utilizando una cámara termostática. La captura de las imágenes de las gotas de los líquidos depositados sobre la superficie de los materiales se obtuvo 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 de los tres tipos de materiales depositadas sobre portaobjetos de microscopio. Estas superficies lisas se obtuvieron tras la adición de manera uniforme de una suspensión acuosa ( $\approx 10\%$ , p/v) de cada tipo de coloide sobre la superficie limpia y seca de una placa de vidrio. En la preparación de la muestra pudimos comprobar que con la adición de 10 mL de suspensión acuosa de nanopartículas se obtenía una capa de material suficientemente gruesa y uniforme. La desecación de los portaobjetos con cada una de las muestras se realizó a  $35.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , utilizando un horno de desecación durante 24 horas. De esta manera, se obtuvo una capa de material muy uniforme a nivel macroscópico, que permitió que la medida de los ángulos de contacto se realizara en gotas muy estables (Figura 36).

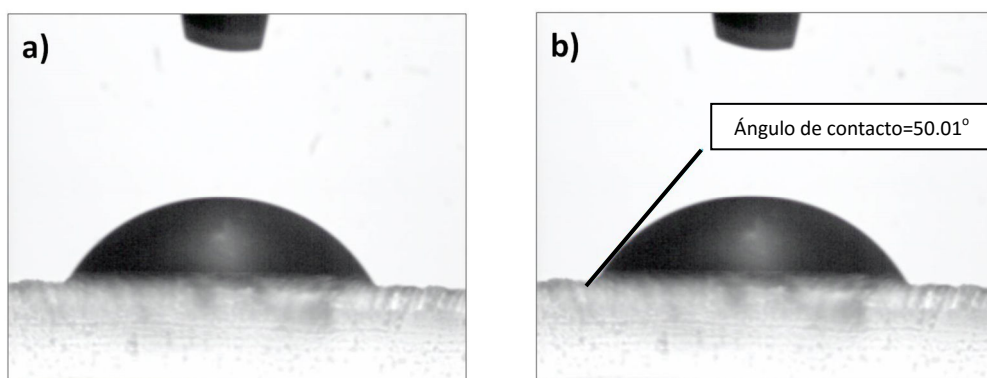


Figura 36. Ejemplo de la determinación del ángulo de contacto. (a) Fotografía de gota depositada; (b) ajuste de perfil de la gota y evaluación del ángulo.

En la tabla 10 se recogen los valores promedio de los ángulos de contacto obtenidos tras realizar 16 determinaciones midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de importantes diferencias entre los núcleos de óxido de hierro y las NLSM.

### 4.4.2. COMPONENTES DE LA ENERGÍA LIBRE SUPERFICIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS

Para aportar una información física veraz sobre la termodinámica de los tres tipos de superficies es necesaria la evaluación de las componentes de  $\gamma_S$ . Los datos indicados en la tabla 10 confirman en gran medida nuestras estimaciones sobre la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos basadas en las propiedades electrocinéticas. En particular, para cualquier componente de la energía libre superficial, los valores para las NLSM coinciden casi totalmente con los correspondientes a las NLS. La componente Lifshitz-van der Waals ( $\gamma_S^{LW}$ ) es la menos afectada por el tratamiento superficial, como suele ser habitual [Arias y cols., 2001, 2006, 2008a]. Por otro lado, a pesar de que la componente electrón-aceptor ( $\gamma_S^+$ ) es muy pequeña para los tres tipos de materiales, sin embargo es virtualmente cero para las NLS y las NLSM y adquiere valores finitos superiores para la  $Fe_3O_4$ . Por último, la contribución electrón-donante ( $\gamma_S^-$ ) muestra una diferencia mucho más notable entre los núcleos de óxido de hierro y las NLSM. El elevado valor de esta última componente en el caso de la magnetita confirma su carácter monopolar electrón-donante [Arias y cols., 2001; van Oss, 2006]. Según van Oss, esto quiere decir que la magnetita puede tener interacciones ácido-base con fases de cualquier polaridad ( $\gamma^+$ ,  $\gamma^-$ , o ambas, diferentes de cero) pero las fuerzas AB no contribuyen a su energía libre de cohesión. Resultados similares se han obtenido anteriormente con diferentes compuestos

## Capítulo 4. Caracterización fisicoquímica

inorgánicos [Chibowski, 1992; Chibowski y Holysz, 1992; Durán y cols., 1994, 1995]. Es bastante general el comportamiento monopolar en los materiales inorgánicos, si bien se ha descrito un carácter bipolar en materiales como la calconita y la galena [Janczuk y cols., 1984, 1987, 1994].

Sólido	$\theta$ (grados)			$\gamma$ (mJ/m <sup>2</sup> )		
	Agua	Formamida	$\alpha$ -Bromonaftaleno	$\gamma_S^{LW}$	$\gamma_S^+$	$\gamma_S^-$
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	35 ± 2	9 ± 1	40 ± 1	33.996 ± 0.432	4.008 ± 0.266	32.718 ± 2.021
<b>NLS</b>	63 ± 3	44 ± 2	31 ± 1	37.595 ± 0.364	0.811 ± 0.019	15.295 ± 2.331
<b>NLSM</b>	68 ± 2	61 ± 3	46 ± 2	31.303 ± 0.928	0.041 ± 0.048	20.541 ± 0.332

Tabla 10. Ángulos de contacto ( $\theta$ , grados) de los líquidos agua, formamida y  $\alpha$ -bromonaftaleno sobre superficies homogéneas preparadas con los tres tipos de materiales (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NLS, y NLSM preparadas partiendo de una relación de masas TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 4:2), y componentes de la energía libre superficial ( $\gamma$ , mJ/m<sup>2</sup>) de éstos.  $\gamma_S^{LW}$  es la componente de Lifshitz-van der Waals, y  $\gamma_S^+$  ( $\gamma_S^-$ ) es la componente electrón-aceptor (electrón-donante).

A la vista de los resultados obtenidos, (junto con el análisis electrocinético de los tres tipos de nanopartículas), podemos afirmar que el recubrimiento de los núcleos magnéticos es completo cuando se utiliza la relación de masas iniciales TG: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 4:2.

### 4.4.3. ANÁLISIS DE LA NATURALEZA HIDRÓFILA/HIDRÓFOBA

Como ya hemos comentado anteriormente, una caracterización termodinámica exhaustiva como la descrita no sólo tiene interés de por sí, esto es, 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 nuestro estudio es que las metodologías empleadas, junto con su base teórica, permiten: *i*) especificar completamente la componente *LW* de la energía de interacción entre las nanopartículas dispersas (contemplada, junto con la repulsión electrostática entre dobles capas eléctricas, en la teoría clásica DLVO); y *ii*) cuantificar igualmente las contribuciones no-DLVO a la energía total del sistema, las cuales se relacionan con la componente *AB* de la teoría superficial tanto del sólido en suspensión como del líquido.

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

$$\Delta G_{121} = \Delta G_{121}^{LW} + \Delta G_{121}^{AB} \quad (9)$$

Si se considera un proceso reversible, 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, existiendo la interfase 1-2. Se define la tensión interfacial ( $\gamma_{12}$ ) mediante la ecuación de Dupré [Adamson, 1982]:

$$\Delta G_{A,12} = -W_{A,12} = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad (10)$$

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:

$$\Delta G_{123} = \gamma_{13} - \gamma_{12} - \gamma_{23} \quad (11)$$

## Capítulo 4. Caracterización fisicoquímica

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:

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

Haciendo uso de la ecuación 12, pueden obtenerse los valores de  $\Delta G_{121}^{LW}$  y  $\Delta G_{121}^{AB}$ :

$$\Delta G_{121}^{LW} = -2\left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}}\right)^2 \quad (13)$$

$$\Delta G_{121}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_1^- \gamma_1^+} + \sqrt{\gamma_2^- \gamma_2^+} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+} - \sqrt{\gamma_2^- \gamma_1^+}\right)^2 \quad (14)$$

En la tabla 11 se puede apreciar que para la magnetita, el intercambio energético debido a la componente *LW* es bastante menor que el asociado a la componente *AB*, siendo además negativo. Por tanto, la variación de la energía libre de interacción total es debida, principalmente, a la componente *AB* [Arias y cols., 2001, 2008].

Sólido	$\Delta G_{121}^{LW}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G_{121}^{AB}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\Delta G_{121}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	Naturaleza
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	-2.543 ± 0.706	13.066 ± 3.709	10.611 ± 2.469	Hidrófila
<b>NLS</b>	-19.827 ± 3.199	-3.631 ± 0.985	-23.178 ± 5.169	Hidrófoba
<b>NLSM</b>	-10.606 ± 0.328	-1.142 ± 0.169	-11.748 ± 1.266	Hidrófoba

Tabla 11. Valores de energía libre de interacción ( $\Delta G_{121}$ , mJ/m<sup>2</sup>) de los tres tipos de nanopartículas (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NLS, y NLSM preparadas partiendo de una relación de masas TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 4:2) en medio acuoso, sus componentes Lifshitz-van der Waals ( $\Delta G_{121}^{LW}$ ) y ácido-base ( $\Delta G_{121}^{AB}$ ), y naturaleza hidrófila/hidrófoba de estos nanomateriales.

En el caso de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  la contribución AB es positiva, lo que indica que su naturaleza fuertemente monopolar provoca una significativa repulsión entre las nanopartículas. La interacción LW debida a la contribución apolar, siempre atractiva en estos casos, es mucho menos intensa, provocando el valor neto positivo para  $\Delta G_{121}$ . Por el contrario, tanto las nanopartículas puras como las compuestas tienen valores negativos de  $\Delta G_{121}$  (atracción hidrófoba), que se añaden a la atracción de van der Waals.

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

La tabla 11 muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de nanomateriales. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde al ser recubierta por el polímero hidrófobo. Esto puede considerarse un indicio muy claro de que dicho recubrimiento es eficaz.

### **4.5. MECANISMO DE INCORPORACIÓN DE LOS NÚCLEOS MAGNÉTICOS EN LA MATRIZ SÓLIDA LIPÍDICA**

Con toda la información expuesta sobre las características superficiales de los nanomateriales estudiados, podemos argumentar el mecanismo por el que una matriz de trimiristato de glicerol se deposita sobre la superficie de los núcleos



magnéticos y los engloba. En concreto, puede predecirse una interacción electrostática netamente atractiva entre las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con carga eléctrica positiva y el lípido con carga eléctrica negativa. Recuérdese (Figura 32), que las condiciones ligeramente ácidas en las que se formulan las NLSM ( $\text{pH} = 6.0$ ) determinan estas cargas eléctricas superficiales.

Gracias a esta interacción electrostática de tipo netamente atractivo, es posible la concentración del lípido en las inmediaciones de la superficie de los núcleos magnéticos.

Por otro lado, se puede justificar la formación de la capa de lípido mediante un mecanismo termodinámico, utilizando la ecuación de Dupré. Esto exige el cálculo de la energía libre ( $\Delta G_{MAL}$ ) de interacción entre la magnetita (M) y el lípido (L) en medio acuoso (A), a partir de los datos ya obtenidos:

$$\Delta G_{MAL} = \gamma_{ML} - \gamma_{MA} - \gamma_{LA} \quad (15)$$

donde las energías libres interfaciales se obtienen para cada par de interfases involucradas. El resultado de este cálculo es  $\Delta G_{MAL} = -4.1 \pm 0.5 \text{ mJ/m}^2$ . Esto significa, que las interacciones ácido-base y de van der Waals entre los núcleos magnéticos y la matriz lipídica son netamente atractivas. Es decir, termodinámicamente es más favorable para el lípido permanecer en contacto con la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y antes de estar aislado en el medio de dispersión acuoso [Arias y cols., 2001].

Este hecho favorece la inclusión de los núcleos superparamagnéticos en el interior de la matriz lipídica y, por lo tanto, la formación de las NLSM. Este es un mecanismo ampliamente descrito en la literatura y que justifica la formación de este tipo de coloides magnéticos compuestos [Arias y cols., 2001, 2007, 2008a; Chen y cols., 2010; Clares y cols., 2013].

## 4.6. PROPIEDADES MAGNÉTICAS

Las propiedades magnéticas macroscópicas de un material son consecuencia de los momentos magnéticos asociados con sus átomos individuales. En un átomo, cada electrón tiene momentos magnéticos que se originan de dos fuentes distintas. Una de estas fuentes está relacionada con el movimiento angular orbital y la otra tiene su origen en su espín. Así, el momento magnético neto de un átomo es justamente la suma de los momentos magnéticos de cada uno de los electrones constituyentes, incluyendo tanto las contribuciones orbitales como de espín y tomando en consideración la cancelación de los momentos. Entre los distintos tipos de magnetismo se incluyen el diamagnetismo, el paramagnetismo y el ferromagnetismo. Junto a éstos, el antiferromagnetismo y el ferrimagnetismo son considerados subclases del ferromagnetismo [Callister, 1996].

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

$$M = \chi \cdot H \quad (16)$$

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

$$B = \mu_0(H + M) \quad (17)$$

Siendo  $\mu_0$  la permeabilidad magnética del vacío. Aplicando la ecuación (16):

$$B = \mu_0(1 + \chi)H \quad (18)$$

donde  $(1+\chi)$  representa la permeabilidad relativa del material ( $\mu_r$ ). La susceptibilidad magnética  $\chi$  y la permeabilidad magnética  $\mu$  se relacionan mediante la ecuación:

$$\mu = \mu_0(1 + \chi) \quad (19)$$

Por tanto, la ecuación (19) quedaría de la siguiente manera:

$$B = \mu_0\mu_r H = \mu H \quad (20)$$

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

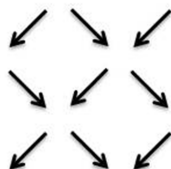


Figura 37. Cuando se coloca un material diamagnético en un campo magnético, se induce en él un momento magnético de sentido opuesto al campo, los espines son repelidos débilmente por un imán potente.

∞ Paramagnetismo: es característico de aquellos átomos o moléculas que tienen momentos magnéticos permanentes que no interactúan entre sí y que en ausencia de gradiente de campo magnético aplicado 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 el gradiente de un campo magnético aplicado. En estos materiales  $\chi$  es positiva y depende de la temperatura, mientras que  $\mu_r$  es ligeramente mayor que uno. Una característica muy interesante por sus implicaciones biomédicas es el superparamagnetismo. Esta propiedad es consecuencia de un cambio cualitativo en la estructura de los materiales magnéticos nanométricos, la cual pasa de estar constituida por numerosos dominios magnéticos, al estar formada por un único dominio magnético o monodominio. Esta particular estructura determina una reducción muy importante de la barrera de anisotropía magnética, lo que provoca la desaparición de la histéresis (no hay campo coercitivo ni remanencia) [Álvarez Paneque y cols., 2008].

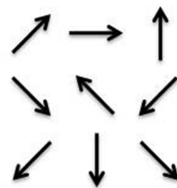


Figura 38. Los espines apuntan en direcciones al azar.

- Ferromagnetismo: en estos materiales las interacciones de acoplamiento hacen que los momentos magnéticos netos de espín de átomos adyacentes se alineen unos con otros aun en ausencia de un campo magnético aplicado. Esta alineación mutua de los espines se presenta en volúmenes relativamente grandes del cristal denominados dominios. La máxima imanación posible (magnetización de saturación) corresponde a la situación en que todos los dipolos magnéticos en una muestra sólida están mutuamente alineados con el gradiente de campo magnético

aplicado. Estos materiales presentan una  $\chi$  positiva, muy grande y dependiente del campo mientras que  $\mu_r$  tiene un valor en torno a  $10^5$ . La magnetización de saturación y la permeabilidad magnética dependen significativamente de  $H$  y de la temperatura.

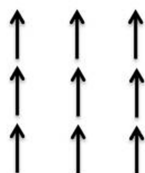


Figura 39. Los espines tienen tendencia a alinearse en una misma dirección. Los materiales ferromagnéticos están divididos en regiones llamadas “dominios”; en cada dominio, los momentos magnéticos atómicos están alineados en paralelo. Los momentos de dominios diferentes no apuntan necesariamente en la misma dirección.

∞ Antiferromagnetismo: fenómeno de acoplamiento entre los momentos magnéticos que determina su alineamiento antiparalelo, de modo que el material mostrará imanación espontánea nula. Estos materiales tienen una  $\mu_r > 1$  y  $\chi_m$  positiva.

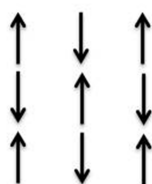


Figura 40. Tendencia de los espines a alinearse antiparalelamente a sus vecinos.

- ☞ Ferrimagnetismo: la interacción de intercambio entre momentos magnéticos en estos materiales favorece también la alineación antiparalela, pero los momentos no son idénticos en módulo, por lo que no se cancelan completamente. Por este motivo, su comportamiento será parecido al de los ferromagnéticos.

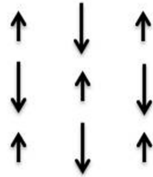


Figura 41. Las interacciones en cada línea son antiferromagnéticas, pero las columnas impares no compensan el momento magnético de las columnas pares.

#### 4.6.1. CICLO DE HISTÉRESIS

La  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  es un material iónico ferrimagnético con estructura cristalina cúbica holoédrica del tipo de las espinelas inversas y que pertenece al grupo de las ferritas blandas [Callister, 1996]. Su fórmula puede escribirse como  $\text{Fe}^{3+}\text{O}^{2-}(\text{Fe}^{3+})_2(\text{O}^{2-})_3$ , donde los iones Fe existen en los estados de valencia +2 y +3 en una proporción 1:2. Para cada uno de los iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  existe un momento magnético que corresponde a 4 y 5 magnetones de Bohr, respectivamente. Además, los iones  $\text{O}^{2-}$  son magnéticamente neutros. Entre los iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  se producen interacciones de acoplamiento de los espines en las direcciones antiparalelas, similares a las que se producen en el caso del antiferromagnetismo. Sin embargo, se produce un momento ferrimagnético neto debido a que los momentos de espín no se cancelan completamente (Figura 42).

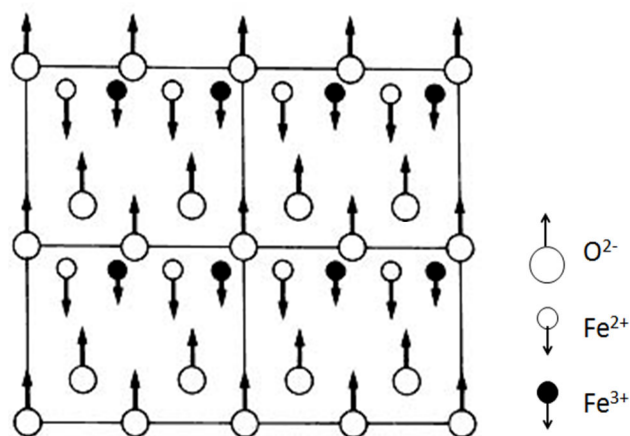


Figura 42. Plano de cuatro celdas de magnetita.

Cualquier material ferromagnético o ferrimagnético a temperaturas inferiores a la temperatura de Curie está formado por pequeñas regiones tridimensionales en las que todos los momentos magnéticos se encuentran alineados en la misma dirección [Callister, 1996; Mercoureff, 1969]. Estas regiones se denominan dominios y cada uno está magnetizado hasta la saturación. Los dominios adyacentes están separados por paredes de dominio, a través de las cuales la dirección de imanación cambia gradualmente. La densidad de flujo ( $B$ ) y la intensidad del campo magnético ( $H$ ) no son proporcionales en el caso de los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos. Si el material está inicialmente no imanado, entonces  $B$  varía en función de  $H$  según se muestra en la figura 43. La curva empieza en el origen, y a medida que aumenta  $H$ , la inducción  $B$  empieza a aumentar lentamente y después más rápidamente hasta que al final alcanza un nivel determinado y se hace independiente de  $H$ . Este valor máximo de  $B$  es la densidad de flujo de saturación ( $B_s$ ) y la imanación correspondiente es la imanación de saturación ( $M_s$ ). Según la ecuación  $B = \mu \cdot H$ , la permeabilidad ( $\mu$ ) es la pendiente de la curva  $B$  frente a  $H$ , y se puede apreciar en la figura 43 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 43.

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

Para reducir a cero  $B$  dentro de la muestra (punto C de la figura 43), se debe aplicar un gradiente  $H$  de magnitud igual a  $-H_c$  en la dirección opuesta del gradiente original.  $H_c$  se denomina coercitividad, o bien, fuerza coercitiva. Al continuar aplicando el gradiente en la dirección contraria a la del original, finalmente se alcanza la saturación en la dirección opuesta, correspondiente al campo  $S'$ . Una segunda inversión del gradiente magnético hasta el punto de saturación inicial (punto S) completa el ciclo de histéresis simétrico y también produce una remanencia negativa ( $-B_r$ ) y una coercitividad positiva ( $+H_c$ ). La curva  $B$  frente a  $H$  de la figura 43 representa un ciclo de histéresis hasta saturación. Desde luego, no es necesario aumentar  $H$  hasta la saturación antes de invertir su dirección. Además, es posible invertir la dirección del gradiente magnético en cualquier punto a lo largo de la curva y generar otros ciclos de histéresis.

A partir de la saturación, punto S de la figura 43, a medida que el campo  $H$  se reduce, la curva no invierte su camino original, sino que se produce un efecto de



histéresis. Debido a este efecto, el campo  $B$  va retrasado con respecto al campo aplicado  $H$ , es decir, disminuye más lentamente. Cuando el campo  $H$  es cero (punto  $R$  de la curva), existe un campo residual  $B$  que se denomina remanencia, o densidad de flujo remanente,  $B_r$ . Por este motivo, el material permanece imanado en ausencia de un campo externo  $H$ .

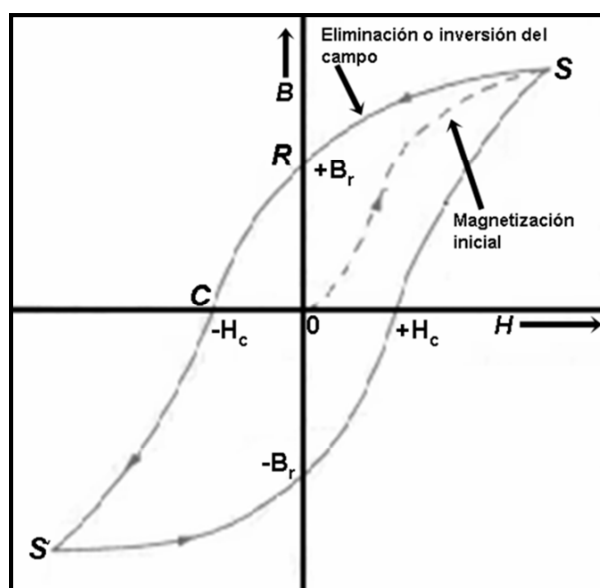


Figura 43. Densidad de flujo magnético frente a la intensidad del campo magnético de un material ferromagnético para la saturación en ambas direcciones (puntos  $S$  y  $S'$ ). La curva de histéresis viene representada por una curva sólida, mientras que la curva discontinua indica la primera imanación del material. La remanencia  $B_r$  y la fuerza coercitiva  $H_c$  también se representan.

La determinación del modo de variación de la imanación de la muestra con el gradiente magnético aplicado es una herramienta muy adecuada para caracterizar (a nivel macroscópico) el comportamiento magnético de un sistema transportador de fármacos basado en nanopartículas de óxido de hierro [Arias y cols., 2007; Reddy y cols., 2012]. Por tanto, el objetivo a alcanzar en este apartado es caracterizar el efecto

que el recubrimiento lipídico puede tener sobre los núcleos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Por otro lado, y con el fin de clarificar las condiciones óptimas para la formulación de las NLSM, investigamos las características magnéticas de las partículas obtenidas para la relación de masa inicial TG: $\text{Fe}_3\text{O}_4$  4:2. Las propiedades magnéticas quedan perfectamente definidas mediante el ciclo de histéresis. Esta caracterización macroscópica del comportamiento magnético de las partículas coloidales se realizó con la ayuda de un magnetómetro tipo Squid Quantum Design MPMS XL equipado con Evercool. Las medidas se realizaron a  $25.0 \pm 0.5$  °C, ya que a esta temperatura se realizó la preparación y el almacenamiento de las suspensiones acuosas.

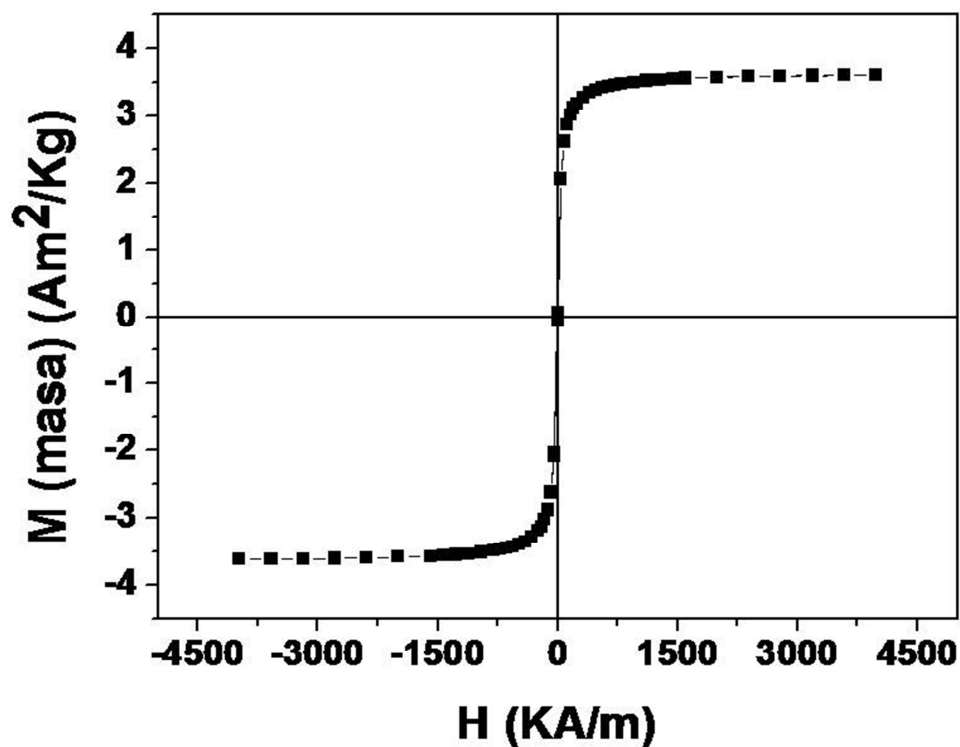


Figura 44. Ciclo de histéresis de las NLSM (■).

La figura 44 recoge el ciclo de histéresis de las NLSM preparadas utilizando una relación de masas TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 4:2. El comportamiento observado se explica considerando el carácter superparamagnético de la Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, consecuencia del pequeño tamaño de las nanopartículas de este óxido de hierro (< 20 nm) [López-López y cols., 2005]. Dado que no se pudo determinar con precisión la densidad de las partículas compuestas, los datos de imanación se dan en masa y no en volumen. De la región lineal del ciclo de histéresis (zona de campo magnético bajo) puede estimarse la susceptibilidad magnética inicial ( $\chi_{mi}$ ) de las NLSM:  $(0.05 \pm 0.002) \text{ Am}^2/\text{kg}$ . También se pudo apreciar un valor muy bajo de la imanación de saturación, debido a la menor cantidad de material magnetizable.

Las nanopartículas obtenidas poseen unas propiedades magnéticas óptimas que pueden ser debidas a que en su modo de obtención albergan un gran número de núcleos superparamagnéticos en su interior (Figura 24c) y, por lo tanto, presentan una mayor capacidad para responder a campos magnéticos. Cabe destacar que cuando el exceso de lípido utilizado en la síntesis de las nanopartículas compuestas es muy grande (relación de masas iniciales TG: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 4:2), las partículas superparamagnéticas quedan embebidas por una cubierta de lípido tan grande que logra reducir significativamente la magnetización de la muestra (véase figura 45a). Si, por el contrario, la cantidad de lípido utilizada es muy pequeña (relación 4:1), la presencia en las nanopartículas compuestas de una matriz que engloba eficientemente los núcleos de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> es muy pobre. De esta manera, pocos núcleos magnéticos deben quedar atrapados en la nanopartícula compuesta formada (Figura 45b), lo que explica su escasa respuesta magnética.

Teniendo en cuenta estas propiedades magnéticas y los resultados obtenidos en el apartado 4.1, queda plenamente justificado que la relación de masas inicial TG: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sea 4:2 para así obtener las nanopartículas magnéticas compuestas con las mejores

características para su uso como coloides magnéticos en el transporte de fármacos hasta el órgano o tejido diana. La imanación de saturación es  $3.61 \text{ Am}^2/\text{Kg}$ .

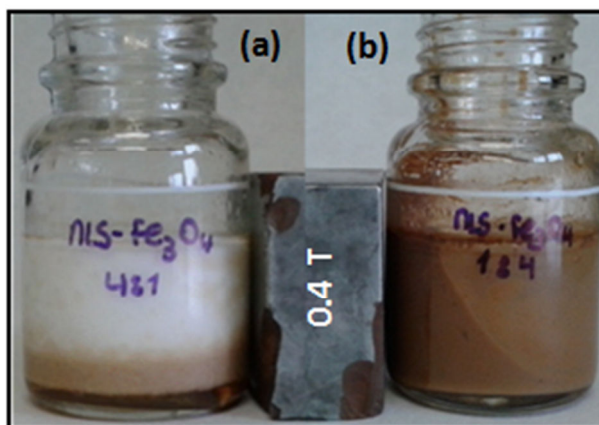


Figura 45. Comportamiento de las dispersiones acuosas de NLSM, sometidas a un campo magnético de 0.4 T, con una relación de masas iniciales TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (a) 4:1 y (b) 1:4.

Estas propiedades magnéticas de las nanopartículas compuestas nos hacen pensar que el sistema diseñado tiene las características adecuadas para su utilización en el transporte de fármacos a un órgano o tejido diana: un recubrimiento lipídico que permitirá el transporte de cantidades suficientes de fármaco y su liberación a una velocidad controlable, y unos núcleos magnéticos con enorme capacidad para responder a gradientes magnéticos aplicados. Por este último motivo la direccionabilidad de las partículas coloidales en el organismo, debe quedar asegurado.

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

La capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados de las partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y de las NLSM fue analizada cualitativamente mediante la visualización del

efecto que ejerce un imán permanente sobre una suspensión acuosa de estas partículas coloidales.

### 4.6.2.1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se prepararon las suspensiones acuosas coloidales conteniendo NLS y NLSM respectivamente con una concentración  $< 0.5 \%$  (p/v). A una temperatura de  $25.0 \pm 0.5$  °C, se puso en contacto la suspensión de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y la de NLSM con un gradiente magnético de 0.4 T, y se observó el comportamiento de las partículas magnéticas en estas condiciones.

Como puede apreciarse en la figura 46, las NLSM son atraídas muy rápidamente por el imán, lo que confirma las excelentes propiedades magnéticas del nanosistema diseñado. El sobrenadante queda completamente transparente en menos de 1 minuto. Por el contrario, la suspensión de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mantiene su aspecto homogéneo incluso tras 24 horas de exposición al gradiente magnético externo. El carácter superparamagnético de los núcleos de óxido de hierro justifica la ausencia de respuesta magnética.

Con el fin de analizar el comportamiento microscópico de las suspensiones acuosas de las nanopartículas compuestas, realizamos en seguimiento mediante microscopía óptica. Las suspensiones acuosas tenían una concentración de nanopartículas del  $0.1 \%$  (p/v) y la exposición a un campo magnético de 400 mT se realizó a  $25.0 \pm 0.5$  °C. En concreto, una gota de suspensión acuosa de las nanopartículas se colocó en un portaobjetos y fue sometida a un imán localizado en diferentes posiciones con respecto a la suspensión magnética.

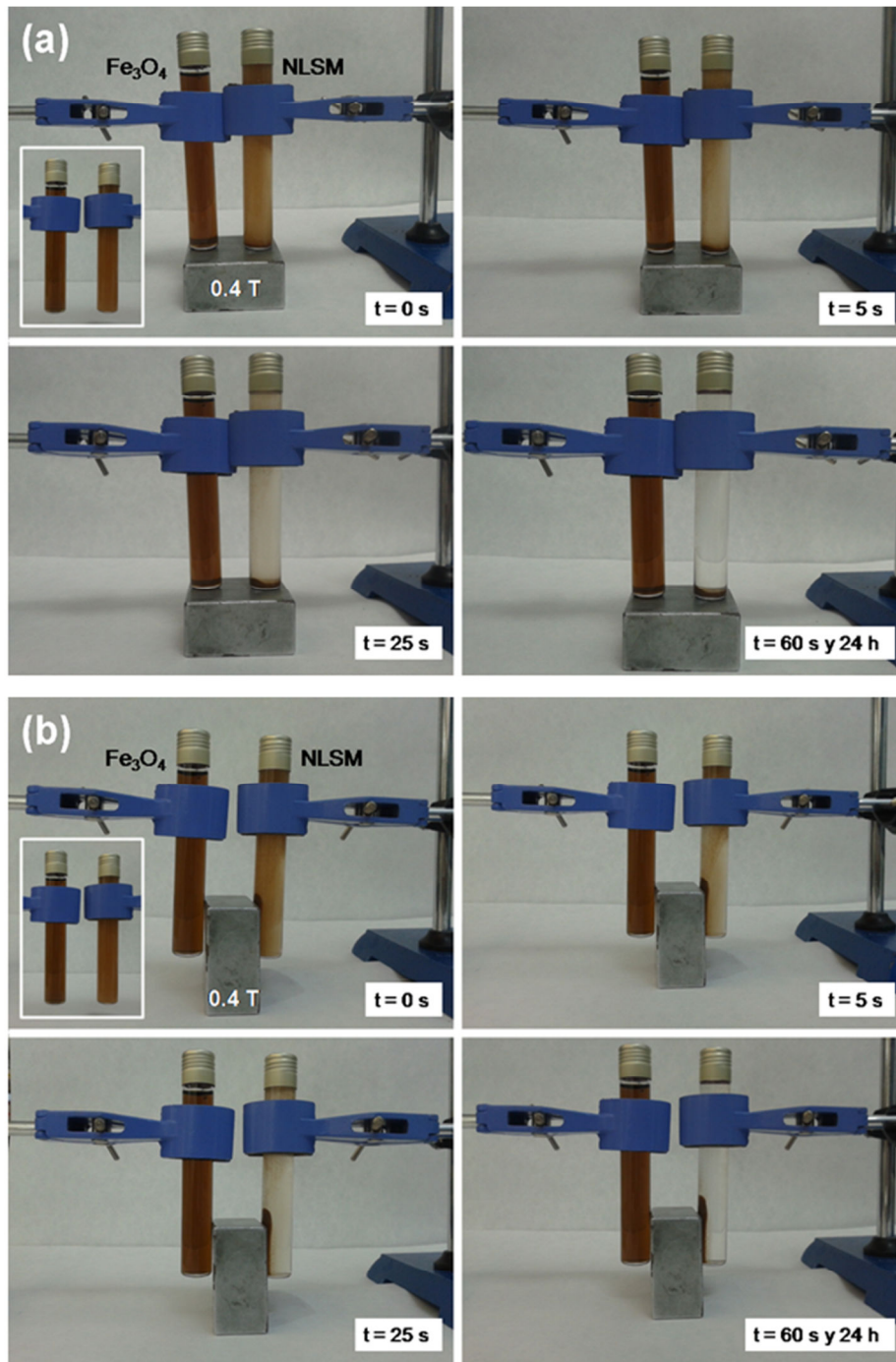


Figura 46. Comportamiento macroscópico de dispersiones acuosas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\approx 0.5\%$ , p/v), y de NLSM ( $\approx 0.5\%$ , p/v; preparadas partiendo de una relación de masas TG: $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 4:2), bajo la influencia de un imán permanente de 0.4 T localizado (a) debajo y (b) en el lateral de estas muestras. Figuras insertadas: aspecto de las dispersiones previo a la exposición al imán.

La visualización del efecto que el gradiente magnético ejerce sobre la suspensión de nanopartículas se realizó utilizando un microscopio óptico (magnificación: 40X) (Figura 47):

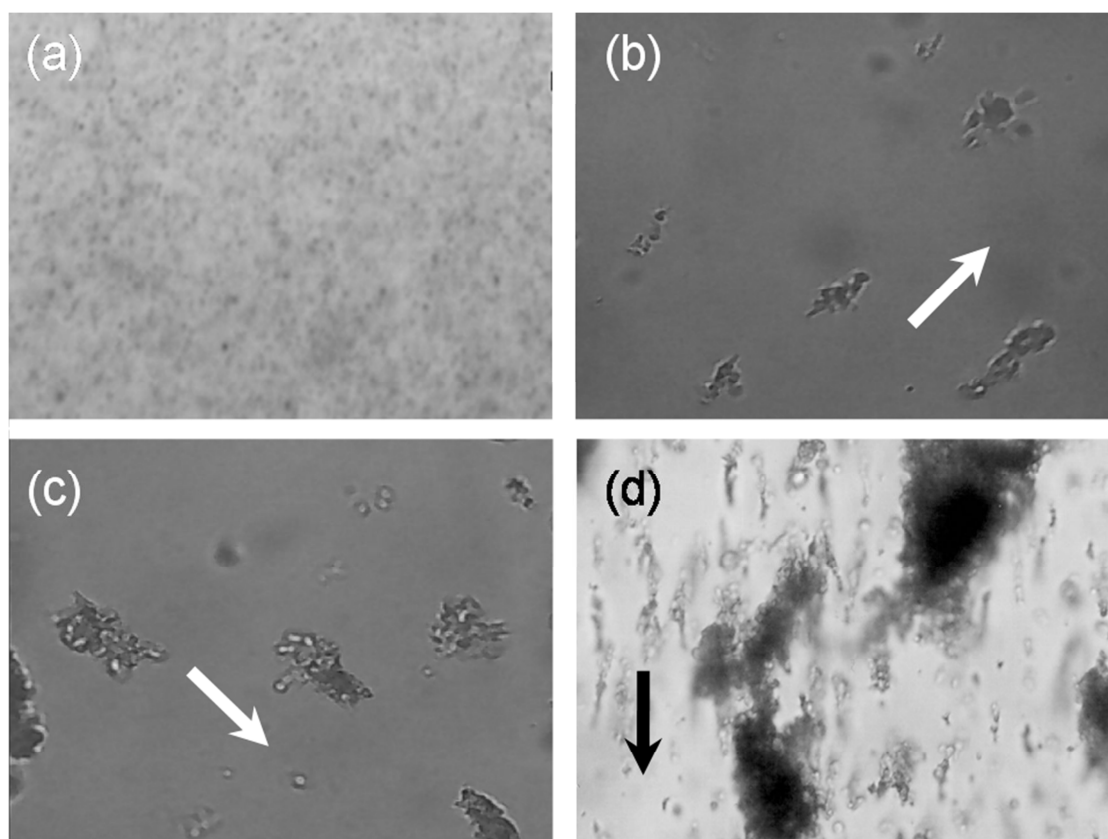


Figura 47. Observación mediante microfotografía óptica (magnificación: 40x) de una dispersión acuosa de NLSM (preparadas partiendo de una relación de masas TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> de 4:2) en ausencia (a) o (b, c, d) bajo la influencia de un imán permanente de 0.4 T, en la dirección de la flecha.

Como puede apreciarse en la figura 47a, la suspensión acuosa de NLSM es muy homogénea en ausencia de campo magnético aplicado. Sin embargo, cuando la gota de suspensión queda bajo la influencia del imán de 0.4 T, las nanopartículas tienden a

formar agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección del gradiente magnético aplicado (Figura 47b en adelante). Este comportamiento puede explicarse si tenemos en cuenta la mayor importancia de las interacciones magnéticas en comparación con las interacciones coloidales de tipo DLVO (interacciones electrostáticas tipo van der Waals y de hidratación o ácido-base) que se producen entre las NLSM, a pesar de la existencia de un recubrimiento lipídico entorno a los núcleos de óxido de hierro.





## **Capítulo 5.**

# **Capacidad de vehiculización de 5-fluorouracilo**



## 5.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL 5-FLUOROURACILO

El objetivo final de la terapia antineoplásica es la eliminación completa de toda célula cancerosa. Para ello, es importante asegurar la máxima acumulación del principio activo en el lugar diana para lograr acrecentar su eficacia terapéutica. Además, diferentes estrategias farmacoterapéuticas intentan minimizar los fenómenos de toxicidad asociados a este tipo de tratamientos farmacológicos y la aparición de resistencias en las células diana [Florez, 2013]. En este sentido, uno de los campos que está recibiendo especial atención es la utilización de coloides como sistemas transportadores de fármacos al tejido u órgano diana. De hecho, numerosos estudios han puesto de manifiesto que los sistemas transportadores basados en nanopartículas de origen polimérico o liposomal, y biodegradables, incrementan la captación del principio activo vehiculizado por las células diana. Así, la eficacia del fármaco se verá significativamente acrecentada, junto con la minimización de la incidencia y severidad de las reacciones adversas asociadas a su utilización [Arias, 2008, 2011; Arias y cols., 2009; González-Rodríguez y cols., 2003; Yong y cols., 2005].

Por todo lo expuesto, el objetivo principal de este capítulo es lograr una óptima vehiculización del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo (5-FU) en las NLSM diseñadas. Según lo expuesto en el capítulo 1, puede esperarse que la utilización de NLSM permita el transporte controlado de la dosis de fármaco vehiculizado hasta el tejido u órgano diana. De esta manera, además de los beneficios ya comentados sobre el uso de este tipo de nanoplataformas [Fang y cols., 2008; Huo y Zhou, 2007; Mehnert y. Mäder, 2001; Müller y cols., 2000; Shidhaye y cols., 2008; Speiser, 1986], en el caso del 5-fluorouracilo, serían mejorados sus problemas de estabilidad-toxicidad (cardiotoxicidad de los productos de degradación generados *in vitro* y/o *in vivo*) [Katzung, 2007; Lemaire y cols., 1994] y su perfil farmacocinético (rápida

metabolización: semivida plasmática de 10 minutos) [Flórez, 2013], pudiéndose incluso llegar a vencer los fenómenos de resistencia que las células cancerosas lograrán en desarrollar [Durán y cols., 2008; Reddy y cols., 2012].

La quimioterapia constituye un método terapéutico muy útil que pretende, junto con otras estrategias terapéuticas como la cirugía y la radioterapia mejorar el tratamiento del cáncer. La actividad de los agentes antineoplásicos pretende frenar la proliferación y el crecimiento de las células malignas. Para ello, los agentes quimioterápicos actúan sobre la maquinaria reproductora celular, y solo excepcionalmente el objetivo primordial es inhibir la síntesis de proteínas [Flórez, 2013]. La Organización Mundial de la Salud clasifica los fármacos antineoplásicos en tres niveles de prioridad, según criterios avalados científicamente de utilidad en el tratamiento de tumores y según la incidencia global de los tumores que responden a la terapia, y dentro de los que pertenecen al grupo de prioridad 1 se encuentra el 5-fluorouracilo [Sikora y cols., 1999].

El 5-fluorouracilo (Figura 48) utilizado (Sigma Aldrich, Alemania) es un polvo cristalino blanco, inodoro, con un peso molecular de 130.08 g/mol y estable en aire. Su punto de fusión se encuentra entre 280 y 284 °C, y es soluble en agua, metanol, etanol y alcohol isopropílico [Florey, 1973].

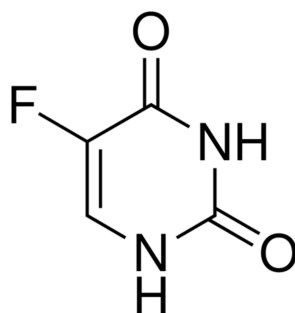


Figura 48. Estructura química del 5-fluorouracilo.

El 5-fluorouracilo es una pirimidina fluorada, difiere del uracilo en un átomo de flúor añadido en la posición 5, en lugar del hidrógeno. Debido a su estructura química, interfiere en el metabolismo de los nucleósidos y puede incorporarse al ARN y ADN, produciendo citotoxicidad y muerte celular.

Es un antimetabolito de la uridina que inhibe la timidilato sintasa y, por lo tanto interfiere con la síntesis del ARN y el ADN [Walther y cols., 2009] (Figura 49).

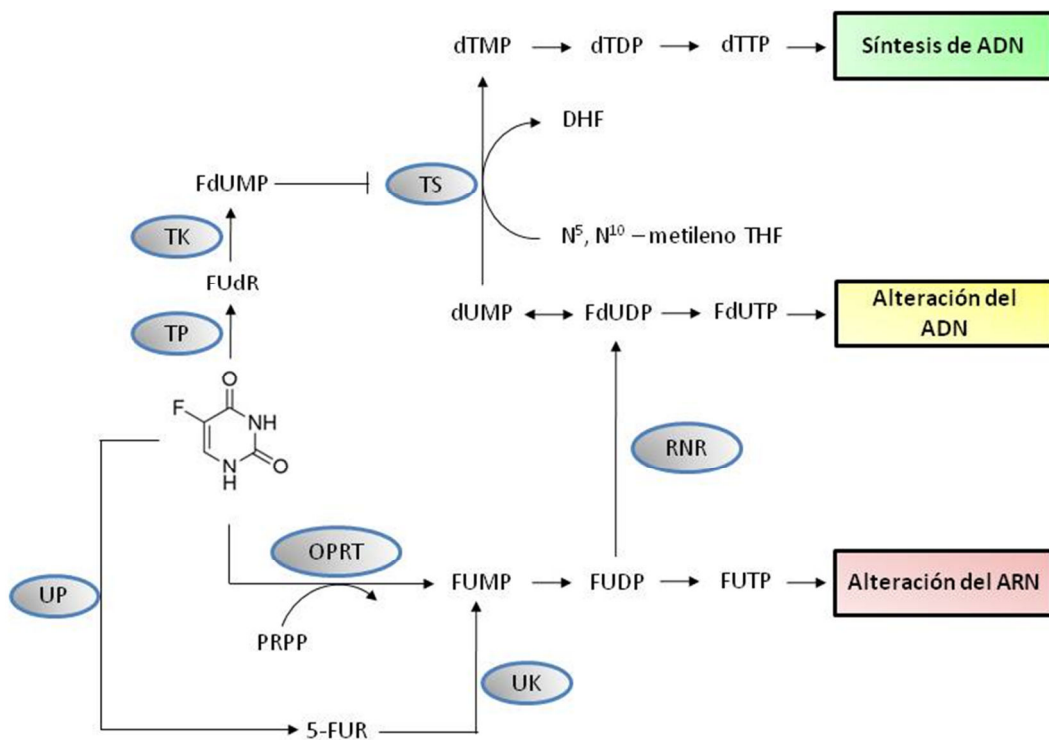


Figura 49. Mecanismo de actuación del 5-FU.

La enzima TS cataliza la reacción de transferencia de un grupo metilo desde el N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metileno tetrahidrofolato al dUMP obteniéndose dTMP y DHF. El dTMP se fosforila dos veces dando lugar a dTDP y seguidamente dTTP, uno de los cuatro desoxirribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN, incorporándose al ADN.

El 5-fluorouracilo puede ser transformado en FdUMP mediante la acción de la TP y luego a FdUMP a través de la TK. El FdUMP se une de manera irreversible a la TS inhibiendo su acción. Se bloquea así la síntesis de timidilato a partir de uracilo. Como el timidilato es el precursor de la timidina trifosfato, uno de los cuatro desoxirribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN, su deficiencia ocasiona la depleción del trifosfato de timidina y, la interrupción de la síntesis de ADN. Además, tanto la FdUDP pueden ser convertidas a FdUTP e incorporarse al ADN mediante la ADN polimerasa en lugar de la dTTP ocasionando un ADN aberrante.

La incorporación de los derivados de 5-fluorouracilo en el ADN puede dar lugar a citotoxicidad. Un sistema intacto de reparación de emparejamientos erróneos puede detectar el FdUTP. Además, variaciones en las enzimas que median en la incorporación en el ARN y en el ADN pueden alterar la concentración intercelular y la citotoxicidad del 5-fluorouracilo, dando lugar a una actividad antitumoral alterada o toxicidad sistémica [Ghoshal y Jacob, 1997; Valeriote y Santelli, 1984].

Los niveles de expresión de la enzima TS están asociados con la eficiencia del fármaco. La selectividad del 5-fluorouracilo hacia las células en división rápida se debe a que las concentraciones de timidilato sintasa son 20 veces mayores en las células en división que en las células no proliferantes. Las células de cáncer colorectal con altos niveles de TS parece que tienen una supervivencia menor que otros tumores con una expresión de TS menor [Johnston y cols., 1995; Leichman y cols., 1997; Popat y cols., 2004; Salonga y cols., 2000]. No está claro los factores que inducen cambios en los niveles de expresión de esta enzima, aunque puede deberse a variaciones genéticas en la línea germinal.

Para incorporarse al ARN, el 5-fluorouracilo se transforma en FUMP, lo que se puede producir mediante la transferencia directa de una ribosa desde el PRPP al 5-fluorouracilo, catalizado por la OPRT; o mediante la adición de una ribosa al 5-

fluorouracilo mediante la UP para formar FUR, el cual se fosforila mediante la UK formándose FUMP. Este último puede fosforilarse dos veces dando lugar a FUDP y seguidamente FUTP. Este último se incorpora al ARN inhibiendo su procesamiento y su función específica, provocando finalmente la apoptosis celular. Por otro lado el FUDP puede transformarse en FdUDP mediante la acción de la RNR.

Durante las primeras 24 horas de exposición al 5-fluorouracilo, se observa una citotoxicidad en la fase S del ciclo celular, probablemente porque actúa como falso sustrato en el proceso de síntesis de los constituyentes esenciales de los ácidos nucleicos, provocando la síntesis de un ADN anómalo o incluso la detención del proceso. A las 24 horas, la citotoxicidad tiene lugar en la fase G1, probablemente como consecuencia de la incorporación del 5-fluorouracilo en el ARN [Li y cols., 2004; Zhu y cols., 1996].

El 5-fluorouracilo exhibe una farmacocinética no lineal tal y como se muestra en la figura 50 [Bocci y cols., 2000].

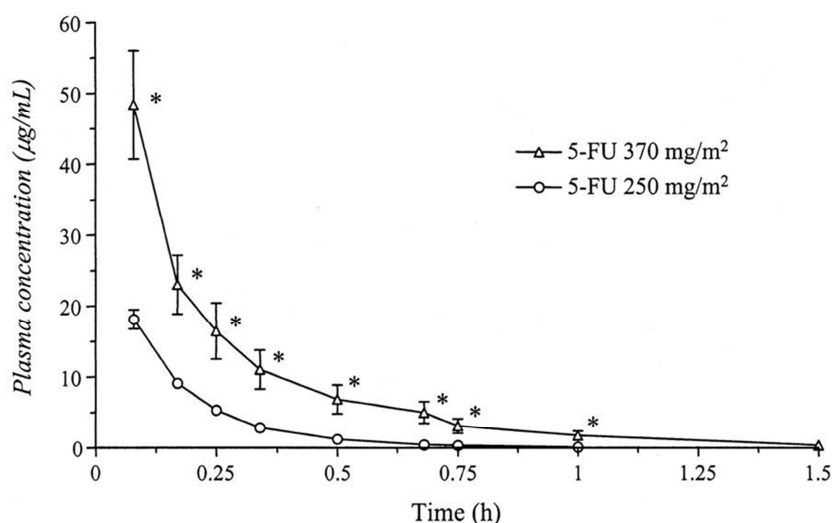


Figura 50. Perfil farmacocinético del 5-fluorouracilo en plasma humano en las dosis 250 y 370 mg/m<sup>2</sup>. Mann-Whitney test. Reproducido de Bocci, 2000. Copyright American Association for Cancer Research (2000).



Como confirman Bocci y cols., después de la administración intravenosa de 5-fluorouracilo, la semi-vida de eliminación es de 16 minutos (entre 8 y 20 minutos) y es dosis-dependiente. A diferencia del fármaco nativo, los nucleótidos intracelulares FUTP y dUMP tienen semi-vidas muy prolongadas [Longley y cols., 2003].

A medida que aumentan las dosis intravenosas, disminuye la captación hepática, aumenta la biodisponibilidad y el área bajo la curva, y se reduce el aclaramiento. Este comportamiento se debe a la saturación de los procesos de metabolización del fármaco. Una pequeña cantidad de 5-fluorouracilo se transforma en metabolitos activos (FUTP y FdUMP) en los diferentes tejidos. El resto (un 85% aproximadamente) es catabolizado mediante la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) a una dihidropirimidina. La DPD está presente en todo el organismo, y se encuentra a unas concentraciones variables, lo que da lugar a unos niveles plasmáticos de 5-fluorouracilo impredecibles. La ausencia o los bajos niveles de DPD, hace que el 5-fluorouracilo sea muy tóxico, incluso en dosis bajas [Harris y cols., 1990; Salonga y cols., 2006]. El 5-fluorouracilo y sus metabolitos se eliminan primariamente a través de la bilis y de la orina.

Una de las limitaciones de la aplicación clínica del 5-fluorouracilo es el desarrollo de resistencias por las células tumorales. Además, su alta metabolización en el organismo hace necesaria una continua administración a dosis altas para conseguir concentraciones terapéuticas eficaces en el lugar de acción, lo que puede ocasionar de forma colateral una toxicidad severa. Por todo esto, su eficacia real en clínica se encuentra seriamente limitada. Concretamente, la respuesta obtenida en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado con el 5-fluorouracilo es inferior al 10 %, y sólo se logra incrementar hasta un 45 % cuando se usa en combinación con otros antitumorales [Zhang y cols., 2008].

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

- ☞ Mediante combinación con otros antitumorales.
- ☞ Uso simultáneo con agentes modificadores biológicos como el ácido fólico y el metotrexato, los cuáles interactúan con las acciones biológicas del 5-fluorouracilo aumentando sus efectos terapéuticos.
- ☞ La infusión continua incrementa el porcentaje de células tumorales susceptibles. Esto posibilita la administración de dosis muy activas en pacientes resistentes al 5-fluorouracilo administrado como bolo inyectable.

Tiene un amplio espectro de actividad contra los tumores sólidos, solo o en combinación con otros quimioterápicos, siendo usado en el tratamiento de cáncer colorectal, hepatocelular, pancreático, de estómago, mama, cabeza y cuello, ovario, queratosis actínica y carcinoma superficial de células basales.

En ocasiones, se ha utilizado en infusión intraarterial (p. ej., en metástasis hepática del carcinoma de colon), pero la forma más frecuente de administración es la intravenosa en forma de bolo (300-500 mg/m<sup>2</sup>/día durante 4 o 5 días, o 600-1500 mg/m<sup>2</sup> una vez a la semana en semanas alternas) o infusión continua (300-1000 mg/m<sup>2</sup>/día cada cuatro semanas, o 300 mg/m<sup>2</sup>/día indefinidamente). Se usa como adyuvante en el tratamiento de cáncer colorrectal en estadio III en combinación con levamisol, leucovorina o radioterapia.

Algunas combinaciones del 5-fluorouracilo son:

Cáncer	Combinación 5-fluorouracilo +
Hepatocelular	Leucovorina
Estómago	Doxorubicina + Mitomicina Doxorubicina + Metotrexato + Leucovorina Doxorubicina + Cisplatino Etoposide + Leucovorina
Páncreas	Doxorubicina + Mitomicina Estreptozocina + Mitomicina
Mama	Ciclofosfamida + Metotrexato
Cabeza y cuello	Cisplatino Carboplatino Cisplatino + Leucovorina
Ovario	Ciclofosfamida + Hexametilmelanina + Metotrexato
Cuello	Cisplatino

Tabla 12. Diversas combinaciones de 5-fluorouracilo con otros antineoplásicos para el tratamiento de diversos tipos de cánceres.

El 5-fluorouracilo también se utiliza como tratamiento paliativo en pacientes no curados por cirugía o radioterapia, y ha sido empleado en el tratamiento del cáncer de la cubierta externa de la glándula adrenal, de endometrio, de esófago, de pene, de vulva y en el hepatoblastoma. Por vía tópica este agente antitumoral puede provocar fotosensibilización y eritema, exfoliación, ulceración, necrosis y reepitelización. No obstante, se utiliza esta vía de administración en el tratamiento de la psoriasis, en la terapéutica de nuevos tumores epidérmicos y de la queratosis premaligna de la piel [Flórez, 2008].

La especificidad del 5-fluorouracilo por las células tumorales es escasa y ello condiciona la frecuente y grave afectación de otros órganos y tejidos. Por este motivo,

se genera una toxicidad que casi siempre limita las posibilidades de administrar la dosis total que teóricamente sería conveniente. Las reacciones adversas más frecuentes se aprecian en el tracto gastrointestinal y en la médula ósea. Las primeras manifestaciones tóxicas abarcan desde náuseas y vómitos hasta estomatitis y ulceraciones en diversas localizaciones del tubo digestivo. En la médula ósea provoca mielosupresión, en la que predomina leucopenia. Este fármaco puede producir también alopecia, conjuntivitis y síntomas neurológicos agudos como somnolencia, parestesias y ataxia cerebelosa. La actividad mielotóxica del 5-fluorouracilo predomina cuando la administración parenteral es en forma de bolo, y disminuye si se administra en infusión intravenosa. Algunos de los efectos adversos que produce pueden aparecer meses o años después de su administración. Un efecto no comúnmente asociado a este fármaco es la cardiotoxicidad [Bertolini y cols., 1999], atribuida a los compuestos de degradación (fluoroacetaldehído y ácido fluoromalonaldehídico) presentes en los viales inyectables que se forman con el tiempo en el medio básico necesario para solubilizar el fármaco. La metabolización del fluoroacetaldehído genera el fluoroacetato, compuesto potencialmente cardiotoxico [Lemaire y cols., 1994]. Además, altera los mecanismos de división y procesamiento de las células implicadas en la inmunidad celular. De ahí que con frecuencia surja un estado de depresión inmunitaria que facilita la aparición de infecciones por virus, hongos y bacterias. Además, la modificación que induce en la estructura del genoma puede originar mutagenicidad y la carcinogenicidad [Katzung, 2007].

La utilización de las NLSM permitiría el transporte controlado de dosis de fármaco vehiculizado hasta el tejido u órgano diana. De esta manera, a los principales beneficios comentados sobre el uso de este tipo de nanoplataformas [Durán y cols., 2008; Pouliquen y Chouly, 1999; Senyei y cols., 1978], se sumarían los derivados de la mejora de sus problemas de estabilidad [Katzung, 2007; Lemaire y cols., 1994] y de su perfil farmacocinético [Flórez, 1997], pudiéndose

incluso llegar a vencer los fenómenos de resistencia que las células cancerosas desarrollen [Durán y cols., 2008].

En el presente capítulo analizaremos las condiciones óptimas de incorporación de 5-fluorouracilo en las NLSM. Para ello, se estudian dos factores fundamentales (la capacidad de vehiculización de fármaco en la matriz de la nanopartícula y la concentración de fármaco empleado en la síntesis) mediante técnicas cualitativas (electroforesis). Finalmente, se analizan las cinéticas de liberación *in vitro* de 5-fluorouracilo desde las NLSM y la influencia en este proceso de liberación de un factor condicionante de la incorporación del fármaco en las nanopartículas: el método de vehiculización.

## 5.2. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS DE LAS DISOLUCIONES DE 5-FLUOROURACILO

### 5.2.1. ABSORBANCIA ÓPTICA DE LAS DISOLUCIONES

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

Las primeras etapas del análisis espectrofotométrico pretenden establecer las condiciones de trabajo y la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración del analito en estudio. Las medidas de absorbancia espectrofotométricas se hacen 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, logrando así la máxima sensibilidad. Además, bajo estas circunstancias se puede esperar un mejor acuerdo con la ley de Beer, y las medidas son menos sensibles a las incertidumbres que surgen de las limitaciones del instrumento [Skoog y cols., 2001].

Si bien la metodología seguida en la formulación de los coloides determina las condiciones de trabajo (el fármaco se encontrará disuelto en la primera fase acuosa diseñada para la pre-emulsión de las nanopartículas), un aspecto crucial previo es la clarificación de las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de fármaco. Este estudio se realizó prestando especial atención a su concentración, a la temperatura y al pH de las disoluciones utilizadas. Debido a la (ligera) fotosensibilidad del fármaco investigado [Florey, 1973], por cautela siempre se procedió con diligencia en la preparación y manipulación de las soluciones del principio activo y se conservaron en recipientes cubiertos por papel de aluminio.

Para llevar a cabo el estudio, se investigaron las condiciones óptimas de conservación durante 24 horas según la concentración molar del fármaco (desde  $10^{-5}$  hasta  $10^{-2}$ ), la temperatura (4 y 25 °C) y el pH de las disoluciones (pH natural = 4.8, pH = 7.4 ajustando con un tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Para la disolución de los cristales de 5-fluorouracilo se precisó la utilización de ultrasonidos, comprobando que su intensidad y el tiempo necesario para su completa disolución fue menor para las disoluciones preparadas a pH 7.4. No se observó ningún tipo de alteración macroscópica en las disoluciones preparadas tras el periodo de conservación de 24 horas. Sin embargo, se ha descrito que en disoluciones con una concentración superior a  $10^{-2}$  M ocurre

espontáneamente la recristalización de este fármaco en la disolución [Arias y cols., 2005; Barberi-Heyob y cols., 1995]. Las disoluciones preparadas se mantuvieron siempre a 4 °C hasta ser utilizadas para así ralentizar los posibles procesos de degradación [Arias y cols., 2005].

La curva de calibrado de las disoluciones de 5-fluorouracilo se realizó utilizando las concentraciones molares  $10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $9 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $7 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  M. Pasadas 24 horas desde su preparación, se determinó el espectro de absorción UV-Vis de cada una de las disoluciones de 5-fluorouracilo (en el intervalo de concentración  $10^{-5}$  –  $10^{-2}$ ), realizando un barrido de longitudes de onda desde 600 a 200 nm, con intervalos de 1.0 nm. Se utilizó como blanco en la calibración previa del aparato agua bidestilada para eliminar posibles interferencias en el espectro del fármaco generadas por el medio de disolución. Los resultados de este estudio se recogen en la figura 51a.

Como puede apreciarse en la figura, sólo se observa señal por debajo de 325 nm y se aprecia que la absorción se incrementa al aumentar la concentración de fármaco en el medio. De los dos máximos observados, el único que presenta una longitud de onda de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones es el correspondiente a 266 nm [Florey, 1973], longitud de onda seleccionada para las medidas que realizamos. A medida que la concentración de 5- fluorouracilo aumenta por encima de la concentración  $2 \cdot 10^{-4}$  M los dos máximos tienden a fusionarse y la longitud de onda de máxima absorbancia decrece significativamente, produciendo una desviación de la ley de Beer, lo que impide realizar determinaciones fiables a estas concentraciones.

La determinación del coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y concentración mediante el método de los mínimos cuadrados. Los valores de absorbancia a diferentes concentraciones obtenidos a 266 nm cumplen

la ley de Beer. En la figura 51b se muestran los datos y la recta de ajuste. El resultado obtenido fue  $\epsilon = 7370 \pm 90 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  ( $r=0.999$ ).

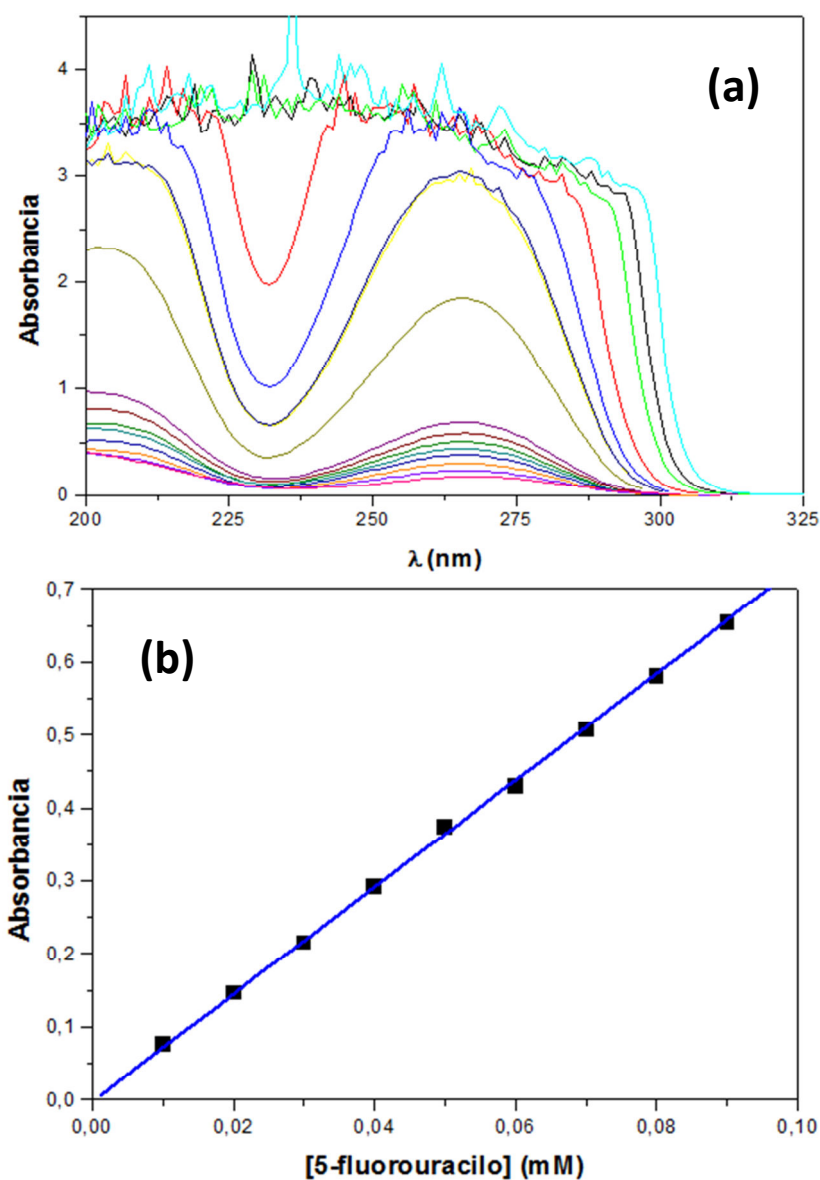


Figura 51. (a) Espectro de absorbancia UV-Vis de las disoluciones de 5-fluorouracilo. Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son:  $10^{-5}$ ,  $2\cdot 10^{-5}$ ,  $3\cdot 10^{-5}$ ,  $4\cdot 10^{-5}$ ,  $5\cdot 10^{-5}$ ,  $6\cdot 10^{-5}$ ,  $7\cdot 10^{-5}$ ,  $8\cdot 10^{-5}$ ,  $9\cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $2\cdot 10^{-4}$ ,  $3\cdot 10^{-4}$ ,  $4\cdot 10^{-4}$ ,  $5\cdot 10^{-4}$ ,  $7\cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5\cdot 10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M. (b) Determinación del coeficiente de absortividad molar de las disoluciones de 5-fluorouracilo a la longitud de onda de máxima absorbancia (266 nm).



### 5.2.2. FACTORES EXPERIMENTALES CONDICIONANTES

En este apartado pretendemos establecer la influencia de la exposición del fármaco a distintas temperaturas de conservación, a la luz y a diferentes condiciones de pH en sus propiedades espectrofotométricas.

En primer lugar, investigamos el efecto de la temperatura y el de la luz sobre la absorbancia UV-Vis de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo preparadas. Para ello, preparamos diferentes disoluciones del antitumoral siempre a la concentración de  $10^{-4}$  M, y las dividimos en cuatro grupos diferentes según las condiciones de conservación durante 24 horas: *i*) exposición a la luz a  $4.0 \pm 0.5$  °C; *ii*) protección de la luz (papel de aluminio) a  $4.0 \pm 0.5$  °C; *iii*) exposición a la luz a temperatura ambiente ( $25 \pm 0.5$  °C); y, *iv*) protección de la luz (papel de aluminio) a temperatura ambiente.

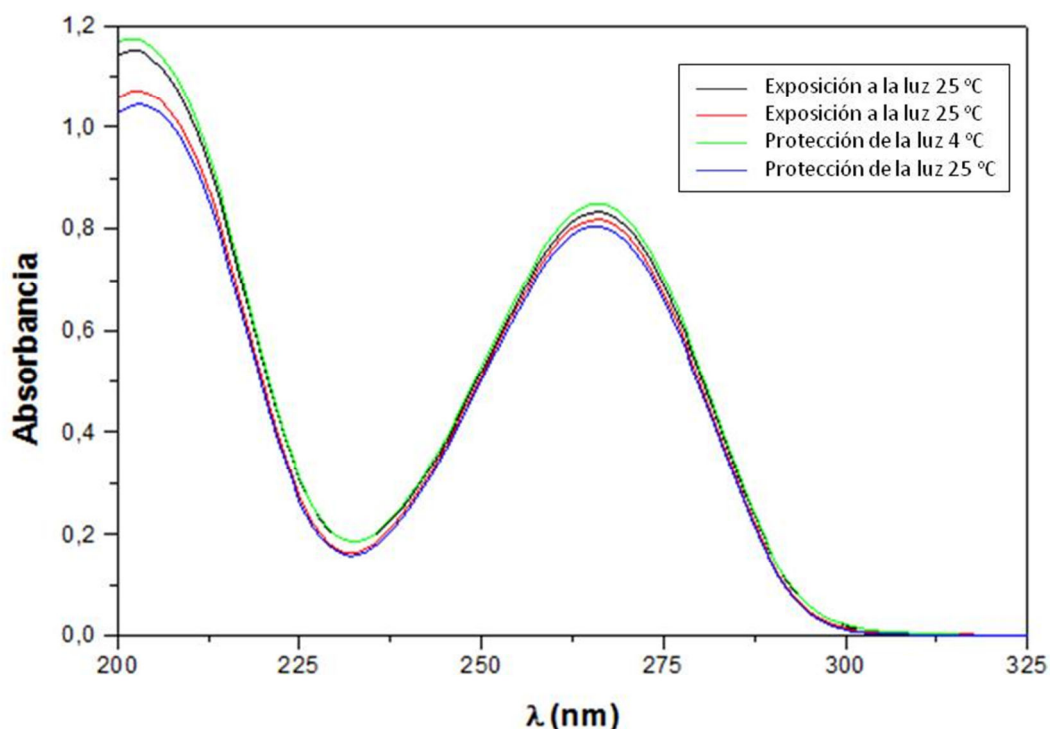


Figura 52. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones de 5-fluorouracilo ( $10^{-4}$  M) expuestas y protegidas de la luz, a diferentes temperaturas (4 y 25 °C).

Como puede apreciarse en la figura 52, la luz y la temperatura afectan levemente a los valores de absorbancia a 266 nm. Se observa que hay una mayor tendencia hacia valores menores cuando el principio activo se conserva a temperatura ambiente y expuesto a la luz ambiental. Por este motivo, las disoluciones acuosas de este fármaco se mantuvieron siempre protegidas de la luz y a baja temperatura.

Por otro lado, comprobamos si el pH afecta al valor de absorbancia del fármaco en disolución. Para ello se prepararon disoluciones a pH natural (4.8) y a pH 7.4 (tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) con diferentes concentraciones de fármaco 10<sup>-4</sup>, 5·10<sup>-5</sup> y 10<sup>-5</sup> M respectivamente, obteniendo los resultados que se presentan en la figura 53.

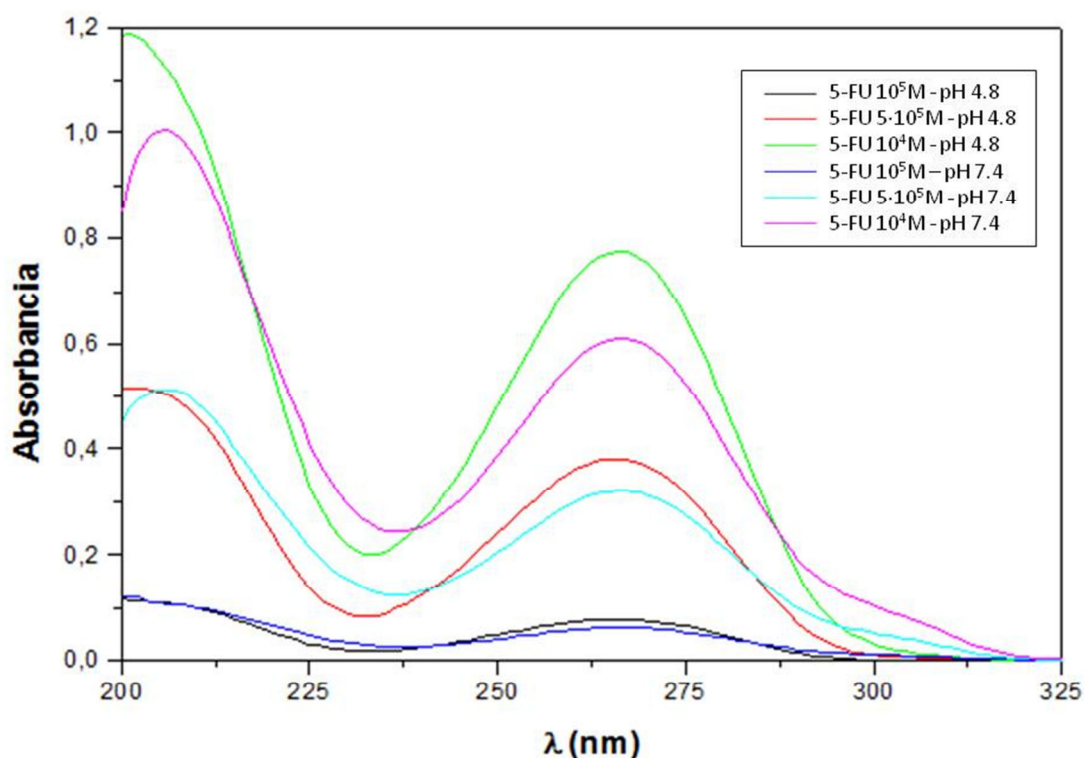


Figura 53. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones de 5-fluorouracilo (5-FU: 10<sup>-5</sup>, 5·10<sup>-5</sup> y 10<sup>-4</sup>) preparadas utilizando agua bidestilada (pH natural 4.8) o tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4).

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

La figura 54a nos muestra la aparición de dos máximos por debajo de 350 nm, cuya absorbancia crece al aumentar la concentración de principio activo en el medio. El primero de ellos ( $\lambda = 266$  nm, como ocurre a pH 4.8) será el que utilizemos en la cuantificación de la liberación de fármaco desde los diferentes tipos de nanopartículas. Por encima de  $2 \cdot 10^{-4}$  M, los máximos tienden a fusionarse en uno (lo que ocurre cuando la concentración es superior a  $10^{-3}$  M), por lo que no pueden realizarse medidas por encima de esta concentración. En la figura 54b quedan recogidos los datos experimentales utilizados y la resta de ajuste obtenida en la determinación del coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon = 5890 \pm 160 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $r = 0.997$ ).

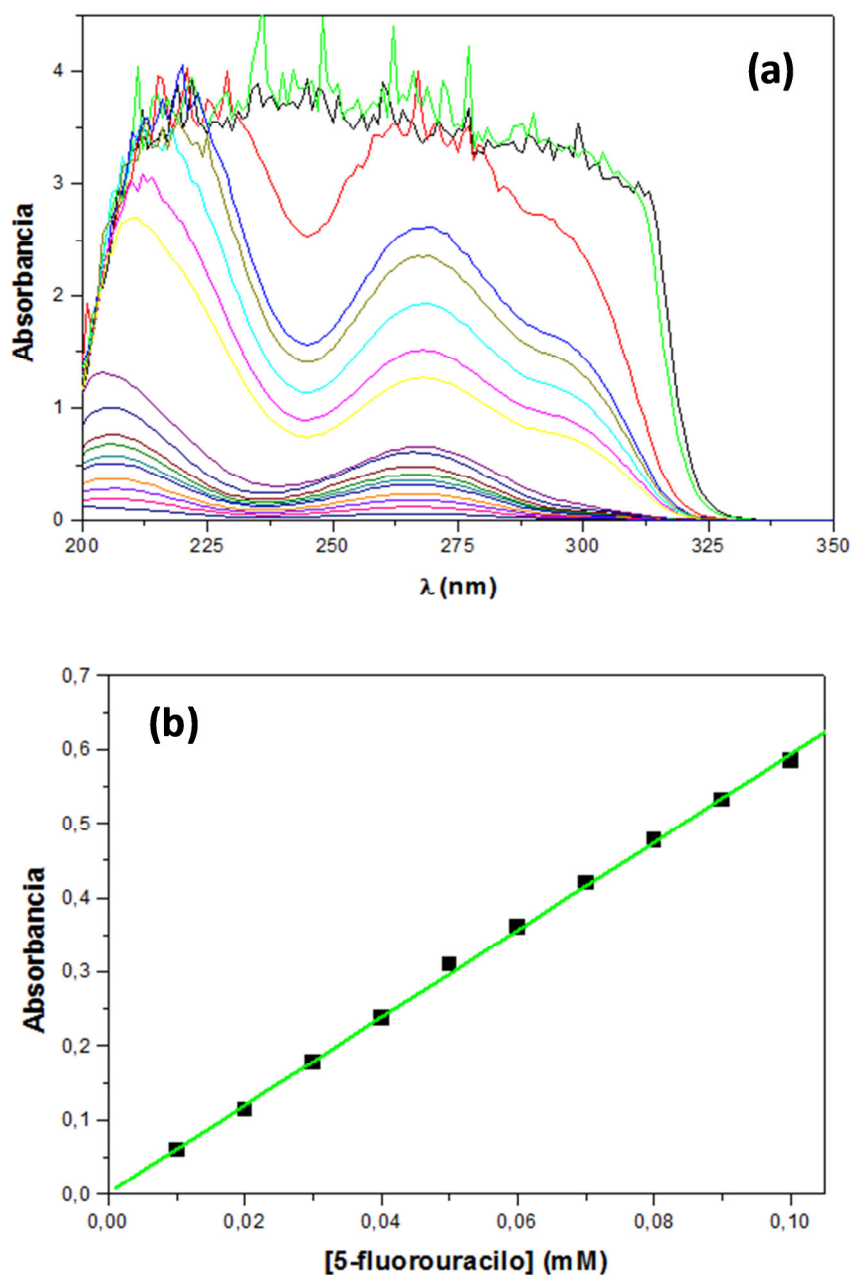


Figura 54. (a) Espectro de absorbanca UV-Vis de disoluciones de 5-fluorouracilo preparadas utilizando un tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4). Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbanca son:  $10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $9 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $7 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M. (b) Determinación del coeficiente de adsorvidad molar de las disoluciones de 5-fluorouracilo a un pH  $7.4 \pm 0.1$  y para la longitud de onda de máxima absorbanca (266 nm).

### 5.2.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

El método espectrofotométrico UV-Vis que se utilizará para el análisis de la cantidad de fármaco vehiculizado o liberado por las nanopartículas debe ser validado previamente para verificar su exactitud, precisión, linealidad y límite de detección. Con este objetivo, se prepararon seis réplicas de disoluciones acuosas con concentraciones molares de fármaco entre  $10^{-5}$  M y  $10^{-2}$  M, a pH natural (4.8) y a pH 7.4 (utilizado en los ensayos de liberación *in vitro*) a las que se les mide la absorbancia.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
$10^{-5}$	$0.076 \pm 0.003$	3.7
$2 \cdot 10^{-5}$	$0.146 \pm 0.003$	2.0
$3 \cdot 10^{-5}$	$0.215 \pm 0.010$	4.8
$4 \cdot 10^{-5}$	$0.292 \pm 0.008$	2.8
$5 \cdot 10^{-5}$	$0.373 \pm 0.009$	2.5
$6 \cdot 10^{-5}$	$0.429 \pm 0.016$	3.8
$7 \cdot 10^{-5}$	$0.507 \pm 0.024$	4.8
$8 \cdot 10^{-5}$	$0.580 \pm 0.008$	1.4
$9 \cdot 10^{-5}$	$0.653 \pm 0.019$	2.8
$10^{-4}$	$0.746 \pm 0.035$	4.7
$2 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.740 \pm 0.009$	1.26
$3 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.740 \pm 0.013$	1.75
$4 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.758 \pm 0.006$	0.78
$5 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.721 \pm 0.007$	0.97
$7 \cdot 10^{-4}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.729 \pm 0.011$	1.5
$10^{-3}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.771 \pm 0.018$	2.3
$5 \cdot 10^{-3}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.762 \pm 0.020$	2.6
$10^{-2}$ ( $\rightarrow 10^{-4}$ )	$0.743 \pm 0.012$	1.68

Tabla 13. Absorbancia (media  $\pm$  D.E.) de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo para cada una de las concentraciones indicadas a pH 4.8 (natural). El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

En la tabla 13 se recogen los valores de absorbancia de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo en función de su concentración a pH natural.

Verdadera (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
$10^{-5}$	$(1.07 \pm 0.04) \times 10^{-5}$	3.10	3.6
$2 \cdot 10^{-5}$	$(1.98 \pm 0.04) \times 10^{-5}$	0.97	2.0
$3 \cdot 10^{-5}$	$(2.92 \pm 0.13) \times 10^{-5}$	2.74	4.6
$4 \cdot 10^{-5}$	$(3.95 \pm 0.11) \times 10^{-5}$	1.26	2.8
$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.06 \pm 0.13) \times 10^{-5}$	1.18	2.5
$6 \cdot 10^{-5}$	$(5.83 \pm 0.22) \times 10^{-5}$	2.91	3.7
$7 \cdot 10^{-5}$	$(6.88 \pm 0.32) \times 10^{-5}$	1.74	4.7
$8 \cdot 10^{-5}$	$(7.87 \pm 0.12) \times 10^{-5}$	1.65	1.5
$9 \cdot 10^{-5}$	$(8.86 \pm 0.26) \times 10^{-5}$	1.58	2.9
$10^{-4}$	$(1.01 \pm 0.47) \times 10^{-4}$	0.99	4.6
$2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.00 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	0.40	1.3
$3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.00 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	0.39	1.8
$4 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.03 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	2.70	0.8
$5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.78 \pm 0.10) \times 10^{-5}$	2.25	1.0
$7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.88 \pm 0.32) \times 10^{-5}$	1.12	1.5
$10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.04 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	4.30	2.3
$5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.03 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	3.20	2.6
$10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.01 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	1.69	0.8

Tabla 14. Comparación de las concentraciones “verdaderas” de 5-fluorouracilo en solución acuosa 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 [(estimado - actual)/estimado], también se muestran los C.V.

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

pequeños valores de los coeficientes de variación (< 5 % en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. El ajuste lineal de la relación absorbancia (A) – concentración molar (C) [ $A = (0.004 \pm 0.005) + (7370 \pm 90) \cdot C$ ] es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

Para comprobar la exactitud del método analítico utilizamos los datos de absorbancia de la tabla 13 (“concentración verdadera” en la tabla 14). Así se obtienen las concentraciones estimadas para cada una de las seis réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas como “estimadas” en la tabla 14. Como antes, los pequeños valores de los C.V. y sus errores relativos son indicativos de la exactitud del método espectrofotométrico.

De igual forma (tabla 15) se procedió en el caso del 5-fluorouracilo a pH 7.4 (tampón NaOH-K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). 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) [ $A = (0.006 \pm 0.01) + (5890 \pm 160) \cdot C$ ] se confirma estadísticamente, con un error inferior al 0.1 %. Finalmente, se procedió de igual forma a la descrita para demostrar la exactitud del método analítico (tabla 16).

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
$10^{-5}$	$0.060 \pm 0.003$	4.3
$2 \cdot 10^{-5}$	$0.114 \pm 0.005$	4.0
$3 \cdot 10^{-5}$	$0.177 \pm 0.007$	3.9
$4 \cdot 10^{-5}$	$0.238 \pm 0.006$	2.5
$5 \cdot 10^{-5}$	$0.310 \pm 0.015$	4.8
$6 \cdot 10^{-5}$	$0.360 \pm 0.006$	1.7
$7 \cdot 10^{-5}$	$0.420 \pm 0.017$	4.1
$8 \cdot 10^{-5}$	$0.477 \pm 0.013$	2.7
$9 \cdot 10^{-5}$	$0.532 \pm 0.011$	2.0
$10^{-4}$	$0.584 \pm 0.020$	3.4
$2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.610 \pm 0.005$	0.008
$3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.579 \pm 0.015$	2.5
$4 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.568 \pm 0.002$	0.3
$5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.589 \pm 0.020$	3.4
$7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.596 \pm 0.009$	1.5
$10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.607 \pm 0.013$	2.1
$5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.563 \pm 0.006$	1.1
$10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$	$0.572 \pm 0.023$	4.0

Tabla 15. Absorbancia (media  $\pm$  D.E.) de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo a pH 7.4 para cada una de las concentraciones indicadas. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.



Verdadera (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
$10^{-5}$	$(1.00 \pm 0.04) \times 10^{-5}$	0.13	4.30
$2 \cdot 10^{-5}$	$(1.94 \pm 0.08) \times 10^{-5}$	3.10	3.97
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.01 \pm 0.12) \times 10^{-5}$	0.41	3.88
$4 \cdot 10^{-5}$	$(4.05 \pm 0.10) \times 10^{-5}$	0.17	2.50
$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.26 \pm 0.25) \times 10^{-5}$	4.06	4.80
$6 \cdot 10^{-5}$	$(6.09 \pm 0.10) \times 10^{-5}$	1.49	1.69
$7 \cdot 10^{-5}$	$(7.13 \pm 0.29) \times 10^{-5}$	1.83	3.19
$8 \cdot 10^{-5}$	$(8.10 \pm 0.22) \times 10^{-5}$	1.25	2.72
$9 \cdot 10^{-5}$	$(9.03 \pm 0.19) \times 10^{-5}$	0.39	2.06
$10^{-4}$	$(9.92 \pm 0.34) \times 10^{-5}$	0.81	3.42
$2 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.04 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	3.40	0.82
$3 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.82 \pm 0.25) \times 10^{-5}$	1.80	2.60
$4 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.65 \pm 0.03) \times 10^{-5}$	3.70	0.35
$5 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.00 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	0.001	3.40
$7 \cdot 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.01 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	1.20	1.50
$10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.03 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	3.01	2.10
$5 \cdot 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.56 \pm 0.10) \times 10^{-5}$	4.60	1.09
$10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.71 \pm 0.40) \times 10^{-5}$	2.99	4.00

Tabla 16. Comparación de las concentraciones “verdaderas” de 5-fluorouracilo a pH = 7.4 con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las medidas espectrofotométricas. Los valores “estimados” son la media ( $\pm$  D.E.) de las 6 réplicas. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado – actual)/estimado], también se muestran los C.V.

El límite de detección de un método es la magnitud mínima que puede detectarse en un ensayo pero no cuantificarse con un valor exacto.

$$L_D = \bar{Y}_n + 3 \cdot S_n \quad (21)$$

Donde  $\bar{Y}_n$  es la cantidad promedio de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco y  $S_n$  es la desviación estándar del blanco.

El límite de cuantificación es la magnitud mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud.

$$L_C = \bar{Y}_n + 10 \cdot S_n \quad (22)$$

Para la determinación de estos dos parámetros se llevo a cabo la realización de seis medidas de la señal del agua bidestilada y se repitió el mismo proceso con el tampón (pH 7.4). En ambos casos, antes de las medidas se realizó el blanco con la cubeta vacía. En ambos casos se obtuvo una  $S_n = 0.000$ , por lo que las ecuaciones quedan:

$$L_D = \bar{Y}_n = 10^{-5}M \quad (23)$$

$$L_C = \bar{Y}_n = 10^{-5}M \quad (24)$$

Como conclusión puede afirmarse que el método espectrofotométrico propuesto queda validado en ambos casos, pudiéndose usar los coeficientes de absortividad molar calculados para evaluar la concentración de 5-fluorouracilo disoluciones cuya concentración se desconoce.

### 5.3. INCORPORACIÓN MATRICIAL DE FÁRMACO

La determinación cuantitativa de la incorporación del antineoplásico 5-fluorouracilo en las nanoplataformas diseñadas se basa en la metodología establecida por otros autores para la cuantificación del fármaco vehiculado y liberado por diferentes tipos de sistemas coloidales [Fawaz y cols., 1997; Müller y cols., 1991;

Sullivan y Birkinshaw, 2004]. Esta metodología ha sido puesta a punto por nuestro grupo de investigación [Arias y cols., 2008a, b, c]. 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. 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. 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 del principio activo) a la absorbancia total del sistema.

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

A continuación nos centraremos en el estudio de la contribución del principal método de vectorización de fármacos en sistemas transportadores: la incorporación del principio activo en el momento en que se produce la formación de la nanoplateforma. Para ello, analizaremos el efecto del principal factor que influye en la captación de principio activo en la matriz de las nanopartículas: la propia concentración de fármaco. De esta manera, pretendemos definir las condiciones de vehiculización óptimas que permiten la incorporación máxima del antineoplásico en el sistema transportador magnético que proponemos. El análisis de la influencia de la

concentración del principio activo sobre su incorporación en la matriz lipídica se realizó siguiendo la rutina de síntesis y el procedimiento de determinación espectrofotométrica ya descritos y justificados. Para ello, la única variable que se introdujo en la metodología de síntesis de las NLS y de las NLSM fue la concentración de fármaco. Las concentraciones molares utilizadas fueron  $10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M. La determinación de la absorción de fármaco en la matriz de las nanopartículas se realizó mediante la comparación de la absorbancia de las muestras del medio (tomadas antes de llevar a cabo la síntesis) con los sobrenadantes obtenidos tras una doble centrifugación de las suspensiones de nanopartículas formuladas, y una vez eliminada la contribución a la absorbancia total del sistema de los residuos o subproductos de la síntesis. Las medidas experimentales se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones molares del fármaco [Arias y cols., 2010b]. La cantidad de fármaco incorporado en la matriz de las nanopartículas se ha expresado en términos de *EE* y *DL* (%) [Arias y cols., 2009a; Brigger y cols., 2004].

La cantidad de 5-fluorouracilo absorbido por las NLS y por las NLSM se recoge en la tabla 17. Como puede apreciarse, el porcentaje de incorporación de fármaco aumenta con la disminución de la concentración de fármaco presente en el medio de síntesis. No obstante, la capacidad de incorporación es mayor que en otros sistemas de la literatura y la cantidad de fármaco máxima incorporada es mayor a la máxima concentración estudiada [Arias y cols., 2008a, b, c, 2011b; Ulbrich y Šubr, 2004].

Concentración 5-FU(M)	NLS		NLSM	
	EE (%)	DL (%)	EE (%)	DL (%)
$10^{-5}$	91.0 ± 1.8	0.01 ± 0.00	88.9 ± 1.1	0.01 ± 0.00
$5 \cdot 10^{-5}$	90.1 ± 1.2	0.05 ± 0.00	87.5 ± 1.0	0.04 ± 0.00
$10^{-4}$	87.4 ± 0.9	0.10 ± 0.00	85.5 ± 1.1	0.08 ± 0.00
$5 \cdot 10^{-4}$	83.5 ± 0.7	0.46 ± 0.00	80.2 ± 1.2	0.38 ± 0.01
$10^{-3}$	81.2 ± 1.2	0.90 ± 0.01	79.3 ± 1.1	0.75 ± 0.01
$5 \cdot 10^{-3}$	77.7 ± 0.5	4.29 ± 0.03	74.9 ± 0.8	3.54 ± 0.05
$10^{-2}$	75.7 ± 0.9	8.36 ± 0.09	72.9 ± 1.2	6.88 ± 0.13

Tabla 17. Valores de *EE* (%) y *DL* (%) del 5-fluorouracilo en la matriz lipídica de las NLS y NLSM en función de la concentración molar de fármaco.

La vehiculización del fármaco en las NLS es ligeramente superior siempre a la obtenida en las NLSM. Sin embargo, la capacidad de respuesta a campos magnéticos aplicados que exhiben las nanopartículas compuestas debe asegurar la llegada de la dosis administrada al lugar de acción, proceso menos controlable en el caso de las NLS.

### 5.3.1. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS PREPARADAS

Para analizar cómo se comportan las NLSM durante su almacenamiento se preparó una síntesis de nanopartículas cargadas de fármaco por triplicado, las cuales a su vez se dividieron en seis alícuotas. Un total de nueve alícuotas se conservaron a 4 °C y las nueve restantes se conservaron a temperatura ambiente en una cámara de estabilidad (TK-120 Nüve, Turquía) bajo las condiciones de temperatura y humedad 25

$\pm 2$  °C y  $60 \pm 5$  %Hr, durante 0, 1, 7, 15 y 30 días. Se midió el tamaño, el potencial zeta y el fármaco liberado obteniéndose (Tabla 18):

Conservación a 4 °C					
Tiempo	0 días	1 día	7 días	15 días	30 días
Tamaño (nm)	172 ± 14	174 ± 10	192 ± 12	206 ± 11	226 ± 14
Potencial zeta (mV)	-48.6 ± 1.2	-47.3 ± 1.6	-45.2 ± 1.8	-46.3 ± 1.0	-45.4 ± 1.7
EE (%)	72.9 ± 1.2	71.6 ± 0.8	66.7 ± 3.7	64.6 ± 1.5	63.2 ± 0.9
DL (%)	6.88 ± 0.13	6.76 ± 0.1	6.30 ± 0.2	6.1 ± 0.1	5.97 ± 0.1
Conservación a temperatura ambiente					
Tamaño (nm)	172 ± 14	179 ± 11	310 ± 10	432 ± 15	498 ± 11
Potencial zeta (mV)	-48.6 ± 1.2	-45.9 ± 1.0	-39.2 ± 1.9	-34.7 ± 2.0	-27.8 ± 1.8
EE (%)	72.9 ± 1.2	64.2 ± 0.4	56.2 ± 1.1	50.6 ± 1.2	41.2 ± 1.1
DL (%)	6.88 ± 0.13	6.06 ± 0.03	5.31 ± 0.1	4.78 ± 0.1	3.89 ± 0.1

Tabla 18. Valores de tamaño (nm), potencial zeta (mV), *EE* (%) y *DL* (%) de las NLSM cargadas con 5-fluorouracilo en diferentes periodos de conservación a 4 °C y a temperatura ambiente.

En ambas condiciones se observa un aumento del tamaño y una disminución de los valores de potencial zeta, *EE* y *DL* con el tiempo; siendo más acusado el incremento de tamaño en las condiciones de conservación ambientales, triplicando el tamaño de las nanopartículas con respecto al momento de su preparación, además de producirse una liberación más rápida del fármaco desde la nanopartícula. Por lo que la suspensión de nanopartículas siempre será conservada a 4 °C.

## 5.4. LIBERACIÓN DE FÁRMACO

En los apartados anteriores se han descrito las condiciones óptimas de vehiculización del fármaco 5-fluorouracilo en las NLSM. El siguiente paso en este trabajo de investigación es utilizar las condiciones que permiten una mayor carga de fármaco para preparar las nanopartículas que se utilizarán en los ensayos de liberación *in vitro*. En estos ensayos se utilizaron aquellas NLSM preparados fijando una concentración de  $10^{-2}$  M de 5-fluorouracilo en la fase acuosa de la síntesis o medio de contacto (partículas con máxima cantidad de fármaco vehiculizado mediante absorción o adsorción, respectivamente).

El ensayo de liberación *in vitro* de fármaco se realizó por triplicado a  $37.0 \pm 0.5$  °C. Para ello, se utilizó el método de diálisis y un tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH =  $7.4 \pm 0.1$ ) como medio de liberación. Las bolsas de diálisis se dejaron sumergidas en agua bidestilada 12 horas antes de comenzar el ensayo. La bolsa de diálisis (Spectrum® Spectra/Por® 6, EE.UU.) tiene un tamaño de poro de 2000 Da y es capaz de retener las nanopartículas en su interior, dejando sólo pasar a su través el fármaco liberado hasta el medio de liberación. Brevemente, las suspensiones de las partículas con fármaco vehiculizado se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 minutos, para así eliminar el principio activo no incorporado. Se introdujo 1 mL de suspensión de nanopartículas (concentración de fármaco: 25 mg/mL) en las bolsas de diálisis, cerrando los extremos de la misma con pinzas. A continuación, se sumergió la bolsa en un vaso con 200 mL de tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. La temperatura de  $37.0 \pm 0.5$  °C y la agitación mecánica (300 rpm) de las bolsas se mantuvieron constante durante todo el ensayo. Las muestras tomadas del medio (1 mL) se recogieron a intervalos de tiempo prefijado (0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 24 horas, y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 días) y se analizaron mediante la metodología UV-Vis ya descrita y en la longitud de onda de máxima absorbancia correspondiente. Un volumen igual de solución tampón,

(mantenido a la misma temperatura), fue añadido al medio de liberación tras cada toma de muestra con el objetivo de mantener las condiciones *sink*. El mismo procedimiento analítico utilizado en la determinación de la vehiculización de fármaco, fue seguido en los ensayos de liberación *in vitro* del mismo.

La figura 55 recoge los valores de liberación de 5-fluorouracilo desde las nanopartículas sintetizadas, donde comprobamos que la liberación del 5-fluorouracilo es sostenida en el tiempo. Tanto en las NLS como en las NLSM, el proceso puede considerarse bifásico. En primer lugar, una fase de liberación rápida que probablemente significa la pérdida del fármaco asociado a la superficie o débilmente atrapado (tras 12 horas el 20 % del 5-fluorouracilo vehiculado se libera desde las NLS mientras que en el caso de las NLSM es el 17 %). Sin embargo, la liberación de fármaco se hace más lenta durante la segunda fase del proceso. En esta última etapa de liberación, el mecanismo responsable podría ser la degradación de la nanopartícula lipídica (véase el apartado 4.3.3.) y/o la difusión de este fármaco a través de la matriz lipídica. En ambos tipos de nanopartículas la liberación del principio activo es completa tras 13 días. Finalmente se puede apreciar una velocidad de liberación ligeramente más lenta en el caso de las nanopartículas compuestas. Este fenómeno puede explicarse en el fenómeno de adsorción del fármaco en la superficie de los núcleos de óxido de hierro y la posterior precipitación del lípido sobre éstos. Así, la cantidad de moléculas de fármaco localizada en la interfase  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -lípido debe difundir a través de toda la matriz lipídica para poder salir al exterior, lo que ralentiza la velocidad de liberación [Hanafi y cols., 2013].



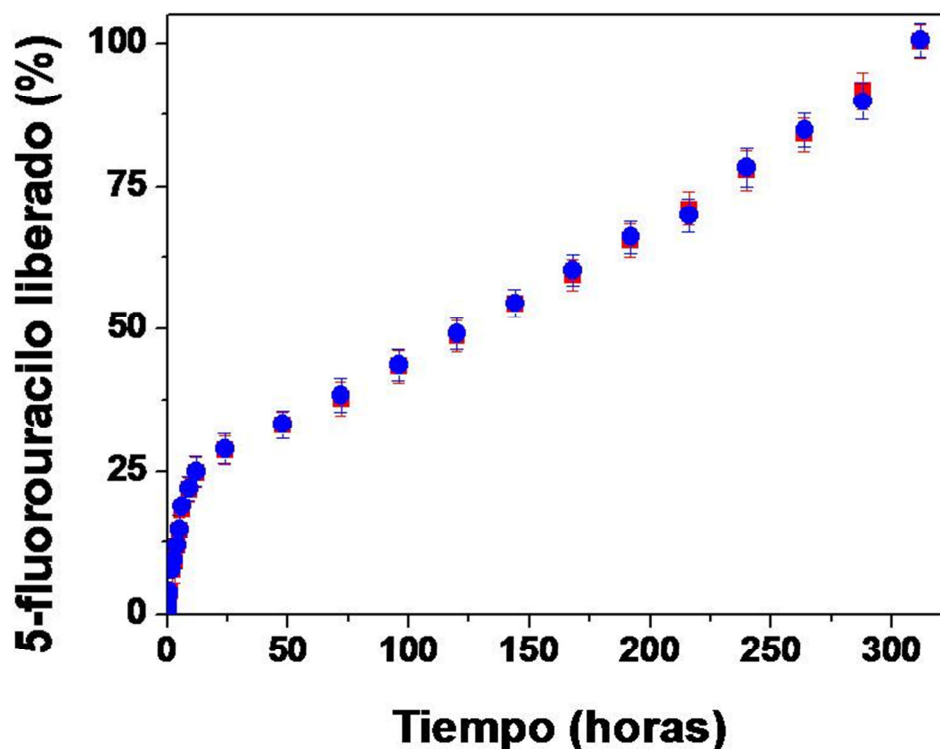


Figura 55. Liberación de 5-fluorouracilo (%) desde las NLS (■) y NLSM (●) en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7.4 ± 0.1) a 37.0 ± 0.5 °C.

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

finalidad de elegir el que con mayor fiabilidad sea capaz de explicar la cinética de liberación de nuestro fármaco:

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

$$Q_t = K_0 t \quad (25)$$

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

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

$$\begin{aligned} \frac{dQ_t}{dt} &= K_1(Q_\infty - Q_t) \\ Q_t &= Q_\infty(1 - e^{-K_1 t}) \end{aligned} \quad (26)$$

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

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

$$Q_t = A + B \cdot \sqrt{t} \quad (27)$$

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

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = A + B \cdot t \quad (28)$$

## Capítulo 5. Capacidad de vehiculización de 5-fluorouracilo

En la tabla 19 se recogen los valores de  $F$  y  $r^2$  correspondientes a los distintos ajustes cinéticos de la liberación de 5-fluorouracilo desde las NLS y NLSM.

En la liberación de fármaco desde el interior de las nanopartículas sintetizadas, debemos diferenciar en la realización del ajuste cinético las dos fases características del proceso: una fase rápida de unas 9 horas de duración y, a continuación, una segunda fase de liberación mucho más prolongada y lenta (Figura 69).

Etapas	Parámetros	Cinética de orden cero	Cinética de orden uno	Cinética de raíz cuadrada	Cinética de raíz cúbica
NLS (1ª fase)	F	314.8	<b>1585.9</b>	622.7	18.9
	$r^2$	0.969	<b>0.992</b>	0.980	0.470
NLS (2ª fase)	F	<b>2240.9</b>	38.4	755.3	229.8
	$r^2$	<b>0.994</b>	0.083	0.936	0.795
NLSM (1ª fase)	F	294.1	<b>1228.9</b>	540.1	18.7
	$r^2$	0.967	<b>0.989</b>	0.977	0.466
NLSM (2ª fase)	F	<b>2092.3</b>	39.2	796.0	228.4
	$r^2$	<b>0.994</b>	0.083	0.939	0.791

Tabla 19. Valores del estadístico  $F$  y del coeficiente de determinación  $r^2$  obtenidos en el estudio del perfil de cantidades acumuladas de 5-fluorouracilo liberado en función del tiempo desde la matriz de las NLS y NLSM.

Como puede apreciarse en la tabla 19, la cinética que mejor describe la primera fase del proceso de liberación es la de orden 1 (véase tabla 20 para los coeficientes de ajuste y figura 56). Esto es indicativo de que la cantidad de fármaco que se libera es proporcional a la concentración del principio activo en la nanopartícula, y dependerá sobre todo de la cantidad de fármaco existente en las capas más superficiales de la nanopartícula. Sin embargo, en la segunda fase la cinética a la que mejor se ajusta el

proceso de liberación se corresponde con orden 0 (coeficientes de ajuste en tabla 21), lo que implica una liberación constante y sostenida del fármaco a lo largo del tiempo, sin efecto significativo de la cantidad ya liberada. Una posible explicación a este tipo de liberación podría basarse en el hecho de que el fármaco que se encuentra originalmente en el interior de la matriz alimenta constantemente la superficie con nuevas moléculas que pasan al medio. Se requiere para ello una elevada cantidad de fármaco absorbida en la matriz y no fuertemente ligado a esta.

SISTEMA	A	B
5-Fu, NLS	(33.86 ± 3.86)	(0.12 ± 0.01)
5-Fu, NLSM	(34.40 ± 4.47)	(0.11 ± 0.02)

Tabla 20. Coeficientes de ajuste de la cinética de liberación de orden 1 que describen la primera etapa de liberación del 5-fluorouracilo desde NLS y NLSM.

SISTEMA	A	B
5-FU, NLS	(20.65 ± 0.94)	(0.24 ± 0.005)
5-FU, NLSM	(21.13 ± 0.96)	(0.23 ± 0.052)

Tabla 21. Componentes de las ecuaciones de las cinéticas de orden cero que describen la segunda etapa de liberación del 5-fluorouracilo desde NLS y NLSM.

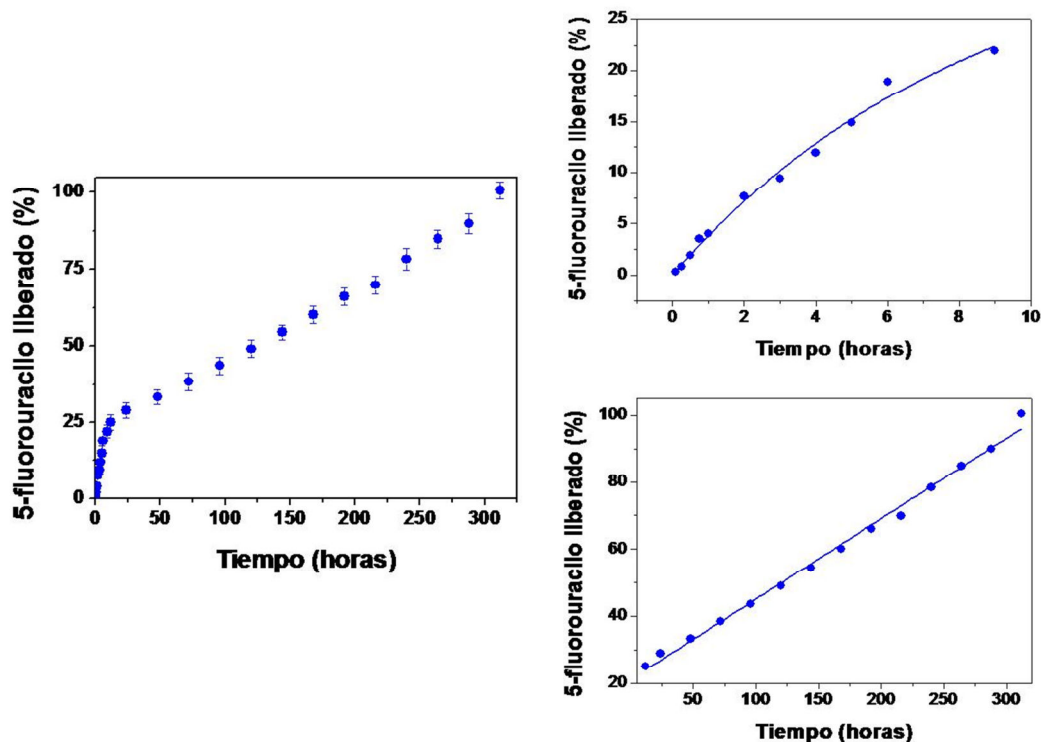


Figura 56. Izquierda: datos experimentales de la cinética de liberación de 5-fluorouracilo desde las NLSM. Derecha: líneas de mejor ajuste de los datos de estas a los modelos descritos en el texto, para la fase inicial de liberación (arriba) y para tiempos largos (abajo).

La liberación sostenida del fármaco en el tiempo es idónea para lograr un efecto farmacológico óptimo *in vivo*. Es decir, casi toda la dosis de principio activo vehiculizada en los nanocompuestos se liberará exclusivamente en el lugar de acción, una vez que las NLSM se acumulen de forma selectiva a este nivel con la ayuda del campo magnético aplicado.

Por otro lado se utilizó el modelo matemático propuesto por Korsmeyer y Peppas [Korsmeyer y Peppas, 1983]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot t^n \quad (29)$$

donde  $M_t/M_\infty$  es la fracción de fármaco liberado en un tiempo  $t$ ,  $K$  es la constante de velocidad de liberación y  $n$  es el exponente que indica el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación del fármaco.

Este modelo es generalmente lineal para valores de  $M_t/M_\infty < 0.6$ . Intenta explicar mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz.

El valor del exponente  $n$  caracteriza el mecanismo de liberación del fármaco. Si  $n = 0.5$ , la liberación del fármaco tiene lugar a través de un fenómeno de difusión que sigue la ley de Fick (un mayor gradiente acelera la difusión, en el sentido en que la concentración disminuye). Si  $0.45 < n < 0.89$  indica que la liberación del fármaco no sigue la ley de Fick. Si  $n = 0.89$  el mecanismo de liberación del fármaco es de orden cero denominada difusión no fickiana denominada transporte caso II, justificada por Peppas en que las cadenas poliméricas se relajan permitiendo que entre agua en el sistema actuando así como plastificante, con un incremento del volumen y la movilidad del sistema. Por último, si  $n > 0.89$  corresponde con un proceso de difusión no fickiano denominado transporte súper caso II, este fenómeno de liberación sería consecuencia de un incremento en el proceso de plastificación del sistema debido a una disminución en las fuerzas atractivas entre las cadenas poliméricas lo que incrementa la movilidad de las macromoléculas.

Para que el principio activo difunda por la matriz, las cadenas poliméricas primero deben relajarse para permitir el proceso de difusión. De esta manera, la movilidad de las cadenas poliméricas es decisiva para la cinética de transferencia del fármaco. Por lo tanto, la velocidad de difusión aumenta con el incremento en la velocidad de relajación de las cadenas del polímero [Chiappetta y cols., 2006; Llabot y cols., 2004; Peppas, 1985; Siepmann y cols., 1999].



## **Capítulo 6.**

# **Citotoxicidad, proliferación celular y capacidad de vehiculización**





Además de la utilización de nanopartículas como sistemas transportadores de fármacos al tejido u órgano diana, incrementando la captación del principio activo vehiculizado por las células diana y el consecuente aumento de la eficacia del fármaco minimizando su biodistribución en el organismo, y por tanto, los efectos secundarios del mismo [Arias, 2008, 2011; Arias y cols., 2009; González-Rodríguez y cols., 2003; Yong y cols., 2005], los nanotransportadores ofrecen la posibilidad de hacer un control externo del tratamiento mediante su rastreo a nivel experimental gracias a la incorporación de otras moléculas como los fluorocromos [Martín del Valle y cols., 2009].

### 6.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LA RODAMINA

La familia de compuestos orgánicos heterocíclicos fluorescentes derivados del 3,6-di(amino-sustituído)-9-benzoato del xanteno se denomina rodamina. Estos compuestos tienen la propiedad de emitir luz tras la excitación luminosa. La longitud de onda de la luz emitida es usualmente mayor que la de la luz incidente.

Algunos componentes de esta familia son la rodamina 6G, la rodamina B y la rodamina 123. Se utilizan como colorantes e indicadores para varios metales; también son utilizados como marcadores fluorescentes en aplicaciones biotecnológicas tales como histoquímica, microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, espectroscopia de correlación de fluorescencia, y ensayos ELISA.

Su detección es fácil y poco costosa empleando fluorímetros.

## Capítulo 6. Citotoxicidad, proliferación celular y capacidad de vehiculización

Las rodaminas son solubles en agua, metanol y etanol. En general, presentan cierta toxicidad.

La rodamina que vamos a utilizar es la rodamina 123 (Rho-123) (Figura 57), la cual presenta baja toxicidad. Es un marcador catiónico que emite fluorescencia verde.

Se puede usar para estudiar el gradiente electroquímico en las mitocondrias en las células vivas, en citometría de flujo para detectar la actividad de eflujo en células normales y malignas de la glicoproteína-P y como un compuesto para el transporte mediado por esta, ya que es un sustrato para dicha glicoproteína transmembrana.

Los estudios revelan que la rodamina 123 puede disminuir el crecimiento clonal de células malignas *in vitro*, lo que podría asociarse con la glicoproteína-P placentaria [Bernal y cols. 1982].

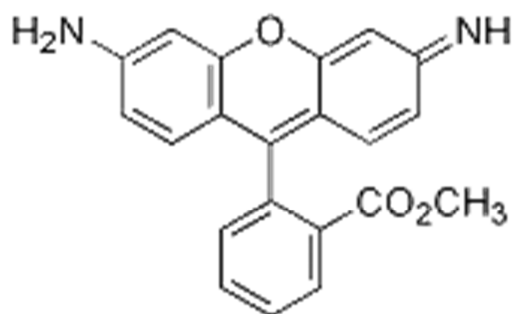


Figura 57. Estructura de la rodamina 123.

La rodamina 123 utilizada (Sigma, Estados Unidos) es un polvo de color rojo, inodoro, con un peso molecular de 380.83 g/mol y estable en aire. En disolución adquiere un color amarillo anaranjado. Es soluble en agua hasta el 0.1% (25 °C), en DMSO, metanol y en etanol (20 mg/mL).

## 6.2. ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA DE LAS DISOLUCIONES DE RODAMINA

Un fluoróforo es aquel compuesto que tras la absorción de radiación electromagnética de energía adecuada, es desactivado mediante fluorescencia (proceso radiativo que consiste en la emisión de radiación resultante de una transición electrónica entre estados de la misma multiplicidad de singlete excitado a singlete fundamental). Ejemplos de fluoróforos conocidos son: el sulfato de quinina, hidrocarburos aromáticos polinucleares (antraceno o perileno) o colorantes como la fluoresceína o la rodamina.

Para que exista fluorescencia, primero tiene que haber absorción.

La ley de Kavanagh relaciona el efecto de la concentración de fluoróforo sobre la intensidad de fluorescencia. La intensidad de la radiación fluorescente es proporcional a la intensidad de la radiación excitatriz que es absorbida por el sistema, de acuerdo con:

$$F = K'(I_0 - I) \quad (30)$$

Donde  $K'$  es proporcional al rendimiento cuántico de fluorescencia ( $K' = k'\Phi_F$ ),  $I_0$  es la intensidad de la radiación incidente e  $I$  la intensidad después de atravesar una longitud  $b$  del medio. Con objeto de relacionar  $F$  con la concentración se utiliza la ley de Beer:

$$A = -\log T = \epsilon bc; \log \frac{I}{I_0} = \epsilon bc; \frac{1}{2.303} \ln \frac{I}{I_0} = -\epsilon bc \quad (31)$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -2.303\epsilon bc; \frac{I}{I_0} = e^{-2.303\epsilon bc}; I = I_0 e^{-2.303\epsilon bc} \quad (32)$$

Sustituyendo  $I = I_0 e^{-\epsilon bc}$  en la ecuación 30 se obtiene:

$$F = K'(I_0 - I_0 e^{-2.303\epsilon bc}) = K'I_0(1 - e^{-2.303\epsilon bc}) \quad (33)$$

Como el término  $e^{-2.303\epsilon bc}$  se puede expandir mediante un desarrollo en serie de Maclaurin de  $e^x$ :

$$e^x = 1 + \frac{x}{1!} + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots + \frac{x^n}{n!} \quad (34)$$

$$e^{-2.303\epsilon bc} = 1 + \frac{(-2.303\epsilon bc)}{1!} + \frac{(-2.303\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(-2.303\epsilon bc)^3}{3!} + \dots + \frac{(-2.303\epsilon bc)^n}{n!} \quad (35)$$

$$(1 - e^{-2.303\epsilon bc}) = 1 - 1 + \frac{(-2.303\epsilon bc)}{1!} + \frac{(-2.303\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(-2.303\epsilon bc)^3}{3!} + \dots + \frac{(-2.303\epsilon bc)^n}{n!} \quad (36)$$

Siempre que  $\epsilon bc < 0.05$  los términos superiores del desarrollo se hacen despreciables frente al primero y en estas condiciones el error relativo máximo en la ecuación anterior es del 2.5%. Finalmente la expresión de la ley de Kavanagh quedaría:

$$F = K'I_0 2.303\epsilon bc = Kc \quad (37)$$

### 6.2.1. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA MÁXIMA DE EXCITACIÓN DE LAS DISOLUCIONES

La medida de la absorción óptica de la rodamina 123 se realizó mediante un espectrómetro de fluorescencia (Perkin Elmer LS 55, Estados Unidos) equipado con un monocromador que utiliza una fuente de alta energía pulsada de Xenon para el proceso de excitación.

Para la obtención de la longitud de onda máxima de excitación se realizó un barrido de excitación-emisión desde 400 a 600 nm con una resolución de 1 nm.

La cubeta utilizada es de cuarzo, con las cuatro caras pulidas y con un camino óptico de 1 cm.

Para ello se preparó una batería de disoluciones de rodamina 123 en agua purificada a diferentes concentraciones:  $4 \cdot 10^{-8}$ ,  $3 \cdot 10^{-8}$ ,  $2 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-8}$ ,  $9 \cdot 10^{-9}$ ,  $8 \cdot 10^{-9}$ ,  $7 \cdot 10^{-9}$ ,  $6 \cdot 10^{-9}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $4 \cdot 10^{-9}$ ,  $3 \cdot 10^{-9}$ ,  $2 \cdot 10^{-9}$  y  $10^{-9}$  M.

Se realiza un barrido inicial de excitación-emisión de cada una de las disoluciones, determinando que la longitud de onda de máxima excitación se obtiene a 498 nm.

### 6.2.2. ESPECTRO DE EMISIÓN DE LAS DISOLUCIONES

Debido a los resultados obtenidos previamente, se realiza la curva de calibrado utilizando las concentraciones molares:  $10^{-8}$ ,  $9 \cdot 10^{-9}$ ,  $8 \cdot 10^{-9}$ ,  $7 \cdot 10^{-9}$ ,  $6 \cdot 10^{-9}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $4 \cdot 10^{-9}$ ,  $3 \cdot 10^{-9}$ ,  $2 \cdot 10^{-9}$  y  $10^{-9}$  M.

Se determinó el espectro de emisión de fluorescencia de cada una de las disoluciones de rodamina 123, realizando un barrido de longitudes de onda desde 400 a 600 nm, con intervalos de 1 nm. Se utilizó como blanco en la calibración previa del aparato agua bidestilada para eliminar las posibles interferencias en el espectro del fluoróforo generadas por el medio de disolución.

Los resultados de este estudio se recogen en la figura 58 donde se aprecia el incremento de la intensidad al aumentar la concentración de fluoróforo en el medio. Por otro lado, se observan dos máximos de emisión, de los cuales el segundo presenta una longitud de onda invariable a diferentes concentraciones correspondiente a 522.85 nm, longitud de onda seleccionada para las medidas que realizamos.

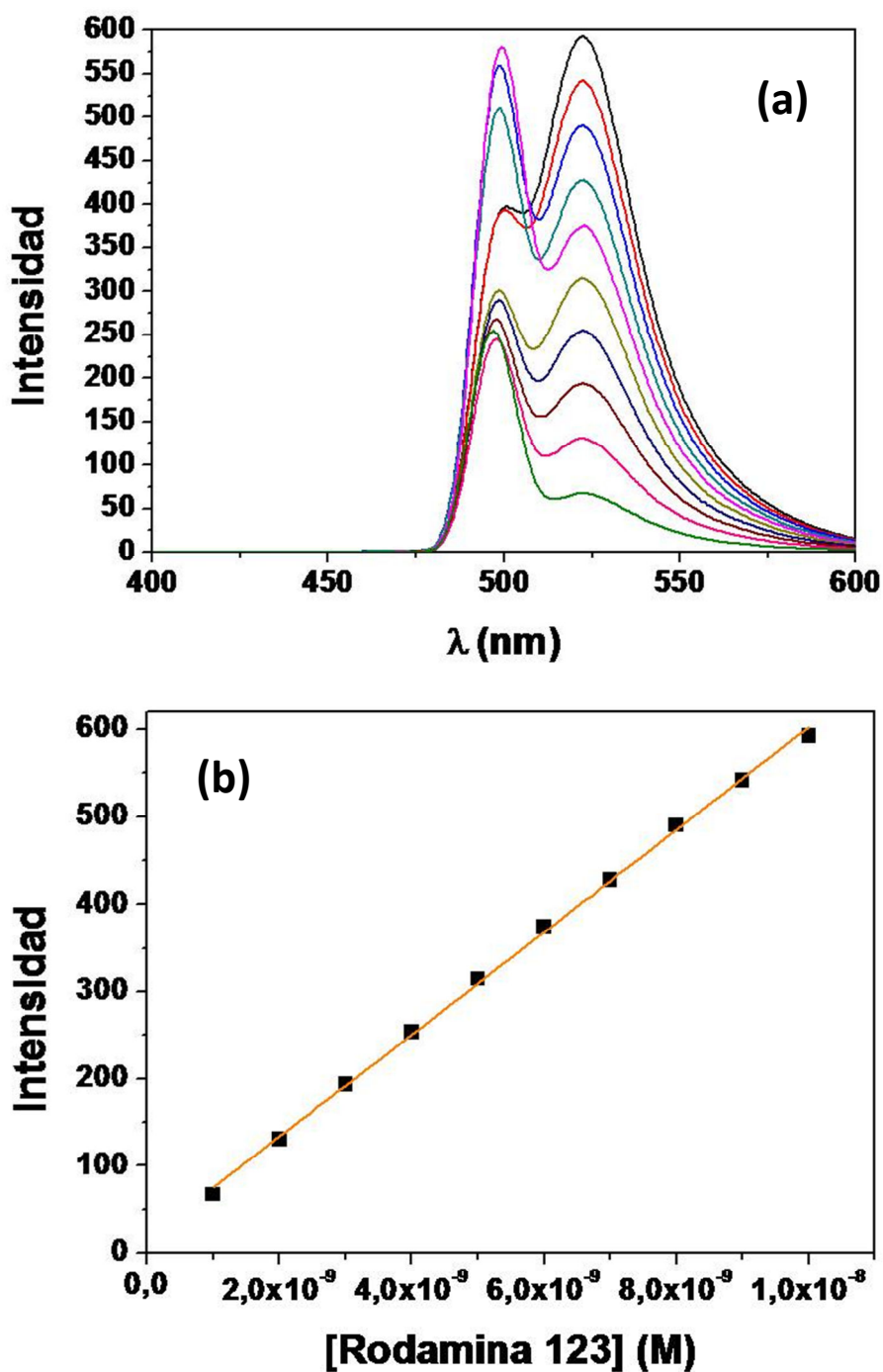


Figura 58. (a) Espectro de emisión de fluorescencia de las disoluciones de rodamina. Las concentraciones molares de rodamina 123 en orden creciente de intensidad son:  $10^{-8}$ ,  $9 \cdot 10^{-9}$ ,  $8 \cdot 10^{-9}$ ,  $7 \cdot 10^{-9}$ ,  $6 \cdot 10^{-9}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $4 \cdot 10^{-9}$ ,  $3 \cdot 10^{-9}$ ,  $2 \cdot 10^{-9}$  y  $10^{-9}$  M. (b) Determinación de K de las disoluciones de rodamina 123 a la longitud de onda de máxima emisión (522.85 nm).

La determinación de  $K$  se realizó ajustando los datos de intensidad y concentración mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue  $K = (5.86 \pm 0.06) \cdot 10^{10}$  ( $r=0.999$ ). En la figura 58b se muestran los datos y la recta de ajuste. Los valores de intensidad a diferentes concentraciones obtenidos a 522.85 nm cumplen la ley de Kavanagh.

### 6.2.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO FLUORIMÉTRICO

El método fluorimétrico que se utilizó para el análisis de la cantidad de rodamina 123 vehiculizada por las nanopartículas debe ser validado previamente para verificar su exactitud, precisión, linealidad y límite de detección. Con este objetivo, se prepararon seis réplicas de disoluciones acuosas con concentraciones molares de fluoróforo entre  $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M, a pH natural (4.8).

En la tabla 22 se recogen los valores de intensidad de las disoluciones acuosas de rodamina 123 en función de su concentración a pH natural. Se muestran los valores medios de intensidad y las desviaciones estándar (D.E.) para cada una de las concentraciones, así como el coeficiente de variación (< 5 % en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. El ajuste lineal de la relación intensidad (F) – concentración molar (C) [ $F = (5.86 \pm 0.06) \cdot 10^{10} \cdot C$ ] es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.



[Rho-123] (M)	Intensidad	C.V. (%)
$10^{-9}$	$67.43 \pm 2.70$	4.0
$2 \cdot 10^{-9}$	$129.91 \pm 1.69$	1.3
$3 \cdot 10^{-9}$	$193.33 \pm 2.75$	1.4
$4 \cdot 10^{-9}$	$253.05 \pm 7.52$	3.0
$5 \cdot 10^{-9}$	$310.04 \pm 6.81$	2.2
$6 \cdot 10^{-9}$	$377.27 \pm 9.55$	2.5
$7 \cdot 10^{-9}$	$431.04 \pm 4.69$	1.1
$8 \cdot 10^{-9}$	$496.63 \pm 15.08$	3.0
$9 \cdot 10^{-9}$	$543.07 \pm 8.93$	1.6
$10^{-8}$	$599.38 \pm 6.64$	1.1

Tabla 22. Intensidad (media  $\pm$  D.E.) de las disoluciones acuosas de rodamina 123 para cada una de las concentraciones indicadas a pH 4.8 (natural). El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio de la absorbancia.

Para comprobar la exactitud del método analítico utilizamos los datos de absorbancia de la tabla 22 (“concentración verdadera” en la tabla 23). Así se obtienen las concentraciones estimadas para cada una de las seis réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas como “estimadas” en la tabla 23. Como antes, los pequeños valores de los C.V. y sus errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método fluorimétrico.

Verdadera (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
$10^{-9}$	$(1.12 \pm 0.04) \times 10^{-9}$	11.01	4.0
$2 \cdot 10^{-9}$	$(2.17 \pm 0.03) \times 10^{-9}$	7.63	1.3
$3 \cdot 10^{-9}$	$(3.22 \pm 0.05) \times 10^{-9}$	6.89	1.4
$4 \cdot 10^{-9}$	$(4.22 \pm 0.12) \times 10^{-9}$	5.16	2.9
$5 \cdot 10^{-9}$	$(5.17 \pm 0.11) \times 10^{-9}$	3.24	2.2
$6 \cdot 10^{-9}$	$(6.29 \pm 0.16) \times 10^{-9}$	4.58	2.5
$7 \cdot 10^{-9}$	$(7.18 \pm 0.08) \times 10^{-9}$	2.56	1.1
$8 \cdot 10^{-9}$	$(8.28 \pm 0.25) \times 10^{-9}$	3.35	3.0
$9 \cdot 10^{-9}$	$(9.05 \pm 0.15) \times 10^{-9}$	0.56	1.6
$10^{-8}$	$(9,99 \pm 0.11) \times 10^{-9}$	0.10	1.1

Tabla 23. Comparación de las concentraciones “verdaderas” de rodamina 123 en solución acuosa con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones fluorimétricas. Los valores “estimados” son la media ( $\pm$  D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente [(estimado - actual)/estimado], también se muestran los C.V.

Los límites de detección y cuantificación se calcularon utilizando las ecuaciones (44) y (45) del capítulo anterior. Para ello se llevo a cabo la realización de seis medidas de la señal del agua bidestilada. Se obtuvo una  $S_n = 0.000$ , por lo que las ecuaciones quedan:

$$L_D = \bar{Y}_n = 10^{-9}M \quad (38)$$

$$L_C = \bar{Y}_n = 10^{-9}M \quad (39)$$

Como conclusión puede afirmarse que el método fluorimétrico propuesto queda validado en ambos casos, pudiéndose usar la K calculada para evaluar la concentración del fluoróforo en disoluciones cuya concentración se desconoce.

#### **6.2.4. DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE FLUORÓFORO EN LAS NANOPARTÍCULAS**

La determinación cuantitativa de la incorporación de rodamina 123 se realiza de la misma manera que para la cuantificación del fármaco vehiculizado descrito en el capítulo 5, pero utilizando la metodología fluorimétrica.

La rodamina se incorpora en la primera fase acuosa [Martins, 2012; Wong, 2006, 2006a]. Una vez realizada la síntesis se centrifuga para eliminar los residuos de síntesis y la rodamina no incorporada. Por lo tanto, puede estimarse la cantidad de rodamina que no ha sido incorporada mediante la diferencia entre la concentración inicial y la concentración de fluoróforo en el sobrenadante. El resultado será la cantidad de fluorocromo incorporado.

### **6.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS DE FLUORÓFORO**

#### **6.3.1. TAMAÑO Y POTENCIAL ZETA**

El tamaño de las nanopartículas sintetizadas bajo las condiciones de formulación indicadas, se midieron mediante difracción laser (Beckman Coulter LS<sup>TM</sup> 13 320 series, Alemania) presentando un tamaño medio de  $158.3 \pm 16$  nm.

La determinación del potencial zeta se llevó a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra) a una temperatura de medida de  $25 \pm 0.5$  °C obteniéndose una carga superficial de  $-40.6 \pm 1.8$  mV, que es muy similar a la carga superficial de las NLS ( $-45.4 \pm 1.4$  mV).

### 6.3.2. LIBERACIÓN DE FÁRMACO

Se estudió la influencia de la incorporación de fluoroforo en la formulación de las nanopartículas y se comprobó que no afecta a la liberación del fármaco ni a la degradación de la nanopartícula.

## 6.4. ESTUDIOS *IN VITRO*

### 6.4.1. LÍNEAS CELULARES

Las líneas utilizadas en la realización de las pruebas *in vitro* de este trabajo fueron HCT-15 y T-84. Ambas están establecidas por la ATCC (American Type Culture Collection).

HCT-15 es una línea celular que deriva de un adenocarcinoma colorectal (Dukes tipo C) de origen humano [Abaan y cols., 2013]. La línea celular T-84 procede de un carcinoma colorectal de origen humano [Proc Natl Acad Sci, USA 1980;77:3464; Am J Physiol 1984;246:G204]. Las dos líneas celulares expresan el antígeno carcinoembrionario (CEA).

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO, Paisley, UK) suplementadas con glutamina 2 mM, ampicilina 500  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , gentamicina (Genta-Gobens) 40  $\mu\text{M}/\text{mL}$  y 10% de suero bovino fetal inactivo (Sigma S.L.) Para dichos cultivos se utilizaron frascos de cultivo (Falcon) estériles y la incubación se llevó a cabo en una estufa a 37 °C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.

Para su mantenimiento, el medio de cultivo fue renovado de acuerdo con su acidificación (amarillo). En cámara de flujo laminar se procede a la retirada del medio y

la adición de nuevo medio de cultivo. Las líneas celulares utilizadas para la realización de las pruebas *in vitro* fueron HCT-15 y T-84. La línea HCT-15 deriva de un adenocarcinoma colorrectal humano (Dukes tipo C) [Abaan y cols., 2013]. Se caracteriza por presentar resistencia intrínseca mediada por P-glicoproteína. La línea celular T-84 procede de un carcinoma colorrectal de origen humano [Proc Natl Acad Sci, USA 1980;77:3464; Am J Physiol 1984;246:G204]. Ambas líneas celulares expresan el antígeno carcinoembrionario (CEA). Las líneas utilizadas fueron obtenidas a través de la ATCC (*American Type Culture Collection*).

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO, Paisley, UK) suplementadas con glutamina 2 mM, ampicilina 500 µM/mL, gentamicina (Genta-Gobens) 40 µM/mL y 10% de suero bovino fetal inactivo (Sigma S.L.). Su crecimiento se realizó en frascos de cultivo (Falcon) de 25 cm<sup>2</sup> estériles colocados en una estufa de cultivo a 37 °C, en atmósfera conteniendo CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad. Los medios de cultivo fueron renovados en función de la acidificación del medio (coloración amarillo) con una media de una vez cada tres días. El proceso de renovación del medio se realizó en campana de flujo laminar en condiciones de total esterilidad.

### 6.4.2. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

Los estudios de citotoxicidad sobre las líneas celulares T-84 y HCT-15 se realizaron mediante el procedimiento de la sulforodamina B (SRB) y se expresaron como porcentaje de inhibición de crecimiento (GI, %).

Para llevar a cabo estos estudios *in vitro*, las células fueron despegadas del frasco de cultivo, retirando el medio y añadiendo una solución de PBS-EDTA 0.02% (el EDTA secuestra el Ca<sup>2+</sup> que es necesario para la adhesión celular). Las células se incubaron 10 minutos en una estufa a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se golpeó

ligeramente el frasco para que las células se despegaran, pasándolas posteriormente a un tubo universal. Las células se centrifugaron a 200xg durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, quedándonos con el pellet celular, que fue lavado con PBS 1x. Este proceso se repitió tres veces, tras lo cual, el botón celular fue resuspendido en medio de cultivo.

Para realizar la siembra en placas de un determinado número de células, se realizó conteo mediante una cámara de Neubauer. Parte de las células fueron de nuevo cultivadas en frasco de cultivo y el resto fue utilizado para crecimiento en placa de 24 pocillos. La siembra fue realizada a una densidad de  $8 \cdot 10^3$  células/pocillo para la línea celular T-84,  $1 \cdot 10^4$  células/pocillo para la línea celular HCT-15. El crecimiento fue realizado utilizando 400  $\mu$ L de medio Dulbecco's modified Eagle (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con 1% estreptomicina penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 10% suero fetal bovino (Gibco®, Life Technologies, Madrid, España). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C y una atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 24 horas de incubación, las células fueron expuestas a tratamientos con NLS, NLS-5FU, NLSM, NLSM-5FU y 5FU, a diferentes concentraciones (desde 0.05, 0.5, 1, 3, 5 y 10  $\mu$ M). La mediciones de la proliferación se realizaron a dos tiempos de exposición (72 y 120 horas).

Trascurrido los tiempos de tratamiento, las células fueron fijadas con 300  $\mu$ L de 10% ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente se añadieron 300  $\mu$ L de una solución de 0.4% SRB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) que se mantuvo durante 20 minutos. Finalmente, las células se lavaron tres veces con 1% ácido acético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), añadiéndoles una solución de Trizma® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (10mM y pH 10.5). La lectura fue realizada mediante colorímetro (Titertek multiscan; Flow, Irvine, California) a 492 nm. La medida de la densidad óptica se usó para calcular el porcentaje de crecimiento celular (CG, %) y la inhibición del crecimiento (GI, %).

## Capítulo 6. Citotoxicidad, proliferación celular y capacidad de vehiculización

Las nanopartículas sin carga de principio activo no mostraron citotoxicidad en la mayoría de las concentraciones estudiadas. Sólo en la concentración mayor (10  $\mu\text{M}$ ) mostraron algo de citotoxicidad a las 72 horas. Esta ligera toxicidad permaneció a las 120 horas en HCT-15 (Figura 59).

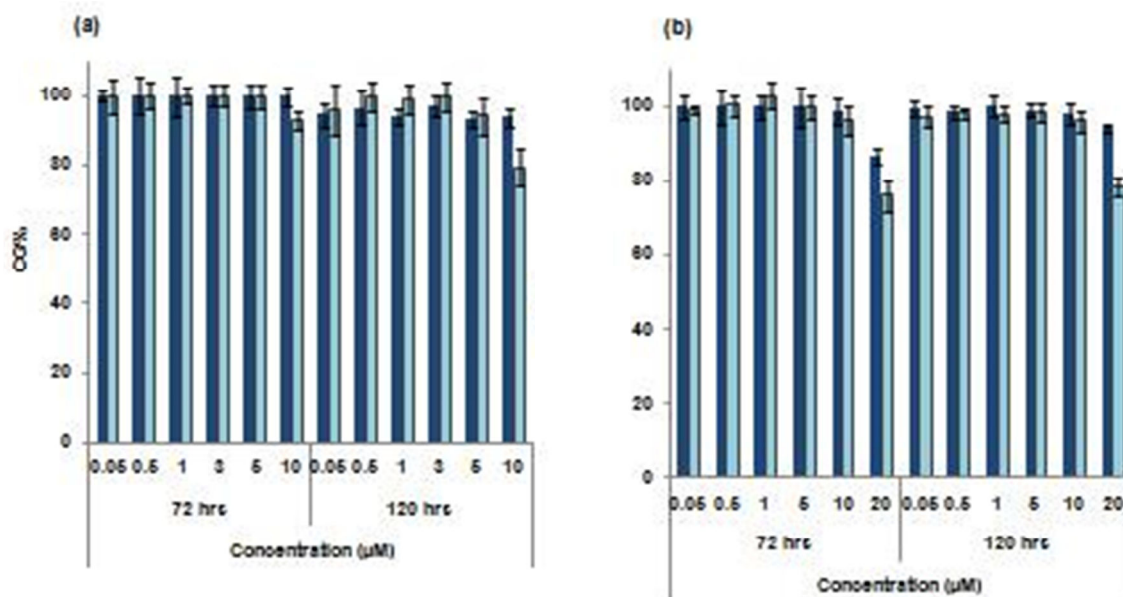


Figura 59. Citotoxicidad de las NLS (gris) y NLSM (azul) en las líneas celulares de cáncer de colon humanas (a) T84 y en (b) HCT-15. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de crecimiento (GI, %). Las concentraciones se establecen en relación al fármaco.

Además, las NLS y las NLSM cargadas con 5-fluorouracilo no modificaron la actividad antiproliferativa del fármaco, encontrando el mismo porcentaje de inhibición del crecimiento en todos los tiempos de exposición (Figura 60).

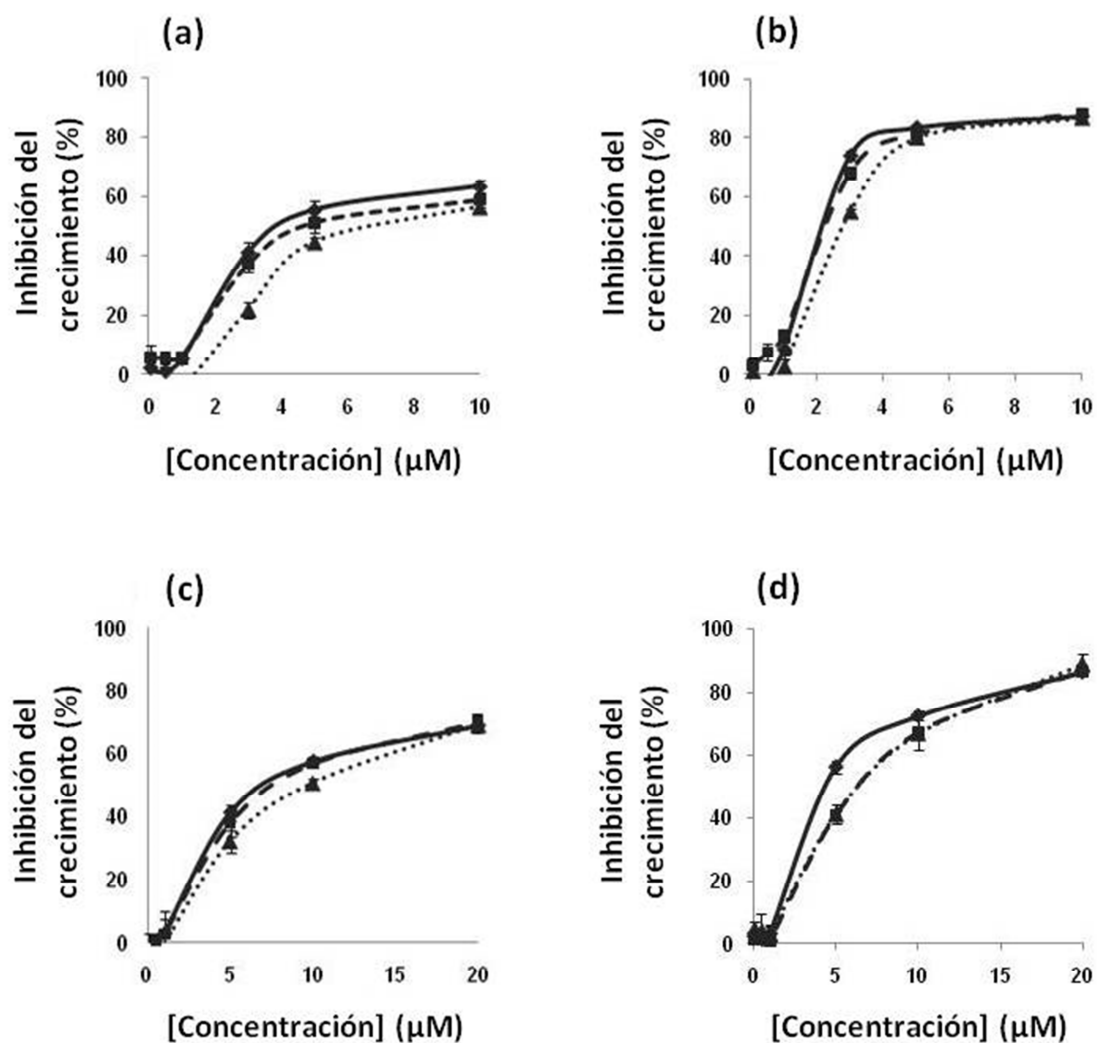


Figura 60. Citotoxicidad de las NLS (- ■ -) y NLSM (· · ▲ · ·) cargadas con 5-FU comparadas con la del 5-FU en solución (- ◆ -) en las líneas celulares T84 y HCT-15 tras 72 horas (a, c) y 120 horas (b, d) de exposición. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de crecimiento (GI, %).



### **6.4.3. ESTUDIO DE INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS AL INTERIOR CELULAR**

Para valorar la incorporación de las NLS y NLSM en las líneas celulares de colon, ambas líneas fueron sembradas en placas de seis pocillos con una concentración por pocillo de  $1 \cdot 10^5$  células en 2 mL de DMEM suplementado.

Tras 24 horas de incubación, las células fueron tratadas con rodamina 123 libre e incorporada en nanopartículas (NLS-Rho, NLS-5FU-Rho, NLSM-Rho, NLSM-5FU-Rho) y NLS y NLSM sin principios activos como control.

Estos tratamientos fueron aplicados a una dosis de rodamina 123 de  $1.3 \mu\text{M}$  durante 0.5, 1, 2 y 4 horas. La línea celular HCT-15 fue pretratada durante una hora con  $14.3 \mu\text{M}$  verapamil hydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para evitar la expulsión de la rodamina 123 por la glicoproteína-P, un transportador transmembrana implicado en la resistencia celular a los fármacos y que está sobreexpresado en esta línea celular [Gottesman y cols., 1993]. A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS, y se observaron mediante microscopía de fluorescencia Leica DM IL LED (Leica Microsystems S.L.U., Barcelona, España).

Las imágenes de microscopía de fluorescencia mostraron una intensidad similar en el interior de las células entre rodamina 123 en disolución comparada con NLS-Rho, NLS-5FU-Rho, NLSM-Rho y NLSM-5FU-Rho indicando que las nanopartículas no incrementan la presencia del fármaco en el interior de las células tumorales (Figura 61).

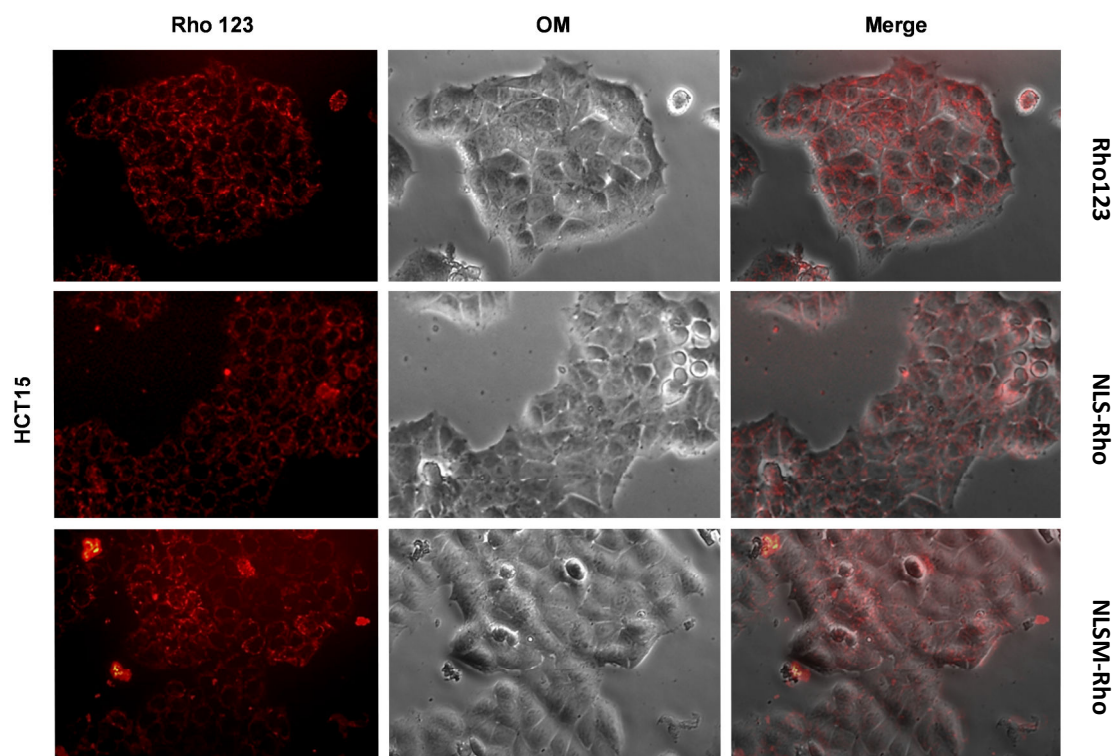


Figura 61. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las líneas celulares HCT15 expuestas a rodamina 123, NLS y NLSM, ambas cargadas con rodamina 123. Las células HCT15 fueron tratadas durante cuatro horas con (a) rodamina 123, (b) NLS-Rho y (c) NLSM-Rho. Las imágenes se tomaron con un aumento de 10x. OM: imágenes de microscopía óptica de la línea celular HCT15.

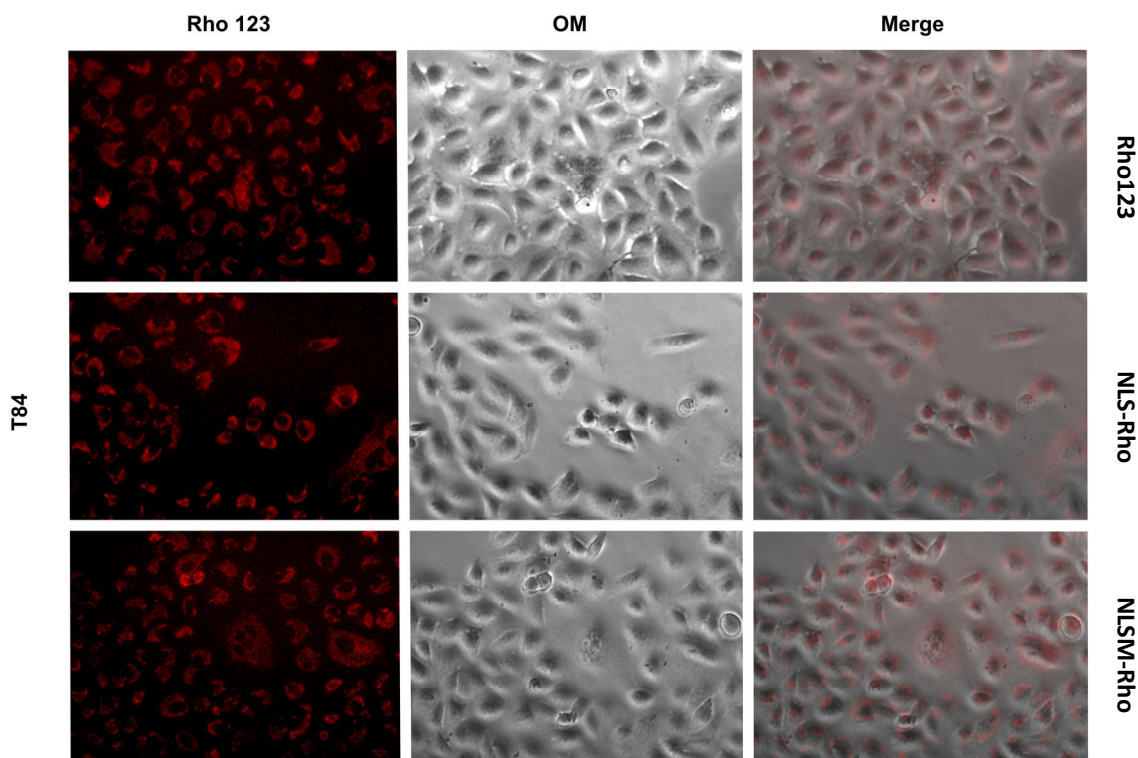


Figura 62. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las líneas celulares T84 expuestas a rodamina 123, NLS y NLSM, ambas cargadas con rodamina 123. Las células T84 fueron tratadas durante cuatro horas con (a) rodamina 123, (b) NLS-Rho y (c) NLSM-Rho. Las imágenes se tomaron con un aumento de 10x. OM: imágenes de microscopía óptica de la línea celular T84.

Estos resultados sugieren que nuestras nanopartículas magnéticas pueden ser usadas como un sistema terapéutico y de diagnóstico en este tumor sin interferir con la actividad farmacológica del 5-fluorouracilo.

Finalmente, el patrón de distribución en el interior celular de la rodamina 123 incorporada en las nanopartículas se muestra similar a la de la rodamina 123 libre. Este patrón es principalmente citoplasmático, sin observarse una acumulación clara en un área en particular.

Podemos concluir que las NLS y NLSM son sistemas biocompatibles que no muestran toxicidad en las líneas celulares ensayadas. Además las NLS y NLSM cargadas con 5-fluorouracilo no disminuyen la toxicidad del fármaco.

Estos resultados indican que las características magnéticas de nuestro sistema de nanopartículas puede ser usado en el tratamiento del cáncer de colon (termoterapia) asociada a la actividad citotóxica del fármaco y para localizar el tejido tumoral a través de un sistema para reconocer el material magnético (por ejemplo MRI).

Por otro lado, NLS y NLSM no afectan a la incorporación de la rodamina al interior celular, aunque su distribución intracelular fue la misma. Esto podría ser debido a las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas como tamaño, forma y carga superficial que puede cambiar la eficacia de captación celular. De hecho, la carga superficial tiene el mayor impacto en la captación celular [Gratton y cols., 2008; Kulkarni y cols., 2013]. Las nanopartículas con carga positiva entran con mayor facilidad al interior celular debido a la carga negativa de la membrana celular, en comparación con nanopartículas con carga negativa o neutra como es nuestro caso.

Otros autores muestran que la cantidad de nanopartículas en el interior celular puede incrementarse mediante la adición de un ligando a la superficie de las nanopartículas, como ferritina, que incrementa la captación celular en comparación con las nanopartículas vacías en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 con receptores de ferritina sobreexpresados [Jain y cols., 2008]. En este contexto, la incorporación de tensioactivos pretende incrementar la incorporación *in vivo*.



## **Capítulo 7.**

### **Conclusiones**



El presente trabajo de investigación, tiene dos objetivos principales. El primero es el diseño y la elaboración, bajo condiciones óptimas, de un sistema transportador de fármacos formado por nanopartículas compuestas de un núcleo magnético y una matriz lipídica biodegradable. El segundo es la vehiculización del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo en el sistema transportador. Las principales aportaciones pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

### **1. Sobre la síntesis de las nanopartículas compuestas.**

a) Se ha puesto a punto un procedimiento reproducible de síntesis de nanopartículas, formadas por un núcleo magnético (magnetita) y una matriz lipídica (trimiristato de glicerol), ambos biodegradables. La metodología de síntesis de los núcleos de óxido de hierro es muy sencilla y permite la obtención de magnetita superparamagnética.

b) Para optimizar las condiciones de la síntesis desarrollada, se analizó el efecto de la proporción inicial de masas magnetita/lípido sobre las nanopartículas compuestas obtenidas, y se concluyó que la relación TG:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 4:2 es la óptima. El análisis de las propiedades eléctricas superficiales y de las propiedades magnéticas de las nanopartículas avala esta conclusión.

c) De esta manera, se ha logrado el diseño de un sistema de liberación controlada de fármaco constituido por un núcleo magnético, responsable de las propiedades magnéticas de las nanopartículas obtenidas; y por una matriz lipídica, cubierta de tensioactivos, muy apropiada para el transporte y liberación controlada de fármaco.



### 2. Sobre la caracterización fisicoquímica.

d) El análisis de las imágenes de microscopía óptica revelan que las nanopartículas obtenidas tienen una geometría muy apropiada para la vía de administración parenteral y los núcleos se encuentran completamente incluidos en el interior celular.

e) Mediante la comparación de los difractogramas de rayos X obtenidos para las nanopartículas de magnetita, las nanopartículas lipídicas sólidas y las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas, comprobamos la perfecta coincidencia de los difractogramas de las nanopartículas magnéticas con el patrón ASTM de la magnetita. Esto permite identificar las muestras de magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta, incluso tras quedar embebida en la matriz lipídica. De esta manera, es de esperar que las propiedades magnéticas persistan tras el recubrimiento de los núcleos magnéticos por el lípido biodegradable.

f) El análisis del espectro de infrarrojos constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos, ya que permitió identificar los grupos funcionales característicos del lípido, así como una banda característica de la magnetita en las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas.

g) El análisis térmico de las nanopartículas por separado nos permite afirmar la gran estabilidad térmica del sistema.

h) El estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de nanopartículas mediante electroforesis constituye una prueba de la eficacia del recubrimiento de las nanopartículas de óxido de hierro en la matriz lipídica. Ésta oculta muy eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas sea indistinguible de la de las nanopartículas lipídicas sólidas.

i) El análisis preliminar de la estabilidad del recubrimiento mediante el estudio de la evolución de las propiedades electrocinéticas de las nanopartículas compuestas en función del tiempo muestra cómo el comportamiento de éstas se aproxima al de la magnetita en agua.

j) Empleando la información obtenida del estudio electrocinético de nuestros materiales, hemos justificado el mecanismo de formación de la capa de recubrimiento lipídico sobre los núcleos magnéticos (junto con el mecanismo termodinámico). Dicha capa se genera como consecuencia de la atracción electrostática entre las nanopartículas de magnetita cargadas positivamente y la matriz lipídica con carga negativa, lo que induce la concentración del lípido en la superficie de la magnetita.

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

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

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

n) La determinación del ciclo de histéresis de las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas ha resultado muy útil en la caracterización de sus propiedades magnéticas. Al quedar englobados los núcleos de óxido de hierro en el interior de la matriz lipídica, la imanación de la nanopartícula resulta ser muy elevada por su carácter

superparamagnético. Esta característica ha sido comprobada cualitativamente de forma visual y mediante microscopía óptica en suspensiones acuosas de los nanocompuestos.

### **3. Sobre la capacidad de transporte y liberación controlada del fármacos 5-fluorouracilo.**

o) Se ha validado y utilizado un procedimiento espectrofotométrico sencillo para la determinación de la incorporación del fármaco antitumoral en las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas, y para la cuantificación de la cantidad de fármaco cedida al medio en los ensayos de liberación.

p) Hemos estudiado y definido las condiciones óptimas de vehiculización del 5-fluorouracilo en las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas, mediante la adición del principio activo en el medio acuoso que quedará englobado en la matriz lipídica, y que contiene los núcleos magnéticos en suspensión, antes de que se desencadene la formación de las nanopartículas compuestas.

q) El estudio preliminar de las formulaciones ha puesto de manifiesto la estabilidad en el tiempo en cuanto a retención de fármaco que tienen las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas para diferentes condiciones típicas de conservación o almacenamiento de estas formulaciones.

r) El estudio de la liberación *in vitro* del fármaco absorbido en la matriz lipídica de las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas revela de forma general un perfil de cesión lento de principio activo, completo en catorce días y que se ajusta, según el análisis de varianza de la regresión al modelo (criterio ANOVA) y del coeficiente de

determinación,  $r^2$ , a una cinética de liberación raíz cuadrada. Esto resulta adecuado para obtener un óptimo efecto farmacológico.

#### **4. Sobre la viabilidad celular *in vitro*.**

s) La ausencia de citotoxicidad por parte de las nanopartículas lipídicas sólidas y las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas, en líneas celulares de cáncer de colon humano T-84 y HCT-15, muestra una biocompatibilidad óptima para ser utilizados como agentes transportadores.

t) La incorporación de fármaco en las nanopartículas lipídicas sólidas no afectaron a la toxicidad del mismo, encontrando el mismo porcentaje de muerte celular comparado con el fármaco en solución.

u) Para el estudio de la incorporación de las nanopartículas al interior celular estas se marcaron con rodamina 123. El patrón de distribución en el interior celular de la rodamina 123 incorporada en las nanopartículas se muestra similar a la de la rodamina 123 libre, siendo principalmente citoplasmático.

v) Las nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas pueden ser usadas como un sistema terapéutico y de diagnóstico de cáncer de colon ya que no afectan a la incorporación de la rodamina al interior celular y no interfieren con la actividad farmacológica del 5-fluorouracilo.

**Capítulo 8.**

**Bibliografía**



- Abaan OD, Polley EC, Davis SR, Zhu YJ, Bilke S, Walker RL, Pineda M, Gindin Y, Jiang Y, Reinhold WC, Holbeck SL, Simon RM, Doroshov JH, Pommier Y, Meltzer PS. The exomes of the NCI-60 panel: a genomic resource for cancer biology and systems pharmacology. *Cancer Res.* 2013; 73: 4372-4382.
- Adams E, Bruchez M. Surface-modified semiconductive and metallic nanoparticles having enhanced dispersibility in aqueous media. US20020045045 A1. 2001.
- Adamson AW. *Physical chemistry of surfaces*. Nueva York: John Wiley & Sons 1982.
- Ahlin P, Kristl J, Kristl A, Vrečer F. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. *Int. J. Pharm.* 2002; 239: 113-120.
- Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lübbe AS. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.* 2000; 60: 6641-6648.
- Alexiou C, Arnold W, Hulin P, Klein RJ, Renz H, Parak FG, Bergemann C, Lübbe AS. Magnetic mitoxantrone nanoparticle detection by histology, X-ray and MRI after magnetic tumor targeting. *J. Magn. Mater.* 2001; 225: 187-193.
- Alexiou C, Schmid RJ, Jurgons R, Kremer M, Wanner G, Bergemann C, Huenges E, Nawroth T, Arnold W, Parak FG. Targeting cancer cells: Magnetic nanoparticles as drug carriers. *Eur. Biophys J.* 2006; 35: 446-450.
- ALHaj NA, Abdullah R, Ibrahim S, Bustamam A. Tamoxifen drug loading solid lipid nanoparticles prepared by hot high pressure homogenization techniques. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 2008; 3: 219-224.

- Allémann E, Leroux JC, Gurny R, Doelker E. In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm. Res.* 1993 ;10: 1732-1737.
- Allen LV. Dosage form design and development. *Clin. Ther.* 2008; 30: 2102-2111.
- Allen TM. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994; 15: 215-220.
- Allen TM, Cullis PT. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science.* 2004; 303: 1818-1822.
- Als-Nielsen J, McMorrow D. Elements of modern X-Ray physics. Copenhagen: Wiley 2001.
- Álvarez Paneque A, Reguera Ruiz E, Estévez Hernández O, Martínez García R, Canino Ramos C, Díaz Castañón S. Síntesis y caracterización de un sistema de nanopartículas superparamagnéticas basado en la ferrita de manganeso (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) tipo espinela. *Revista Cubana de Química* 2008; 20: 70-76.
- Andresen TL, Davidsen J, Begtrup M, Mouritsen OG, Jørgensen K. Enzymatic release of anti-tumor ether lipids by specific phospholipase A2 activation of novel liposome-forming prodrugs. *J. Med. Chem.* 2004; 47: 1694-1703.
- Andresen TL, Jensen SS, Kaasgaard T, Jørgensen K. Triggered activation and release of liposomal prodrugs and drugs in cancer tissue by secretory phospholipase A2. *Curr. Drug Deliv.* 2005; 2: 353-362.
- Ang KL, Venkatraman S, Ramanujan RV. Magnetic PNIPA hydrogels for hyperthermia applications in cancer therapy. *Mater. Sci. Eng. C.* 2007; 27: 347-351.



- Aquino E, Prieto F, Galán CA, González CA, Barrado E, Medina J. Síntesis y caracterización de ferritas de Cd, Pb y Mn vía hidroquímica. *ACI*. 2010; 1: 1-13.
- Arakaki A, Nakazawa H, Nemoto M, Mori T, Matsunaga T. Formation of magnetite by bacteria and its application. *J. R. Soc. Interface*. 2008; 5: 977-999.
- Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Release* 2001; 77: 309-321.
- Arias JL, Gallardo V, Gómez-Lopera SA, Delgado AV. Loading of 5-fluorouracil to poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Biomed. Nanotechnol*. 2005; 1: 632-634.
- Arias JL, Gallardo V, Linares-Molinero F, Delgado AV. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci*. 2006; 299: 599-607.
- Arias JL, López-Viota M, Ruiz MA, López-Viota J, Delgado AV. Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/Shell nanoparticles for biomedical applications. *Int. J. Pharm*. 2007; 339: 237-245.
- Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules*. 2008; 13: 2340-2369.
- Arias JL, Harivardhan Reddy L, Couvreur P. Magneto-responsive squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. *Langmuir*. 2008a; 24: 7512-7519.

- Arias JL, Gallardo V, Ruiz MA, Delgado AV. Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-fluorouracil delivery systems for active targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008b; 69: 54-63.
- Arias JL, Ruiz MA, Gallardo V, Delgado AV. Tegafur loading and release properties of magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles. *J. Control. Release.* 2008c; 125: 50-58.
- Arias JL, Linares-Molinero F, Gallardo V, Delgado AV. Study of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) (core/shell) particles as anticancer drug delivery systems: Loading and release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008d; 33: 252-261.
- Arias JL, López-Viota M, López-Viota J, Delgado AV. Development of iron/ethylcellulose (core/shell) nanoparticles loaded with diclofenac sodium for arthritis treatment. *Int. J. Pharm.* 2009a; 382: 270-276.
- Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine. *J. Drug Target.* 2009b; 27: 586-598.
- Arias JL, López-Viota M, Gallardo V, Ruiz MA. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the chemotherapy agent tegafur. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2010a; 36: 744-750.
- Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA. Formulation and physicochemical characterization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2010b; 75: 204-208.
- Arias JL, Martínez-Solez GI, López-Viota M, Ruiz MA. Formulation of chitosan nanoparticles loaded with metronidazole for the treatment of infectious diseases. *Lett. Drug Des. Discov.* 2010c; 7: 70-78.

- Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: An overview. *Mini Rev. Med. Chem.* 2011; 11: 1-17.
- Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA, Delgado AV. Engineering of an antitumor (core/shell) magnetic nanoformulation based on the chemotherapy agent ftorafur. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2011a; 384: 157-163.
- Arias JL, Reddy LH, Couvreur P. Superior preclinical efficacy of gemcitabine developed as chitosan nanoparticulate system. *Biomacromolecules.* 2011b; 12: 97-104.
- Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Hirsuta S, Arbiol J, Ibarra MR, Santamaría J. Sustained release of doxorubicin from zeolite-magnetite nanocomposites prepared by mechanical activation. *Nanotechnology.* 2006a; 17: 4057-4064.
- Arruebo M, Galán M, Navascues N, Téllez C, Marquina C, Ibarra MR, Santamaría J. Development of magnetic nanostructured silica based materials as potential vectors for drug delivery applications. *Chem. Mater.* 2006b; 18: 1911-1919.
- Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today.* 2007; 2: 22-32.
- Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.* 1954; 139: 846-852.
- Aulton ME. *Pharmaceutics.* Churchill Livingstone. Edinburgh. 2002.
- Babbs CF. Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 1990; 8: 191-200.
- Barberi-Heyob M, Watelet M, Merlin JL, Bleyer C, Schroeder B. Stability of newly-formulated 5-fluorouracil solutions. *Bull. Cancer* 1995; 82: 1025-1031.

- Batrakova EV, Kabanov AV. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J. Control. Release.* 2008; 130: 98-106.
- Bawa P, Pillay V, Choonara YE, Toif LC. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. *Biomed. Mater.* 2009; 4: 022001-022015.
- Beck P, Scherer D, Kreuter J. Separation of drug-loaded nanoparticles from free drug by gel filtration. *J Microencapsul.* 1990; 7: 491-496.
- Bee A, Massart R. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Mater.* 1995; 149: 6-9.
- Behrens S, Bönnemann H, Matoussevitch N, Gorschinski A, Dinjus E, Habicht W, Bolle J, Zinoveva S, Palina, Hormes J, Modrow H, Bahr S, Kempter V. Surface engineering of Co and FeCo nanoparticles for biomedical application. *J. Phys. Condens. Matter.* 2006; 18: S2543-S2561.
- Bellocq NC, Pun SH, Jensen GS, Davis ME. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 2003; 14: 1122-1132.
- Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int. J. Cancer.* 2001; 91: 421-430.
- Bernal SD, Lampidis TJ, Summerhayes IC, Chen LB. Rhodamine-123 selectively reduces clonal growth of carcinoma cells in vitro. *Science.* 1982; 218: 1117-1119.
- Berrino F, Krogh V, Riboli E. Epidemiology studies on diet and cancer. *Tumori.* 2003; 89: 581-5.

- Bertolini A, Fiumanò M, Muffatti A, Pedroncelli S, Doria A, Codazi G, Giustiani S, Scarinci A, Redaelli G. Acute cardiotoxicity due to 5-fluorouracil: An underestimated toxicity. *Minerva Cardioangiol.* 1999; 47: 269-273.
- Betancourt T, Brown B, Brannon-Peppas L. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: preparation, characterization and in vitro evaluation. *Nanomedicine (Lond).* 2007; 2: 219-232.
- Bibby DC, Talmadge JE, Dalal MK, Kurz SG, Chytil KM, Barry SE, Shand DG, Steiert M. Pharmacokinetics and biodistribution of RGD-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles in tumor-bearing mice. *Int. J. Pharm.* 2005; 293: 281-290.
- Billmeyer FW. Morfología y orden en los polímeros cristalinos. En: *Ciencia de los Polímeros.* (Ed.: Billmeyer FW). Barcelona: Reverté 1975. 148-167.
- Bindu NHS, Kumar SR. A new spectroscopic determination and stability indicating assay for the estimation of trymiristin in API and Polyherbal Ayurvedic formulation. *Int. J. PharmTech Res.* 2013; 5: 1498-1507.
- Bisby RH, Mead C, Morgan CG. Active uptake of drugs into photosensitive liposomes and rapid release on UV photolysis. *Photochem. Photobiol.* 2000; 72: 57-61.
- Blagoeva PM, Balansky RM, Mircheva TJ, Simeonova MI. Diminished genotoxicity of mitomycin C and famorubicin included in polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Mutat. Res.* 1992; 268: 77-82.
- Bocci G, Danesi R, Di Pablo A, Innocenti F, Allegrini G, Falcone A, Melosi A, Battistoni M, Barsanti G, Conte PF, Del Tacca M. Comparative pharmacokinetic analysis of 5-fluorouracil and its major metabolite 5-fluoro-5,6-dihydrouracil after conventional and reduced test dose in cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 3032-3037.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Bogdanov A, Wright SC, Marecos EM, Bogdanova A, Martin C, Petherick P, Weissleder R. A long-circulating co-polymer in “passive targeting” to solid tumors. *J. Drug Target.* 1997; 4: 321-330.
- Boltri L, Canal T, Esposito PA, Carli F. Lipid nanoparticles: Evaluation of some critical formulation parameters. *Proc. Intern. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 1993; 20: 346-347.
- Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26(17): 2828-38.
- Bowen DK, Tanner BK. High resolution X-Ray diffractometry and topography. CRC Press. 1998.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 631-651.
- Brigger I, Morizet J, Laudani L, Aubert G, Appel M, Velasco V, Terrier-Lancombe MJ, Desmaële D, d'Angelo J, Couvreur P, Vassal G. Negative preclinical results with stealth® nanospheresencapsulated doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *J. Control Release.* 2004; 100: 29-40.
- Budrugaec P, Miu L, Bocu V, Wortmann FJ, Popescu C. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2003; 72: 1057-1064.
- Budrugaec P, Miu L, Popescu C, Wortmann FJ. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2004; 79: 975-985.
- Bunjes H, Koch MH, Westesen K. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92: 1509-1520.

- Bunjes H, Unhuh T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007; 59: 379-402.
- Burt RW. Rare syndromes and genetic testing for colorectal cancer. *Semin. Gastrointest. Dis.* 2000; 11: 147-151.
- Byrn SR, Pfeiffer RR, Stowell JG. Solid-state chemistry of drugs. SSCI, West Lafayette. 1999.
- Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2008; 60: 1615-1626.
- Cannon WR, Danforth SC, Flint JH, Haggerty JS, Marra RA. Sinterable ceramic powders from laser-driven reactions: I, Process description and modelling. *J. Am. Chem. Soc.* 1982; 77: 324-330.
- Carpenter EE. Iron nanoparticles as potential magnetic carriers. *J. Magn. Magn. Mater.* 2001; 225: 17-20.
- Cavalli R, Marengo E, Rodríguez L, Gasco MR. Effects of some experimental factors on the production process of solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1996; 42: 110-115.
- Cavalli R, Caputo O, Marengo E, Pattarino F, Gasco MR. The effect of the components of microemulsions on both size and crystalline structure of solid lipid nanoparticles (SLN) containing a series of model molecules. *Pharmazie.* 1998; 53: 392-396.
- Chan DCF, Kirpotin DB, Bunn JrPA. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer. *J. Magn. Mater.* 1993; 122: 374-378.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Chapman H, Vigneswaran S, Ngo HH, Dyer S, Ben Aim R. Pre-flocculation of secondary treated wastewater in enhancing the performance of microfiltration. *Desalination*. 2002; 146: 367-372.
- Chari RV, Jackel KA, Bourret LA, Derr SM, Tadayoni BM, Mattocks KM, Shah SA, Liu C, Blättler WA, Goldmacher VS. Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065 analogue through immunoconjugate formation. *Cancer Res*. 1995; 55: 4079-4084.
- Charles SW. The preparation of magnetic fluids. En: *Ferrofluids*. (Ed.: Odenbach S). Berlin: Springer 2003; pp. 3-18.
- Chen Y, Dalwadi G, Benson HA. Drug delivery across the blood-brain barrier. *Curr. Drug Deliv*. 2004; 1: 361-376.
- Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, Wang T, Yuan H, Ye C, Zhao F, Chai Z, Zhu C, Fang X, Ma B, Wan L. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters*. 2006; 163: 109-120.
- Chen Y, Zhu X, Zhang X, Liu B, Huang L. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol. Ther*. 2010; 18: 1650-1656.
- Chiappetta DA, Gergic EP, Legaspi MJ, Cantarelli GN, Garcia Gamboa MF, Bregni C. Comprimidos bioadhesivos formulados con excipientes hidrofílicos para uso bucofaríngeo. *Acta Farm. Bonaerense*. 2006; 25: 360-365.
- Chibowski E. Solid surface free energy components determination by the thin-layer wicking technique. *J. Adhesion Sci. Technol*. 1992; 6: 1069-1090.
- Chibowski E, Holysz L. Use of the Washburn equation for surface free energy determination. *Langmuir*. 1992; 8: 710-716.



- Chibowski E, González-Caballero F. Theory and practice of thin-layer wicking. *Langmuir*. 1993; 9: 330-340.
- Chibowski E, Kerkeb ML, González-Caballero F. Effect of inorganic ions on changes in the energetic heterogeneity of the cholesterol surface. *Langmuir*. 1993; 9: 2491-2495.
- Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004; 140(8): 603-13.
- Cho SJ, Jarrett BR, Louie AY, Kauzlarich SM. Gold-coated iron nanoparticles: a novel magnetic resonance agent for T1 and T2 weighted imaging. *Nanotechnology*. 2006; 17: 640.
- Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14: 1310-1316.
- Ciofani G, Riggio C, Raffa V, Menciassi A, Cuschieri A. A bi-modal approach against cancer: Magnetic alginate nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia. *Med. Hypotheses*. 2009; 73: 80-82.
- Clares B, Biedma-Ortiz RA, Sáez-Fernández E, Prados JC, Melguizo C, Cabeza L, Ortiz R, Arias JL. Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2013; 85: 329-338.
- Connelly-Frost A, Poole C, Satia JA, Kupper LL, Millikan RC, Sandler RS. Selenium, apoptosis, and colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2006; 15: 486-93.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Cortesi R, Esposito E, Luca G, Nastruzzi C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials*. 2002; 23: 2283-2294.
- Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.* 2006; 23: 1417-1450.
- Cucos A, Budrugaec P, Miu L, Mitrea S, Sbarcea G. Dynamic mechanical analysis (DMA) of new and historical parchments and leathers: Correlations with DSC and XRD. *Thermochimica Acta*. 2011; 516: 19-28.
- Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin. Immunol.* 2006a; 121: 144-158.
- Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin. Immunol.* 2006b; 121: 159-176.
- Dash BC, Réthoré G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials*. 2010; 31: 8188-8197.
- Davis SC, Szoka FC. Cholesterol phosphate derivatives: Synthesis and incorporation into a phosphatase and calcium-sensitive triggered release liposome. *Bioconj. Chem.* 1998; 9: 783-792.
- Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008; 7: 771-782.

- 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. *Gastroenterol.* 2004; 126: 42-48.
- De Labouret A, Thioune O, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. Application of an original process for obtaining colloidal dispersions of some coating polymers: preparation, characterization, industrial scale-up. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 1995; 21: 229-241.
- Decuzzi P, Pasqualini R, Arap W, Ferrari M. Intravascular delivery of particulate systems: Does geometry really matter? *Pharm. Res.* 2009; 26: 235-243.
- Delgado A. *Interfacial electrokinetics and electrophoresis.* New York: Marcel Dekker 2002.
- Derycke A, Kamuhabwa A, Gijssens A, Roskams T, de Vos D, Kasran A, Huwyler J, Missiaen L, de Witte PAM. Transferrin-conjugated liposome targeting of the photosensitizer ALPcS4 to rat bladder carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004; 96: 1620-1630.
- Dickson C. *Experiments in Pharmaceutical Chemistry.* New York: CRC Press.2014.
- DiFeo TJ. Drug product development: A technical review of chemistry, manufacturing and controls information for the support of pharmaceutical compound licensing activities. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2003; 29: 939-958.
- Ding ZY, Liu GH, Olsson B, Sun XF. Upregulation of the antiapoptotic factor Livin contributes to cisplatin resistance in colon cancer cells. *Tumour Biol.* 2013; 34: 683-93.

- Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Develop. Res.* 2006; 67: 55-60.
- Doménech J, Martínez J, Plá JM. En: *Biofarmacia y farmacocinética*. Madrid: Síntesis 1998.
- Drenth J. *Principles of protein X-ray crystallography*. New York: Springer Science & Business Media. 2007.
- Dubes A, Parrot-Lopez H, Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H, Shahgaldian P, Coleman AW. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *Eur. J Pharm. Biopharm.* 2003; 55: 279-282.
- Dukhin SS. *Surface and colloid science*. (Ed.: Matijević E). Nueva York: Wiley; 1974.
- Durán JDG, Delgado AV, González-Caballero F, Chibowski E. Surface free energy components of monodisperse zinc sulfide. *Mater. Chem. Phys.* 1994; 38: 42-49.
- Durán JDG, Guindo MC, Delgado AV. Electrophoretic properties of colloidal dispersions of monodisperse zinc sulphide: Effects of potential determining ions and surface oxidation. *J. Colloid Interface Sci.* 1995; 173: 436-442.
- Durán JDG, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Magnetic colloids as drug vehicles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97: 2948-2983.
- Edens HA, Levi BP, Jaye DL, Wash S, Reaves TA, Turston JR, Nusrat A, Parkos CA. Neutrophil transepithelial migration: Evidence for sequential, contact-dependent signalling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. *J. Immunol.* 2002; 169: 476-486.

- Elaissari A, Sauzedde F, Montagne F, Pichot C. Preparation of magnetic lattices. En: Colloidal polymers. Synthesis and characterization. (Ed.: Elaissari A) New York: CRC Press. 2003; pp. 285-318.
- Esmaeili F, Grahremani MH, Ostad SN, Atyabi F, Seyedabadi M, Malekshahi MR, Amini M, Dinarvand R. Folate-receptor-targeting delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J. Drug Target.* 2008; 16: 415-423.
- Estella-Hermoso de Mendoza A, Rayo M, Mollinedo F, Blanco-Prieto MJ. Lipid nanoparticles for alkyl lysophospholipid edelfosine encapsulation: development and in vitro characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; 68: 207-213.
- Fang JY, Fang CL, Liu CH, Su YH. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; 70:633-640.
- Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 6315-6320.
- Fattal E, Roques B, Puisieux F, Blanco-Prieto MJ, Couvreur P. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 1997; 28: 85-96.
- Fawaz F, Guyot M, Lagueny AM, Devissaguet JPh. Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: Preparation and characterization, *Int. J. Pharm.* 1997; 154: 191-203.
- Feltin N, Pileni MP. New technique for synthesizing iron ferrite magnetic nanosized particles. *Langmuir.* 1997; 13: 3927-3933.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Fernández-Pacheco R, Arruebo M, Marquina C, Ibarra R, Arbiol J, Santamaría J. Highly magnetic silica-coated iron nanoparticles prepared by the arc-discharge method. *Nanotechnology*. 2006; 17: 1188-1192.
- 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.* 2007; 311: 318-322.
- Fessi C, Devissaguet JP, Puisieux F, Thies C. Precipitation of film-forming material and biologically active substance from solvent-non-solvent mixture. US 5118528 A. 1992
- Fiévet F. Polyol process. Polyol process. En: *Fine particles: Synthesis, characterization and mechanism of growth*. (Ed.: Sugimoto T). New York: Marcel Dekker 2000; pp. 460-496.
- Fischer HC, Chan WCW. Nanotoxicity: The growing need for in vivo study. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007; 18: 565-571.
- Florey K. *Analytical profiles of drug substances*. New York and London: Academic Press 1973.
- Flórez J. *Farmacología humana*. Barcelona: Maason S.A. 2008.
- Florez JC. Pharmacogenetic perturbations in humans as a tool to generate mechanistic insight. *Diabetes*. 2013;62:3019-3021.
- Ford JL, Timmins P. In: *Pharmaceutical thermal analysis*. John Wiley and Son. Chichester. 1989.

- Freitas C, Müller RH. J. Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion after addition of electrolyte. *J. Microencapsulation*. 1999; 16: 59.
- Friedrich I, Müller-Goymann CC. Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003; 56: 111-119.
- Gaber MH, Wu NZ, Hong K, Huang SK, Dewhirst MW, Papahadjopoulos D. Thermosensitive liposomes: Extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1996; 36: 1177-1187.
- Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz AT, Zalipsky S. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1177-1192.
- Gaines RV, Skinner HCW, Foord EE, Mason B, Rosenzweig A. Multiple oxides. En: *Dana's New Mineralogy*. (Ed.: Dana J). New York: John Wiley & Sons. Inc. 1997; pp. 299-300.
- Gaisford S, Buanz AB, Jethwa N. Characterisation of paracetamol form III with rapid-heating DSC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010; 53: 366-370.
- Gao Z, Fein HD, Rapoport N. Ultrasound-enhanced tumour targeting of polymeric micellar drug carrier. *Mol. Pharm.* 2004; 1: 317-330.
- Gao J, Zhonga W, Hea J, Li H, Zhanga H, Zhoua G, Li B, Lua Y, Zoua H, Koua G, Zhanga D, Wang H, Guoa Y, Zhong Y. Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes. *Int. J. Pharm.* 2009; 374: 145-152.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- García-Fuentes M, Torres D, Alonso MJ. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids Surf., B.* 2003; 27: 159-168.
- Garg A, Tisdale AW, Haidari E, Kokkoli E. Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide. *Int. J. Pharm.* 2009; 366: 201-210.
- Gartstein E, Cohen JB, Mason TO. Defect agglomeration in Wüstite at high temperatures-II.: An electrical conduction model. *J. Phys. Chem. Solids* 1986; 47: 775-781.
- Gasco MR. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. U.S. Patent No 5,250,236, 5 Oct. 1993.
- Gasco MR. Solid lipid nanospheres from warm microemulsions. *Pharm. Tech. Eur.* 1997; 9: 52-58.
- Ghoshal K, Jacob ST. An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem. Pharmacol.* 1997; 53: 1569-1575.
- Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl. Cancer Inst.* 1995; 87: 265-73.
- Glöckl G, Hergt R, Zeisberger M, Dutz S, Nagel S, Weitschies W. The effect of field parameters, nanoparticles properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2935-S2950.
- 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.* 2004; 64: 3014-3021.
- Gómez-Lopera SA, Arias JL, Gallardo V, Delgado AV. Colloidal stability of magnetite/poly(lactic acid) core/shell nanoparticles. *Langmuir.* 2006; 22: 2816-2821.
- González-Carreño T, Morales MP, Gracia M, Serna CJ. Preparation of uniform g-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles with nanometer size by spray pyrolysis. *Mater. Lett.* 1993; 18: 151-155.
- González-Rodríguez ML, Maestrelli F, Mura P, Rabasco AM. In vitro release of sodium diclofenac from a central core matrix tablet aimed for colonic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003; 20: 125-131.
- Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S, Gabizon A. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 1949-1957.
- Gosselin P, Lacasse FX, Preda M, Thibert R, Clas SD, McMullen JN. Physicochemical evaluation of carbamazepine microparticles produced by the rapid expansion of supercritical solutions and by spray-drying. *Pharm. Dev. Technol.* 2003; 8: 11-20.
- Gottesman S, Clark WP, de Crecy-Lagard V, Maurizi MR. ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and in vivo activities. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 22618-22626.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev.* 2002; 2: 48-58.
- Grainger DW. Nanotoxicity assessment: All small talk. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009; 61: 419-421.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2008; 105: 11613-11618.
- Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, Langer RS, Farokhzad OC. Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today.* 2007; 2: 14-21.
- Gu M, Li Y, Li X, Hu S, Zhang X, Xu W, Thevuthasan S, Baer DR, Zhang JG, Liu J, Wang C. In Situ TEM Study of Lithiation Behavior of Silicon Nanoparticles Attached to and Embedded in a Carbon Matrix. *ACS Nano.* 2012; 6: 8439-8447.
- Guan H, McGuire MJ, Li S, Brown KC. Peptide-targeted polyglutamic acid doxorubicin conjugates for the treatment of alpha(v)beta(6)-positive cancers. *Bioconjug. Chem.* 2008; 19: 1813-1821.
- Guo WX, Huang KX. Preparation and properties of poly(dimer acid–dodecanedioic acid) copolymer and poly(dimer acid–tetradecanedioic acid) copolymer. *Biopolymers.* 2004; 3: 248-255.
- Guo X, Szoka FC. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery. *Acc. Chem. Res.* 2003; 36: 335-341.
- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005; 26: 3995-4021.
- Gupta AS. Nanomedicine approaches in vascular disease: a review. *Nanomedicine.* 2011; 7: 763-779.
- 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* 2014; 18(4): 236-44.
- Han SK, Na K, Bae YH. Sulfonamide based pH sensitive polymeric micelles: Physicochemical characteristics and pH-dependent aggregation. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2003; 214: 49-59.
- Hanafi EM, Ahmed WM, Zaabal MM, El-Hadi AA, El Khadrawy HH, Ghazy EA. An overview on applications of nanoparticles in biological systems. *Global J. Pharm.* 2013; 7: 348-359.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- Harris BE, Song R, Soong SJ, Diasio RB. Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res.* 1990; 50:197-201.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 1363-1380.
- Hau P, Fabel K, Baumgart U, Rummele P, Grauer O, Bock A, Dietmaier C, Dietmaier W, Dietrich J, Dudel C, Hübner F, Jauch T, Drechsel E, Kleiter I, Wismeth C, Zellner A, Brawanski A, Steinbrecher A, Marienhagen J, Bogdahn U. Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer*. 2004; 100: 1199-1207.
- Hauck M, Coffin D, Dodge R, Dewhirst M, Mitchell J, Zalutsky MA. A local hyperthermia treatment which enhances antibody uptake in a glioma xenograft model does not affect tumor tumour interstitial blood pressure. *Int. J. Hyperth.* 1997; 13: 307-316.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Hayat MA. Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy. New York: Van Nostrand Reinhold Inc. 1974.
- Heiati H, Tawashi R, Phillips NC. Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilisation. *J. Microencapsul.* 1998; 15: 173-184.
- Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 806-813.
- Hergt R, Dutz S, Müller R, Zeisberger M. Magnetic particle hyperthermia: Nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2919-S2934.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 1995; 55: 4525-4530.
- Hess PH, Parker PH. Polymers for stabilization of colloidal cobalt particles. *J. Appl. Polymer. Sci.* 1966; 10: 1915-1917.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials.* 2003; 24: 4283-4300.
- 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.* 1992; 70: 419-429.
- Hilgenbrink AR, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: From therapeutics to diagnostics. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94: 2135-2146.

- Hilger I, Dietmar E, Linß W, Streck S, Kaiser WA. Developments for the minimally invasive treatment of tumours by targeted magnetic heating. *J. Phys. Cond. Mater.* 2006; 18: S2951-S2958.
- Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheresch DA. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science.* 2002; 296: 2404-2407.
- Hu FQ, Yuan H, Zhang HH, Fang M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.* 2002; 239: 121-128.
- Huang M, Ma Z, Khor E, Lim LY. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharm. Res.* 2002; 19: 1488-1494.
- Huang ZR, Hua SC, Yang YL, Fang JY. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. *Acta Pharmacol. Sin.* 2008; 29: 1094-1102.
- Huber DL. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small.* 2005; 1: 482-501.
- Hunter RJ. *Foundations of colloid science.* Oxford: Oxford University Press 1987.
- Hunter KU, Fernandes LL, Vineberg KA, McShan D, Antonuk AE, Cornwall C, Feng M, Schipper MJ, Balter JM, Eisbruch A. Parotid glands dose-effect relationships based on their actually delivered doses: implications for adaptive replanning in radiation therapy of head-and-neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2013; 87: 676-682.

- Huo J, Zhou SW. New research on development of solid lipid nanoparticles. *Journal of Medical Colleges of PLA*. 2007; 22: 385–390.
- Huwyler J, Drewe J, Krähenbühl S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. *Int. J. Nanomed*. 2008; 3: 21-29.
- Hwang SH, Rait A, Pirolo KF, Zhou Q, Yenugonda VM, Chinigo GM, Brown ML, Chang EH. Tumor-targeting nanodelivery enhances the anticancer activity of a novel quinazolinone analogue. *Mol. Cancer. Ther.* 2008; 7: 559-568.
- Hyeon T, Lee SS, Jongnam Park J, Chung Y, Na HB. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 12798-12801.
- Iannone A, Magin RL, Walczack T, Federico M, Swartz HM, Tomasi A, Vannini V. Blood clearance of dextran magnetite particles determined by a non-invasive in vivo ESR method. *Magn. Reson. Med.* 1991; 22: 435-442.
- Ibrahim A, Couvreur P, Roland M, Speiser P. New magnetic drug carrier. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983; 35: 59-61.
- Igartua M, Saulnier P, Heurtault B, Pech B, Proust JE, Pedraz JL, Benoit JP. Development and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with magnetite. *Int. J. Pharm.* 2002; 233: 149-157.
- Iglesias-Silva E, Vilas-Vilela JL, López-Quintela MA, Rivas J, Rodríguez M, León LM. Synthesis of gold-coated iron oxide nanoparticles. *J. Non-Cryst. Solids*. 2010; 356: 1233-1235.
- Iinuma H, Maruyama K, Okinaga K, Sasaki K, Sekine T, Ishida O, Ogiwara N, Johkura K, Yonemura Y. Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-

- polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int. J. Cancer*. 2002; 99: 130-137.
- Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2006; 6: 714-727.
- Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 100: 1-11.
- Iyer RP, Padmanabhan S, Coughlin JE. Microwave-assisted functionalization of solid supports for rapid loading of nucleosides. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 2006.
- Jabr-Milane LS, van Vlerken LE, Yadav S, Amiji MM. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. *Cancer Treat. Rev.* 2008; 34: 592-602.
- Jahnke S. The theory of high pressure homogenization. In: Muller RH, Benita S, Bohm B, editors. *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 1998.
- Jain RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors: Lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *J. Control. Release* 2001; 74: 7-25.
- Jain SK, Chaurasiya A, Gupta Y, Jain A, Dagur P, Joshi B, Katoch VM. Development and characterization of 5-FU bearing ferritin appended solid lipid nanoparticles for tumour targeting. *Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers*. 2008; 25: 289-297.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T. Interpretation of the contact angle in quartz/organic liquid film-water system. *J. Colloid Interface Sci.* 1984; 102: 533-538.

- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T. Interpretation of the contact angle in marble/organic liquid film-water system. *Mater. Chem. Phys.* 1987; 16: 489-499.
- Janczuk B, Chibowski E, Bialopiotrowicz T, González-Caballero F. Surface free energy of celestite and its flotation activity. *Colloids and Surfaces.* 1989; 35: 41-48.
- Janczuk B, Chibowski E, Wójcik W, Guindo MC, González-Caballero F. Surface free energy of some lead compounds compared to galena. *Mater. Chem. Phys.* 1994; 37: 64-67.
- 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.* 2000; 118: 829-834.
- Jenning V, Schäfer-Korting M, Gohla SH. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J. Control. Release.* 2000; 66: 115–126.
- Jeong JH, Kim SW, Park TG. A new antisense oligonucleotide delivery system based on self-assembled ODN-PEG hybrid conjugate micelles. *J. Control. Release* 2003; 93: 183-191.
- Jian F, Zhang Y, Wang J, Ba K, Mao R, Lai W, Lin Y. Toxicity of biodegradable nanoscale preparations. *Curr. Drug Metab.* 2012; 13: 440-446.
- Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-Fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* 1995; 55: 1407-1412.



- Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mäder K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J. Control Release*. 2004;95: 217-227.
- Jurgons R, Seliger C, Hilpert A, Trahms L, Odenbach S, Alexiou C. Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy. *J. Phys. Condens. Matter*. 2006; 18: S2893-S2902.
- Kaiser CS, Römpp H, Schmidt PC. Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide. *Pharmazie*. 2001; 56: 907-926.
- Kallumadil M, Tada M, Nakagawa T, Abe M, Southern P, Pankhurst QA. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater*. 2009; 321: 1509-1513.
- Kamada H, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Kodaira H, Tsunoda S, Okamoto T, Mukai Y, Shibata H, Nakagawa S, Mayumi T. Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy. *Clin. Cancer Res*. 2004; 10: 2545-2550.
- Karant H, Murthy RS. pH-sensitive liposomes: Principle and application in cancer therapy. *J. Pharm. Pharmacol*. 2007; 59: 469-483.
- Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles – A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett*. 2009; 188: 112-118.
- Karmali PP, Kotamraju VR, Kastantin M, Black M, Missirlis D, Tirrell M, Ruoslahti E. Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors. *Nanomedicine: NBM* 2009; 5: 73-82.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Katsnelson BA, Privalova LI, Sutunkova MP, Tulakina LG, Pichugova SV, Beykin JB, Khodos MJ. Interaction of iron oxide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and alveolar macrophages in vivo. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012; 152: 627-629.
- Katzung BG. *Farmacología básica y clínica*. Méjico: Manual Moderno. 2007.
- Kaur IP, Bhandari R, Bhandari S, Kakkar V. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *J. Control Release*. 2008; 127: 97-109.
- Kellens M, Meussen W, Gehrke R, Reynaers H. Synchrotron investigations of the polymorphic transitions of saturated monacid triglycerides. Part 1: tripalmitin and tristearin. *Chem. Phys. Lipids*. 1991; 58: 131.
- Kheirelseid EA, Miller N, Chang KH, Nugent M, Kerin MJ. Clinical applications of gene expression in colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol*. 201;4: 144-157.
- Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, Marks JD, Benz CC, Park JW. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res*. 2006; 66: 6732-6740.
- Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, Seki M, Tanaka K, Maeda Y, Iino H, Fukayama M, Koike M, Mori T, et al. Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res*. 1992 ; 52: 3965-3971.
- Kim SH, Jeong JH, Chun KW, Park TG. Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate. *Langmuir*. 2005; 21: 8852-8857.

- Kim D, Lee ES, Park K, Kwon IC, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive micelle: Antitumoral efficacy against ovarian A2780/DOXR tumor. *Pharm. Res.* 2008a; 25: 2074-2082.
- Kim MJ, Lee HJ, Lee IA, Kim IY, Lim SK, Cho HA, Kim JS. Preparation, of pH-sensitive, long-circulating and EGFR-targeted immunoliposomes. *Arch. Pharm. Res.* 2008b; 31: 539-546.
- Kim IY, Kang YS, Lee DS, Park HJ, Choi EK, Oh YK, Son HJ, Kim JS. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice. *J. Control. Release.* 2009; 140: 55-60.
- Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *Int. J. Hyperther.* 1999; 15: 345-370.
- Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, Braun RD, Colvin OM, Needham D, Dewhirst MW. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: Importance of triggered drug release. *Cancer Res.* 2000; 60: 6950-6957.
- Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Res.* 2001; 61: 3027-3032.
- Kono K. Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 307-319.
- Korsmeyer RW, Peppas NA. *Controlled release delivery systems.* New York: Marcel Dekker, Inc. 1983.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Kos J, Obermajer N, Doljaka B, Kocbeka P, Kristl J. Inactivation of harmful tumour-associated proteolysis by nanoparticulate system. *Int. J. Pharm.* 2009; 381: 106-112.
- Krause PJ, Malech HL, Kristie J, Kosciol CM, Herson VC, Eisenfeld L, Pastuszak WT, Kraus A, Seligmann B. Polymorphonuclear leukocyte heterogeneity in neonates and adults. *Blood.* 1986; 68: 200-204.
- Kulkarni SA, Feng SS. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharm Res.* 2013; 30: 2512-2522.
- Kuno T, Hatano Y, Tomita H, Hara A, Hirose Y, Hirata A et al. Organomagnesium suppresses inflammation-associated colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice. *Carcinogenesis* 2013; 34(2): 361-9.
- Kunzmann A, Andersson B, Thumherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1810: 361-373.
- Kuo YC, Chen IC. Evaluation of surface charge density and surface potential by electrophoretic mobility for solid lipid nanoparticles and human brain-microvascular endothelial cells. *J. Phys. Chem. B.* 2007; 111: 11228-11236.
- Lai TY, Lee WC. Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2009; 204: 148-153.
- LaMer VK, Dinegar RH. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* 1950; 72: 4847-4854.

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 'two-hit' hypothesis. *Nat. Med.* 1999; 5: 1071-1075.

Lamlum H, Papadopoulou A, Ilyas M, Rowan A, Gillet C, Hanby A, Talbot I, Bodmer W, Tomlinson I. APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000; 97: 2225-2228.

Lander R, Manger W, Scouloudis M, Ku A, Davis O, Lee A. Gaulin homogenization: A mechanistic study. *Biotechnol. Prog.* 2000; 16: 80-85.

Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Elst LV, Müller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* 2008; 108: 2064-2110.

LaVan DA, McGuire T, Langer R. Smallscale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnol.* 2003; 21: 1184-1191.

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.* 2004; 41: 955-964.

Lee ES, Na K, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor. *J. Control. Release* 2005; 103: 405-418.

Lee WH, Loo CY, Young PM, Traini D, Mason RS, Rohanizadeh R. Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2014; 11: 1183-1201.

- Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, Boswell W, Metzger R, Tan M, Danenberg PV. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol.* 1997; 15: 3223-3229.
- Lemaire L, Arellano M, Malet-Martino MC, Martino R, De Forni M. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil: A question of formulation. *Bull. Cancer.* 1994; 81: 1057-1059.
- Lemieux P, Page M. Sensitivity of multidrug-resistant MCF-7 cells to a transferrin-doxorubicin conjugate. *Anticancer Res.* 1994; 14: 397-403.
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J. Surg.* 2002; 89: 845-860.
- Levin AD, Lobach AS, Shmytkova EA. Study of geometric parameters of nonspherical nanoparticles by partially depolarized dynamic light scattering. *Nanotechnologies in Russia.* 2015; 10: 400-407.
- Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery. *Trends Biotechnol.* 2008; 26: 442-449.
- Li JL, Wang L, Liu XY, Zhang ZP, Guo HC, Liu WM, Tang SH. In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* 2009; 274: 319-326.
- Li L, Mak KY, Shi J, Koon HK, Leung CH, Wong CM, Leung CW, Mak CS, Chan NM, Zhong W, Lin KW, Wu EX, Pong PW. Comparative in vitro cytotoxicity study on uncoated magnetic nanoparticles: effects on cell viability, cell morphology, and cellular uptake. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012; 12: 9010-9017.

- Li MH, Ito D, Sanada M, Odani T, Hatori M, Iwase M, Nagumo M. Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral Oncol.* 2004; 40: 63-70.
- Liang B, He ML, Chan CY, Chen YC, Li XP, Li Y, Zheng D, Lin MC, Kung HF, Shuai XT, Peng Y. The use of folate-PEG-grafted-hybranched-PEI nonviral vector for the inhibition of glioma growth in the rat. *Biomaterials* 2009; 30: 4014-4020.
- Liburdy RP, Tenforde TS, Magin RL. Magnetic field-induced drug permeability in liposome vesicles. *Radiation Res.* 1986; 108: 102-111.
- Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, Hornung RW, Hoit BD, McIntosh TC, Walsh RA. The Ile164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 1534-1539.
- Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL, Wang LF. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. *Biomaterials* 2009; 30: 5114-5124.
- Lince F, Marchisio DL, Barresi AA. Strategies to control the particle size distribution of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *J. Colloid. Interface Sci.* 2008; 322: 505-515.
- 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.* 2004; 3: 28.
- Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997; 40 Suppl: S3-8.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Liu YS, Hsu HC, Tseng KC, Chen HC, Chen SJ. Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 2013; 67(8): 791-9.
- Liu YS, Hsu HC, Tseng KC, Chen HC, Chen SJ. Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 2013; 67(8): 791-9.
- Llabot JM, Manzo RH, Allemandi DA. Drug release from carbomer:carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *Int J Pharm.* 2004; 276: 59-66.
- Lo CL, Lin KM, Hsiue GH. Preparation and characterization of intelligent core-shell nanoparticles based on poly(D,L-lactide)-g-poly(N-isopropyl acrylamide-comethacrylic acid). *J. Control. Release* 2005; 104: 477-488.
- Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J. Drug Target.* 2004; 12: 635-641.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3: 330-338.
- Lopes de Menezes DE, Pilarski LM, Allen TM. In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 1998; 58: 3320-3330.
- López García JJ, Moya AA, Horno JJ, Delgado AV, González-Caballero F. A network model of the electrical double layer around a colloid particle. *J. Colloid. Interface Sci.* 1996; 183: 124-130.



- López-López MT, Durán JDG, Delgado AV, González-Caballero F. Stability and magnetic characterization of oleate-covered magnetite ferrofluids in different nonpolar carriers. *J. Colloid. Interface Sci.* 2005; 291: 144-151.
- López-Pérez JA, López-Quintela MA, Mira J, Rivas J. Preparation of magnetic fluids with particles obtained in microemulsions. *IEEE Trans. Magn.* 1997; 33: 4359-4362.
- Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009; 13: 256-262.
- Lu YJ, Low PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 675-693.
- Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, Matthias M, Dörken B, Herrmann F, Gürtler R, Hohenberger P, Haas N, Sohr R, Sander B, Lemke AJ, Ohlendorf D, Huhnt W, Huhn D. Clinical experiences with magnetic drug targeting: A phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* 1996; 56: 4686-4693.
- 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.* 2011; 411: 648-653.
- Lugemwa FN. Extraction of betulin, trimyristin, eugenol and carnosic acid using water-organic solvent mixtures. *Molecules.* 2012; 17: 9274-9282.
- Lyklema J. Water at interfaces: A colloid-chemical approach. *J. Colloid Interface Sci.* 1977; 58: 242-250.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Lyklema J. Thermodynamic foundation of interface and colloid science. En: Fundamentals of Interface and Colloid Science: Solid-Liquid Interfaces. Londres: Academic Press 1995; 2.1-2.103.
- Lynch I, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions. Nano Today. 2008; 3: 40-47.
- Lyon RJP. Infrared absorption spectroscopy. En: Physical methods, in determinative mineralogy. (Ed.: Zussman J). Londres: Academic Press 1967; pp. 371-399.
- Maaßen S, Reichl A., Knapp H. Measurements at high dilution: ecological significance. Fluid Phase Equilibr. 1993; 82: 71–78.
- Maeda H, Wu T, Sawa Y, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. J. Control Release 2000; 65: 271-284.
- Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009; 71: 409-419.
- Mai J, Song S, Rui M, Liu D, Ding Q, Peng J, Xu Y. A synthetic peptide mediated active targeting of cisplatin liposomes to Tie2 expressing cells. J. Control. Release 2009; 139: 174-181.
- Mamot C, Drummond DC, Hong K, Kirpotin DB, Park JW. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. Drug Resist. Updates 2003; 6: 271-279.
- Manjunath K, Reddy JS, Venkateswarlu V. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2005; 27: 127-144.
- Mao S, Wang P, Bi D. Investigations on 5-fluorouracil solid lipid nanoparticles (SLN) prepared by hot homogenization. Pharmazie. 2005; 60: 273-277.

- 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*. 1995; 268: 1336-1338.
- Martin del Valle EM, Galan MA, Carbonell RG. Drug delivery technologies: the way forward in the new decade. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2009; 48: 2475-2486.
- Martins S, Silva AC, Ferreira DC, Souto EB. Improving oral absorption of Salmon calcitonin by trimyristin lipid nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2009; 5: 76-83.
- Martins S, Costa-Lima S, Carneiro T, Cordeiro-da-Silva A, Souto EB, Ferreira DC. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Int. J. Pharm.* 2012; 430: 216-227.
- Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, Kennel SJ, Huang L, Iwatsuru M. Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipatic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal-antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*. 1995; 1234: 74-80.
- Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000; 1: 169-178.
- Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Mag. Mag.* 1981; 17: 1247-1248.
- Matijević R. WS15-08 Physiologic change of spiral arteries – what ultrasound can add?. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2000; 16: 29.
- Matijević E, Sapieszko RS. Forced hydrolysis in homogeneous solutions. En: *Fine particles: Synthesis, characterization and mechanism of growth*. (Ed.: Sugimoto T). New York: Marcel Dekker 2000; pp. 2-34.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Matsuo H, Wakasugi M, Takanaga H, Ohtani H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y. Possibility of the reversal of multidrug resistance and the avoidance of side effects by liposomes modified with MRK-16, a monoclonal antibody to P-glycoprotein. *J. Control. Release* 2001; 77: 77-86.
- Meers P. Enzyme-activated targeting of liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 265-272.
- Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47: 165-196.
- Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012; 64: 83-101.
- Mercoureff W. Propriétés magnétiques des solides et propriétés similaires. En: *Aspects Modernes de la Physique des Solides*. (Ed.: Mercoureff W). París: Masson & Cie 1969; pp. 75-103.
- Minko T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 491-509.
- Mitra S, Gaur U, Gosh PC, Maitra AN. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Release* 2001; 74: 317-323.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 283-318.
- Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: Critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* 2003; 42: 463-478.

- Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, Montero MI, Serna CJ. Surface and internal spin canting in g-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Chem. Mater.* 1999; 11: 3058-3064.
- Morales ME, Gallardo V, Calpena AC, Doménech J, Ruiz MA. Comparative study of morphine diffusion from sustained release polymeric suspensions. *J. Control. Release* 2004; 95: 75-81.
- Moroz P, Jones SK, Gray BN. Magnetically mediated hyperthermia: Current status and future directions. *Int. J. Hyperthermia.* 2002; 18: 267-284.
- Muchow M, Maincent P, Muller RH. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2008; 34: 1394-1405.
- Abu Mukh-Qasem R, Gedanken A. Sonochemical synthesis of stable hydrosol of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2005; 284: 489-494.
- Müller RH, Keck CM, Petersen RD (2008) Rutin smart Crystals: Bioactivity enhancement and stability against electrolytes. Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), Atlanta, USA
- Müller RH, Lherm C, Herbort J, Couvreur P. Propidium-iodide-loaded polyalkylcyanoacrylate particles: Labelling conditions and loading capacity. *Colloid Polymer Sci.* 1991; 269: 147-152.
- Müller RH, Mehnert W, Lucks JS, Schwarz C, zur Mühlen A, Meyhers H, Rühl D. Solid lipid nanoparticles (SLN) – An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995; 41: 62-69.
- Müller RH, Maaßen S, Weyhers H, Specht F, Lucks JS. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1996; 138: 85-94.

- Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000; 50: 161-177.
- Müller RH, Keck CM. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J. Biotechnol.* 2004 ; 113: 151-170.
- Müller RH, Lucks JS. 1996 Arzneistofftrager aus festen Lipid-teilchen, Feste Lipidnanosphären (SLN) European Patent0605497.
- Na K, Lee ES, Bae YH. Adryamicin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity in vitro. *J. Control. Release* 2003; 87: 3-13.
- Nabi-Meibodi M, Vatanara A, Najafabadi AR, Rouini MR, Ramezani V, Gilani K, Etemadzadeh SM, Azadmanesh K. The effective encapsulation of a hydrophobic lipid-insoluble drug in solid lipid nanoparticles using a modified double emulsion solvent evaporation method. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 112: 408-414.
- Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 285-305.
- Némati F, Dubernet C, Fessi H, De Verdière AC, Poupon MF, Puisieux F, Couvreur P. Reversion of multidrug resistance using nanoparticles in vitro: Influence of the nature of the polymer. *Int. J. Pharm.* 1996; 138: 237-246.
- Neumann A, Good RJ. Thermodynamics of contact angles. I. Heterogeneous solid surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 1972; 38: 341-358.

- Nyskohus LS, Watson AJ, Margison GP, Leu RK, Kim SW, et al. Repair and removal of azoxymethane-induced O6-methylguanine in rat colon by O6-methylguanine DNA methyltransferase and apoptosis. *Mutat Res* 2013; 758(1-2): 80-6.
- Ocaña M, Rodríguez-Clemente R, Serna CJ. Uniform colloidal particles in solution: Formation mechanisms. *Adv. Mater.* 1995; 7: 212–216.
- Ohue M, Tomita N, Monden T, Fujita M, Fukunaga M, Takami K, Yana I, Ohnishi T, Enomoto T, Inoue M. A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res.* 1994; 54: 4798-4804.
- Okon E, Pouliquen D, Okon P, Kovaleva ZV, Stepanova TP, Lavit SG, Kudryavtsev BN, Jallet P. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat: A histologic and biophysical study. *Lab. Invest.* 1994; 71: 895-903.
- Olbrich C, Müller RH. Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. *Int. J. Pharm.* 1999; 180: 31-39.
- Olbrich C, Kayser O, Müller RH. Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN)--effect of surfactants, storage time and crystallinity. *Int. J. Pharm.* 2002; 237: 119-128.
- Omer-Mizrahi M, Margel S. Synthesis and characterization of magnetic and non-magnetic core-shell polyepoxide micrometer-sized particles of narrow size distribution. *J. Colloid Interface Sci.* 2009; 329: 228-234.
- Önyüksel H, Mohantya PS, Rubinsteina I. VIP-grafted sterically stabilized phospholipid nanomicellar 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin: A novel targeted nanomedicine for breast cancer. *Int. J. Pharm.* 2009; 365: 157-161.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Pakunlu RI, Wang Y, Saad M, Khandare JJ, Starovoytov V, Minko T. In vitro and in vivo intracellular liposomal delivery of antisense oligonucleotides and anticancer drug. *J. Control. Release* 2006; 114: 153-162.
- Paliwal SK, Chauhan R, Sharma V, Majumdar DK, Paliwal S. Entrapment of ketorolac tromethamine in polymeric vehicle for controlled drug delivery. *Indian J. Pharm Sci.* 2009 ; 71: 687-691.
- Pan XQ, Lee RJ. In vivo antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal daunorubicin in a murine leukemia model. *Anticancer Res.* 2005; 25: 343-346.
- Pan J, Feng SS. Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs)- loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials* 2009; 30: 1176-1183.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Application of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2003; 36: R167-R181.
- Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting enables neuroprotection in brain ischemia following delayed intravenous administration of neurotrophins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002; 513: 397-430.
- Park EK, Kim SY, Lee SB, Lee YM. Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *J. Control. Release* 2005; 109: 158-168.
- Park JW, Kirpotin DB, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Papahadjopoulos D, Benz CC. Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced anticancer efficacy due to targeted delivery. *J. Control. Release* 2001; 74: 95-113.



- Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* 2002; 4: 95-99.
- Parulekar W, de Marsh RW, Wong R, Mendenhall W, Davey P, Zlotecki R, Berry S, Rout WR, Bjarnason GA. Phase I study of 5-fluorouracil and leucovorin by continuous infusion chronotherapy and pelvic radiotherapy in patients with locally advanced or recurrent rectal cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004; 58: 1487-1495.
- Patil YB, Toti US, Khair A, Ma L, Panyam J. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* 2009a; 30: 859-866.
- Patil Y, Sadhukha T, Ma L, Panyam J. Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. *J. Control. Release* 2009b; 136: 21-29.
- 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* 2013; 9: 119.
- Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrovskaya A. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother Oncol* 2013; 108(3): 378-87.
- Peppas NA. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv.* 1985; 60: 110-111.
- Pérez-Artacho B, Gallardo V, Ruiz MA, Arias JL. Maghemite/poly (D, L-lactide-co-glycolide) composite nanoplatfrom for therapeutic applications. *J. Nanopart. Res.* 2012; 14: 768.

- Petri-Fink A, Hofmann H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): from synthesis to in vivo studies--a summary of the synthesis, characterization, in vitro, and in vivo investigations of SPIONs with particular focus on surface and colloidal properties. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2007; 6: 289-297.
- Pileni MP. Nanosized particles made in colloidal assemblies. *Langmuir* 1997; 13: 3266-3276.
- Pileni MP. Magnetic fluids: Fabrication, magnetic properties, and organization of nanocrystals. *Adv. Funct. Mater* 2001; 11: 323-333.
- Pinkas J, Reichlova V, Zboril R, Moravec Z, Bezdicka P, Matejkova J. Sonochemical synthesis of amorphous nanoscopic iron(III) oxide from Fe(acac)<sub>3</sub>. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2008; 15: 257-264.
- Plaza RC, Arias JL, Espín M, Jiménez ML, Delgado AV. Aging effects in the electrokinetics of colloidal iron oxides. *J. Colloid Interface Sci*. 2002; 245: 86-90.
- Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Oncol*. 2004; 22: 529-536.
- Pouliquen D, Chouly C. Magnetic microcarriers for medical applications. En: *The MML series: Medical & biotechnology applications*. (Ed.: Arshady R). Vol. 2. Londres: Citus Books 1999; pp. 343-382.
- Pulkkinen M, Pikkarainen J, Wirth T, Tarvainen T, Haapa-aho V, Korhonen H, Seppälä J, Järvinen K. Three-step tumor targeting of paclitaxel using biotinylated PLA-PEG nanoparticles and avidin-biotin technology: formulation development and in vitro anticancer activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2008; 70: 66-74.

- Puntes VF, Krisnan KM, Alivisatos AP. Colloidal nanocrystal shape and size control: The case of cobalt. *Science* 2001; 291: 2115-2117.
- Purushotham S, Ramanujan RV. Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. *Acta Biomater.* 2009; 6: 502-510.
- Qi C, Chen Y, Huang JH, Jin QZ, Wang XG. Preparation and characterization of catalase-loaded solid lipid nanoparticles based on soybean phosphatidylcholine. *J. Sci. Food Agric.* 2012; 92: 787-793
- Qu X, Jin F, Hao Y, Zhu Z, Li H, Tang T, et al. Nonlinear association between magnesium intake and the risk of colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013; 25(3): 309-18.
- Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A, Raygoza-Trejo D, Doelker E. Relationship between the swelling process and the release of a water-soluble drug from a compressed swellable-soluble matrix of poly(vinyl alcohol). *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999; 25: 169-174.
- Radtke M, Souto EB, Müller RH. Nanostructured Lipid Carriers: A novel generation of Solid Lipid Drug Carriers. *Pharm. Tech. Eur.* 2005; 17: 45.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature.* 2002; 418: 934.
- Rapoport N, Christensen D, Fein HD, Barrows L, Gao Z. Ultrasound-triggered drug targeting to tumors in vitro and in vivo. *Ultrasonics* 2004; 42: 943-950.
- Rapoport N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* 2007; 32: 962-990.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Reddy LH. Drug delivery to tumors: Recent strategies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005; 57: 1231-1242.
- Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chem Rev.* 2012; 112: 5818-5878.
- Reddy GR, Bhojani MS, McConville P, Moody J, Moffat BA, Hall DE, Kim G, Koo YEL, Woolliscroft MJ, Sugai JV, Johnson TD, Philbert MA, Kopelman R, Rehemtulla A, Ross BD. Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 6677-6686.
- Regazzoni AE, Blesa MA, Maroto AJG. Interfacial properties of zirconium dioxide and magnetite in water. *J. Colloid Interf.* 1983; 91: 560.
- Richter GH. *Laboratory Manual of Elementary Organic Chemistry.* New York: John Wiley and Sons. 1951.
- Rivas J, Sánchez RD, Fondado A, Izco C, García-Bastida AJ, García-Otero J, Mira J, Baldomir D, González A, Lado I, López-Quintela MA, Oseroff SB. Structural and magnetic characterization of Co particles coated with Ag. *J. Appl. Phys.* 1994; 76: 6564-6566.
- Rockenberger J, Scher EC, Alivisatos AP. A new nonhydrolytic single-precursor approach to surfactant-capped nanocrystals of transition metal oxides. *J. Am. Chem. Soc.* 1999; 121: 11595-11596.
- Rosengart AJ, Kaminski MD, Chen H, Caviness PL, Ebner AD, Ritter JA. Magnetizable implants and functionalized magnetic carriers: A novel approach for noninvasive yet targeted drug delivery. *J. Magn. Mater.* 2005; 293: 633-638.

Rosenweig RE. Magnetic fluids. En: Ferrohydrodynamics. (Ed.: Rosenweig RE). New York: Dover Publications 1997; pp. 33-73.

Ruckmani K, Sivakumar M, Ganeshkumar PA. Methotrexate loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for effective treatment of carcinoma. J. Nanosci. Nanotechnol. 2006; 6: 2991-2995.

Russel WB, Saville DA, Schowalter WR. Electrostatics. En: Colloidal dispersions. (Eds.: Russel WB, Saville DA). Cambridge: University Press 1989; 88-128.

Sáez-Fernández E, Ruiz MA, López-Ruiz A, Arias JL. Review of the “state of the art” and possibilities of the most significant approaches to the specific delivery of chemotherapy agents to tumor cells. ARS Pharm. 2010; 51: 121-135.

Sahoo SK, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. Int. J. Cancer 2004; 112: 335-340.

Sahoo SK, Labhasetwar V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. Mol. Pharm. 2005; 2: 373-383.

Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. Clin Cancer Res. 2000; 6: 1322-1327.

Salonga y cols 2006 cap5

- 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.* 2005; 65: 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.* 2004; 304: 554.
- Sanders JP, Gallagher PK. Kinetic analysis of complex decomposition reactions using evolved gas analysis. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2009; 96: 805-811.
- Sapra, P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid Res.* 2003; 42: 439-462.
- Schiffelers RM, Storm G, Bakker-Woudenberg IAJM. Host factors influencing the preferential localization of sterically stabilized liposomes in *Klebsiella pneumoniae*-infected rat lung tissue. *Pharm. Res.* 2001; 18: 780-787.
- Schiffelers RM, Koning G.A, ten Hagen TL, Fens MH, Schraa AJ, Janssen AP, Kok RJ, Molema G, Storm G. Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *J. Control. Release* 2003; 91: 115-122.
- Schmidt H, Ram RJ. Coherent magnetization reversal of nanoparticles with crystal and shape anisotropy. *J. Appl. Phys.* 2001; 89: 507.
- Schröder A, Honen R, Turjeman K, Gabizon A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *J. Control. Release.* 2009; 137: 63-68.
- Schubert MA, Müller-Goymann CC. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 61: 77-86.

- Schultz-Sikma EA, Joshi HM, Ma Q, MacRenaris KW, Eckermann AL, Dravid VP, Meade TJ. Probing the Chemical Stability of Mixed Ferrites: Implications for Magnetic Resonance Contrast Agent Design. *Chem. Mater.* 2011; 23: 2657-2664.
- Schütt W, Grüttner C, Häfeli U, Zborowski M, Teller J, Putzar H, Schümichen C. Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy-possibilities and limitations: A mini-review. *Hybridoma.* 1997; 16: 109-117.
- Schwarz C, Mehnert W, Lucks JS, Müller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J. Control Release.* 1994; 30: 83-96.
- Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; 6: 44-55.
- Senyei A, Widder KJ, Czerlinski G. Magnetic guidance of drug-carrying microspheres. *J. Appl. Phys.* 1978; 49: 3578-3583.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993; 366:704-707.
- Shahgaldian P, Gualbert J, Aïssa K, Coleman AW. A study of the freeze-drying conditions of calixarene based solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003a; 55: 181-184.
- Shahgaldian P, Da Silva E, Coleman AW, Rather B, Zaworotko MJ. Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLNs): a detailed study of preparation and stability parameters. *Int. J. Pharm.* 2003b; 253: 23-38.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Sharma AK, Zhang L, Li S, Kelly DL, Alakhov VY, Batrakova EV, Kabanov AV. Prevention of MDR development in leukemia cells by micelle-forming polymeric surfactant. *J. Control. Release* 2008; 131: 220-227.
- Shen Z, Wei W, Zhao Y, Ma G, Dobashi T, Maki Y, Su Z, Wan J. Thermosensitive polymer-conjugated albumin nanospheres as thermal targeting anti-cancer drug carrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008; 35: 271-282.
- Shen Z, Zhan G, Ye D, Ren Y, Cheng L, Wu Z, et al. MicroRNA-34a affects the occurrence of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the antiapoptotic gene survivin. *Med Oncol* 2012; 29(4): 2473-80.
- Shenoy DB, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm.* 2005; 293: 261-270.
- Shidhaye SS, Vaidya R, Sutar S, Patwardhan A, Kadam VJ. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers--innovative generations of solid lipid carriers. *Curr. Drug. Deliv.* 2008; 5: 324-331.
- Shmeeda H, Mak L, Tzemach D, Astrahan P, Tarshish M, Gabizon A. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5: 818-824.
- Shubayev VI, Pisanic II TR, Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61: 467-477.
- Shum P, Kim JM, Thompson DH. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 53: 273-284.



- Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem Cells* 2012; 30(3): 372-8.
- Siekmann B, Westesen K. Sub-micron sized parenteral carrier systems based on solid lipid. *Pharma. Pharmacol. Lett.* 1992; 1: 123-126.
- Siekmann B, Westesen K. Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1996; 43: 104-109.
- Siepmann J, Lecomte F, Bodmeier R. Diffusion-controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles. *J. Control. Release.* 1999; 60: 379-389.
- Sikora K, Advani S, Korolchouk V, Magrath I, Levy L, Pinedo H, Schwartzman G, Tattersall M, Yan S. Essential drugs for cancer therapy: A World Health Organization consultation. *Ann. Oncol.* 1999; 10: 385-390.
- Silverstein R, Webster FX. Spectrometry identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons Inc. 1998.
- Simard P, Leroux JC. pH-sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells. *Int. J. Pharm.* 2009; 381: 86-96.
- Singh M, Atwal H, Micetich R. Transferrin directed delivery of adriamycin to human cells. *Anticancer Res.* 1998; 18: 1423-1427
- Sinha AK, Seelan S, Tsubota S, Haruta M. A three-dimensional mesoporous titanasilicate support for gold nanoparticles: vapor-phase epoxidation of propene with high conversion. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004; 43: 1546-1548.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Sjöström B, Bergenstahl B. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int. J. Pharm.* 1992; 88: 53-62.
- Sjöström B, Bergenstahl B, Kronberg B. A method for the preparation of submicron particles of sparingly water-soluble drugs by precipitation in oil-in-water emulsions. II: Influence of the emulsifier, the solvent, and the drug substance. *J. Pharm. Sci.* 1993; 82: 584-589.
- Skinner SA, Tutton PJ, O'Brien PE. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res.* 1990; 50: 2411-2417.
- Skitzki JJ, Repasky EA, Evans SS. Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009; 10: 550-558.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principios de análisis instrumental.* Madrid: Mc Graw Hill 2001.
- Somasundaram K, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Frontiers in Bioscience.* 2000; 5: 424-437.
- Souto EB, Mehnert W, Müller RH. Polymorphic behaviour of Compritol888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. *J. Microencapsul.* 2006; 23: 417-433.
- Speiser P. Lipid nano pellets as drug carriers for oral administration patent EP0167825A3.
- Steinkea F, Andräa W, Heidec R, Wernera C, Bellemann ME. Rotating magnetic microspheres as heating mechanism for remote controlled drug release. *J. Magn. Magn. Mater.* 2007; 311: 216-218.

- Stella B, Arpicco S, Peracchia MT, Desmaële D, Hoebeke J, Rendir M, d'Angelo J, Cattel L, Couvreur P. Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 2000; 89: 1452-1464.
- Stubbs M, McSheehy RMJ, Griffiths JR, Bashford L. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol. Med. Today* 2000; 6: 15-19.
- Sugimoto T, Matijević E. Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. *J Colloid Interface Sci.* 1980; 74: 227-243.
- Sullivan CO, Birkinshaw C. In vitro degradation of insulin-loaded poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles, *Biomaterials* 2004; 25: 4375-4382.
- Sun B, Ranganathan B, Feng SS. Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. *Biomaterials* 2008; 29: 475-486.
- Sun S, Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am Chem. Soc.* 2002; 124: 8204-8205.
- Sunderland CJ, Steiert M, Talmadge JE, Derfus AM, Barry SE. Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Develop. Res.* 2006; 67: 70-93.
- Suryanarayanan R. X-Ray Powder Diffractometry. En: *Physical characterization of pharmaceutical solids.* (Ed.: Brittain HG). New York: Marcel Dekker Inc. 1995; pp. 187-221.
- Suzuki S, Inoue K, Hongoh A, Hashimoto Y, Yamazoe Y. Modulation of doxorubicin resistance in a doxorubicin-resistant human leukaemia cell by an immunoliposome targeting transferrin receptor. *Br. J. Cancer* 1997; 76: 83-89.

- Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 3153-3162.
- Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J. Gastroenterol.* 2006; 41: 185-192.
- Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Kawamura T, Shimada S, Matsumoto K, Saida T, Honda H. Heat immunotherapy using magnetic nanoparticles and dendritic cells for T-lymphoma. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 100: 112-115.
- Taratula O, Garbuzenko OB, Kirkpatrick P, Pandya I, Savla R, Pozharov VP, He H, Minko T. Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery. *J. Control. Release* 2009; 140: 284-293.
- Tartaj P, González-Carreño T, Serna CJ. Single-step nanoengineering of silica coated maghemite hollow spheres with tunable magnetic properties. *Adv. Mater.* 2001; 13: 1620-1624.
- Tartaj P, González-Carreño T, Serna CJ. Synthesis of nanomagnets dispersed in colloidal silica cages with applications in chemical separation. *Langmuir* 2002; 18: 4556-4558.
- Tartaj P, Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T, Serna CJ. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D Appl. Phys.* 2003; 36: R182-R197.
- Tashjian JA, Dewhirst MW, Needham D, Viglianti BL. Rationale for and measurement of liposomal drug delivery with hyperthermia using non-invasive imaging techniques. *Int. J. Hyperthermia* 2008; 24: 79-90.

- Tietze R, Jurgons R, Lyer S, Schreiber E, Wiekhorst F, Eberbeck D, Richter H, Steinhoff U, Trahms L, Alexiou C. Quantification of drug-loaded magnetic nanoparticles in rabbit liver and tumor after in vivo administration. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009; 321: 1465-1468.
- Timms RE. Phase behavior of fats and their mixtures. *Prog. Lipid Res.* 1984; 23: 1–38.
- Tinat J, Baert-Desurmont S, Latouche JB, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, Frébourg T. The three nucleotide deletion within the 3'untranslated region of MLH1 resulting in gene expression reduction is not a causal alteration in Lynch syndrome. *Fam. Cancer.* 2008; 7: 339-340.
- Tishchenko G, Luetzow K, Schauer J, Albrecht W, Bleha M. Purification of polymer nanoparticles by diafiltration with polysulfone/hydrophilic polymer blend membranes. *Separation and purification technology.* 2001; 22: 403-415.
- Toneguzzo P, Viau G, Acher O, Fiévet-Vincent F, Fiévet F. Monodisperse ferromagnetic particles for microwave applications. *Adv. Mater* 1998; 10: 1032-1035.
- Toshima N, Lu P. Synthesis and catalysis of colloidal dispersions of Pd/Ni bimetallic clusters. *Chem. Lett.* 1996; 9: 729-730.
- Trasi NS, Byrn SR. Mechanically induced amorphization of drugs: a study of the thermal behavior of cryomilled compounds. *AAPS PharmSciTech.* 2012; 13: 772-784.
- Trotta M, Gallarate M, Carlotti ME, Morel S. Preparation of griseofulvin nanoparticles from water-dilutable microemulsions. *Int. J. Pharm.* 2003; 254: 235-242.
- Tsao J, Shibata D. Further evidence that one of the earliest alterations in colorectal carcinogenesis involves APC. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 531-534.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Ulbrich K, Šubr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1023-1050.
- Valeriotte F, Santelli G. 5-Fluorouracil (FUra). *Pharmacol. Ther.* 1984; 24:107-132.
- Van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 1986; 111: 378-390.
- Van Oss CJ. *Interfacial forces in aqueous media.* Boca Raton: CRC Press 2006.
- Van Verklen LE, Duan Z, Seiden MV, Amiji MM. Modulation of intracellular ceramide using polymeric nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 4843-4850.
- Van Worterghem J, Morup S, Charles S, Wells S, Villadsen J. Formation of metallic glass by thermal decomposition of Fe(CO)<sub>5</sub>. *Phys. Rev. Lett.* 1986; 55: 410-413.
- 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.* 1999; 116: 1453-1456.
- Vauthier C, Dubernet C, Chauvierre C, Brigger I, Couvreur P. Drug delivery to resistant tumors: The potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Control Release* 2003; 93: 151-160.
- Veiseh O, Kievit FM, Gunn JW, Ratner BD, Zhang M. A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells. *Biomaterials* 2009; 30: 649-657.

- Viau G, Fievet-Vincent F, Fiévet F. Monodisperse iron-based particles: Precipitation in liquid polyols. *J. Mater Chem.* 1996; 6: 1047-1053.
- Villar AV, Alonso A, Goni FM. Leaky vesicle fusion induced by phosphatidylinositol-specific phospholipase C: observation of mixing of vesicular inner monolayers. *Biochemistry* 2000; 39: 14012-14018.
- Viota JL, Durán JDG, González-Caballero F, Delgado AV. Magnetic properties of extremely bimodal magnetite suspensions. *J. Magn. Magn. Mater.* 2007; 314: 80-86.
- Vijaya Kumar R, Elgamiel R, Diamant Y, Gedanken A. Sonochemical Preparation and Characterization of Nanocrystalline Copper Oxide Embedded in Poly(vinyl alcohol) and Its Effect on Crystal Growth of Copper Oxide. *Langmuir.* 2001; 17: 1406-1410.
- Vippagunta SR, Maul KA, Tallavajhala S, Grant DJ. Solid-state characterization of nifedipine solid dispersions. *Int J Pharm.* 2002; 236: 111-123.
- 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.* 1988; 319: 525-532.
- Wagner E. Programmed drug delivery: Nanosystems for tumor targeting. *Expet. Opin. Biol. Ther.* 2007; 7: 587-593.
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2009; 9: 489-499.
- Wang Y, Deng Y, Mao S, Jin S, Wang J, Bi D. Characterization and body distribution of beta-elemene solid lipid nanoparticles (SLN). *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2005; 31: 769-778.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

- Wang Y, Zhu L, Dong Z, Xie S, Chen X, Lu M, Wang X, Li X, Zhou W. Preparation and stability study of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticle suspensions. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2012; 98: 105-111.
- Wang Y, Sharpless N, Chang S. p16INK4 a protects against dysfunctional telomere-induced ATR-dependent DNA damage responses. *J Clin Invest* 2013; 123(10): 4489-501.
- Westesen K, Siekmann B, Koch MHJ. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *Int. J. Pharm.*, 1993; 93: 189–199.
- Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J. Control. Release*. 1997; 48: 223–236.
- Weyhers H, Ehlers S, Mehnert W, Hahn H, Müller RH. Solid lipid nanoparticles-determination of an in vivo toxicity. *Proceedings of first world Meeting APGI/APV*. 1995: 489–490
- Williams DB, Carter CB. *Transmission Electron Microscopy*. Springer US. 2009.
- Willingham AT, Deveraux QL, Hampton GM, Aza-Blanc P. RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene*. 2004; 23: 8392-8400.
- Willis MC, Collins BD, Zhang T, Green LS, Sebesta DP, Bell C, Kellogg E, Gill SC, Magallanez A, Knauer S, Bendele RA, Gill PS, Janjić N. Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjug. Chem*. 1998 ; 9: 573-582.
- Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2004; 56: 1257-1272.



- Wong HL, Rauth AM, Bendayan R, Manias JL, Ramaswamy M, Liu Z, Erhan SZ, Wu XY. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharm Res.* 2006a; 23: 1574-1585.
- Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Xue HY, Babakhanian K, Wu XY. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006b; 317: 1372-1381.
- Wu J, Lu Y, Lee A, Pan X, Yang X, Zhao X, Lee R.J. Reversal of multidrug resistance by transferrin-conjugated liposomes coencapsulating doxorubicin and verapamil. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2007; 10: 350-357.
- Xu Z, Chen L, Gu W, Gao Y, Lin L, Zhang Z, Xi Y, Li Y. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. *Biomaterials.* 2009; 30: 226-232.
- 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.* 2012; 51: 8373-8377.
- Yassin AE, Anwer MK, Mowafy HA, El-Bagory IM, Bayomi MA, Alsarra IA. Optimization of 5-fluorouracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer. *Int. J. Med. Sci.* 2010; 7: 398-408.
- Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science.* 1978; 202: 1290-1293.

- Yellen BB, Forbes ZG, Halverson DS, Fridman G, Barbee KA, Chorny M, Levy R, Friedman G. Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005; 293: 647-654.
- Yong CS, Oh YK, Kim YI, Kim JO, Yoo BK, Rhee JD, Lee KC, Kim DD, Park YJ, Kim CK, Choi HG. Physicochemical characterization and in vivo evaluation of poloxamer-based solid suppository containing diclofenac sodium in rats. *Int. J. Pharm.* 2005; 301: 54-61.
- Yuan H, Miao J, Du YZ, You J, Hu FQ, Zeng S. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. *Int. J. Pharm.* 2008; 348: 137-145.
- Yuan H, Jiang SP, Du YZ, Miao J, Zhang XG, Hu FQ. Strategic approaches for improving entrapment of hydrophilic peptide drugs by lipid nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2009; 70: 248-253.
- Zara GP, Cavalli R, Bargoni A, Fundaro A, Vighetto D, Gasco MR. Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: Pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues. *J. Drug Target.* 2002; 10: 327-335.
- Závišová V, Koneracká M, Múčková M, Kopčanský P, Tomašovičová N, Lancz G, Timko M, Pätoprstá B, Bartoš P, Fabián M. Synthesis and characterization of polymeric nanospheres with the anticancer drug paclitaxel and magnetic particles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2009; 321: 1613-1616.

- Zhang ZY, Shum P, Yates M, Messersmith PB, Thompson DH. Formation of fibrinogen-based hydrogels using phototriggerable diplasmalogen liposomes. *Bioconj. Chem.* 2002; 13: 640-646.
- Zhang Y, Schlachetzki F, Pardridge WM. Global non-viral gene transfer to the primate brain following intravenous administration. *Mol. Ther.* 2003; 7: 11-18.
- Zhang J, Misra RDK. Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core-shell nanoparticle carrier and drug release response. *Acta Biomater.* 2007; 3: 838-850.
- Zhang CF, Jugold M, Woenne EC, Lammers T, Morgenstern B, Mueller MM, Zentgraf H, Bock M, Eisenhut M, Semmler W, Kiessling F. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res.* 2007; 67: 1555-1562.
- Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 2008; 13: 1551-1569.
- 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.* 2003; 63: 6357-6362.
- Zhu X, Kumar R, Mandal M, Sharma N, Sharma HW, Dhingra U, Sokoloski JA, Hsiao R, Narayanan R. Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 6091-6095.
- Zhu MQ, Wang LQ, Exarhos GJ, Li AD. Thermosensitive gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2004; 126: 2656-2657.

## Capítulo 8. Bibliografía

---

Zhu L, Huo Z, Wang L, Tong X, Xiao Y, Ni K. Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive magnetoliposomes. *Int. J. Pharm.* 2009; 370: 136-143.

Zimmermann E, Müller RH. Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001; 52: 203-10.

zur Mühlen A, zur Mühlen E, Niehus H, Mehnert W. Atomic force microscopy studies of solid lipid nanoparticles. *Pharm. Res.* 1996; 13: 1411-1416.

zur Mühlen A, Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery--drug release and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998; 45: 149-155.