



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO HEMORREOLÓGICO A DIFERENTES NIVELES DE
COLESTEROL UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
IMPRONTADAS CON DOXORRUBICINA EN RATAS WISTAR**

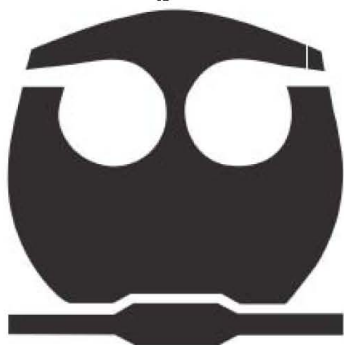
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

P R E S E N T A

YONNER ANTONIO CASILLAS BALDERAS



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Novelo Torres Alma Miriam
VOCAL: Medina Torres Luis (Asesor)
SECRETARIO: Aguilar Contreras Liliana
1° SUPLENTE: Lemus Barajas María Guadalupe
2° SUPLENTE: Noriega Navarro Roxana Isela.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Farmacia
Laboratorio 002, Edificio F, Facultad de Química, Universidad
Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Medina Torres

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. Pedro Javier Salas Ambrosio.

SUSTENTANTE:

Yonner Antonio Casillas Balderas.

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1.MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Reología.....	1
1.1.1 Régimen de viscoelasticidad lineal.....	3
1.1.2 Ecuaciones Constitutivas.....	5
1.1.3 Clasificación de los Fluidos.....	5
1.1.4 Modelo de Herschel- Bulkley y esfuerzo de cedencia (τ_0).....	7
1.1.5 Hemorreología.....	8
1.2 Sangre.....	9
1.3 Colesterol.....	10
1.4 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	11
1.5 Sistemas de liberación modificada.....	13
1.5.1 Mecanismos de liberación de fármacos.....	14
1.5.2 Sistemas particulado para liberación modificada.....	15
1.6 Nanopartículas de hierro.....	18
1.6.1 Superparamagnetismo (SP).....	19
1.6.2 Hipertermia.....	20
1.7 Caracterización de Nanopartículas.....	21
1.7.1 Potencial zeta.....	21
1.7.2 Tamaño de Partícula.....	23
1.8 Polímeros de impresión molecular.....	25
1.8.1 Polímeros de Impresión molecular como sistemas de liberación modificada...26	
1.9 Cáncer.....	27
1.9.1 Tratamientos contra el cáncer.....	29
1.10 Doxorrubicina.....	33
1.10.1 Propiedades fisicoquímicas.....	33
1.10.2 Mecanismo de acción.....	35
1.10.3 Farmacodinamia.....	36
1.10.4 Farmacocinética.....	37
1.10.5 Advertencias del uso de Doxorrubicina.....	37
1.10.6 Vía de administración.....	38
2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	38
2.1 Materiales para la síntesis de nanopartículas magnéticas.....	38

2.2	Materiales para el estudio hemorreológico.	38
2.3	Materiales para la caracterización de nanopartículas.	38
2.4	Materiales para la extracción de sangre con alto contenido de colesterol.	39
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	39
4	OBJETIVOS.	40
4.1	Objetivo general.	40
4.2	Objetivos particulares.	40
5	HIPÓTESIS.	41
6	MÉTODOS.	41
6.1	Síntesis de nanopartículas magnéticas de magnetita (NM).	41
6.2	Funcionalización de nanopartículas magnéticas con TEOS. (NMS)	41
6.3	Nanopartículas Magnéticas funcionalizadas con Tetraetil Orto Silicato sin doxorubicina como molécula molde. (NMSP)	42
6.4	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato recubiertas con acrilatos utilizando doxorubicina como molécula molde (NMSPD)	43
6.5	Tamaño de partícula y potencial zeta.	43
6.6	Espectroscopía infrarroja (IR)	44
6.7	Estudios de adsorción.	44
6.8	Dieta de Ratas.	44
6.9	Administración de quimioterapia.	45
6.10	Obtención de la sangre.	45
6.10.1	Determinación de contenido de colesterol.	45
6.10.2	Determinación del nivel de hematocrito.	46
6.11	Caracterización reológica.	46
7	RESULTADOS Y ANÁLISIS.	47
7.1	Nanopartículas Magnéticas (NM).	47
7.1.1	Caracterización de las NM.	47
7.2	Nanopartículas Magnéticas funcionalizadas con Tetraetil Orto Silicato (NMS).	49
7.2.1	Caracterización de las NMS.	49
7.3	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato recubiertas con acrilatos sin utilizar doxorubicina como molécula (NMSP).	52
7.3.1	Caracterización de las NMSP.	52
7.4	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato recubiertas con acrilatos utilizando doxorubicina como molécula molde (NMSPD)	55
7.4.1	Caracterización de las NMSPD.	55
7.5	Estudio de adsorción de NM, NMS, NMSP, NMSPD y ajuste de dosis.	59

7.6	Resultados de colesterol y peso de ratas antes de la administración de nanopartículas.....	62
7.7	Administración de nanopartículas y toma de muestra.....	64
7.8	Hematocrito.....	66
7.9	Reología.....	67
7.9.2	Esfuerzo de cedencia.....	68
7.9.3	Pruebas de flujo oscilatorio.....	70
7.10	Análisis Termogravimétrico (TGA).....	75
8	CONCLUSIONES.....	85
9	PERSPECTIVAS.....	86
10	REFERENCIAS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Movimiento de una partícula.	1
Figura 2. Curva maestra para los módulos de almacenamiento y de pérdida	4
Figura 3. Clasificación de Fluidos.....	5
Figura 4. Volumen fundamental de un fluido, sometido a algunas fuerzas.	9
Figura 5. Metabolismo básico del colesterol.....	11
Figura 6. Intersección de pH y potencial Zeta, punto isoeléctrico.....	22
Figura 7. Doble capa de Stern.....	23
Figura 8. Patrón moteado.....	24
Figura 9. Propagación de ondas de luz debido a partículas.....	25
Figura 10: Representación esquemática de la síntesis de un MIP.....	26
Figura 11. Pérdida del crecimiento normal celular en cáncer.....	28
Figura 12. Molécula de doxorubicina.....	34
Figura 13. Mecanismo de acción de Doxorubicina.....	36
Figura 14. Funcionalización con TEOS de las nanopartículas magnéticas	42
Figura 15. Síntesis de MIP en nanopartículas funcionalizadas con TEOS	42
Figura 16. Síntesis de MIP utilizando doxorubicina como molécula horma.....	43
Figura 17. Distribución de potencial Zeta para NM.....	48
Figura 18. Distribución del tamaño de partícula para NM.....	48
Figura 19. Espectro de Infrarrojo para NM.....	49
Figura 20. Distribución de potencial Zeta de NMS	50
Figura 21. Distribución de tamaño de partícula de NMS.....	50
Figura 22. Espectro de Infrarrojo para NMS.....	51
Figura 23. Distribución de potencial zeta para NMSP.....	53
Figura 24. Distribución del tamaño de partícula de NMSP.....	53
Figura 25. Espectro de Infrarrojo NMSP.....	54
Figura 26. Distribución del tamaño de partícula para NMSPD.....	56
Figura 27. Distribución de potencial Zeta para NMSPD.....	56
Figura 28. Espectro de infrarrojo para NMSPD.....	57
Figura 29. Toma de muestra en método de adsorción.....	59
Figura 30. Curva de calibración de doxorubicina	60
Figura 31. Disección de tejido conectivo.....	64
Figura 32. Comparativo de viscosidad	67

Figura 33. Evaluación del esfuerzo de cedencia (τ_0)	69
Figura 34. Prueba de cizalla oscilatoria muestra CONTROL.....	71
Figura 35. Prueba de cizalla oscilatoria en muestra de sangre con NM.....	72
Figura 36. Prueba de cizalla oscilatoria muestra NMS administradas.....	73
Figura 37. Prueba de cizalla oscilatoria NMSP.	74
Figura 38. Prueba de cizalla oscilatoria muestra con NMSPD.	75
Figura 39. Análisis térmico de sangre liofilizada con NMS.	76
Figura 40. Análisis térmico de una muestra de sangre liofilizada con NM.....	78
Figura 41. Análisis térmico de sangre liofilizada con NMSP.....	80
Figura 42. Análisis térmico de sangre liofilizada con NMSPD.	82
Figura 43. Termograma comparativo entre muestras.....	84

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Modelos de flujo.....	2
Tabla 2. Métodos de Análisis térmico más comunes	13
Tabla 3. Nomenclaturas utilizadas para designar nanopartículas.	16
Tabla 4. Productos fabricados a base de nanotecnología	17
Tabla 5. Bandas características del espectro IR para NM.....	49
Tabla 6. Bandas características del espectro IR para NMS	51
Tabla 7. Bandas características del espectro IR para NMSP.....	55
Tabla 8. Bandas características del espectro de IR para NMSPD.	58
Tabla 10. Adsorción máxima calculada.	61
Tabla 11. Peso corporal de cada rata	62
Tabla 12. Resultados de peso y colesterol total promedio.	63
Tabla 13. Mediciones de colesterol por muestra administrada.....	65
Tabla 14. Resultados de hematocrito	66
Tabla 15. Resultados de esfuerzo de cedencia.....	69
Tabla 15. Análisis de Termograma NMS	77
Tabla 16. Análisis de Termograma NM.	79
Tabla 17. Análisis de Termograma NMSP.....	81
Tabla 18. Análisis de Termograma NMSPD.....	83

ÍNDICE DE ECUACIONES.

Ecuación 1. Número de Deborah.	2
Ecuación 2. Módulo de almacenamiento (elástico).	3
Ecuación 3. Módulo de pérdida (viscoso).....	4
Ecuación 4. Modelo de Maxwell.	6
Ecuación 5. Modelo de Herschel-Bulkley.	7
Ecuación 6. Susceptibilidad magnética volumétrica.	19
Ecuación 7. Relación Stokes- Einstein.	23
Ecuación 8. Síntesis de ferrofluido a partir de Fe^{2+} y Fe^{3+}	41
Ecuación 9. Calculo de área superficial.....	61

NOMENCLATURA

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Armstrong	Å
Coefficiente de viscosidad dinámica	η
Differential Thermal Analysis/ Análisis Térmico Diferencial	DTA
<i>Dynamic Light Scattering</i> . Dispersión dinámica de luz	DLS
Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier por la técnica Reflectancia Total Atenuada	FTIR
Etilenglicol dimetacrilato	EGDMA
Gramos	g
Hidróxido de tetrametil amonio	TMAH
High density Lipoprotein/ Lipoproteína de alta densidad	HDL
Kilodalton	kDa
<i>Laser Doppler Velocimetry</i> . Velocimetría Láser Doppler	LDV
<i>Low density Lipoprotein</i> /Lipoproteína de baja densidad	LDL
<i>Magnetic Resonance Imaging</i> ./ Imagen por Resonancia Magnética	MRI
Microlitro	μL
Micrómetro	μm
Espectroscopía ultravioleta-visible	UV-vis
Microscopio electrónico	ME
Miligramos	mg
Mililitro	mL
Milivolts	mV
<i>Molecular imprinted polymers</i> . Polímeros de impresión molecular	MIP
Nanómetro	nm
Nanopartículas magnéticas	NPM
Nanopartículas magnéticas de magnetita	NM
Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato	NMS

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato recubiertas con acrilatos sin utilizar doxorubicina como molécula molde	NMSP
Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato recubiertas con acrilatos utilizando doxorubicina como molécula molde	NMSPD
Peso molecular crítico	PMc
Polímero no impreso molecularmente	NIP
Polivinilpirrolidona	PVP
<i>Poly (lactic-co-glycolic acid)</i> . Poli (ácido láctico-co-glicólico)	PLGA
Sistema de liberación de fármacos	SLF
Sistema Retículo Endotelial	SER
Superparamagnetismo	SP
Tetraetil ortosilicato	TEOS
Thermogravimetric analysis /Análisis termogravimétrico	TGA
Unidad de Soporte Analítico Interno	USAI
Very Low density Lipoprotein/Lipoproteína de muy baja densidad	VLDL
Vía intravenosa	I.V.

RESUMEN.

La sangre es un fluido biológico de estructura compleja, los componentes solubles más importantes son: colesterol, triglicéridos y proteínas; la concentración de estas sustancias modifica el comportamiento mecánico del flujo de la sangre. En este trabajo se evaluó el efecto en el comportamiento reológico que tiene el colesterol y un sistema nanoparticulado cuya función es ser un sistema de liberación modificada; en particular se utilizó doxorubicina como molécula a liberar en sangre de ratas Wistar. Al tiempo que se evaluaba a las ratas, se sintetizaron nanopartículas de magnetita, funcionalizadas con silicatos y recubiertas de un polímero de impresión molecular (MIP) utilizando como molécula molde doxorubicina. Se llevó a cabo la caracterización básica de dichas nanopartículas, se evaluó: el potencial Zeta, la distribución del tamaño de partícula y la caracterización por Infrarrojo con transformada de Fourier ¹. Se observó que los sistemas nanoparticulados tienden a la floculación (potencial Zeta dentro del rango ± 30 mV) cuando son suspendidos en solución fisiológica comercial. Además se determinó las distribuciones del tamaño de partícula de cada sistema con los siguientes resultados: NM = 305.4 nm, NMS = 141.1 nm, NMSP = 113.7 nm y NMSPD = 131.2 nm. Estos resultados entran en el intervalo de tamaño para que un vehículo nanométrico sea considerado como un potencial agente terapéutico.

Por otro lado, las nanopartículas se administraron en las ratas siguiendo las precauciones de una quimioterapia, y se monitorearon como tal. A las muestras obtenidas se les realizaron pruebas tanto bioquímicas como hemorreológicas. Se encontró mediante las pruebas oscilatorias de baja amplitud de deformación que el módulo viscoso predomina sobre el módulo elástico ($G'' > G'$) con un comportamiento pseudosólido, y en las pruebas de corte simple la sangre tiene un comportamiento adelgazante al flujo con esfuerzo de cedencia. Además, se realizó un estudio comparativo con un grupo de ratas alimentadas con altos contenidos de lípidos. Todas las ratas desarrollaron altos contenidos de colesterol en sangre. A cada rata se le administró un lote de nanopartículas diferente, y se hizo el comparativo. Los resultados obtenidos de las muestras de sangre con NMS, se destacaron de los otros sistemas, pues presentaron propiedades reológicas interesantes comportamiento pseudo sólido más marcado.

INTRODUCCIÓN.

Una partícula, en el ámbito de nanotecnología se define como un pequeño objeto que se comporta como una unidad definida por sus propiedades de transporte². Las propiedades de transporte de las nanopartículas dependen en alto grado de sus características de superficie. Precisamente, la cobertura particular de cada nanopartícula puede influir en aspectos como: estabilidad fisicoquímica, solubilidad y focalización. Al proceso de proveer de ciertas características a las nanopartículas se le llama funcionalización. En general lo que pretende la funcionalización es la modificación química de la superficie. Así pues, una de las técnicas más atractivas, por el alto grado de selectividad⁸⁸ que logra, entre otras propiedades son los materiales molecularmente impresos, los cuales consisten en preparar un polímero con sitios de selección específicos hacia una molécula de interés, por ejemplo, un fármaco. Esto se logra primero preparando la matriz de polimerización, posteriormente se permite que la molécula molde haga interacciones en la solución con la matriz polimérica, después la polimerización se completa con la molécula molde dentro, para finalizar la molécula molde es removida con un solvente adecuado³. Se ha comprobado que una de las moléculas capaces de ser hormada y en algunos estudios encapsulada con éxito bajo la técnica de impresión molecular es la Doxorrubicina^{4, 5,89}.

La Doxorrubicina es un fármaco utilizado para tratamiento del cáncer, principalmente como antineoplásico, como único agente quimioterapéutico o parte de una mezcla.⁶ Es un antibiótico de la familia de las antraciclinas y su mecanismo de acción es básicamente ser un intercalante de ADN.

En cualquier quimioterapia existe una serie de reglas empíricas que se deben de observar para tener éxito en este proceso: elegir el momento para iniciar la quimioterapia, utilizar dosis adecuadas, respetar ritmos de administración así como la vía de administración además del protocolo seleccionado. Si estas simples reglas no se siguen se pueden tener complicaciones como causar necrosis o irritación en la zona administrada incluso hasta la muerte del paciente o sujeto de experimentación⁷.

Además, existe una variedad amplia de técnicas para caracterizar las nanopartículas que se han sintetizado, todo depende de la propiedad que se quiera conocer, además del diseño. En este trabajo, se han utilizado las técnicas: Potencial Zeta, espectroscopía infrarroja, tamaño de partícula y un ensayo de desorción para

evaluar la cantidad de ligando unido al polímero de impresión y de ésta manera, calcular posteriormente la dosis que se debe aplicar a cada una de las ratas por lote de nanopartícula.

La forma farmacéutica que se busca en este trabajo es una suspensión inyectable de nanopartículas magnéticas entre otros motivos para disminuir la toxicidad, aumentar la eliminación además de que Doxorubicina es un fármaco intravenoso estricto⁹⁰. Es importante considerar los factores fisicoquímicos que modifiquen su estabilidad, lo que se desea primordialmente en esta forma farmacéutica es que tenga características organolépticas adecuadas sea uniforme y que fluya con facilidad. En este sentido unos de los indicadores primordiales de la estabilidad son el potencial Zeta y de su flujo, la reología. El potencial Zeta es en términos generales un valor al equilibrio que nos indica cual es la contribución tanto de fuerzas electroestáticas de repulsión como de atracción⁸. En general, se considera un potencial zeta aceptable entre: $\pm 40 - \pm 60$ mV²⁷.

Existen varias técnicas para evaluar la respuesta reológica. Lo más común es simplemente aplicar una fuerza constante y medir cual es la respuesta mecánica al flujo con la que el fluido responde, a este tipo de técnicas de manera general se le llaman reométricas⁹.

Se sabe que las condiciones de flujo de la sangre dependen de factores como: viscosidad sanguínea y viscosidad plasmática, además de los factores celulares como el hematocrito o contenido de eritrocitos por cada 100 mL. En este trabajo se pretende evaluar la contribución que tiene sobre el flujo de sangre no sólo los factores antes mencionados sino también un sistema de liberación nanoparticulado en sangre con alto contenido de colesterol en ratas Wistar¹⁰. La hipótesis preliminar de este estudio es que las nanopartículas magnéticas en la sangre tendrán un comportamiento reológico diferente al de la sangre sin nanopartículas, y se observarán posibles interacciones físicas entre los grupos funcionales de la sangre, colesterol y nanopartículas, y a partir de éstos poder explicar dicha respuesta macroscópica.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1 Reología.

La reología se define como la ciencia que estudia la deformación y flujo. En principio esta definición incluye la dinámica de fluidos, hidráulica, aeronáutica e incluso la mecánica del estado sólido. Sin embargo, la reología tiende a enfocarse en los materiales que presentan un comportamiento entre líquido y sólido. Esta ciencia comenzó en la década de 1920 cuando los polímeros empezaron a producirse a gran escala (por ejemplo pinturas acrílicas y vinílicas)⁹.

La reología es una ciencia aplicada, con dos enfoques principales:

1. La reología trata de comprender las propiedades y relación estructura-función. Esto es muy importante en el diseño y formulación de materiales en ciertas aplicaciones.
2. El estudio del comportamiento de materiales utilizando deformación simple, esto derivará en relaciones fundamentales deformación-fuerza. Estas relaciones se expresan en ecuaciones constitutivas, que pueden utilizarse después para predecir el comportamiento de materiales con deformación compleja y luego trasladarlos a procesos y operaciones, por ejemplo: extrusión, formación de películas poliméricas, recubrimiento polimérico, etc.⁹

Hay dos tipos básicos de flujo (Figura 1) relativos al movimiento de las partículas adyacentes, estos son flujo al corte y flujo extensional. En el flujo al corte los elementos del líquido fluyen deslizándose unos sobre otro, mientras que en flujo extensional, los elementos adyacentes fluyen fuera uno de otro⁹.

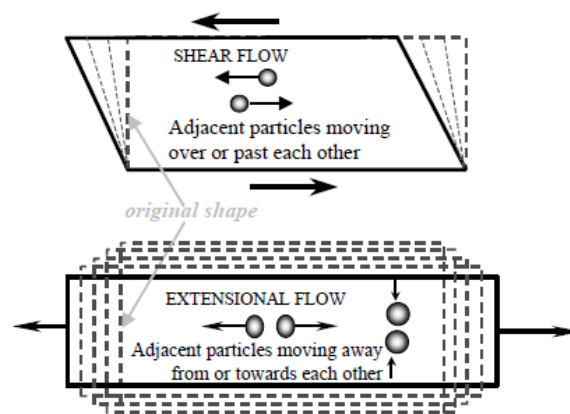


Figura 1. Movimiento de una partícula que esquematiza movimiento de corte y extensional⁹.

Un parámetro utilizado para clasificar las sustancias de acuerdo a su comportamiento elástico/viscoso/viscoelástico es el número de Deborah, parámetro introducido por el Dr. Reiner, uno de los fundadores de la reología. Éste número se define en la ecuación 1:

$$De = \frac{\lambda}{t}$$

Ecuación 1. Número de Deborah.

Donde, t es un tiempo característico del proceso de deformación al que se ve sometido una determinada sustancia y λ es un tiempo de relajación característico de dicha sustancia; el tiempo de relajación es infinito para un sólido de Hooke y cero para un fluido Newtoniano. Si el número de Deborah es muy pequeño ($De \rightarrow 0$) el material se comportará como un fluido porque la escala de observación es lo suficientemente amplia para examinar. En el otro extremo del intervalo, si el número de Deborah es muy grande ($De \rightarrow \infty$) el tiempo de observación se reduce al mínimo sin posibilidad de percibir algún cambio y el material tendrá el comportamiento de un sólido.

En reología hay muchos modelos que son aplicables a diversos tipos de fluidos, cada uno describe un comportamiento particular y es expresado con una ecuación en función de la respuesta mecánica y la deformación aplicada. En la tabla 1 se muestran algunos de los más utilizados. Dónde: τ , es el esfuerzo cortante (Pa), η es la viscosidad aparente (Pa*s), $\dot{\gamma}$ es la rapidez de corte (s^{-1}), k constante de viscosidad (m^2s^{-2}).

Tabla 1. Modelos de flujo.

Modelo	Expresión
Newtoniano	$\tau = \eta\dot{\gamma}$
Ley de la potencia	$\tau = K\dot{\gamma}^n$
Bingham	$\tau = \eta\dot{\gamma} + \tau_0$
Cross	$\eta = \eta_0 + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + K_1\dot{\gamma}^n}$

1.1.1 Régimen de viscoelasticidad lineal.

Este concepto hace referencia a la zona en la cual la deformación aplicada a un material es lo suficientemente pequeña para no modificar el estado de equilibrio, donde las propiedades reológicas sean independientes de la magnitud del esfuerzo aplicado y la relación entre esfuerzo-deformación y tiempo puedan ser descritas mediante ecuaciones constitutivas.

Los fluidos viscoelásticos entonces, son aquellos en los que se presenta la coexistencia de un comportamiento elástico y viscoso, esta propiedad es característica de fluidos compuestos por grandes cadenas o estructuras. La respuesta dinámica de estos materiales se emplea para elucidar los aspectos estructurales de un sistema a una escala macroscópica. El comportamiento viscoelástico es inherente a todas las dispersiones de biopolímeros, sistemas multifase y estructuras de tejidos biológicos. Muchos de los fluidos biológicos poseen esta naturaleza. El comportamiento viscoelástico es particularmente relevante en situaciones de movimiento inconstante, esto es, cuando los esfuerzos o deformaciones están cambiando con el tiempo. Por lo que la respuesta dinámica de los materiales viscoelásticos puede ser utilizada para obtener información de aspectos estructurales de un sistema a nivel molecular o predecir el comportamiento a una escala macroscópica¹¹.

Uno de los modelos que describe el comportamiento viscoelástico es el de *Maxwell*. A partir de este modelo se pueden obtener funciones que representen los módulos de almacenamiento y disipación (G' y G''), como se muestra en las ecuaciones 1.1.1 y 1.1.2: Donde: G = Módulo de rigidez, G' = Módulo de almacenamiento G'' = Módulo de pérdida, η_0 = Viscosidad a bajas velocidades de cizalla simple, λ = tiempo de relajación de esfuerzos, w = Frecuencia de oscilación.

$$G' = \eta_0 \frac{\lambda w^2}{1 + (\lambda w)^2} = G \frac{(\lambda w)^2}{1 + (\lambda w)^2}$$

Ecuación 2. Módulo de almacenamiento (elástico).

$$G'' = \eta_0 \frac{\omega}{1 + (\lambda\omega)^2} = G \frac{\lambda\omega}{1 + (\lambda\omega)^2}$$

Ecuación 3. Módulo de pérdida (viscoso)

En la viscoelasticidad lineal las funciones materiales: los módulos de almacenamiento G' y de pérdida G'' indican la cantidad de energía que se almacena en el material en cada ciclo de deformación y el último, es un indicativo de la cantidad de energía disipada durante cada ciclo de deformación. De esta manera, para un sólido perfectamente elástico, donde toda la energía se almacena y se recupera en cada ciclo, G' tendrá un valor de cero tanto el esfuerzo y la deformación estarán en fase ($\delta=0$); contrariamente, para un líquido perfectamente viscoso, donde toda la energía se disipa en forma de calor, G'' tendrá un valor de cero y el esfuerzo y la deformación estarán desfasados 90° . Por lo tanto, para un material viscoelástico donde tanto la componente elástica como la viscosa están presentes, el ángulo de desfase (δ) tendrá un valor intermedio entre 0° y 90° ¹¹.

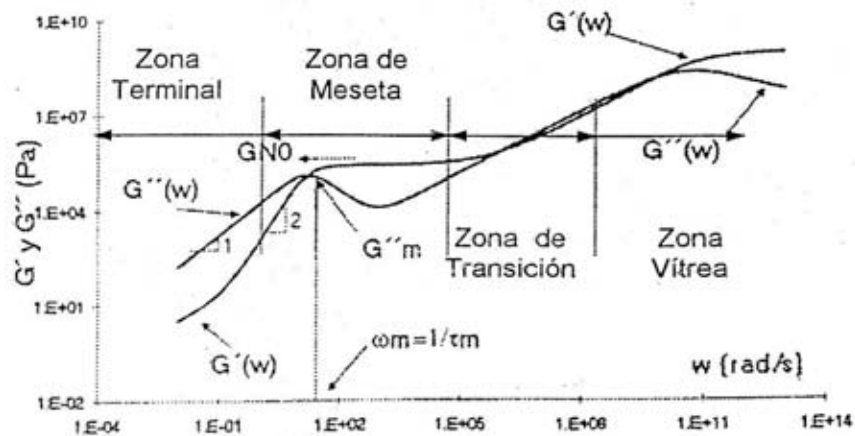


Figura 2. Curva maestra para los módulos de almacenamiento y de pérdida en el dominio de la frecuencia¹¹.

Para la mayoría de los materiales biológicos con pesos moleculares altos (por encima del peso molecular crítico PM_c , el cual se define como el peso molecular en donde se empiezan a observar interacciones entre cadenas) se han identificado cuatro zonas viscoelásticas: vítrea, transición, meseta o plástica, y terminal o de flujo (Figura 2) donde, la zona terminal está representada a bajas frecuencias y tiene como características generales pendientes de 1 para G'' y 2 para G' en escala logarítmica: la zona de terminal sigue a la zona de meseta y empieza por un máximo en G' (ω) denominado $G'_{m\acute{a}x.}$, y se presenta en una frecuencia ω_m , luego G'' pasa

por un mínimo para volver a aumentar, en esta zona G' permanece relativamente constante y se denomina como módulo de meseta (G_n^0); en la zona de transición G'' vuelve a ser mayor que G' , y por último, en el inicio de la zona vítrea vuelven a cruzarse G' y G'' , siendo G'' menor que G' , la cual se vuelve casi constante .

1.1.2 Ecuaciones Constitutivas.

Son aquellas que relacionan tensión y deformación y en las que pueden intervenir otros parámetros como temperatura, velocidad de deformación, deformaciones plásticas acumuladas, variables de endurecimiento y cualquier otra propiedad mecánica relacionada y con el material analizado.

1.1.3 Clasificación de los Fluidos.

El coeficiente de viscosidad dinámica η de un líquido Newtoniano es independiente de la tasa de corte. Muchos líquidos presentan un comportamiento viscoso que se aparta del descrito para los fluidos Newtonianos y se denominan en conjunto no Newtonianos, son aquellos en que el valor de η varía de manera más o menos compleja con la tasa de corte y o con el tiempo, como se muestra en la Figura 3:

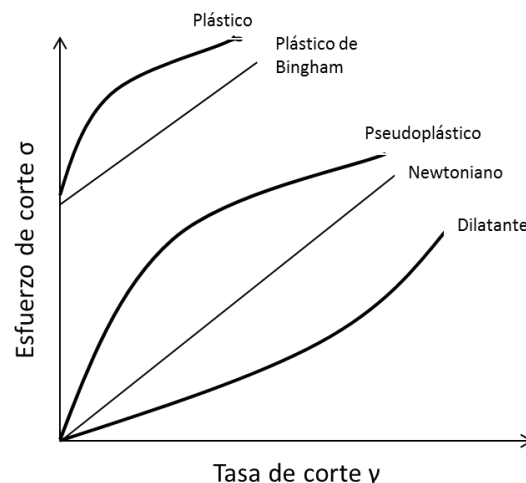


Figura 3. Clasificación de Fluidos.

Es decir, se denomina plástico al líquido que requiere un cierto esfuerzo mínimo antes de comenzar a fluir, es decir, que $\dot{\gamma}$ es cero por debajo de ese valor umbral. Un plástico de Bingham muestra asimismo un esfuerzo de corte umbral, pero una vez que comienza a fluir $\dot{\gamma}$ aumenta linealmente con σ , como lo haría un líquido newtoniano. Un líquido pseudo-plástico carece de un valor umbral de σ , al igual que

un líquido newtoniano, pero su coeficiente de viscosidad aumenta con la tasa de corte. Un líquido dilatante también carece de valor umbral de σ , pero a la inversa del caso anterior, η crece a medida que aumenta σ .

El comportamiento que tienen los fluidos no Newtonianos con respecto al tiempo cuando son sometidos a una tasa de corte constante se denomina: reopéctico a un líquido cuya viscosidad aumenta con el tiempo cuando es sometido a una tasa de corte constante y tixotrópico al líquido cuya viscosidad aparente disminuye con el tiempo al ser sometido a una tasa de corte constante.

Otra clasificación de los fluidos son los fluidos viscoelásticos, estos se clasifican por poseer en mayor o menor grado características elásticas y viscosas simultáneamente, cualquier fluido biológico tiene este comportamiento. La ecuación matemática que relaciona las propiedades de este tipo de fluidos es la ecuación de *Maxwell*, ecuación 4:

$$\dot{\tau} + \tau / \lambda = m \dot{\gamma}$$

Ecuación 4. Modelo de Maxwell.

Para la ecuación de Maxwell, τ es el esfuerzo cortante aplicado al fluido, λ es el tiempo de relajación, $\dot{\tau}$ es el gradiente del esfuerzo cortante, m se refiere a la viscosidad del fluido y $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación.

Los fluidos viscoelásticos se deforman instantáneamente por acción de una fuerza. En el momento inicial el material en cuestión fluye regido por un modelo reológico, de modo que la tensión se relaja al momento de que el material llegue a un estado de equilibrio, cuando el tiempo tiende a infinito, la tensión se ha relajado totalmente, si se retira la tensión en cualquier momento antes de la relajación, el material recuperará sus condiciones estructurales iniciales.

En particular el modelo de la ley de la Potencia, expresada como $\tau = K\dot{\gamma}^{\eta-1}$ clasifica a los fluidos Newtonianos donde la viscosidad η es constante ($\eta = 1$). Y para los fluidos no Newtonianos se tiene que cuando $\eta < 1$, se dice que el fluido es adelgazante al corte, es decir, que la viscosidad va disminuyendo conforme la rapidez de corte aumenta. Finalmente si $\eta > 1$, se dice que el fluido es espesante al corte.

1.1.4 Modelo de Herschel- Bulkley y esfuerzo de cedencia (τ_0).

Es un modelo general para un fluido no Newtoniano, en el cual el corte que experimenta el fluido en cuestión, está relacionado con la fuerza en una relación compleja no lineal. Los tres parámetros que utiliza este modelo para la caracterización del fluido son: consistencia K , índice de flujo n y el esfuerzo de cedencia τ_0 . La consistencia es simplemente una constante de proporcionalidad, mientras que el índice de flujo mide el grado en que el fluido es adelgazante al corte, finalmente el esfuerzo de cedencia. Este modelo para fluidos no Newtonianos fue introducido por *Winslow Herschel* y *Ronald Bulkley* en 1926. En su forma general dicho modelo está expresado en la ecuación 5. Donde: τ = Fuerza de corte (Pa), $\dot{\gamma}$ = Velocidad de corte (1/s), τ_0 = Esfuerzo de cedencia (Pa), K y n : constantes que dependen del material.

$$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$$

Ecuación 5. Modelo de Herschel-Bulkley.

En una suspensión sólido-líquido existe una fuerte interacción interparticular que a veces exhibe características de flujo plástico y la presencia de un esfuerzo de cedencia. Las partículas suspendidas pueden formar estructuras más sólidas cuando sucede la floculación, que interactúan unas con otras y que forman una red tridimensional que se extiende en todos los confines del fluido en cuestión. Así, el esfuerzo de cedencia mide la fuerza de dicha estructura coherente. Los sistemas sólido-líquido se deforman elásticamente con una deformación finita cuando se aplica una fuerza mínima y de esta manera el material comienza a fluir, como un fluido viscoso cuando la fuerza excede T_0 . El esfuerzo de cedencia es así considerado como una propiedad de los materiales que representa la transición entre las propiedades sólido-líquido, líquido-sólido.

El esfuerzo de cedencia es definido entonces como la fuerza de corte mínima para iniciar el flujo. La cedencia tiene implicaciones industriales en por ejemplo, procesos de diseño y calidad para materiales relacionados con alimentos. El esfuerzo de cedencia ha sido fuertemente asociado con la aceptación de cierto producto por los clientes así como la retención de dicho producto y consumo continuo. Un esfuerzo de cedencia excesivo puede resultar en un innecesario consumo de fuerza para

sacar de su envase por ejemplo, un dentífrico o salsa cátsup, además de que los gastos en operación se elevan más durante su producción.

1.1.5 Hemorreología.

Cuando se analiza el flujo de la sangre, resulta interesante estudiar cómo ésta responde a las fuerzas de corte, fuerzas tangenciales. El procedimiento general para predecir la mecánica de un fluido en respuesta a diferentes fuerzas abarca tres pasos básicos: ¹²

1. Considerar todas las fuerzas involucradas en un volumen infinitesimal y pequeño del fluido en cuestión.
2. Introducir las ecuaciones constitutivas reológicas que son específicas para el fluido a analizar. Estas ecuaciones indican como el fluido responde a las fuerzas y a su vez como se relacionan a los gradientes de velocidad. Las ecuaciones reológicas reflejan las características específicas del fluido, por ejemplo, viscosidad aparente como función de la velocidad de corte.
3. Substituir las ecuaciones reológicas en ecuaciones de momento y la integración de la diferencial resultante para obtener relaciones macroscópicas como las que hay entre la velocidad de flujo y el gradiente de presión.

Debido a que las ecuaciones reológicas para la respuesta específica de cierto fluido implican velocidades de fluido, se debe de definir un sistema coordenado con el objetivo de hacer posible la medición de distancias y velocidades.

Existen tres tipos básicos de sistemas coordenados que son útiles para varios tipos de fluidos son:

1. Sistema rectangular.
2. Sistema cilíndrico.
3. Sistema esférico.

La decisión del uso de alguno de los sistemas coordenados depende directamente en cuál es el límite en la forma de flujo y la dirección de los componentes de velocidad diferentes de cero. Así, para un flujo laminar estable entre platos paralelos donde solamente la componente de velocidad es diferente de cero, se debe usar el sistema rectangular; para un flujo en geometría de tubos concéntricos, se debe usar el sistema coordenado cilíndrico, mientras que para una geometría de cono-plato se usa el sistema esférico. Después de seleccionar un sistema coordenado correcto, el procedimiento anteriormente descrito se lleva a cabo.

Para obtener la relación fuerza-respuesta, primero se considera un volumen infinitamente pequeño del fluido, cuya forma ha sido definida por el sistema coordenado y donde todas las caras deben ser perpendiculares a las direcciones de cada coordenada. En el sistema coordenado rectangular dicho volumen debe ser un cubo o paralelepípedo cuyas orillas están orientadas paralelamente a los ejes coordenados y los cuales tienen longitud δ_x en la dirección x , δ_y y δ_z en las direcciones y e z respectivamente. La fuerza representada por el vector que actúa en la cara frontal se muestra descompuesta en sus tres componentes F_x , F_y y F_z . Véase Figura 4.

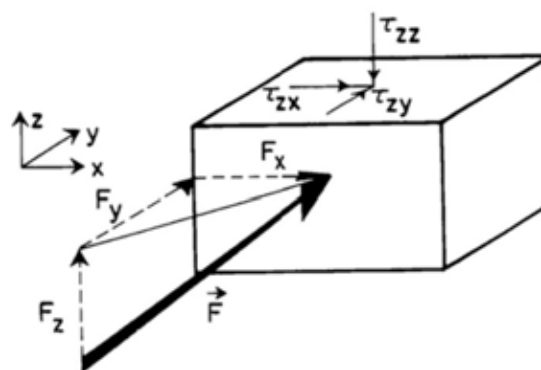


Figura 4. Volumen fundamental de un fluido, sometido a algunas fuerzas.

1.2 Sangre.

La sangre es una suspensión de células dentro de un líquido. Mientras fluye, suministra nutrientes a todas las partes del cuerpo. Para un mejor entendimiento, los investigadores pueden ser más certeros en cuanto al modelado de este líquido dentro del cuerpo humano si se considera a este como una disolución en su mayoría hecha de agua que transporta células rojas y blancas, plaquetas, sales, proteínas y lípidos. Para después utilizar estos datos y así desarrollar sustitutos artificiales ¹³.

Mediante centrifugación, la sangre es separada en plasma y células. El 90% en masa del plasma es agua, 7% proteínas plasmáticas, 1% sustancias inorgánicas y el 2% restante sustancias orgánicas. Esencialmente, el contenido celular son eritrocitos o células rojas, con células blancas de varias categorías siendo solamente 1/600 del volumen celular, las plaquetas son menos de 1/800 del volumen celular. Normalmente, los eritrocitos ocupan el 50% del volumen sanguíneo son pequeñas y hay alrededor de 5 millones/mm³. El conteo de células blancas normal está

considerado entre 5000-8000/mm³ y las plaquetas entre 250 000 –300 000/mm³. Los eritrocitos humanos tienen la forma de un disco con un diámetro de 7.6 μm y 2.6 μm de grosor. Las células blancas son más redondeadas y hay muchos tipos. Las plaquetas son mucho más pequeñas y tienen un diámetro de 2.5 μm.

La viscosidad de la sangre varía con respecto al hematocrito, *H* o *Htc*, el porcentaje del volumen total de sangre ocupado por las células varía también con la temperatura. Además, estudios más recientes como el de Moreno *et.al*,¹³ demuestran que las propiedades reológicas de la sangre se ven modificadas por el contenido de colesterol, triglicéridos y carbohidratos.

Se puede dejar el estudio de muchas de estas importantes propiedades de la sangre a hematólogos, bioquímicos y químicos patólogos. Para la biomecánica la información más importante que se necesita es una ecuación constitutiva¹⁴.

1.3 Colesterol.

El colesterol es requerido para construir y mantener las membranas celulares, proporciona a la membrana propiedades de fluidez (cierto grado de viscosidad); es estable en un amplio intervalo de temperaturas. Y es fundamental en la formación de la bilis (la cual ayuda a la digestión de grasas); es también, especialmente importante para el metabolismo de las vitaminas solubles en grasa incluyendo vitaminas A, D, E y K, además de ser el mayor precursor en la síntesis de vitamina D y de hormonas esteroideas humanas.

El colesterol es casi insoluble en agua, por lo que no puede viajar a través del torrente sanguíneo cuya base es agua. En vez de eso es transportado mediante lipoproteínas, coberturas moleculares que son solubles en agua y acarrean el colesterol y los triglicéridos. En su superficie existen apolipoproteínas que determinan de qué células se tiene que remover el colesterol y a dónde tiene que ser suministrado.

Las lipoproteínas más grandes, donde primeramente son transportados lípidos de la mucosa intestinal hacia el hígado, son llamados quilomicrones. En el hígado los quilomicrones depositan la mayoría del colesterol además de los triglicéridos. Después, son convertidos en lipoproteínas de baja densidad o LDL por sus siglas en inglés, las cuales se encargan de transportar triglicéridos y colesterol hacia otras células (colesterol malo).

Por otro lado, las lipoproteínas de alta densidad o HDL transportan el colesterol de vuelta al hígado (colesterol bueno), pero varía mucho la efectividad al llevar a cabo dicha tarea.

Cuando existen condiciones de elevada concentración de LDL oxidado, se promueve una condición llamada ateroma en las paredes de las arterias, entonces se desarrolla aterosclerosis, principal causa de enfermedad cardiovascular y otras formas de enfermedades cardiovasculares. En contraste, el HDL ha sido identificado como el único mecanismo por el cual el colesterol puede ser removido. Se sabe que concentraciones altas de HDL se correlacionan con bajos índices de progresión de ateroma y aún hasta la regresión de dicha condición¹⁴. En la figura 4 se muestra un esquema del metabolismo básico del colesterol donde: HDL: *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidad), LDL: *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de baja densidad), VLDL: *Very Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de muy baja densidad)¹⁵.

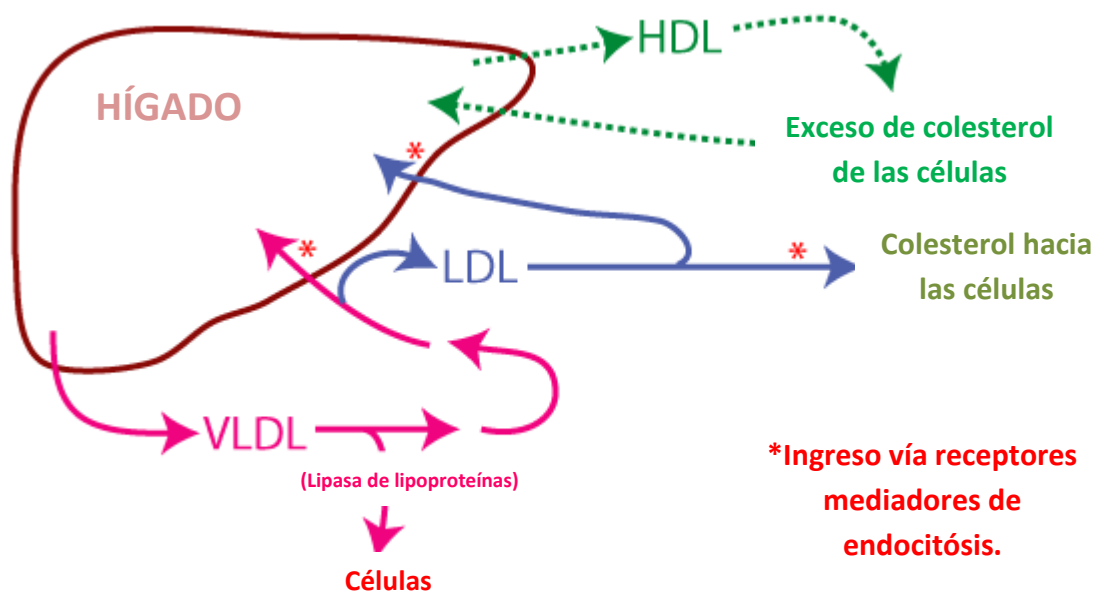


Figura 5. Metabolismo básico del colesterol.

1.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica donde la masa de un material es estimada en función de la temperatura o el tiempo, mientras que la muestra es sometida a un programa de temperatura controlado, bajo una atmósfera controlada. El resultado gráfico obtenido se denomina curva de análisis térmico.

Se pueden distinguir tres tipos básicos de análisis:

- TGA isotérmico: Se mantiene la temperatura constante registrando los cambios de peso.
- TGA *cuasi* isotérmico: La muestra a analizar se calienta mientras el peso es constante y se estabiliza la temperatura mientras se van produciendo los cambios de peso.
- TGA dinámico: La muestra se calienta en una atmósfera controlada con una rampa de temperatura establecida.

Los rangos de temperatura de los aparatos comerciales van desde la temperatura ambiente 25°C hasta 1000°C o más en algunas aplicaciones más especializadas. Un analizador TG consiste principalmente en un platillo o crisol, también conocido como portamuestras, donde la muestra se coloca. Este portamuestras se encuentra en contacto o próximo a un sensor que detecta la temperatura y sus variaciones durante el experimento, asimismo, consta de una balanza de precisión (termobalanza) que permite la medida continua del peso de la muestra en función de la temperatura o tiempo. El portamuestras yace en un horno que se calienta o se enfría durante el proceso. El gas de purga que fluye a través de la termobalanza crea una atmósfera que puede ser inerte, como N₂, Ar u He, oxidante como O₂ o bien reductora como la mezcla de gases 8-10% H₂ en N₂, las atmósferas reductoras son rara vez requeridas. De igual forma, el contenido de humedad en el gas puede variar entre seco o saturado¹⁵.

El trazo de la primera derivada con respecto al tiempo o la temperatura corresponde a una técnica conocida como “termogravimetría derivada (DTG)”, la curva térmica resultante se debe a la variación de la pérdida de masa contra la temperatura. La curva DTG representa el resultado del mismo experimento que la curva TG (variación del peso frente a la temperatura o el tiempo), pero de forma diferente. Una curva TG de un compuesto puro puede considerarse como característica del compuesto, debido a la secuencia de procesos fisicoquímicos que experimenta en determinadas condiciones en un intervalo de temperaturas. Si se representa el porcentaje de peso en función de la temperatura, se pueden relacionar las variaciones de peso con las estequiometrías de las reacciones, lo cual conduce directamente al análisis cuantitativo de muestras cuya composición cualitativa se desconoce. La mayoría de los autores están de acuerdo en reconocer que el uso de

las curvas DTG en lugar de las TG es mejor, puesto que un pequeño cambio en la curva de TG se ve mejor definido en la DTG ¹⁵.

El campo actual del análisis térmico es muy diverso y altamente dinámico. Teóricamente casi cualquier sustancia ya sea sólida, semisólida o líquida puede ser analizada y caracterizada con alguna de las técnicas de análisis térmico. Esta amplia lista incluye materiales muy comunes como son: alimentos, fármacos, materiales electrónicos, polímeros, cerámicos, compuestos orgánicos e inorgánicos aún organismos biológicos y sus productos. Aunque hay disponibles muchas técnicas, la diferencia principal radica en que cada técnica es capaz de medir una propiedad en específico. A continuación en la tabla 2 se muestran las técnicas más comunes y las propiedades que miden ¹⁶.

Tabla 2. Métodos de Análisis térmico más comunes y las propiedades que miden ¹⁵.

Método	Abreviación	Propiedad medida.
Análisis Térmico Diferencial	DTA	Diferencia de temperatura
Calorimetría Diferencial de Barrido	DSC	Entalpía
Análisis Termogravimétrico	TGA	Masa
Análisis Dinámico Mecánico	DMA	Deformación
Análisis Térmico Dieléctrico	DEA	Deformación
Análisis de Gas Desprendido	EGA	Descomposición gaseosa.
Análisis Termo-Óptico	TOA	Propiedades ópticas

1.5 Sistemas de liberación modificada.

La liberación de fármaco es el proceso de cesión de un compuesto farmacéutico desde la forma farmacéutica hasta la diana biológica con el fin de alcanzar un efecto terapéutico en humanos o animales ¹⁷. Para alcanzar el objetivo que plantea la definición, se necesitan sistemas de liberación en específico y para fines de este trabajo, de liberación modificada. Se definen como las tecnologías especialmente diseñadas para dirigir la liberación de un agente terapéutico hacia un órgano diana con condiciones que permiten que la liberación del fármaco sea apropiada ¹⁸.

La necesidad de diseñar nuevos sistemas de liberación surge del hecho de que los agentes terapéuticos clásicos al tener un peso molecular bajo son capaces de atravesar tejidos que muy pocos metabolitos lo harían, lo que les confieren la capacidad de llegar a múltiples destinos del organismo, sin embargo, aunque esto

pareciera a simple vista una ventaja también se tiene que considerar que la baja focalización de este tipo de terapias aumenta el grado de toxicidad potencial en uno o más tejidos. Aunado a esto, la alta permeabilidad renal permite que el fármaco se elimine muy rápido, haciendo inminente la administración de dosis muy altas para alcanzar la ventana terapéutica. Por este motivo las investigaciones en nuevos sistemas de liberación van encaminadas a minimizar la toxicidad y la dosis, sin perder el efecto terapéutico.

Los componentes integrales de los sistemas de liberación son por lo regular acarreadores de alto peso molecular, como son: capsosomas, micelas y dendrímeros en donde el fármaco se encuentra embebido y unido covalentemente¹⁹. En la actualidad el diseño de polímeros pretende alcanzar propiedades fisicoquímicas tales que satisfagan la necesidad de focalización y liberación en cierto órgano o tejido, dichos polímeros son variados, utilizados para distintas terapias y con mecanismos de liberación diferentes.

1.5.1 Mecanismos de liberación de fármacos.

Los mecanismos de liberación de fármacos desde una matriz polimérica capaz de sostener un agente terapéutico son de manera general los siguientes¹⁹.

Liberación por hinchamiento: El polímero alcanza un grado de hidratación en donde el volumen de poro ha aumentado a tal grado que el fármaco se libera por difusión.

- Liberación por degradación: La hidratación gradual del polímero conduce a degradación hidrolítica con la subsecuente liberación del fármaco.
- Degradación heterogénea: Se utiliza una mezcla de polímeros que se degraden en tiempos y condiciones diferentes, tal que cuando están en contacto con el medio fisiológico la degradación es tan alta que el fármaco se libera.
- Liberación por difusión simple: El fármaco difunde lentamente desde la matriz polimérica hacia el medio fisiológico.

En esencia, un sistema de liberación de fármacos eficiente debe de cumplir con las siguientes características: proveer de una rapidez de liberación adecuada hasta alcanzar la dosis terapéutica justo en el lugar adecuado en el cuerpo, para prolongar la duración de la acción farmacológica y reducir los efectos adversos, minimizar la frecuencia de dosis y con esto facilitar al paciente el cumplimiento del tratamiento¹⁹.

1.5.2 Sistemas particulado para liberación modificada.

Más allá de las aplicaciones en farmacia y en medicina resulta interesante el estudio de las nanopartículas, ya que se encuentran en muchas partes y alrededor de nosotros. Sólo por poner algún ejemplo, se sabe que en el cerebro humano existen alrededor de 10^8 nanopartículas magnéticas por gramo de tejido. Además del alto contenido de nanopartículas de diferentes metales que se han encontrado en fragmentos de meteoritos provenientes del espacio exterior ²⁰.

En un principio, las nanopartículas eran utilizadas para ensayos clínicos de naturaleza diagnóstica como agente de contraste, además con fines de investigación de estructuras celulares como retículo endotelial. En general se ha propuesto que un tamaño adecuado para las nanopartículas que se utilizan con fines terapéuticos es de $20-300 \mu\text{m}^{21}$, claramente ésta restricción de tamaño depende de la vía de administración y del órgano diana a donde se quiere llegar, por ejemplo se ha alcanzado células pigmentadas del epitelio en el ojo con nanopartículas de menos de 10 nm, hay también conocimiento que para producir una endocitosis exitosa en el sistema linfático se deben preparar nanopartículas magnéticas de tamaño entre 40-50 nm ⁹¹.

El avance real de la nanotecnología actual es que se enfoca en desarrollar mediante técnicas variadas la creación de plataformas específicas de carga de moléculas, ejemplo específico, fármacos ²². De hecho, hasta el año 2008 se reportó un crecimiento sostenido y sustancial en cuanto a la venta de productos nuevos basados en nanotecnología, a continuación se muestra la Tabla 4 con información al respecto ²³.

Se han utilizado varias terminologías para delimitar el espacio de las nanopartículas, debido a esto hay varios consensos, uno de los cuales indica que además de la distribución de tamaño de partícula que presente es necesario considerar la naturaleza química de las nanopartículas, en general, considerando a los acarreadores como polímeros, lípidos, proteínas, nanoestructuras metálicas, entre otros. A continuación se muestra la Tabla 3 con esta nomenclatura y posteriormente en la Tabla 4 se dan ejemplos de algunos productos hechos a base de nanotecnología.

Tabla 3. Nomenclaturas utilizadas para designar nanopartículas²².

Nomenclatura según varias fuentes.	Terminología utilizada.	Distribución de tamaño de partícula (nm).
Sistemas poliméricos		
1	Dendrímeros	1-10
2	Micelas Poliméricas	10-100
3	Niosomas	10-150
4	Nanopartículas	50-500
5	Nanocápsulas	100-300
6	Nanogeles	200-800
7	Polímero- Fármaco nanoconjugado	1-15
8	Polímeros de Quitosán	100-800
9	Polímeros de Metacrilato	100-800
Sistemas lipídicos		
1	Nanopartículas lipídicas sólidas	50-400
2	Sistemas lipídicos nanoestructurados	200-800
3	Cubosomas	50-70
4	Liposomas	10-1000
5	Polimerosomas	100-300
6	Inmunoliposomas	100-150
Nanotubos Protéicos		
1	Nanotubos peptídicos	1-100
2	Proteínas de fusión e inmunotoxinas	3-15
Nanoestructura metálica		
1	Coloides metálicos	1-50
2	Nanotubos de carbón	1-10 (diámetro) y 1-1000 (longitud)
3	Fulereo	1-10
4	Nanopartículas de Oro	100-200
5	Nanocoberturas de Oro	10-130
6	Nanopartículas de Silicona	100
7	Coloides magnéticos	100-600

Tabla 4. Productos fabricados a base de nanotecnología ya en el mercado o en pruebas científicas hasta el 2008 ²².

Producto/Grupo	Compañía	Aplicaciones
Daunoxoma®	Giead Science, Cambridge, Reino Unido	Cáncer
Doxil®	Johnson & Johnson, Bridgewater, Nueva Jersey	Cáncer
Myocet®	Sepherion Therapeutics, Princeton, Nueva Jersey	Cáncer
Amphotec®	Amphotec, Beverly, Massachusetts	Antifúngico
Gendicina®	Aprobado para el mercado chino.	Liberación génica
Accell	Powderject Vaccine, Inc. Madison Wisconsin	Pistola génica
Helios	Bio Rad Labs, Hercules California	Pistola génica
Rexin- G™	Epeius Biotech Corp, Glendale, California	Liberación génica
Vitravene™	ISIS Pharm, Carlsbad, California	Relacionado al SIDA Genérico de tecnología polimérica anfifílica
Medusa®	Flamel Technologies, Lyon, Francia	Cáncer
Transdrug®	Bioalliance, Paris, Francia	Cáncer
Caelyx®	Johnson & Johnson, Bridgewater, Nueva Jersey	Cáncer
Nanoedge®	Baxter Health Corp, Deerfield, Illinois	Sistema de liberación génica
Emend®	Elan/Merck & Co, King of Prussia, Pennsylvania	Fármaco anti nausea
Rapamune	Elan/Wyeth, King of Prussia, Pennsylvania	Inmunosupresor
Tecnología Nanocristalina	Elan, Dublin, Irlanda	Tecnología génica
Abraxane®/paclitaxel cristales	American Bioscience, Santa Monica, California	Cáncer Acarreadores genéricos de lípidos sólidos para cosméticos y fármacos
Nanobase	Yamanouchi Japón	fármacos
Nanoxel	Dabur Pharma, India	Paclitaxel
Bioimagen/diagnostico		Sistema MRI de óxido de hierro supermagnético
Endorem™	Guebert CCL, Bloomington, Indiana	
Nanoacarreadores Multifuncionales	Georgia Tech, Atlanta, California	Bioimagen para cáncer de mama

1.6 Nanopartículas de hierro.

El hierro es un metal de transición, en su estado metálico tiene una gran variedad de aplicaciones, ciertamente el crecimiento y desarrollo de la civilización humana no se entendería sin tan valioso metal. Para que el hierro presente las propiedades buscadas es necesario someterlo a ciertos procedimientos para separarlo de minerales con los que se encuentra en la naturaleza ²⁴.

La nanotecnología también se vale de métodos para aprovechar las mejores propiedades del hierro, el método que más se utiliza para la preparación de nanopartículas de hierro es la descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$, sin embargo, los productos son muy reactivos y por lo tanto, poco estables. De igual importancia son la descomposición por reducción de sales de Fe (II) y Fe (III). La reducción de sales de hierro mediante una base, por ejemplo NaBH_4 ²⁰.

La magnetita, de fórmula Fe_3O_4 , $\text{Fe}^{+2}\text{O}\cdot\text{Fe}_2^{+3}$ ó $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3}]\text{O}_4$, se conoce como tetróxido de trihierro u óxido ferrosférico, de manera que su fórmula general se escribe como $\text{Y}[\text{XY}]\text{O}_4$ (fórmula típica de una estructura cristalina de espinela, siendo la magnetita inversa), donde el oxígeno forma la red cúbica de cara centrada, $\text{X}=\text{Fe}^{+2}$ y $\text{Y}=\text{Fe}^{+3}$; los corchetes denotan los sitios octaédricos (32 espacios) y los restantes los sitios tetraédricos (64 espacios).

Los métodos más comúnmente utilizados para la síntesis de magnetita son la descomposición térmica y la coprecipitación. La reacción se realiza bajo una atmósfera inerte de N_2 o Ar al mismo tiempo que se utilizan disoluciones degasificadas para prevenir o controlar la oxidación de Fe^{2+} en Fe^{3+} . En este método los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} son por lo general precipitados mediante soluciones alcalinas como KOH o NaOH , a temperaturas que oscilan entre $70\text{-}80^\circ\text{C}$ o aún más altas ²⁵.

Las nanopartículas magnéticas ofrecen una serie de posibilidades atractivas para la medicina. Su tamaño por ejemplo, que va de unos pocos nanómetros a unos cuantos cientos de nanómetros, permiten que sean asimilados por el organismo como alguna otra entidad biológica y más aún cuando se recubren con alguna molécula biológica de interés como anticuerpos. A continuación se enlistan algunas entidades biológicas y su tamaño: ²⁶

- Célula $10\text{-}100\ \mu\text{m}$.
- Virus $20\text{-}450\ \text{nm}$.
- Proteína $5\text{-}50\ \text{nm}$.
- Gen $2\ \text{nm}$ de ancho por $10\text{-}100\ \text{nm}$ de largo.

Otra de las propiedades más relevantes es el magnetismo, lo que significa que obedecen la ley de Coulomb y por lo tanto, pueden ser manipuladas por algún campo magnético externo. Lo que abre la posibilidad de manipular las nanopartículas a través de los tejidos.

De igual forma las nanopartículas son entidades capaces de transferir energía al ser sometidas a un campo magnético alterno, esto significa que el entorno puede sufrir calentamiento que facilitaría la liberación de algún agente terapéutico por estar embebida en una matriz polimérica susceptible a temperatura, produciendo ruptura o hinchamiento de dicha matriz polimérica ²⁶.

Todos los materiales exhiben en cierto grado propiedades magnéticas que dependen principalmente de su estructura atómica y temperatura. Dicha propiedad se puede clasificar en términos de la susceptibilidad magnética volumétrica, χ , incluida en la ecuación 6. Donde: H es el campo magnético o fuerza magnética [Am^{-1}]; χ : susceptibilidad magnética volumétrica. [Adimensional]; M es el momento magnético en un volumen V de algún material [Am^{-1}].

$$M = \chi H$$

Ecuación 6. Susceptibilidad magnética volumétrica.

Los materiales paramagnéticos con valores de $\chi = -10^{-6} - 10^{-1}$ y diamagnéticos con $\chi = -10^{-6} - -10^{-3}$ muestran susceptibilidad mínima a la presencia de un campo magnético aplicado, mientras que los materiales ferromagnéticos, ferrimagnéticos y antiferromagnéticos muestran valores de $\chi=10^4$ por acoplamiento natural entre electrones. Los acarreadores magnéticos que actualmente se utilizan son de magnetita Fe_3O_4 o magemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ por sus propiedades ferromagnéticas que cuando se habla de sistemas nanoparticulados es más propio hablar de superparamagnetismo como la propiedad a destacar ²⁶.

1.6.1 Superparamagnetismo (SP).

Aunado a las propiedades intrínsecas de cada material como la susceptibilidad magnética volumétrica, la versatilidad de un buen sistema de liberación depende en buena manera del tamaño de partícula que tenga, en particular cuando se habla de sistemas con propiedades magnéticas se sabe que los sistemas diseñados a escala

nanométrica presentan la propiedad llamada superparamagnetismo. De manera puntual las nanopartículas magnéticas de hierro que presentan propiedades de superparamagnetismo con una magnetización saturada mayor son aquellas de un radio de entre 5 -7.5nm, además de ésta condición se debe cuidar en todo momento el recubrimiento de éstas, para así garantizar la estabilidad electrostática, tal como el recubrimiento de dextran descrito por Forge *et. al.*⁹²

Superparamagnetismo (SP) describe el tamaño del dominio singular de un grano, cuando la energía térmica es suficiente para rebasar las barreras de una magnetización reversa. Estas barreras surgen de manera intrínseca de propiedades magnetocristalinas, magnetoelásticas y de la forma anisotrópica, todas son proporcionales al volumen del grano (V). Cuando las barreras energéticas son grandes con respecto a la energía térmica, la magnetización es “bloqueada” y la probabilidad de una magnetización reversa se vuelve despreciable. Cuando las barreras son relativamente pequeñas, la excitación térmica puede resultar en una magnetización reversa dentro de escalas de tiempo muy pequeñas, luego entonces el grano se encuentra en el estado superparamagnético. A una temperatura dada el volumen al cual la partícula está bloqueada es conocida como volumen de bloqueo (V_b). Para un volumen dado, podemos bloquear el grano disminuyendo la temperatura (disminuyendo la energía térmica disponible) por debajo de la temperatura de bloqueo (T_b)²⁷.

1.6.2 Hipertermia.

La principal aplicación que tienen las nanopartículas magnéticas en el campo del tratamiento contra el cáncer es la hipertermia magnética. La hipertermia se define como el tratamiento por calor. Se sabe que la temperatura de un tejido puede ser elevada de manera artificial, por ejemplo, cuando se induce sobre éste un campo magnético, aunado a esto las células cancerosas son más susceptibles a temperaturas alrededor de 41.8°C. Cuando las nanopartículas son dirigidas dentro del tumor, se genera por un campo magnético alternativo el calor suficiente para destruir el tumor sin dañar el tejido circundante^{20, 92}.

La teoría de la hipertermia se basa en las observaciones hechas por Rosensweig que revelaron que los ferrofluidos tienen la característica o capacidad de alterar el campo magnético alrededor de ellos cuando se les induce otro externo. La cantidad de corriente es proporcional al tamaño del campo magnético y al tamaño del objeto,

mientras la corriente fluye en el metal, éste resiste el flujo y mientras esto sucede se calienta, dicho proceso se llama inducción térmica. Si este metal es magnético este fenómeno es ampliamente favorecido.

El efecto de calentar un tejido tumoral mediante la aplicación de nanopartículas multifuncionales en sitios específicos del tumor emerge actualmente más como un arte de “terapia nanotérmica”. En general, existen dos consideraciones mayores: 1. Un tiempo de exposición largo es la clave principal de un agente terapéutico hipertérmico; 2. Nanopartículas hechas de materiales como oro pueden ser utilizadas para el monitoreo de temperatura además de ser sensibles a estímulos físicos y metabólicos en diferentes partes del tumor ²⁸.

Decenas de aplicaciones surgen de la literatura cuando se consulta más a profundidad este tema. Debido a estos hechos las nanopartículas funcionalizadas para un fin dado, deben ser consideradas como un vector excelente para la deposición de un fármaco y por lo tanto, ser utilizado como un agente terapéutico potencial.

1.7 Caracterización de Nanopartículas.

1.7.1 Potencial zeta

La suspensión o dispersión de partículas está presente en un gran número de productos utilizados de manera extensa y en gran número de aplicaciones. Ejemplos de lo anterior pueden ser: líquidos abrasivos, cerámicos, medicinas, aderezos y tintas de impresión, entre otros.

Para considerar como buena la calidad de la suspensión el criterio que se toma en cuenta es la estabilidad de la misma. Los factores de manera general que contribuyen a la estabilidad de dicha suspensión son termodinámicos o cinéticos. La estabilización electroestática que es la suma de las fuerzas de repulsión-atracción entre las partículas del sistema y la estabilidad cinética que depende de factores entálpicos y entrópicos y repercuten en la sedimentación o agregación del sistema. ⁸

En general, si las fuerzas de repulsión son mayores que las de atracción en un sistema particulado éste será estable. El término físico que nos da razón de este fenómeno se llama potencial zeta (ζ , ϕ_z), que se define como la indicación mensurable del potencial presente en la superficie de una partícula, asociado al solvente y la doble capa eléctrica que se forma alrededor de dicha partícula. ²⁹ Los valores de potencial zeta que indican una buena estabilidad en suspensión son

aquellas fuera de ± 30 mV, por el contrario, si el valor está dentro de ese rango, la suspensión no presenta buena estabilidad fisicoquímica y floclula.

El factor más importante que afecta al potencial zeta es el pH. Un valor dado de potencial zeta por sí sólo sin referencia a un pH es virtualmente un número sin significado. El pH donde se alcanza un potencial zeta de cero, se llama punto isoeléctrico este punto es donde el coloide es menos estable.³⁰ Véase Figura 6.

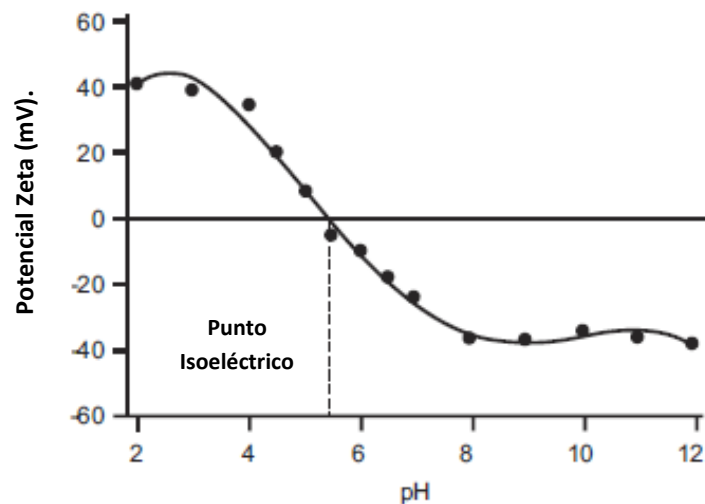


Figura 6. Intersección de pH y potencial Zeta en donde se alcanza el punto isoeléctrico.

La carga neta de una partícula modifica la distribución de sus cargas a su alrededor, en la región interfacial esto resulta en la agregación a su alrededor de contra iones (iones de carga opuesta a la partícula en cuestión). Entonces el líquido alrededor existe en dos partes primordiales: una región interior llamada capa de Stern donde los contra iones están fuertemente unidos y una región exterior donde los iones se encuentran más difusos y unidos con menor fuerza. Cuando la partícula se mueve influenciada por el movimiento Browniano, la capa de Stern se mueve en conjunto, mientras que la capa difusa no, entre las dos capas entonces se forma un plano de deslizamiento y es ahí donde el potencial zeta tiene sentido físico.²⁹ Véase Figura 7. En donde se observa que la capa interior o capa de Stern, donde los iones están fuertemente unidos a la partícula en suspensión y la región externa o región difusa, donde existe una unión más débil entre iones. El plano de deslizamiento es el efecto que sucede cuando la partícula se mueve y los iones en la capa externa lo siguen. El potencial zeta es el potencial eléctrico que existe en la frontera del plano de deslizamiento.

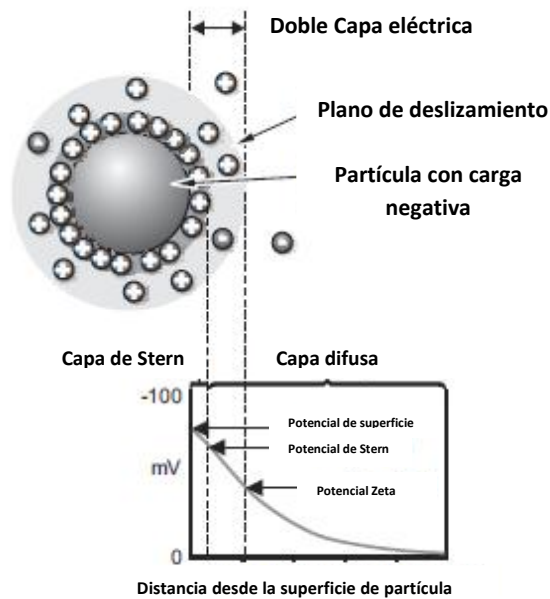


Figura 7. Doble capa de Stern.

1.7.2 Tamaño de Partícula.

El tamaño de partícula como indicador tiene un importante significado en diferentes industrias. Hay dos formas principales de cómo impacta en la industria farmacéutica: influye directamente en el rendimiento dentro de proceso y también como un indicador de contaminación.³¹

La técnica más utilizada en la industria farmacéutica para el análisis de tamaño de partícula es la difracción láser.³² La difracción laser mide el movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de partícula mediante la dispersión dinámica de la luz o espectroscopía de correlación fotónica.³⁰ El análisis de las fluctuaciones de intensidad producidas por el movimiento browniano se hace mediante la relación Stokes-Einstein, ecuación 7.³² Donde: D es la constante de difusión, K_B es la constante de Boltzmann, T es la Temperatura, r es el radio de partícula esférica y η es la viscosidad

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta r}$$

Ecuación 7. Relación Stokes- Einstein.

La relación Stokes- Einstein se utiliza para saber la difusión de partículas esféricas a través de un líquido con un número de Reynolds pequeño. Un dato importante

acerca del movimiento Browniano en la dispersión dinámica de luz es que las partículas más pequeñas se muevan más rápido mientras que las partículas más grandes se mueven más lentamente.

Considérese una pequeña partícula que es iluminada por una fuente de luz, la partícula dispersará la luz en todas las direcciones. Ahora considérese a la misma partícula iluminada por la misma fuente de luz, mientras que es sostenida una pantalla, entonces ahora la pantalla será iluminada por la luz dispersada y por la sombra de la partícula. Ahora, por último considérese que se reemplaza una sola partícula por varios cientos de partículas en las mismas condiciones, lo que ahora se vería en la pantalla sería un patrón moteado de luz y sombra. Figura 8. Éste patrón consiste en áreas de luz y oscuridad donde la luz no es detectada.

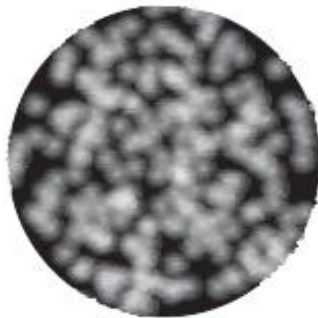


Figura 8. Se muestra el patrón moteado.

Lo que causa las zonas blancas y oscuras es la dispersión de luz provocada por las partículas. Las zonas claras indican que la luz dispersada ha llegado a la pantalla e interfieren de manera constructiva con la misma intensidad (en el caso de que las partículas estuvieran estáticas) formando el parche blanco. Las zonas oscuras indican una adición destructiva. La figura 9 ilustra mejor este fenómeno. El diagrama muestra las ondas que se propagan por la luz dispersa debido a las partículas, las zonas con brillo son donde la luz dispersada por las partículas llega a la pantalla con la misma fase e interfiere constructivamente y forma un parche brillante. Las zonas oscuras son donde las adiciones de fases son mutuamente destructivas y se cancelan la una a la otra.

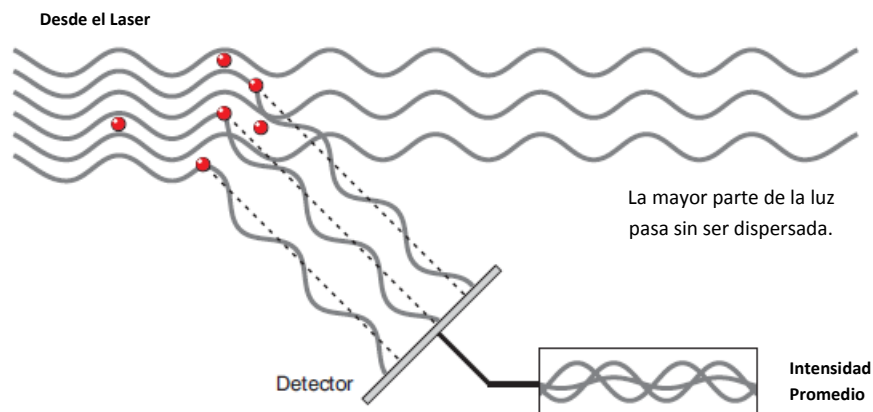


Figura 9. Ondas que se propagan por la luz dispersa debido a las partículas

Debido a que las partículas no están estáticas, si no influenciadas en todo momento por el movimiento Browniano las fases destructivas y constructivas disminuyen y aumentan, por lo que, la intensidad parece fluctuar. La instrumentación utilizada mide esta fluctuación y la utiliza para medir el tamaño de las partículas ²⁹.

1.8 Polímeros de impresión molecular.

Dentro de la gama de polímeros que se han diseñado con la finalidad de ser utilizados como sistemas de liberación modificada, están los polímeros de impresión molecular, entre muchas otras aplicaciones.

El concepto de diseño de este tipo de polímeros surge de la idea del “biomimetismo” que a grandes rasgos es la reproducción de las interacciones macromoleculares bioquímicas, por ejemplo, enzima-sustrato de una manera sintética pensada a escala molecular y altamente específica.

La impresión molecular es una de las aproximaciones más esquemáticas hacia este concepto del biomimetismo. Es el proceso mediante el cual se preparan sitios específicos de reconocimiento en una matriz polimérica usando un molde molecular, plantilla, horma o sustrato. Lo primero que se hace es permitir que el sustrato forme interacciones y uniones con uno o varios tipos de grupos funcionales, a esto se le conoce como paso de pre arreglo, lo siguiente es cerrar las interacciones o terminar la formación de la matriz que será específica para dicho sustrato, para después

proceder con una desorción de la molécula molde dejando el polímero impreso adecuado y específico ³³. Véase Figura 10 ³⁴.

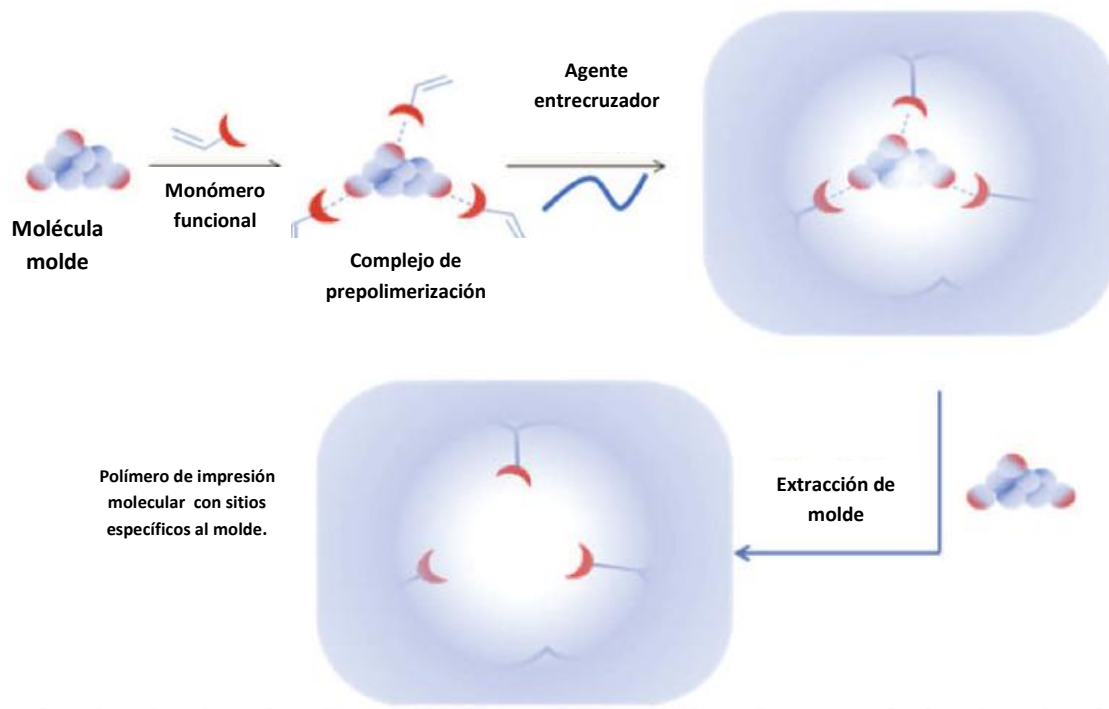


Figura 10: Representación esquemática de la síntesis de un MIP.

Uno de los detalles que se deben de cuidar durante la síntesis de un polímero de esta naturaleza es la formación de radicales libres, los cuales se generan por la descomposición de compuestos azo, peróxidos, etc. los cuales requieren una temperatura relativamente alta de polimerización que en teoría debe de asegurar su descomposición ³³. La temperatura de polimerización se debe de cuidar, ya que se sabe que cuando se tienen temperaturas altas las cavidades generadas por la molécula molde resultan inespecíficas debido a que a temperaturas altas, el equilibrio de desorción de la molécula molde se alcanza más rápido.

1.8.1 Polímeros de Impresión molecular como sistemas de liberación modificada.

La estructura de las cavidades del polímero debe presentar propiedades de flexibilidad y rigidez tal que, la conformación del polímero se pueda mantener cuando la molécula molde no ocupa este espacio, pero ser flexible para que se alcance un equilibrio de desorción-resorción a una velocidad apropiada. Esta propiedad depende en gran medida de la proporción en la que se encuentra presente el agente entrecruzador, es importante resaltar que cuando se aumenta la

proporción del agente entrecruzador también aumenta la rigidez del sistema, lo que en aplicaciones médicas puede conllevar el aumento en fricción mecánica con los tejidos en contacto.

De las características deseables que debe presentar un polímero de impresión molecular se encuentra la estabilidad química, debido a que éste entrará en contacto con medios fisiológicos que son complejos, debe entonces resistir a la degradación enzimática o por cambios de pH u otras variables. Aunado a esto, los polímeros deben de ser probados *in vivo* para determinar características de toxicidad y demostrar entonces que son seguros. En este sentido, el EGDMA (etilen glicol dimetacrilato) ha probado ser un agente entrecruzador seguro *in vitro*, además de ser altamente estable. Es preferible entonces, llevar a cabo una síntesis en medios acuosos o que puedan ser lavados en agua y no en solventes orgánicos los cuales aumentarían potencialmente la toxicidad.

Debido a las características que presentan los MIP's ya antes expuestas, esta tecnología puede proveer sistemas poliméricos de reconocimiento específico para una serie de moléculas de uso terapéutico, además de brindar características de desorción dependientes del medio o propias de la molécula molde. Aunque aún no se ha comercializado estos polímeros para tal fin, tienen un enorme potencial para ser incluidos en formas farmacéuticas de liberación modificada. Los nuevos retos para esta tecnología incluyen, poder realizar la síntesis completa de los polímeros en solución acuosa, que reduciría el potencial tóxico que implican los solventes orgánicos, hasta el momento esto no ha sido posible ya que en el agua se generan interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno principalmente) de menor fuerza que imposibilitan la obtención de un polímero de alta especificidad.³⁴ Otro de los retos consiste en hacer de los MIP's "sistemas de liberación inteligente", lo cual se refiere a la liberación de un agente terapéutico regulado por un estímulo específico como la presencia de alguna otra molécula intrínseca del organismo, tal como el sistema de liberación de testosterona dependiente de hidrocortisona, descrito por Sreenivasan *et al.*³⁵ elaborado de un polímero de impresión molecular a base de 2-Hidroxi-etil-metacrilato.

1.9 Cáncer.

El Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos indica que el cáncer es un término para un grupo de enfermedades que tienen como característica común que

las células del tejido afectado se dividen sin control y además si existe metástasis, pueden invadir otros tejidos, esto sucede mediante el riego sanguíneo y por el sistema linfático ³⁶. La Figura 11 muestra el desarrollo anormal de células característico de cáncer.

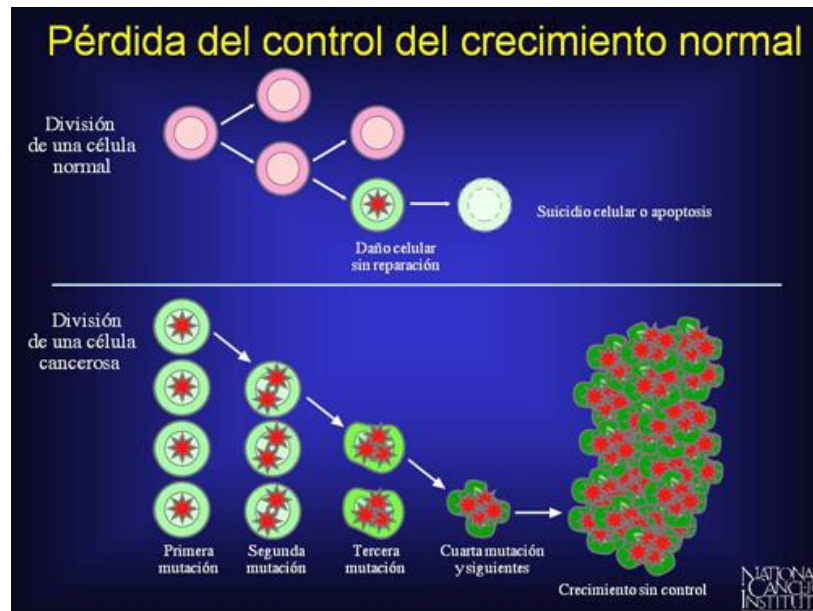


Figura11. Pérdida del crecimiento normal celular en cáncer ³⁶.

El cáncer ha sido un problema que se desarrolló con la historia misma del hombre y desde tiempos inmemorables se habla de que él ya convivía de manera íntima con este padecimiento. De hecho, existe en la actualidad un debate entre los expertos de si el cáncer es una enfermedad moderna, influenciada por tantos agentes carcinógenos potenciales o si se trata de una enfermedad antigua, como lo muestra el estudio publicado por Nature Reviews Cancer hecho por David y Zimmerman, el cual consiste en un estudio histopatológico por medio de microscopía de cáncer en una momia egipcia ³⁷.

En la actualidad el cáncer representa un problema de salud pública y un reto a nivel global, tan sólo en la Unión Americana se calcula que el 64% de la población de origen hispano es mexicana y según cifras oficiales la probabilidad de fallecer por algún tipo de cáncer entre los hombres hispanos es de 1 de cada 5 y de 1 de cada 6 entre las mujeres. Siendo para los hombres los tipos más comunes: próstata 24%, colon y recto 12%, pulmones y bronquios 10%, para las mujeres: seno 28%, colon y recto 10%, pulmones y bronquios 7%. Aun cuando estas cifras son de Estados

Unidos, reflejan de manera general la situación de nuestro país, siendo la única diferencia el cambio o reestructuración de hábitos por parte de los emigrantes.³⁸

1.9.1 Tratamientos contra el cáncer.

En el año 2013, en Ciudad del Cabo Sudáfrica se firmó la Declaración Mundial contra el Cáncer, en la cual se establecen las metas, acciones y medidas para combatir esta enfermedad hasta el año 2025. Se establece en el artículo noveno la importancia de apoyar la investigación en todos los ámbitos relacionados con este tema, dando el impulso necesario a nuevas tecnologías y técnicas de tratamiento³⁹. Para establecer nuevos tratamientos contra el cáncer es siempre necesario conocer lo que ya se tiene, en este sentido es indispensable elegir en base a que se quiere lograr: curar, evitar que se expanda o aliviar la sintomatología relacionada con éste. En la actualidad se tienen establecidos esquemas que intentan cubrir los tres puntos anteriores de manera integral. Los siguientes son los tratamientos que actualmente se aplican⁴⁰.

- Cirugía: Consiste en extirpar de manera parcial o total el tejido con cáncer además de los tejidos circundantes en los que se sospecha pudo haberse esparcido. Hay dos tipos de cirugía básicos.
 1. De diagnóstico o cirugía ambulatoria. Consiste en realizar una biopsia para un diagnóstico preciso, junto con el estudio microscópico patológico adecuado.
 2. Curativa o primaria. Consiste en la extirpación completa de un tumor además del tejido circundante.

La cirugía es el método de tratamiento más antiguo para el cáncer, sin embargo, es de los más utilizados debido a su efectividad y en algunos casos, como la única opción para curar⁴¹.

- Radioterapia: Consiste en utilizar una fuente de radiación ionizante y dirigirla hacia el tejido afectado. Existen fuentes externas como los rayos X y fuentes internas implantadas dentro del cuerpo en recipientes adecuados como lo pueden ser cápsulas que contienen por ejemplo, isótopos radioactivos de yodo (yodo 125 o yodo 131)⁴².

- Terapia hormonal: Este tipo de terapia es utilizada de manera común en cáncer de próstata y mama. El objetivo primordial de esta terapia es contrarrestar los efectos y la influencia que de manera natural tienen las hormonas para el desarrollo y crecimiento de tumores cancerígenos, así, existen dos maneras de alcanzar este objetivo, la primera extraer glándulas que se saben secretan hormonas que ayudan a la proliferación del cáncer, y la segunda, administrando fármacos que bloquean la señal molecular de hormonas.

El diagnóstico que lleva al oncólogo a tomar esta opción de terapia se basa en cuantificación e identificación de receptores hormonales en los tejidos tumorales, de esta manera si el resultado es positivo el médico concluirá que hay hormonas que favorecen el desarrollo de cáncer. Por el contrario, si el resultado es negativo quiere decir que las hormonas no favorecen al crecimiento de células cancerígenas, por lo que otra opción de tratamiento debe ser considerada.⁴³

En un estudio realizado en 2003 y dirigido por la Asociación Médica Americana, se comprobó que el tratamiento con hormonas de reemplazo en mujeres que padecían síntomas de menopausia aumentaba considerablemente el riesgo de sufrir cáncer de mama, en especial cuando se utilizaban mezclas de estrógeno/progesterona.⁴⁴ Este tipo pruebas hablan de las implicaciones que tiene el uso de hormonas como tratamiento aun cuando se haga bajo la supervisión de un profesional, así pues, la terapia hormonal aunque efectiva conlleva riesgo ya contemplado.

- Inmunoterapia o terapia biológica: El objetivo y estrategia primordial de este tipo de terapia es estimular el sistema inmunitario para que trabaje de una mejor manera y pueda combatir al cáncer. Por lo regular, esto se logra administrando a los pacientes algunos componentes del sistema inmune, como proteínas.⁴⁵
- Ensayos clínicos: Este tipo de tratamiento se refiere a la última etapa de un protocolo de investigación en lo que a una tecnología para combatir el cáncer se refiere, como nuevas vacunas, fármacos, tratamientos, dispositivos médicos o alguna nueva forma de implementar elementos ya conocidos.

Actualmente, los ensayos clínicos buscan resolver una serie de preguntas específicas, con tal fin, los estudios están separados en etapas y/o fases:

- Fase 0: Fase de Farmacodinámica y Farmacocinética. Se establecen protocolos piloto donde se estudian de 10 a 15 sujetos y se evalúa básicamente lo que el fármaco le hace al cuerpo (farmacodinamia) y lo que el cuerpo le hace al fármaco (farmacocinética).
- Fase 1: Fase de monitoreo por seguridad. Se identifican por primera vez aspectos como, ventana de seguridad en la dosificación y efectos secundarios esto en grupos de 20 a 80 personas por lo regular.
- Fase 2: Fase donde se establece la eficacia del fármaco mediante placebo Último paso donde se evalúa la seguridad de un fármaco en grupos de 100 a 300 personas.
- Fase 3: Fase final de confirmación de seguridad y eficacia. En esta etapa se utilizan grupos de personas más numerosas de 1000-3000 personas, se confirma efectividad, se monitorean efectos secundarios además de hacer comparaciones con tratamientos que ya se utilizan.
- Fase 4: Fase de estudios de farmacovigilancia. Es la etapa en la que el producto ya está a la venta pero son necesarios hacer evaluaciones riesgo-beneficio acerca del uso del medicamento.⁴⁶

Los ensayos clínicos en oncología con finalidad terapéutica pertenecen a la fase 3 antes expuesta, ya que el tratamiento se realiza en pacientes diagnosticados con cáncer. Estos estudios deben ser siempre controlados y aleatorizados.⁴⁷

La importancia de este tipo de seguimiento terapéutico radica en que se generan conocimientos para prevenir, detectar y dar tratamiento al cáncer. De hecho se puede llegar a obtener tratamientos mucho más efectivos que los que ya se tienen.⁴⁸

- Medicina complementaria y alternativa: Se trata de un conjunto de prácticas, diversos sistemas y productos médicos que de manera convencional no se consideran dentro del tratamiento para el cáncer, sin embargo, han ido tomando relevancia por su eficacia comprobada, controlando síntomas y previniendo el cáncer principalmente, pero, jamás sustituyendo el tratamiento formal contra el cáncer.⁴⁹

La opinión científica al respecto de estos tratamientos es clara, ya que no se ha demostrado que ninguno de ellos cure el cáncer de manera total o parcial. La Sociedad de Oncología Integrativa (ASOI) en 2009 publicó unas guías que indican la manera en que los médicos deben de recomendar los tratamientos complementarios

o alternativos, en éstos se indica la manera en que el tratamiento debe ser incluido además de cuáles son los beneficios y contraindicaciones que este puede implicar.

Uno de los objetivos implícitos en este tipo de tratamientos que por lo regular no se mencionan, es buscar que el paciente se sienta que participa de manera activa en su propio tratamiento.

- Trasplante de células hematopoyéticas. La palabra hematopoyético, se refiere a las células que se encargan de formar tejido sanguíneo, este tipo de células son diferentes a las células tronco hematopoyéticas que se encuentran durante la etapa fetal (hígado fetal, cordón umbilical y médula ósea principalmente) y tienen la capacidad de formar cualquier tipo de tejido. En general, la terapia por trasplante de células hematopoyéticas tiene como objetivo renovar las células sanguíneas perdidas por la quimioterapia, radioterapia, cáncer o por alguna otra enfermedad ⁵⁰.

Existen tres tipos de trasplante de células hematopoyéticas básicamente:

Autólogos: Los pacientes reciben sus propias células.

Singénicos: Los pacientes reciben el trasplante de un gemelo idéntico.

Alogénicos: Los pacientes reciben el trasplante de algún pariente o algún donante que no tenga que ver en parentesco.

En la actualidad, el trasplante de médula ósea representa un negocio en los Estados Unidos de alrededor de 1.3 billones de dólares, ya que es el procedimiento médico quirúrgico de mayor demanda y crecimiento en cuanto al tratamiento de ciertos tipos de cáncer se refiere, por ejemplo, la leucemia mieloide aguda, AML por sus siglas en inglés. Por lo que proponer nuevas variantes para procedimientos de esta naturaleza tiene mucho sentido si se considera que este tratamiento se limita a personas menores de 55 años. Las tendencias apuntan a que la alternativa es la radioinmunoterapia ⁵¹.

- Quimioterapia: La quimioterapia se define como el uso racional de fármacos diseñados para el tratamiento especializado en células o tejidos cancerosos. De manera generalizada, la quimioterapia interrumpe la capacidad de las células cancerosas de multiplicarse y esparcirse en el organismo ⁵².

Hay cuatro formas básicas de recibir una quimioterapia. Mediante inyección a través de la vena, por perfusión intravenosa mediante goteo, por tabletas o cápsulas.

El hecho de que la quimioterapia ataque principalmente las células en división ayuda a explicar porque la quimioterapia ataca a cierto tipo de células que se encuentran siempre en renovación continua, pelo, médula espinal, piel, sistema digestivo, reproductivo y en general mucosa.⁵³

La quimioterapia tiene siempre efectos secundarios, es difícil saber cuál será el efecto o los efectos secundarios que presentarán los pacientes. Se conocen los siguientes: supresión de la médula ósea, inflamación en las membranas mucosas, náuseas y vómito, pérdida del apetito, diarrea, deshidratación, fatiga, pérdida de pelo, fatiga, entre otros ⁵⁴.

Por lo anteriormente mencionado, se busca que la quimioterapia tenga una o varias de las características ideales⁵⁵, las cuales son:

- Toxicidad selectiva. Dirigida hacia las células anormales y no contra las normales.
- Farmacocinética favorable. Mantener una dosis sistémica o en órgano diana apropiada.
- Espectro de acción. Amplio o estrecho, dependiendo del diagnóstico.
- “Sin” efectos secundarios. La más ideal de las características, todavía no se alcanza, sin embargo, se sigue buscando.
- Capaz de permear a través de membranas citoplasmáticas. Esto para que pueda llegar la molécula íntegra al órgano diana.
- Nivel bajo de interacción con agentes antibióticos.
- Resistentes a inactivación por enzimas microbianas.

1.10 Doxorrubicina.

1.10.1 Propiedades fisicoquímicas.

- Fórmula molecular: $C_{27}H_{29}NO_{11}$.
- Peso molecular:⁵⁶ 543.519 g/mol / 579.99 g/mol (clorhidrato de)
- Forma y color:⁵⁷ sólido cristalino rojo.
- Punto de fusión: 230 °C
- Constante de disociación:

$pK_{a1}=7.34$ (fenol); $pK_{a2}=8.46$ (amina); $pK_{a3}=9.46$ (éster).

- Coeficiente de partición octanol/agua: $\log K_{o/w}=1.27$

- Solubilidad:⁵⁸

En agua 2600 mg/L a 25 °C.

Soluble en soluciones hidroalcohólicas.

Moderadamente soluble en metanol anhidro.

Insoluble en solventes orgánicos no polares.

- Propiedades Espectrales:⁵⁸

Rotación óptica específica: 248 grados a 20 grados C/D (en metanol al 0.1%).

Absorción máxima (en metanol a 56°C): 290 nm ($\epsilon=223,1\%,1\text{cm}$); 530 nm

($\epsilon=658,1\%,1\text{cm}$); 253 nm ($\epsilon=440,1\%,1\text{cm}$)

- Presión de Vapor:⁵⁸ 2.5×10^{-23} a 25°C.

La doxorubicina es un antibiótico antracíclico utilizado como citotóxico aislado de la cepa *Streptomyces peucetius var. caesius*. Se ha comercializado con varios nombres como: Adriablastina y Adriamicina de Pfizer, Caelyx de Janssen- Cilag, Myocet de Cephalon, entre otros.⁵⁹

La doxorubicina es una molécula que consiste en un núcleo de naftaquinona unido mediante una unión glicosídica a daunomisina. Cuyo nombre IUPAC es: (8S,10S)-10-[(3-Amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl)-oxy]-8-glycoloyl-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-5,12-naphthacenedionehydrochloride⁶⁰.

Véase la Figura 12

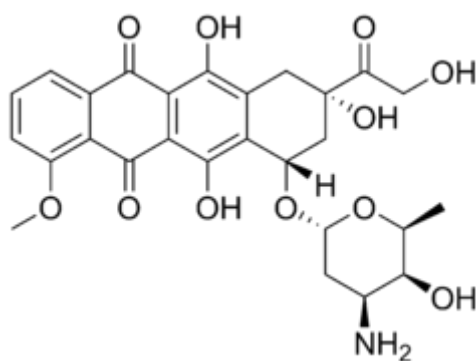


Figura 12. Molécula de doxorubicina.

1.10.2 Mecanismo de acción.

Muchos de los fármacos que se usan hoy en día, se utilizan sin haber entendido por completo cómo funcionan, en la oncología este debería ser un punto de reflexión y debate ya que se administran potentes citotóxicos a un buen número de pacientes, a pesar de que no se entiende por completo el funcionamiento, lo que podría representar un problema de salud importante.

La historia de la doxorubicina comienza hace poco más de 40 años cuando fue introducida junto con la daunorubicina (ambas pertenecientes a la familia de antraciclinas) en prácticas clínicas. Desde esa época hasta la fecha se siguen utilizando estas moléculas para el tratamiento de tumores, debido a su eficacia comprobada, sin embargo, se ha limitado su uso por su también comprobada cardiotoxicidad, la cual sólo se presenta por la acumulación de dosis y los efectos se pueden ver hasta décadas después, sin embargo, con lo que respecta al mecanismo de acción pocas aproximaciones se han hecho.

De las propuestas más sobresalientes y mejor aceptadas hasta la fecha se encuentra: Inhibición de la topoisomerasa II, intercalamiento en DNA y generación de radicales libres. Más recientemente, un grupo de la universidad de Texas Southwestern basados en una serie de evidencias propusieron que las antraciclinas inducen la síntesis de ceramidas que a su vez inducen el anclaje de un factor de transcripción llamado *CREB3L1*, lo que posteriormente desencadena una expresión alterada de genes que muy probablemente contribuye al efecto del fármaco.⁵⁹ Véase la Figura 13. La doxorubicina ayuda a estabilizar los complejos que contienen topoisomerasa II y DNA de doble cadena (en la parte superior de la imagen), esta enzima después corta las dos cadenas de DNA, lo que conlleva a la muerte de las dos células hijas (predominantemente vía topoisomerasa II β) y las células tumorales que son susceptibles a este fármaco (predominantemente vía topoisomerasa II α) así provocando un efecto agonista entre ambas tanto la toxicidad como la eficacia antitumoral de la doxorubicina. Otra de las propuestas es que la doxorubicina aumenta la producción de ceramidas dentro de la célula (parte superior izquierda) lo que conduce a la traslocación del factor de transcripción CREBL1 desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi. Dos proteasas están presentes (S1P y S2P) que cortan después a la proteína CREBL1, posteriormente su fragmento amino-terminal migra hacia dentro de la célula, donde actúa como un factor de transcripción para activar el locus CDNK1A y algunos genes adicionales (parte inferior derecha)

Por último, esto conduce al incremento en la expresión de la proteína p21 además de otras proteínas que inhiben la proliferación en un tumor celular

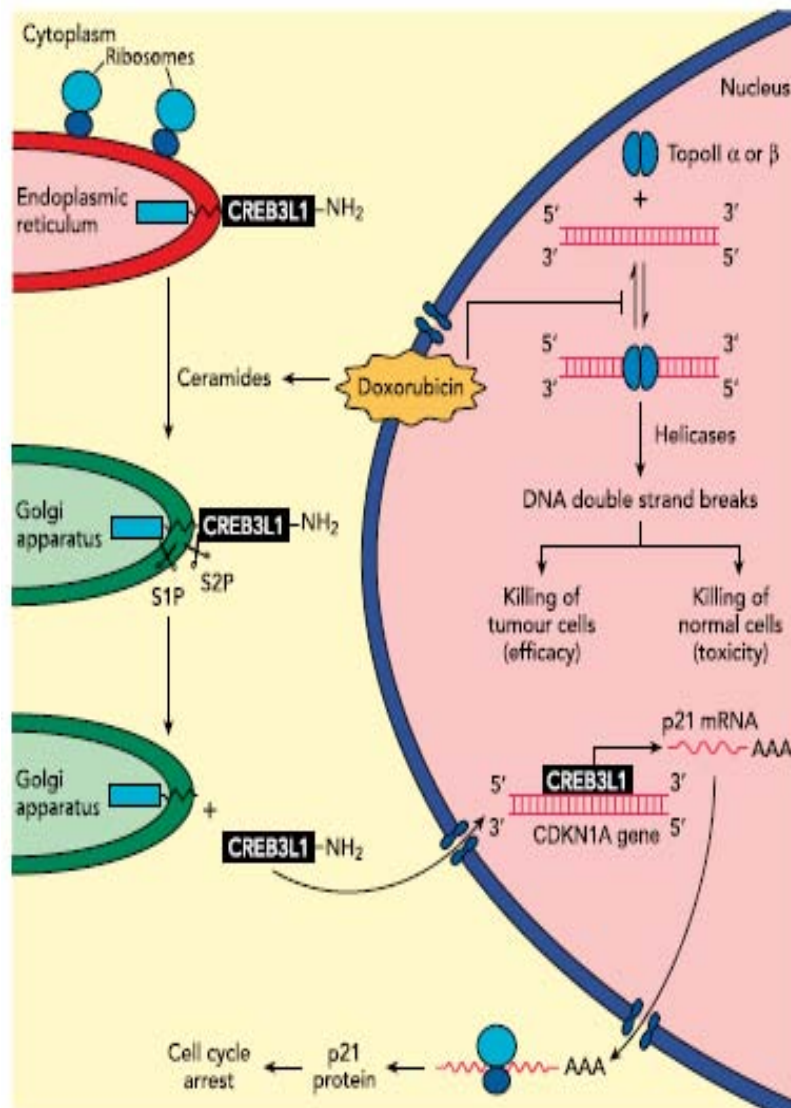


Figura 13. Mecanismo de acción de Doxorubicina

1.10.3 Farmacodinámia.

La doxorubicina es metabolizada por aldocetoreductasas dependientes de NADPH, presentes principalmente en hígado, riñón y eritrocitos, dando como producto principal el doxorubicinol que presenta propiedades antineoplásicas e hidrofílicas. Aun cuando no está del todo esclarecido, este metabolito principal se cree que también es el responsable de la mayoría de los efectos cardiotóxicos que presenta dicho fármaco. Existen también agliconas, metabolitos secundarios no solubles o pobremente solubles en agua, son también inactivos desde el punto de vista

terapéutico, se forman en los microsomas por citocromos reductasas dependientes de NADPH.⁶¹

1.10.4 Farmacocinética.

La doxorubicina administrada vía intravenosa, se distribuye rápidamente por todo el tejido corporal. Presenta metabolismo principalmente hepático que es donde se produce el ya mencionado metabolito principal, doxorubicinol y demás derivados. Del 74-76% se une a proteínas plasmáticas independiente a la concentración plasmática, mientras que solamente el 5% de la dosis administrada es excretada por orina en un periodo de 5 días posteriores. La doxorubicina es capaz de cruzar la barrera placentaria, pero incapaz de cruzar barrera hematoencefálica.⁶²

1.10.5 Advertencias del uso de Doxorubicina.

La doxorubicina no debe ser administrada vía subcutánea o intramuscular, por lo que es un fármaco intravascular estricto, esto es debido a que se sabe que la extravasación puede provocar necrosis en los tejidos periféricos.⁶³

La doxorubicina provoca cardiotoxicidad cuya forma más severa se llama insuficiencia cardiaca congestiva grave (CHF por sus siglas en inglés) la cual se presenta de meses a varios años después de haber recibido el tratamiento. El riesgo de padecer CHF se potencializa cuando existe acumulación de dosis de doxorubicina en el orden aproximado de 400 mg/kg, además del tratamiento concomitante con otras antraciclina o antracetodionas que de igual forma son cardiotóxicas⁶⁴. El mecanismo de acción de dicha cardiotoxicidad no se conoce con exactitud, pero, se cree está relacionada directamente con la producción de radicales libres por la formación de complejos hierro-antraciclina, el corazón es muy sensible a éste tipo radicales libres⁹³.

El tratamiento con doxorubicina puede causar mielosupresión, por lo que la dosis en pacientes con falla hepática debe ser reducida y siempre supervisada por un experto.⁶⁵

La terapia con doxorubicina siempre trae como consecuencia alopecia completa, por lo que los pacientes deben siempre ser avisados de eso, sin embargo, el crecimiento del cabello se presenta hasta 2-3 meses después de haber discontinuado la administración de doxorubicina.⁶⁶

1.10.6 Vía de administración.

La dosificación depende del tipo de tumor, de la función hepática y de la quimioterapia concurrente.⁶⁵ El uso de doxorubicina debe limitarse a las unidades especializadas en la administración de quimioterapia citotóxica y debe administrarse exclusivamente bajo la supervisión de un médico con experiencia en el uso de quimioterapia.⁶⁴

La doxorubicina debe administrarse de manera intravenosa, sin embargo, en todo momento debe supervisarse que no haya extravasación ya que puede producir de irritación hasta necrosis en los tejidos circundantes.⁶⁴

Cuando la doxorubicina se utiliza en combinación con otros fármacos quimioterapéuticos la dosis usual es de 40-60 mg/kg cada 21-28 días y se propone que también se utilice cada 21 días en dosis de 60-75 mg/kg. En todo momento se recomienda que los pacientes que presentan insuficiencia de médula ósea, debido a agentes multifactoriales se les administre las dosis más bajas.⁶⁴

2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Materiales para la síntesis de nanopartículas magnéticas.

Las sustancias utilizadas fueron grado reactivo y ninguna purificación extra fue realizada. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, TEOS (tetraetil ortosilicato), EGDMA (etilenglicol dimetacrilato), alcohol alílico, ácido metacrílico de Aldrich Co, NH_4OH y HNO_3 de la marca JT Baker S.A de C.V., AIBN (azobisisobutironitrilo) de Akzonobel, doxorubicina de Merck, Etanol 98.75%, acetonitrilo de PROQUIFIN y mediante el equipo Nanopure Diamond se obtuvo el agua deionizada.

2.2 Materiales para el estudio hemorreológico.

Reómetro de esfuerzos controlados ARG2 (TA Instruments) con geometría de cilindros concéntricos. Sangre con anticoagulante extraída mediante punción cardiaca de ratas con alto contenido de colesterol. Software de análisis de datos "Data Analysis" versión 5.2.2.

2.3 Materiales para la caracterización de nanopartículas.

Zetasizer ZEN3600 Malvern Instruments[®], con software incluido. Cubetas de poliestireno de capacidad 0.750 mL, para uso con solventes hidroalcohólicos, agua deionizada para el enjuague de solventes.

Termobalanza TGA/SDTA 851^o METTLER TOLEDO, cuyas condiciones fueron atmósfera de N₂, velocidad de calentamiento de 10°C/ minuto de 20°C a 600°C.

2.4 Materiales para la extracción de sangre con alto contenido de colesterol.

Cinco ratas Wistar macho, alimentadas con una dieta de 6.5%⁶⁷ de contenido de grasa, Formulab diet 5008 de Purina[®] más grasa mixta agregada. Éter anhidro utilizado como anestésico. Sangre con y sin anticoagulante obtenida con la colaboración y apoyo del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Centrífuga para la determinación del hematocrito.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se sabe que la reología de los fluidos biológicos es compleja, en particular, la sangre ya que tiene propiedades de tanto un líquido adelgazante en pruebas de cizalla simple, y presenta comportamiento pseudo sólido en pruebas de flujo oscilatorio¹⁰⁻¹⁴.

Algunos de los de los elementos de la sangre que influyen directamente en las propiedades reológicas son: la concentración de lípidos en particular colesterol y el hematocrito. Resulta de sumo interés estudiar las propiedades de la sangre con colesterol, ya que cuando se excede la concentración de éste se presentan una serie de complicaciones sistémicas y tiene gran prevalencia en la población³⁸.

Por otro lado, las partículas sintetizadas en este trabajo se sitúan dentro de la escala nanométrica biológica de interés, por mencionar sólo algunos: célula (10-100 nm), virus (20-450 nm), proteína (5-50 nm) y un gen (2 nm de ancho por 10-100 nm de longitud). Además, pueden ser funcionalizadas con moléculas que les permitan llegar a su destino con más precisión. Otro aspecto importante a considerar es que son partículas magnéticas, lo que significa en teoría que pueden ser manipuladas por un campo magnético exterior. Dichas características las hacen de gran interés y de amplio estudio desde varias décadas a la fecha.^{26, 85-90}

Al ser básicamente una suspensión de nanopartículas, el sistema de liberación modificada sintetizado en este trabajo, resulta de gran interés su caracterización. Otro factor a considerar para la estabilidad de la suspensión es el tamaño de partícula, ya que entre más grande es la partícula más rápido tiende a flocular

además de formar estructuras, además de la penetrabilidad que pueda o no tener en tejidos profundos cuando sea administrado en torrente sanguíneo.²⁷

Por lo anterior, es de gran interés estudiar el comportamiento mecánico al flujo como parte elemental en la caracterización de nanopartículas como sistema de liberación modificada de fármacos. En este trabajo se estudia, el caso particular de nanopartículas improntadas con doxorrubicina y aplicadas en sangre con altos contenidos de colesterol. Se estudia el caso de la doxorrubicina por ser una buena molécula molde para este tipo de nanopartículas y por la trascendencia que podría tener este sistema de liberación modificada en el tratamiento para posible cáncer de colon en un futuro^{1, 4, 5,33}.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de las propiedades macro y micro estructurales de sangre con hipercolesterolemia cuando se agrega un agente terapéutico nanoparticulado con y sin doxorrubicina, con el fin de elucidar el cambio en dichas propiedades.

4.2 Objetivos particulares.

1. Sintetizar las nanopartículas magnéticas (NM) empleando el método de coprecipitación. Para obtener los núcleos magnéticos de hierro.
2. Funcionalizar con TEOS (tetraortosilicato) por hidrólisis simple en medio acuoso básico. Obtener un recubrimiento de apto para la polimerización con acrilatos.
3. Recubrir las NM funcionalizadas con acrilatos para obtener la matriz de polimerización apta para ser molecularmente improntada.
4. Realizar estudio de adsorción- desorción de las nanopartículas sintetizadas con el fin de cuantificar la Doxorrubicina hormada por cada gramo de nanopartícula sintetizado y de ésta manera ajustar la dosis para administración en ratas.
5. Realizar la caracterización de cada lote de nanopartículas, además de la sangre liofilizada mediante análisis termogravimétrico.
6. Estudiar el efecto que tiene cada lote de nanopartículas sintetizado sobre la reología de la sangre.

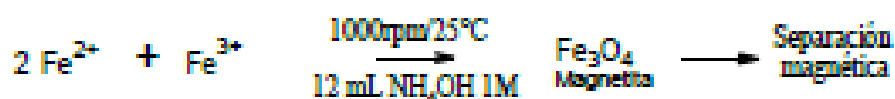
5 HIPÓTESIS.

Si la sangre de rata con niveles elevados de colesterol modifica sus propiedades reológicas, ésta se podrá analizar en función de los procesos de formación y destrucción de la estructura interna debido a los mecanismos de relajación, cinéticos y difusivos. Las nanopartículas magnéticas administradas para cada muestra son de naturaleza diferente, por lo que modificarán las propiedades reológicas de la sangre dependiendo directamente del tipo de interacción física entre las nanopartículas funcionalizadas con los componentes de la sangre.

6 MÉTODOS.

6.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de magnetita (NM).

En un matraz Erlenmeyer, se colocaron 1.081 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.02 moles de Fe^{3+}) y, 0.397 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.04 moles de Fe^{2+}) en 25 mL de agua desionizada, agitando magnéticamente a 1000 rpm y 25 °C, se adicionaron 12 mL de NH_4OH 2M y se mantuvo a agitación durante 5 minutos; pasado este tiempo se decantó el sobrenadante mediante una separación magnética con imanes de Neodimio de 14000 Gauss, el precipitado se lavó con 20 mL de agua. Posteriormente, se adicionaron 20 mL de HNO_3 1M agitando en las mismas condiciones por 10 minutos. La concentración de nanopartículas y la eliminación de HNO_3 , se llevó a cabo por filtración tangencial en el equipo Labscale TFF Systems, utilizando membranas Pellicon PLCGC10 marca Millipore de 10 kDa, equivalentes a un tamaño de partícula de 6 nm. Una vez concluido lo anterior se secaron a temperatura de 80-85°C por 24h a presión baja.



Ecuación 8. Síntesis de ferrofluido a partir de Fe^{2+} y Fe^{3+} en medio acuoso alcalino.

6.2 Funcionalización de nanopartículas magnéticas con TEOS. (NMS)

Se colocaron 100 mg de nanopartículas magnéticas en un vial, se adicionaron 1.6 mL de NH_4OH al 28%, 1.3 mL de H_2O y se llevaron a 20 mL con etanol, se sonicó la mezcla por 30 minutos, se adicionaron 20 μL de tetraetil ortosilicato (TEOS), se agitó a 1000 rpm/24h, pasado este tiempo se decantaron magnéticamente las

nanopartículas se neutralizaron con HCl 0.1M, se lavaron 6 veces con 5 mL de etanol y se secaron en una parrilla a 60 °C.¹

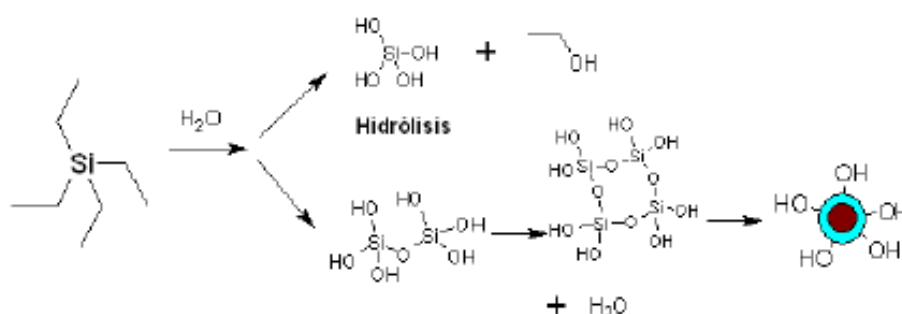


Figura 14. Funcionalización con TEOS de las nanopartículas magnéticas, tomada de Salas et. al.¹

6.3 Recubrimiento polimérico por Impresión Molecular sin doxorubicina como molécula molde (NMSP)

Se colocaron 100 mg de NMS en un matraz de dos bocas, se adicionaron 5 mL de etanol, se sonicaron por 15 minutos, se adicionaron 20 µL de ácido metacrílico, se llevaron a 20 ml con etanol, se agitó la mezcla magnéticamente por 2 horas. Pasado este tiempo se decantaron magnéticamente las nanopartículas, se lavaron con etanol se resuspendieron en 5 mL de acetonitrilo, se sonicaron por una hora, se adicionaron 6 mL de alcohol alílico, 170 µL de EGDMA, 10 mg de AIBN, ésta mezcla se purgó con N₂ durante 10 minutos, posteriormente se agitó magnéticamente a 60 °C por 48 horas. Al finalizar se lavaron las NMSP con acetonitrilo 20 mL tres veces, se secaron a 50 °C a baja presión en desecador.¹

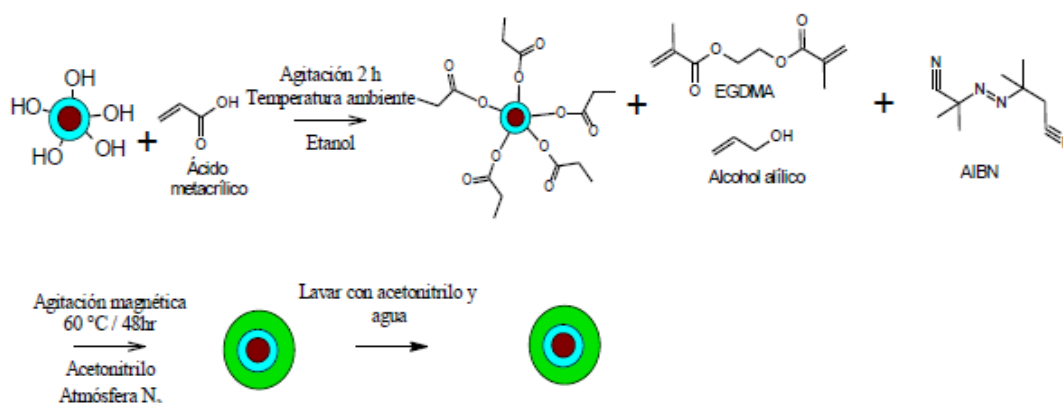


Figura 15. Síntesis de MIP sobre las nanopartículas funcionalizadas con TEOS, tomada de Salas et. al.¹

6.4 Recubrimiento polimérico por Impresión Molecular utilizando doxorubicina como molécula molde (NMSPD)

Se colocaron 100 mg de NMS, se adicionaron 5 mL de etanol en un matraz de dos bocas, se sonicaron por 15 minutos, se adicionaron 20 μL de ácido metacrílico, se llevaron a 20 mL con etanol, se agitaron magnéticamente por 2 horas. Pasado este tiempo se decantaron magnéticamente, se lavaron con etanol. Se resuspendieron en 5 mL de acetonitrilo, se sonicaron por una hora, se adicionaron 6 mL de alcohol alílico, 170 μL de EGDMA, 10 mg de AIBN, 60 mg de doxorubicina, se purgó con N_2 durante 10 minutos. Posteriormente, se agitó la mezcla a 60 $^\circ\text{C}$ por 48 horas. Al finalizar se lavaron con acetonitrilo y se secaron a 50 $^\circ\text{C}$. Una vez secas se procedió a remover la molécula molde utilizando una disolución 0.1M de NaOH, agregando 10 mL en un vial y 100 mg de NMSPD. Se agitó por 10 minutos, se separaron magnéticamente las partículas, se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 495 nm, este procedimiento se realizó 10 veces hasta que ya no había presencia de doxorubicina, se enjuagaron con 10 mL de agua. Finalmente, se secaron a 50 $^\circ\text{C}$ a baja presión.¹

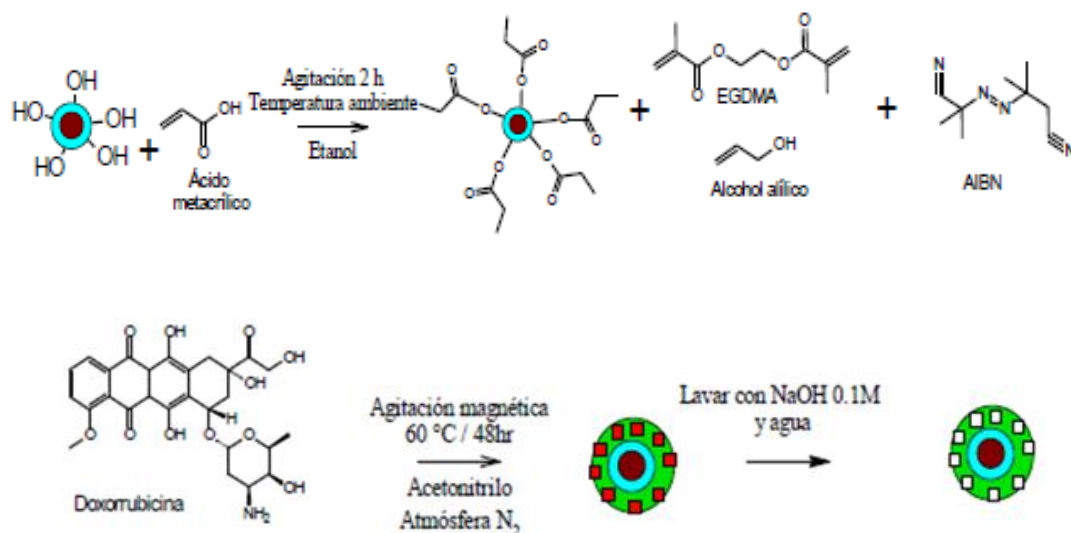


Figura 16. Síntesis de MIP utilizando doxorubicina como molécula horma, tomada de Salas et.al.¹

6.5 Tamaño de partícula y potencial zeta.

En un equipo Nanosizer ZEN3600 con láser rojo de 633nm, se midió potencial Zeta mediante la técnica de velocimetría láser Doppler y tamaño de partícula mediante la

técnica de dispersión dinámica de luz preparando una disolución con una concentración de 0.012mg/mL

6.6 Espectroscopía infrarroja (IR)

A manera de cita bibliográfica ¹ se incluye el método: Se realizó IR con Transformadas de Fourier a las partículas obtenidas en los diferentes pasos de síntesis en el equipo Spectrum 400 de Perkin mediante la técnica ATR (reflectancia total atenuada) utilizando las nanopartículas en polvo. Es importante mencionar que en ésta misma cita se incluye un estudio hecho por el mismo autor donde se hace la caracterización de las mismas muestras pero por la técnica de difracción de rayos X de polvos, obteniéndose una caracterización de las mismas nanopartículas congruente con lo citado por otros autores y de ésta manera determinando que la síntesis de las dichas nanopartículas fue exitosa.

6.7 Estudios de adsorción.

En un vial se adicionaron 10 mg de partículas, 10 mL de solución 3×10^{-4} M de doxorubicina, se agitaron magnéticamente a 900 rpm y 25 °C. Para determinar la cantidad de fármaco adsorbida se separaron magnéticamente 2 mL de la mezcla, se centrifugaron por 30 minutos a 15000 rpm, se midió la absorbancia a 495 nm. Al terminar esto, se resuspendieron las nanopartículas centrifugadas y se regresó la muestra a la mezcla.¹ Éste estudio se realizó con la finalidad de cuantificar la cantidad de doxorubicina adsorbida por gramo de nanopartícula, no se resolvió a hacer isothermas porque no se realizaron estudios que describan capacidad de unión u homogeneidad en el polímero que implica determinación de constantes cinéticas³. El método anterior se repitió con cada una de los lotes de nanopartículas, a saber, NM, NMS, NMSP y NMSPD.

6.8 Dieta de Ratas.

Se estudió un único grupo de ratas que fueron alimentadas bajo una dieta con alto contenido de grasa, que consistió en dosificar FormuLab Chow 5008 de Purina® con 6.5 % de grasa y a este a su vez se adicionó grasa mixta vegetal en una proporción de 300 g/ 1 kg de alimento. El consumo de dicha dieta fue controlado y supervisado, es decir, el contenido de alimento fue pesado además de que el agua fue proporcionada *ad libitum*. Con lo que respecta al espacio de ubicación de las ratas,

fueron colocadas en el área de prueba en la unidad de constatación de la FMVZ de la UNAM, a temperatura controlada de 18-20°C con ciclos de luz y oscuridad de 12 h.

6.9 Administración de quimioterapia.

El método de referencia para la administración de la quimioterapia en ratas es inyección intravenosa por la vía de la vena safena.⁶⁸ Los animales fueron anestesiados con éter anhidro, fueron ubicados en un cepo para ratas y después de ubicar anatómicamente la vena safena se rasuró el área y desinfectó con etanol se aplicó xileno para promover la vasodilatación así como ácido pícrico para marcar correctamente a las ratas. En seguida se canalizaron con jeringas de 2mL y el sistema BD punzocat[®] calibre 20. Después, la dosis ajustada de quimioterapia fue administrada lentamente de 30-45 min por rata. Al finalizar, las ratas fueron puestas en jaulas acondicionadas para su recuperación, fueron monitoreadas para observar principalmente inflamación, necrosis o dolor en la zona de administración.

6.10 Obtención de la sangre.

Se extrajo sangre mediante una punción cardíaca extrayendo más del 10% de la volemia de cada rata, administrando oportunamente eutanasia junto con este procedimiento. La sangre se dividió en dos fracciones, almacenada en tubos con anticoagulante para análisis reológico y sin anticoagulante para determinación de hematocrito.

6.10.1 Determinación de contenido de colesterol.

Se contó con la ayuda de la Unidad de Patología de la FMVZ de la UNAM, para la realización de este análisis. El método de referencia es determinación de colesterol total y determinación de HDL-colesterol.⁶⁹ Para la determinación de colesterol total se utilizan reactivos comerciales que incluyen enzimas y sustratos necesarios para la cuantificación de todas las formas de colesterol presentes en el suero. Para la determinación del colesterol presente en las principales lipoproteínas que lo contienen como HDL y LDL, es necesario primero, la separación selectiva de la lipoproteína correspondiente con agentes precipitantes.

6.10.2 Determinación del nivel de hematocrito.

El método de referencia para la determinación del hematocrito es la centrifugación.⁷⁰ Cuando se llenan los tubos capilares hay que tener en cuenta que el extremo opuesto al orificio de llenado de estos permanezca seco. Para determinar el hematocrito se llenarán los tubos capilares hasta un 75% aproximadamente. Se cierra el extremo seco de los tubos con plastilina epóxica. Para ello, los tubos capilares deben pincharse en la masilla de manera vertical hasta que el borde de los tubos capilares toque el fondo de la placa de masilla. Inclinar ligeramente los tubos capilares hacia un lado y sacarlos de la plastilina. Introducirlos a la centrifuga a 10 000 rpm durante 5 min, después hacer las mediciones de cada tubo comparándolo consigo mismo, tomando esto como 100 %.

6.10.3 Análisis Termogravimétrico, TGA.

Para la obtención de los termogramas se utilizó un equipo SDT Q600 de TA Instruments, en una atmósfera de nitrógeno. La temperatura se aumentó a una velocidad de 10 °C/min, de 20 °C a 500 °C. Para esto se contó con el apoyo de la Unidad de Soporte Analítico Interno de la Facultad de Química (USAI).

6.11 Caracterización reológica.

La muestra de sangre se agita dentro del mismo tubo para homogeneizar y se colocan 5 mL dentro de la geometría de cilindros concéntricos del reómetro ARG2 (TA Instruments®) previamente limpio y seco. Controlado desde la interface del reómetro la geometría ubicada en la parte superior del reómetro se hace descender, hasta una distancia de 24 μm . Se hace un barrido de deformación (0-100%) como la variable impuesta, y se monitorean los módulos mecánicos del material (G' y G'') como variable de respuesta para la determinación de la zona de viscoelasticidad lineal (<10 %).

Una vez determinado el porcentaje de deformación en el cual se presenta la viscoelasticidad lineal se realiza un barrido de frecuencia de 1 hasta 300 rad/s, monitoreando los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de la muestra. Posteriormente se hace una prueba de cizalla simple en una ventana de observación de 0.1 hasta 300 s^{-1} . Todos los datos obtenidos de los ensayos, son almacenados para su análisis en el software Data Analysis versión 5.2.2.

7 RESULTADOS Y ANÁLISIS.

7.1 Nanopartículas Magnéticas (NM).

La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo por el método de coprecipitación, que consiste en colocar sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} disueltas en agua, con agitación magnética y posteriormente, provocar una precipitación mediante una base. En este caso se utilizó hidróxido de amonio. Después de 5 minutos se separaron de manera magnética, neutralizando la reacción al final con HNO_3 1 M. El exceso de ácido se elimina mediante la filtración tangencial de las nanopartículas. Obteniendo de éste proceso 640 mg de NM.

7.1.1 Caracterización de las NM.

Después de obtener un $\text{pH}=7$ en el ferrofluido final, se procedió a secar mediante calor hasta obtener un polvo de color negro muy fino. A partir de este polvo se prepararon alícuotas utilizando solución fisiológica PISA inyectable (NaCl 0.9%) como medio de resuspensión obteniendo los siguientes resultados:

La distribución del potencial Zeta para estas partículas (Figura 17) indica que la mayor contribución se encuentra a 12.6 mV y un área de 62.6 %, con este resultado se puede predecir que la suspensión tiende a flocular⁸. Por otra parte, el tamaño de partícula para este sistema (Figura 15), muestra el pico más alto en un valor de 4.9 μm con una intensidad de 74.5% y el pico más pequeño 305.4 nm con una intensidad de 25.5%. Confirma que efectivamente la aglomeración entre las partículas es muy grande, sobrepasando la escala nanométrica aceptable para que se considere una nanopartícula apta como agente terapéutico. Sin embargo, no se puede menospreciar el segundo valor obtenido de 305.4 nm, que clarifica la idea de que efectivamente se han obtenido nanopartículas aptas para su posible aplicación terapéutica.

Los resultados son contrastantes y hasta este momento difieren a lo reportado por Salas *et al*¹, donde el tamaño de partícula reportado mediante la misma técnica, con el mismo tipo de nanopartículas, es de 18.7nm. A pesar de lo anterior, no se considera la síntesis como errónea, lo importante en este punto es que el medio de resuspensión (solución inyectable comercial), es un medio iónico e isotónico adecuado para mantener la tonicidad vascular, la contribución principal al es cambio

de interacción de las nanopartículas de magnetita aglomerandolas al cambiar su potencial Zeta en la superficie (Figuras 17-18).

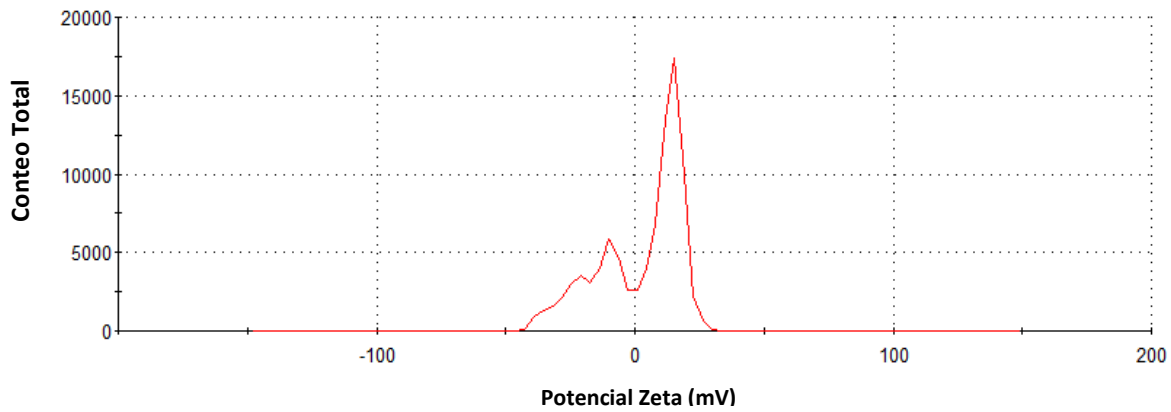


Figura 17. Distribución de potencial Zeta para NM a pH=7.

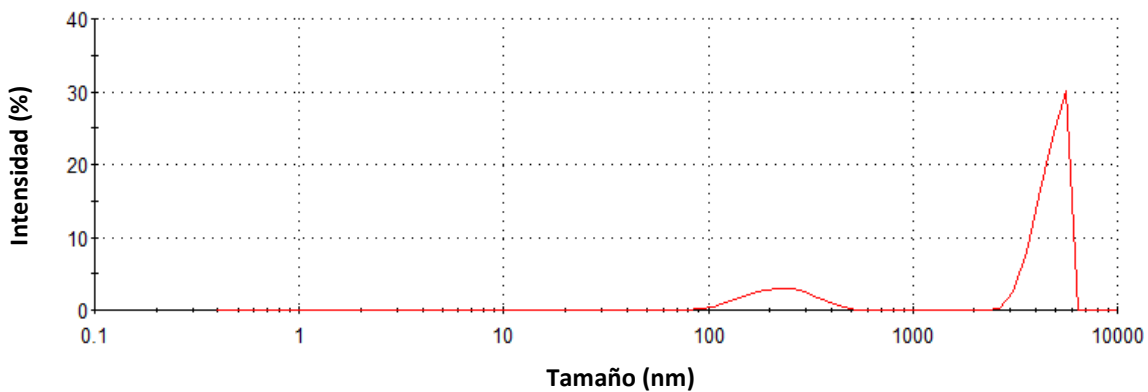


Figura 18. Distribución del tamaño de partícula para NM.

Z average =1029nm y PDI=0.794.

El espectro de IR tomado de referencia ¹ (Figura 19), se muestra de manera ilustrativa, donde se han caracterizado este tipo de nanopartículas con esta técnica. Las bandas características de éstas se muestran en la Figura 19 y en la Tabla 5

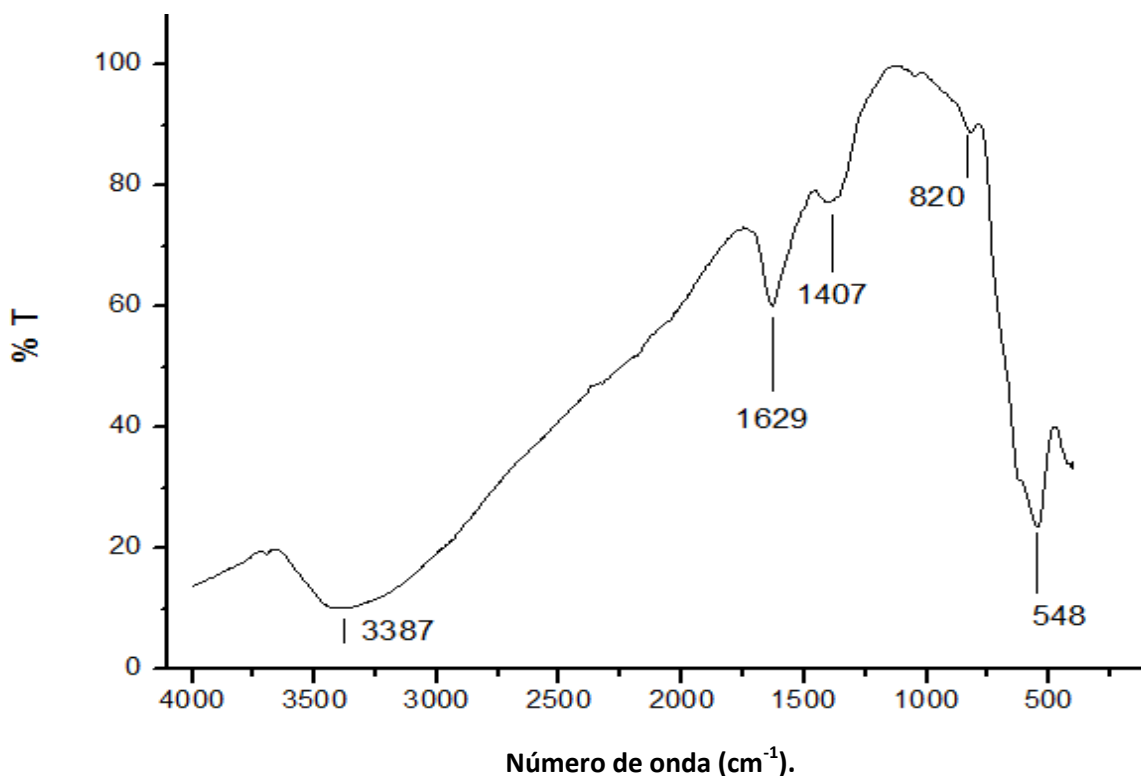


Figura 19. Espectro de Infrarrojo con transformada de Fourier para NM.

Tabla 5. Bandas características del espectro IR para NM.

Banda (cm ⁻¹)	Significado.
548	Vibraciones torsionales de enlaces Fe-O, correspondientes a magnetita y magemita.
1629	Vibración de flexión de H-O-H (adsorción de moléculas de agua)
1407	Vibración de deformación de O-H (adsorción de agua)
3387	Vibración de tensión O-H (adsorción de agua).
820	iones NO ₃ ⁻ adsorbidos.

7.2 Nanopartículas Magnéticas funcionalizadas con Tetraetil Orto Silicato (NMS).

7.2.1 Caracterización de las NMS.

Los resultados de tamaño de partícula obtenidos por DSL y de potencial Zeta, se muestran en las Figuras 20 y 21. El potencial Zeta muestra un valor medio de 10.4

mV y un área bajo la curva de 78.6 %, lo que indica que este sistema es floculado o tiende a la floculación; los valores del tamaño de partícula muestran un solo pico con intensidad del 100% y un valor medio de 141.1 nm que según la referencia Salas *et al*¹, sigue siendo un valor muy alto, a pesar de eso nos indica que es adecuado para uso como agente terapéutico.²²

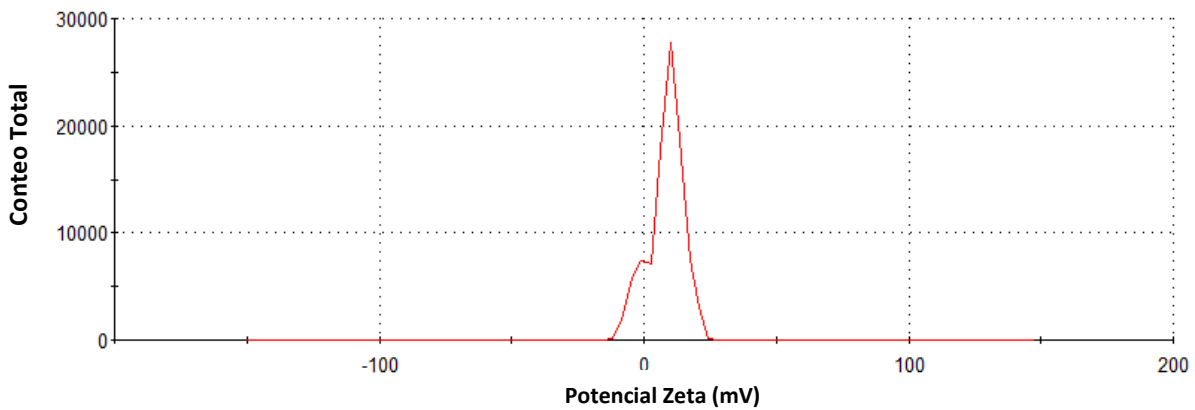


Figura 20. Distribución de potencial Zeta de NMS

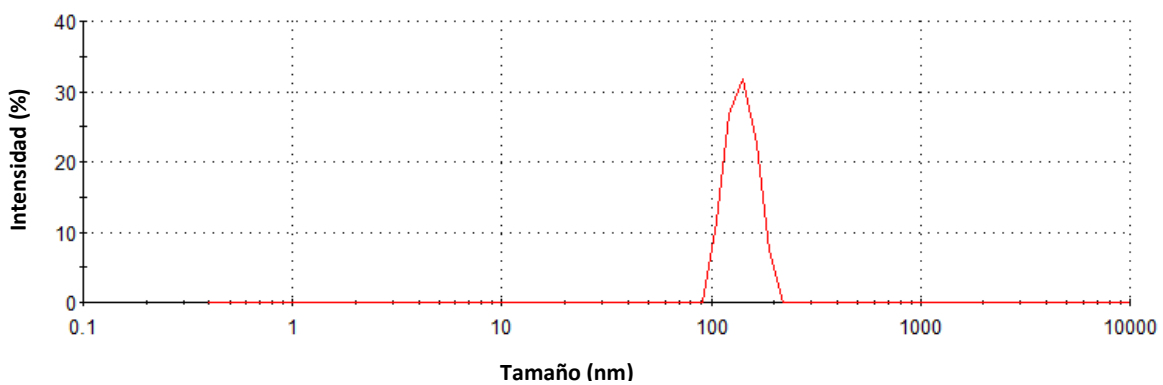


Figura 21. Distribución de tamaño de partícula de NMS.

Z average= 3663nm y PDI= 1.000

El espectro de infrarrojo (IR) se muestra en Figura 22, y su descripción de los grupos funcionales para cada una de las bandas en la Tabla 6.

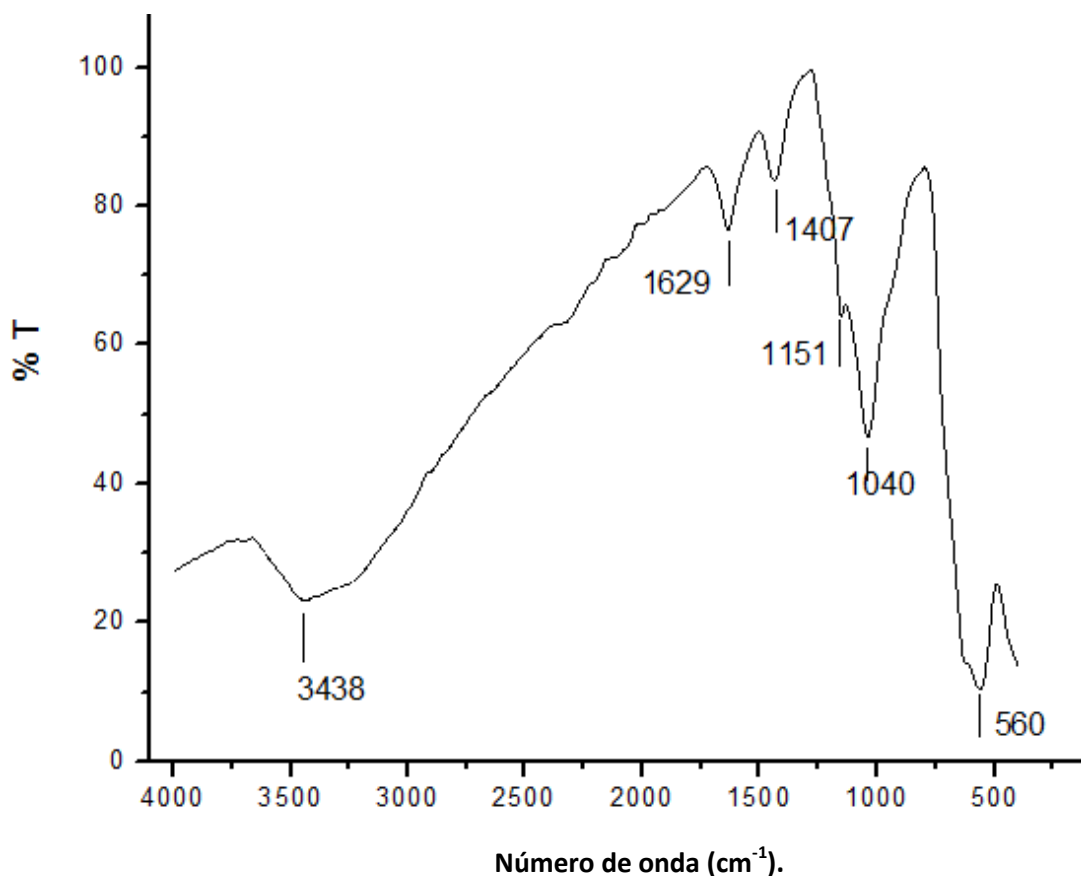


Figura 22. Espectro de Infrarrojo con Transformada de Fourier para NMS.

Tabla 6. Bandas características del espectro IR para NMS

Banda (cm ⁻¹)	Significado
560	Vibración torsional y de estiramiento de Fe-O, magnetita.
1629	Vibración de flexión de H-O-H
1407	Vibración de deformación O-H
3438	Vibración de tensión de O-H
Las últimas tres bandas pertenecen a la adsorción de agua y compuestos orgánicos residuales.	
1040 y 1151	Vibraciones torsionales del enlace Si-O-H y Si-O-Si. Formados en la superficie.

7.3 Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato recubiertas con acrilatos sin utilizar doxorrubicina como molécula hor,a (NMSP).

7.3.1 Caracterización de las NMSP.

Posterior al recubrimiento de las nanopartículas magnéticas con acrilatos, se prosiguió a la síntesis del MIP sobre dicho recubrimiento. Para lograr esto, primero el ácido metacrílico se une a las NMS, el EGDMA funciona como entrecruzador, en este paso la doxorrubicina no se utilizó como molde. Bajo una atmósfera de N₂ y a 60°C, la polimerización se inició con AIBN. Para finalizar, el solvente fue removido con calor y baja presión hasta dejar un polvo a sequedad.

Los resultados de tamaño de partícula por DSL revelan que existen dos poblaciones predominantes, la más grande con un valor de 5.2 µm con intensidad de 50.1% y el segundo con valor de 113.7 nm e intensidad de 49.9 % Figura 23. El primer pico, es indicativo de un sistema floculado o con grandes tendencias a la floculación, como ha sucedido con las otras muestras preparadas.

En lo que respecta a la distribución de potencial Zeta, la Figura 24 muestra que sólo existe un pico con valor de 1.55 mV con un área del 99.9 %, este valor confirma lo anteriormente mencionado en cuanto a la floculación del sistema. Aunque ambos estudios son parte de la caracterización, no son indicativos absolutos de que la síntesis del NIP (polímero no molecularmente impreso) se ha producido, por ejemplo: no se puede hacer una comparación definitiva en cuanto al tamaño de partícula antes y después de la polimerización, que en teoría ⁵⁷⁽¹⁾ debe ser observable con estos indicadores además del estudio TEM respectivo.

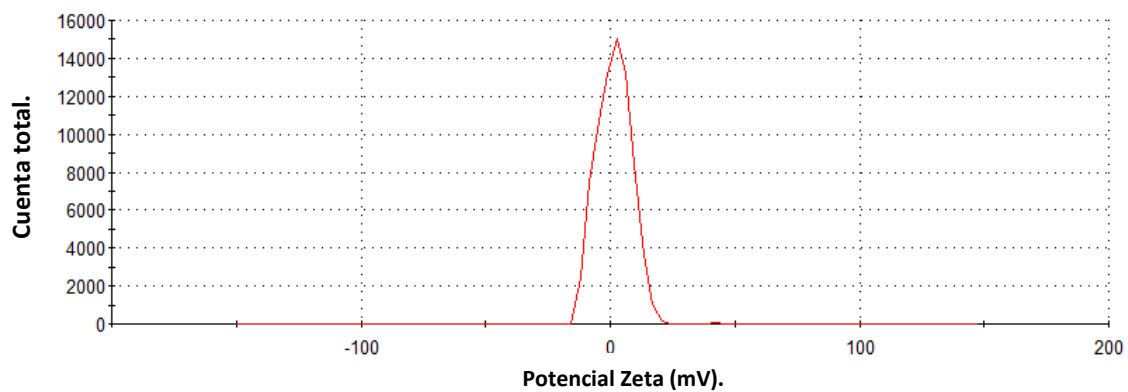


Figura 23. Distribución de potencial zeta para NMSP.

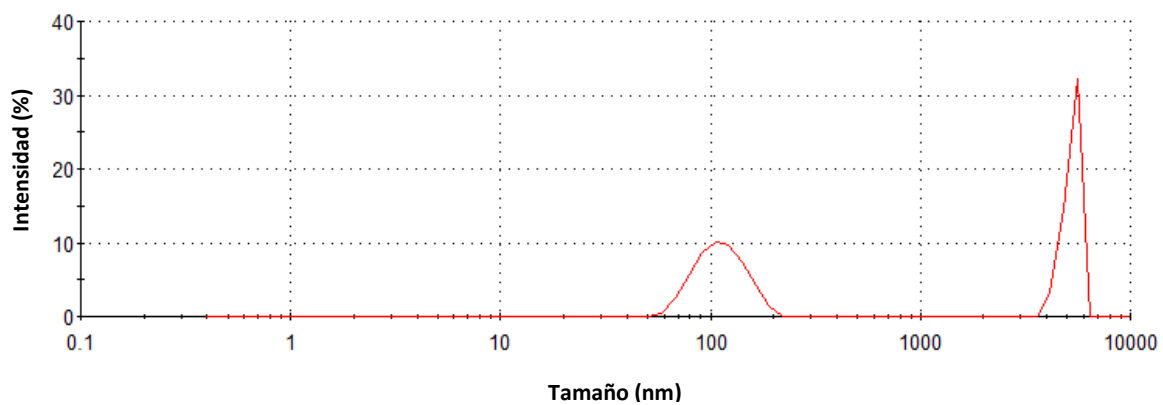


Figura 24. Distribución del tamaño de partícula de NMSP.
Z average= 914 nm y PDI= 0.842

El espectro de Infrarrojo con Transformada de Fourier se muestra en Figura 25 y la Tabla 7, describe cada señal.

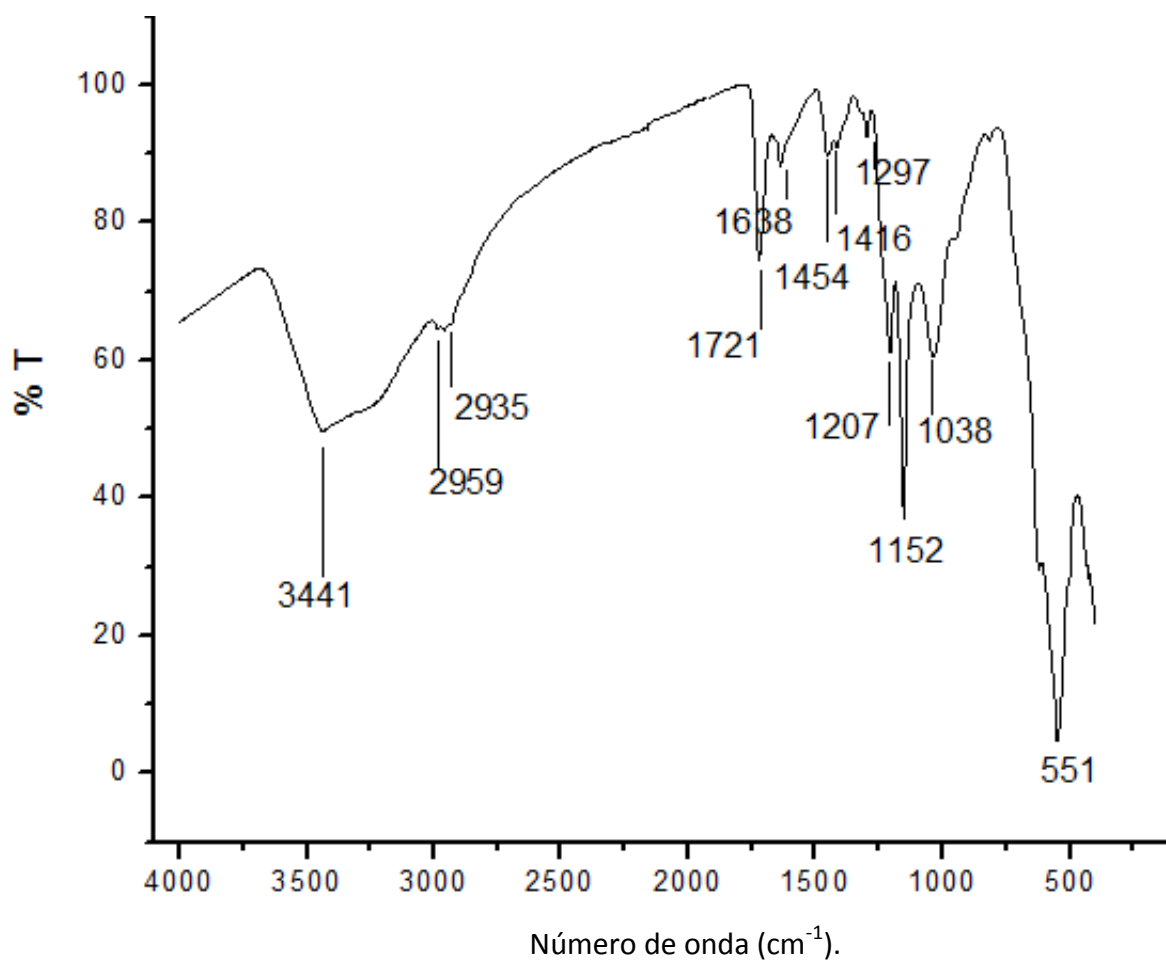


Figura 25. Espectro de Infrarrojo con Transformada de Fourier para NMSP.

Tabla 7. Bandas características del espectro IR para NMSP.

Banda (cm⁻¹)	Significado
3441	Vibración de estiramiento de O-H
2959	Tensión asimétrica –CH ₃
2935	Vibración de tensión asimétrica –CH ₂
1721	Estiramiento del enlace R ₂ C=O de ésteres.
1638	Estiramiento del enlace R ₂ C=O para cetonas.
1454	Vibración de flexión de –CH ₃
1416	Vibración de flexión para –CH ₂ -CO-
1297	Vibración de torsión/estiramiento de carboxilo.
1207	Vibración de estiramiento de R-COO-R
1152	Vibración de estiramiento alquiléster.
1038	Vibración de estiramiento C-OH
1040 y 1151	Presencia de vibraciones de estiramiento Si-O-H y Si-O-Si. En la superficie de las nanopartículas.

7.4 Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato recubiertas con acrilatos utilizando doxorrubicina como molécula molde (NMSPD)

7.4.1 Caracterización de las NMSPD.

Después de la obtención de NMS, se procede a la polimerización del MIP en la superficie, esta vez utilizando la doxorrubicina como molécula molde. Después de la remoción del solvente por lavados y posterior secado por calor, se caracterizan.

Los resultados de distribución de tamaño de partícula por DSL (Figura 26), indican dos picos. El valor más alto es de 4.4 μm con una intensidad de 56.2 % y 131.2 nm con una intensidad de 43.8%. En general, se presenta el mismo fenómeno de aglomeración entre partículas lo que se confirma con el valor de potencial Zeta (Figura 27), 2.59 mV, en su pico más alto. Este valor aunque es indicativo no es confirmativo para considerar este sistema en particular, como floculante, ya que la distribución es bastante más amplia que los casos anteriores. En este caso se

presentan más picos con valores aún más variados. Por ejemplo, existe un valor de 61.3 mV con intensidad de 18.7%, lo que nos da la idea de que efectivamente la interacción interparticular ha cambiado y casi un 20% de la muestra, tiene una tendencia a no flocular, lo que se puede explicar debido al cambio de la naturaleza química de la superficie de las nanopartículas.

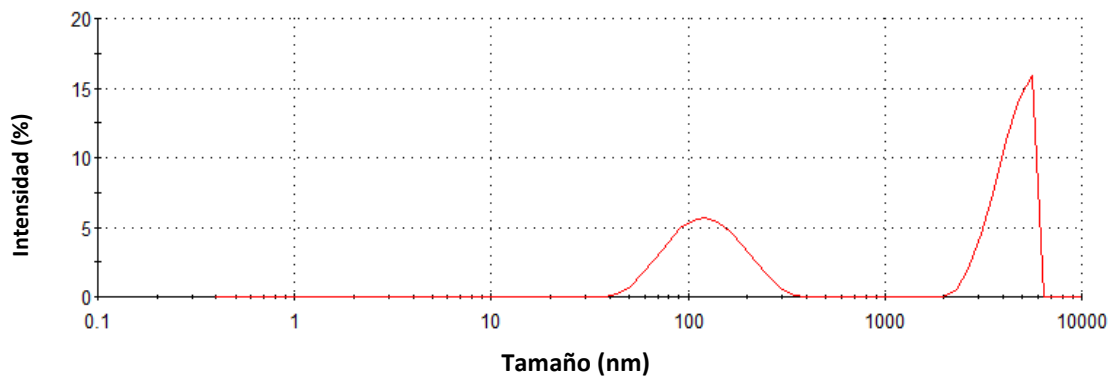


Figura 26. Distribución del tamaño de partícula para NMSPD.

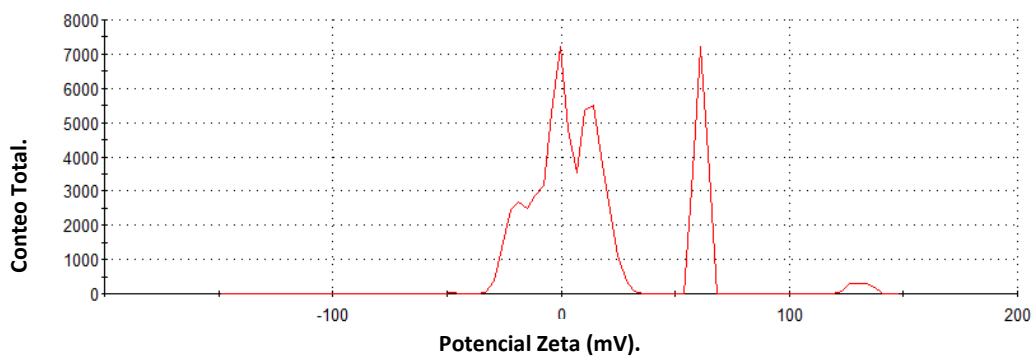


Figura 27. Distribución de potencial Zeta para NMSPD.

Z average = 729.8 nm y PDI= 0.638

La figura 28 muestra el espectro de Infrarrojo para NMSPD mientras la tabla 8 proporciona toda la descripción.

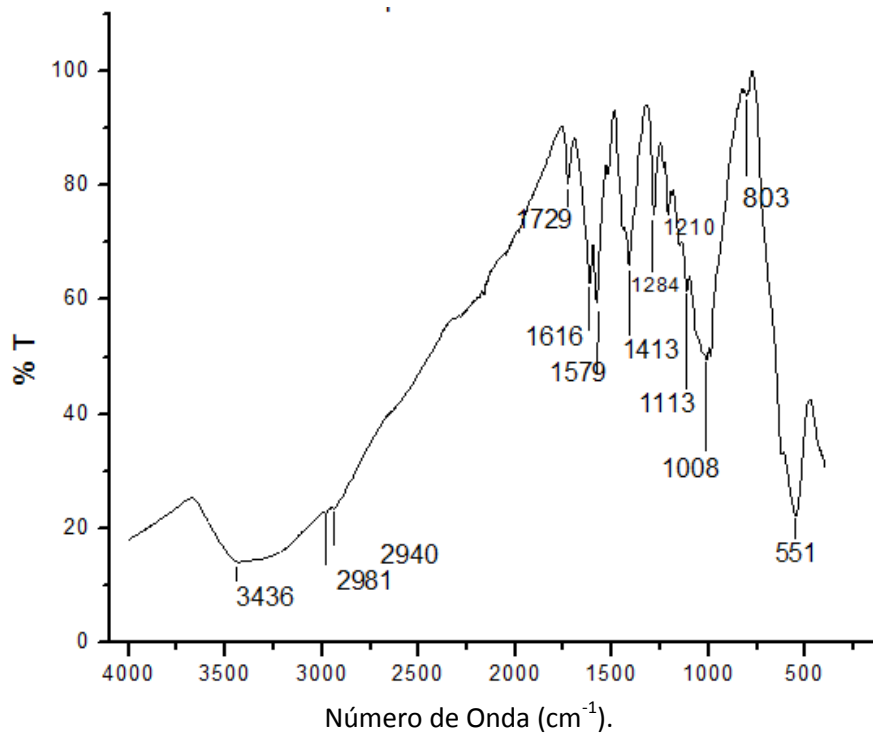


Figura 28. Espectro de infrarrojo con Transformada de Fourier para NMSPD.

Tabla 8. Bandas características del espectro de IR para NMSPD.

Banda (cm⁻¹)	Significado
3436	Vibración de estiramiento del enlace O-H o por estiramiento de -NH ₂ ambos grupos pertenecientes a la doxorubicina.
1616	Vibración de flexión del grupo -NH ₂ , esta banda confirma la presencia de dicho grupo.
2981 y 1579	Vibración de estiramiento para enlace =C-H, que corresponden a anillos aromáticos
803	Banda que pertenece a la doxorubicina, ⁹⁷⁽⁷¹⁾ por lo que se confirma que ésta molécula se encuentra en la nanopartícula.
2940	Vibración de tensión asimétrica en -CH ₂
1729	Vibración del estiramiento del enlace R ₂ C=O para ésteres.
1413	Vibración de flexión -CH ₂ -CO-
1284	Vibración/Estiramiento del carboxilo.
1210	Vibración de estiramiento de R-COO-R
1113	Vibración de estiramiento de alquiléster.
1008	Vibración de estiramiento C-OH
1040 y 1151	Estiramiento de los enlaces Si-O-H y Si-O-Si
551	Vibraciones torsionales y de estiramiento de Fe-O correspondientes a la magnetita. Confirmatorio de la unión sistema polimérico-sistema nanoparticulado.

7.5 Estudio de adsorción de NM, NMS, NMSP, NMSPD y ajuste de dosis.

Antes de realizar este estudio fue necesario lavar las NMSPD con NaOH 0.1 M ya que, debido al proceso mismo de síntesis, estas nanopartículas contaban con la doxorubicina embebida en la matriz polimérica. En términos generales, el estudio tuvo la finalidad de conocer la adsorción de doxorubicina por gramo de nanopartícula y de esta manera, tener un parámetro para el ajuste de dosis por cada tipo de nanopartícula. Este estudio se realizó después de lavadas y secas las nanopartículas obtenidas en las diferentes etapas.

Se colocaron 100 mg de nanopartículas en 100 mL de una disolución acuosa de doxorubicina 3×10^{-4} M, a temperatura ambiente (25°C). Después se procedió con el método de adsorción, descripción en la Figura 29.

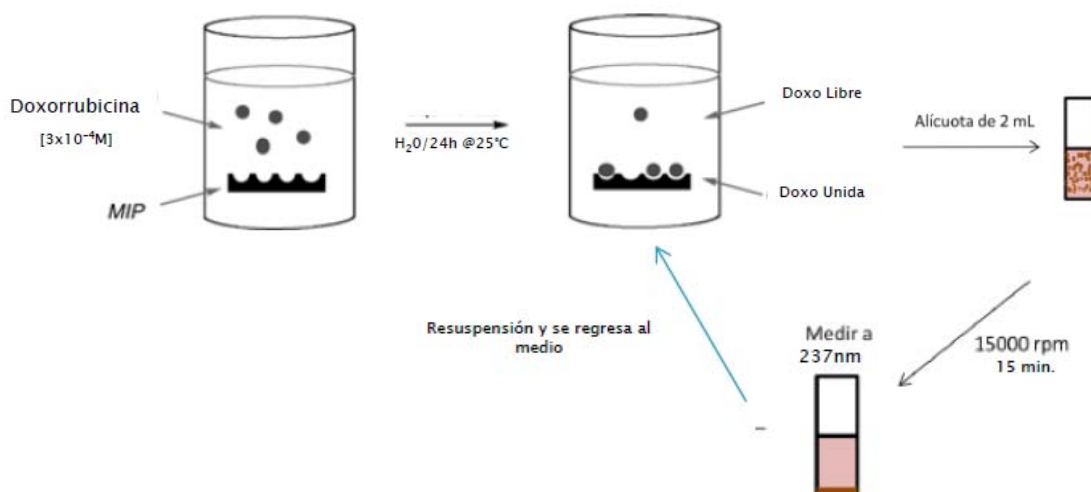


Figura 29. Proceso que se sigue para la toma de muestra en el método de adsorción.

La lectura de adsorción se hizo 24 h posteriores al comienzo del experimento. Con el fin de tener un parámetro de referencia se preparó una curva de calibración (Figura 30) de doxorubicina y a partir de ésta, y las lecturas de absorbancia, se calculó entonces la concentración de doxorubicina residual en cada muestra.

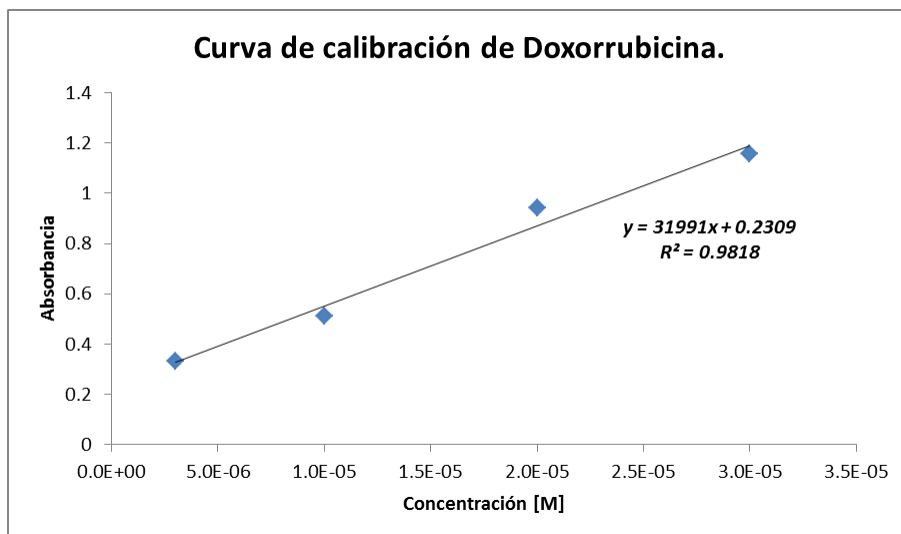


Figura 30. Curva de calibración de doxorubicina, a temperatura ambiente (25°C).

Se muestran los resultados en la Tabla 9 de la absorbancia ($\lambda=237\text{nm}$) para nanopartículas por triplicado, obteniendo un promedio. A partir de este promedio, se calcula la concentración de doxorubicina residual en la muestra.

Tabla 9. Absorbancia ($\lambda=237\text{nm}$) de cada nanopartícula por triplicado.

Nanopartícula	Absorbancia promedio ($\lambda=237\text{nm}$)	Concentración (M)
NM	0.920	2.16×10^{-4}
NMS	0.695	1.45×10^{-4}
NMSP	0.576	1.08×10^{-4}
NMPD	0.394	5.08×10^{-6}

Después de obtener estos resultados y dado que se agregaron 100 mg de nanopartículas, se calcula los mg de doxorubicina adsorbidos/g de nanopartículas y cuyos resultados se muestran a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Adsorción máxima calculada por cada una de los tipos de nanopartículas.

Nanopartículas	mg de doxorubicina/g nanopartículas
NM	484.3
NMS	943.9
NMSP	1058.2
NMSPD	1616.3

Las partículas de magnetita (NM) muestran la menor adsorción del fármaco, como era de esperarse, ya que estas nanopartículas tienen una superficie menos específica y compacta. Las nanopartículas recubiertas con silicatos (NMS), muestran una adsorción mayor de la doxorubicina, esto debido a que el recubrimiento aumenta el área superficial de contacto con el fármaco, además de que la interacción química es más favorable, al formarse grupo silanol sobre la superficie del material (Si-O-H).

Las nanopartículas recubiertas con polímero, sin doxorubicina como molécula molde (NMSP), presentan una adsorción mayor que las recubiertas solamente con silicatos, ya que en este paso de síntesis existen mayor número de moléculas sobre la superficie de la nanopartícula como carboxilato (RCOO⁻) y alcohol (OH) además del ya mencionado silanol (Si-O-H)

Por último, en las nanopartículas recubiertas de polímero, utilizando como molde doxorubicina (NMSPD), presentan la adsorción mayor a las anteriores. Debido por supuesto a que la interacción con el fármaco es específica.

Para el ajuste de dosis de cada tipo de nanopartícula, así como por cada rata en estudio, fue necesario emplear algunas consideraciones posológicas particulares de doxorubicina aplicada en animales, la dosis recomendada para una quimioterapia es de 25 mg/kg⁷. El área superficial de cada animal se calcula con la ecuación 8:

$$\text{Superficie (m}^2\text{)} = \frac{10 \times (\text{kg peso vivo})^{0.66}}{100}$$

Ecuación 9. Calculo de área superficial.⁷

Para la aplicación de la fórmula anterior se pesaron las ratas de estudio y se hicieron los ajustes de dosis según la fórmula, para cada individuo de estudio. En la Tabla 11

se muestran los resultados de peso corporal de cada rata en estudio, alimentado con una dieta con 6.5% de contenido de grasa, así como la dosis de doxorubicina calculada para cada uno de ellos.

Tabla 11. Se muestran los resultados de peso corporal de cada rata en estudio.

Grupo con dieta de 6.5% de grasa.	Peso (kg)	Nanopartículas administradas.	Superficie (m²).	Dosis de doxorubicina (mg)
CONTROL	0.628	--	0.074	--
Rata 1	0.619	NM	0.073	1.8
Rata 2	0.404	NMS	0.055	1.4
Rata 3	0.526	NMSP	0.065	1.6
Rata 4	0.520	NMSPD	0.065	1.6

7.6 Resultados de colesterol y peso de ratas antes de la administración de nanopartículas.

Antes de la administración de las nanopartículas a las ratas alimentadas para desarrollar alto contenido colesterol en sangre se monitorearon, por 105 días, evaluando peso y colesterol cada quince días. Junto con este grupo de estudio se monitorearon otros dos, alimentadas con bajo y con un contenido de grasa normal (3 % y 4.5 % respectivamente) como parte de un estudio paralelo, donde de igual manera se evaluaron propiedades reológicas en sangre de rata. A manera de referencia inicial (antes de administrar nanopartículas) y con el fin de apreciar la evolución en la talla que tuvieron los sujetos de estudio, en la Tabla 12 se muestran los resultados de peso y colesterol total promedio, evaluado durante 105 días previos a la administración de nanopartículas. Existen tres grupos, alimentados con dietas cuyo contenido en grasa es diferente (3%, 4.5% y 6.5%), el grupo de más alto contenido de colesterol fue el utilizado para las pruebas posteriores hechas con nanopartículas. Los resultados resaltados en gris, fueron tomados como datos iniciales al administrar la quimioterapia.

Tabla 12. Resultados de peso y colesterol total promedio, evaluado durante 105 días previos a la administración de nanopartículas.

Tiempo (días)	Grupo 3%		Grupo 4.5%		Grupo 6.5%	
	Colesterol Total (mg/dL)	Peso (g)	Colesterol Total (mg/dL)	Peso (g)	Colesterol Total (mg/dL)	Peso (g)
0	----	364	----	368	----	386
15	46.01	381	44.07	411	51.33	446
30	40.22	397	35.57	396	49.87	445
45	49.88	397	42.92	402	37.12	475
60	57.62	378	67.67	414	66.9	496
75	51.04	398	47.95	437	58.78	517
105	61.1	433	56.46	477	70.38	533

Los resultados anteriores muestran el efecto que tuvo la dieta sobre la talla, en los primeros 30 días muestran disparidades en cuanto al aumento de peso, sin embargo, en los últimos 45 días los resultados son congruentes siendo el grupo alimentado con más grasa el que más crece. Los resultados de colesterol total promedio no muestran la misma tendencia, esto se puede atribuir al metabolismo lipídico propio de las ratas y no a una diferencia en tiempos y formas de alimentación a cada grupo. Dicho metabolismo propio de las ratas fue estudiado por Soler *et al.*⁷² estudio que consistió en alimentar de igual forma a un grupo de ratas con una dieta suplementada con alto contenido en colesterol, los resultados indican claramente cómo los niveles de colesterol total aumentan hasta 20 días después del comienzo de la dieta y después de esos días los niveles dejan de aumentar. Se atribuye principalmente este efecto a la operación de un eficiente mecanismo de homeostasis que contrarresta la sobrecarga de colesterol en la sangre, entre otros efectos notables, ese mecanismo homeostático provoca una mayor redistribución del colesterol en los distintos tejidos. Véase la Figura 31 que ilustra la disección de tejido conectivo. A: Rata alimentada con 3.5% de grasa y B: Rata alimentada con 6.5% de grasa. Nótese el mayor crecimiento de tejido adiposo (zonas más claras en Figura B).

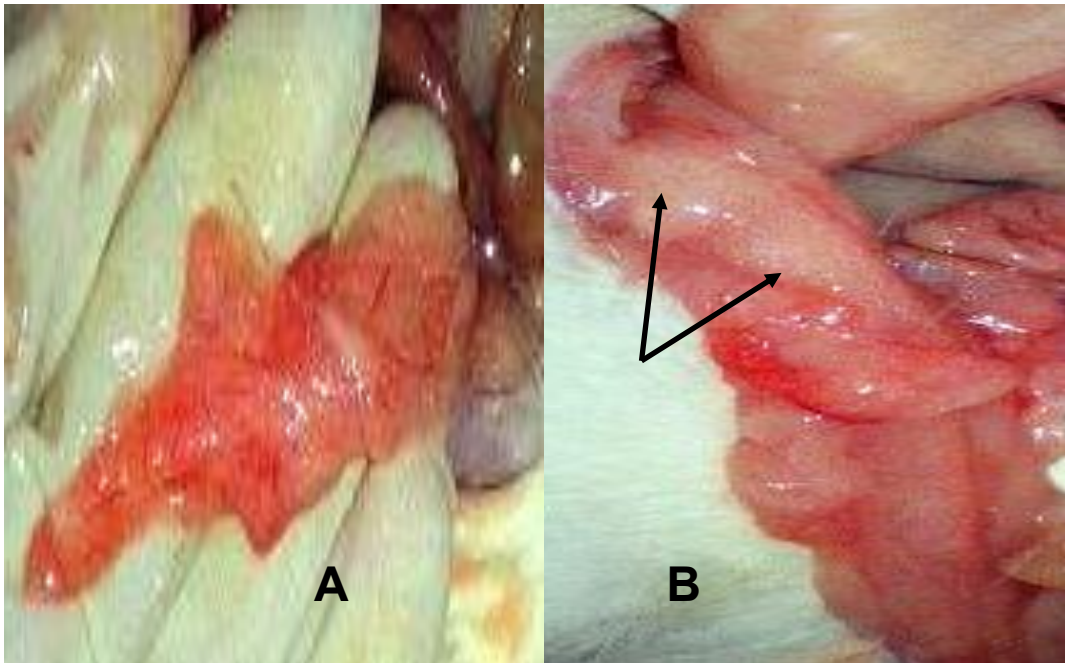


Figura 31. Disección de tejido conectivo.

Aun cuando los resultados sugieren influencia del metabolismo, al día 105 de la evaluación, la tendencia a más grasa en la dieta mayor contenido de colesterol en circulación, es clara y congruente.

7.7 ADMINISTRACIÓN DE QUIMIOTERAPIA Y TOMA DE MUESTRA.

Las nanopartículas fueron resuspendidas en una solución fisiológica comercial PISA (NaCl al 0.9%), con el debido ajuste de dosis según la nanopartícula. La administración de las nanopartículas fue hecha según las recomendaciones para la aplicación de estos fármacos ⁷.

Las ratas, fueron monitoreadas cada semana después de haber sido administradas con el fármaco para buscar principalmente indicios de lesiones que el fármaco por su naturaleza citotóxica puede provocar. En este sentido, en ninguna de las ratas se encontraron inflamaciones, lesiones o necrosis, lo que indica la correcta administración de las nanopartículas determinadas.

En la tabla 13 se muestra las mediciones de colesterol, hechas por la Unidad de Patología de la FMVZ de la UNAM, al término de los 45 días después de la administración de la quimioterapia.

Tabla 13. Mediciones de colesterol por muestra administrada.

Muestra de sangre según el tipo de nanopartícula administrada						
Identificación	Unidades	CONTROL	NM	NMS	NMSP	NMSPD
COLESTEROL TOTAL	mg/dL	60.13	35.57	49.88	33.25	40.98
COLESTEROL HDL	mg/dL	18.94	13.92	21.26	16.24	21.65
COLESTEROL LDL	mg/dL	1.74	6.18	87.39	3.86	ND

Lo primero que es de interés acerca de estos resultados es que, tomando como referencia la rata control, se puede decir que cada uno de los tipos de nanopartículas tuvo efectos en cuanto a la disminución de los niveles de colesterol total. En un estudio hecho por Poveda,⁷³ donde se analizan diferentes perfiles lipídicos en ratas Wistar, la referencia control del valor de colesterol total es de 84.8 ± 4.5 mg/dL. A primera vista parecería que la referencia comparada con el estudio en este trabajo realizado es muy impar, sin embargo, en el trabajo de Poveda *et al.* las ratas en cuestión son alimentadas con una dieta comercial de un 10% de contenido en grasa y las ratas aquí tratadas con una dieta de 6.5%, es decir, casi un 54% más de grasa, además de la diferencia metabólica de las ratas por tratarse de ejemplares más jóvenes (con sólo 80 g de peso) utilizadas por Poveda. Así se puede afirmar que los valores control obtenidos, son valores confiables y buenos para ser analizados en un estudio de esta naturaleza.

El único de los tipos de nanopartículas disminuye menos el colesterol total son NMS, cabe mencionar que durante todo el tiempo de estudio la dieta fue invariable y siempre fue de alto contenido en lípidos. Es aquí en primera instancia, donde se debe centrar la atención en cuanto a las posibles interacciones nanopartícula-colesterol.¹³ De igual forma, se debe poner especial atención en que todas las nanopartículas presentan disminución del colesterol total, lo que pone de manifiesto las interacciones generadas entre nanopartículas-colesterol, y no menos considerables.

7.8 Hematocrito.

El hematocrito es la proporción de eritrocitos en el total de sangre.⁷⁴ Los valores normales del hematocrito dependen del sexo, edad y talla del individuo, además como es de esperarse varían de una especie a otra. A continuación en la tabla 14 se muestra los resultados de hematocrito, según el tipo de nanopartícula administrada en cada una de las ratas.

Tabla 14. Resultados de hematocrito

Nanopartículas administradas	Hematocrito (%)
NM	41
NMS	42.3
NMSP	43.1
NMSPD	39

En un estudio previo realizado por Probst *et. al.*⁷⁵ (2006), se describe las diferencias en los valores hematológicos típicos de ratas en función al sexo, donde reportan que los valores de hematocrito para individuos machos de un peso alrededor de 420 g y 12 semanas de edad están dentro del intervalo de 34-57 %.

En ese estudio, la evaluación del hematocrito es importante para considerar dos fenómenos que se pueden presentar por la administración de las nanopartículas improntadas con doxorubicina: El primero, un descenso del hematocrito debido al efecto citotóxico de la doxorubicina⁷ y el segundo, consecuencia del primero, el efecto en la reología que el descenso de la cantidad de células en sangre pudiera tener.

Al analizar los resultados aquí obtenidos se puede observar que el único descenso importante de hematocrito lo presenta la rata administrada con NMSPD, sin embargo, el valor de 39% está dentro del parámetro referencia. Se puede afirmar que, los efectos citotóxicos de la quimioterapia no fueron suficientes para reducir de manera significativa los valores de hematocrito que influyen en los estudios reológicos presentados posteriormente, por lo que, los cambios reológicos detectables se deben considerar como factores importantes, sólo el colesterol total y las nanopartículas.

7.9 REOLOGÍA.

7.9.1 Pruebas de cizalla simple.

En esta sección se presenta la figura 32 que muestra el comparativo de las muestras de sangre según el tipo de nanopartícula administrada en una prueba de flujo estacionario (cizalla simple), el parámetro principal en esta gráfica es la viscosidad.

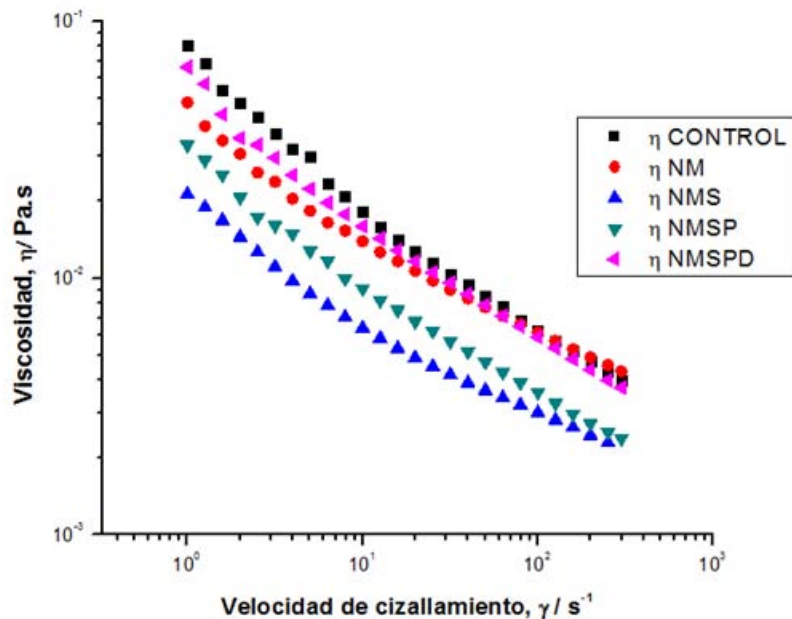


Figura 32. Comparativo de viscosidad según el tipo de nanopartícula administrada.

La muestra control presenta la viscosidad inicial más alta. Esta muestra pertenece a una rata con la misma dieta pero con la obvia falta de administración de quimioterapia. Se espera una correlación entre el contenido de colesterol y la viscosidad de la muestra. A velocidades mayores de 100 s^{-1} , (se esperaría entonces un comportamiento pseudoplástico) hay variaciones visibles en cuanto a la disminución progresiva de la viscosidad. En la zona de altas velocidades de corte, la mayoría de las células y todo lo que en la sangre tenga suspendido se direcciona en sentido de la aplicación de la deformación, es decir, la estructura de los componentes de la sangre están alineados al flujo. Por otro lado, a bajos valores de corte hay mayor interacción y agregación celular en la sangre, promovida por el colesterol o también por la agregación de las nanopartículas entre sí (tal como se presenta en la curvas de esfuerzo de cedencia). Además, el potencial zeta, indica que los sistemas nanoparticulados tienden a la floculación o agregación. El resultado

de la interacción que puedan tener las nanopartículas con el colesterol, resulta de interés al estudiar las curvas de viscosidad al corte simple de las NMS, ya que esta muestra que tuvo la mayor disminución en la viscosidad, contiene el más alto contenido de colesterol entre las muestras con nanopartículas. En un estudio previo realizado por Murashov *et al* (2006)⁷⁶, se reporta la influencia de grupos silanol en la toxicidad de nanopartículas de sílice respirables y se confirma que los grupos silanol expuestos, en ciertas formas de sílice, tienen un efecto hemolítico destruyendo principalmente los eritrocitos. El mecanismo de acción de dicha toxicidad es explicado en otro estudio hecho por Saffiotti *et al* (1994)⁷⁷, observan la presencia y formación de productos altamente reactivos de oxígeno, por espectroscopía infrarroja se demuestra la inducción y destrucción posterior del DNA celular.

Como ya se ha comentado, los resultados de hematocrito son normales según la referencia, por lo que se puede descartar un efecto citotóxico debido a la doxorubicina, sin embargo, se debe considerar el efecto citotóxico de los silicatos en las nanopartículas. De hecho, se ve que no existe alguna relación entre el hematocrito y la viscosidad en la muestra que contiene NMSPD, siendo esta la que presenta un hematocrito más bajo y por lo que, en teoría debe presentar una viscosidad inicial más baja.

7.9.2 Esfuerzo de cedencia.

La Figura 33 presenta un comparativo entre las diferentes muestras, donde se calculó el esfuerzo de cedencia de la sangre con nanopartículas. El modelo de Herschel-Bulkley, H-B (Billmeyer, 1975) es el que mejor se ajusta, presentando en general un error $\leq 5\%$ los valores de esfuerzo de cedencia estimados por H-B, se muestran en la Tabla 15.

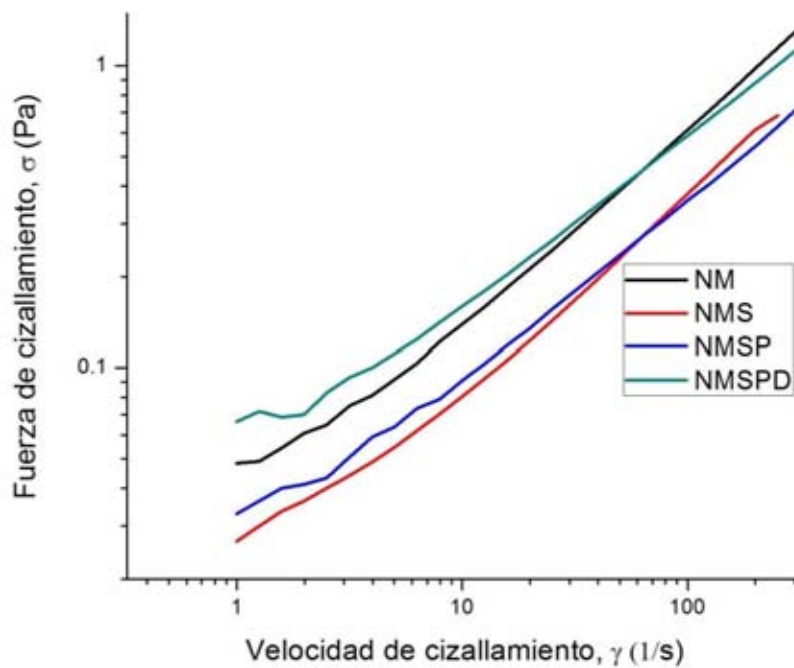


Figura 33. Evaluación del esfuerzo de cedencia (τ_0), mediante el modelo de Herschel-Bulkley.

Tabla 15. Resultados de Esfuerzo de cedencia calculado a partir del modelo Herschel-Bulkley, por muestra.

Esfuerzo de cedencia modelo de Herschel-Bulkley.	
Muestra	τ_0 (Pa)
NM	0.21620
NMS	0.01414
NMSP	0.14140
NMSPD	0.02390

Los resultados indican que, la muestra de sangre con nanopartículas funcionalizada con silicatos tiene un menor valor de esfuerzo de cedencia 0.01414 Pa. Este resultado confirma que el efecto mecánico de los grupos silanol, está sobre la doxorubicina por su efecto citotóxico y hemolítico tal como se explica en el estudio realizado por Nash et. al. (1967) donde se estudia el efecto tóxico de las micro y nanopartículas de asbesto inhaladas que pasan a torrente sanguíneo, y se explica que la permeabilidad de la capa de fosfolípidos se ve favorecido por la interacción fuerte de los grupos hidroxilo (OH) expuestos en la superficie de las partículas (grupos silanol) y la carga neta de los fosfolípidos presentes en la membrana celular

⁹⁴. Así, se abre la posibilidad de que dichos grupos silanol tienen un efecto sobre el colesterol en sangre, pues como se mencionó, dicha muestra es la de mayor contenido de colesterol.

Por otro lado, estos resultados demuestran que las nanopartículas, donde se utiliza la doxorubicina como molécula molde, tienen un esfuerzo de cedencia mayor (0.02392 Pa), congruente con las pruebas de cizalla oscilatoria mostrados posteriormente. Abriendo la posibilidad de que la doxorubicina, al interactuar con el polímero cambia la carga superficial de tal manera (comportamiento pseudo-sólido), que el producto final actúa como un agente espesante en la sangre.

7.9.3 Pruebas de flujo oscilatorio.

Las Figuras 34 a 38 presentan los resultados de las curvas de flujo oscilatorio de pequeña amplitud de deformación (pruebas no destructivas), en las cuales las muestras se deforman un cierto porcentaje dentro del régimen de viscoelasticidad lineal mientras se evalúan los módulos viscoso y elástico (G' y G'') en función de la frecuencia angular. De manera global, se observa un comportamiento viscoelástico, con una contribución mayor de la componente viscosa (G''), lo que sugiere en primera instancia que la sangre no ha formado estructuras que hagan a la misma más elástica que viscosa. Sin embargo, es importante también notar que a bajas frecuencias y/o tiempos largos ambos módulos tienden a ser independientes del flujo (Figuras 36-38), lo que puede sugerir que existe la formación o interacción de estructuras complejas (típico de un comportamiento pseudo-sólido), debidas al contenido de colesterol y la agregación de nanopartículas. Se puede además comentar, que las posibles estructuras de colesterol que se forman, no se deben a la formación de placa arterioesclerótica ya que en el metabolismo propio de ratas se sabe que no desarrollan este tipo de afección.

La Figura 34, muestra la independencia frente al flujo (los módulos no guardan paralelismo a frecuencias bajas de oscilación) señalada en el recuadro, debido a que la muestra es el control, es muy posible que las estructuras que se forman sean interacciones físicas debidas a las células de la sangre (eritrocitos primordialmente) y el colesterol. Éste comportamiento nos refleja que a pesar de que efectivamente hay formación de estructuras internas, sangre-colesterol, éstas son lo suficientemente inestables como para verse afectadas por la oscilación a la que son sometidas.

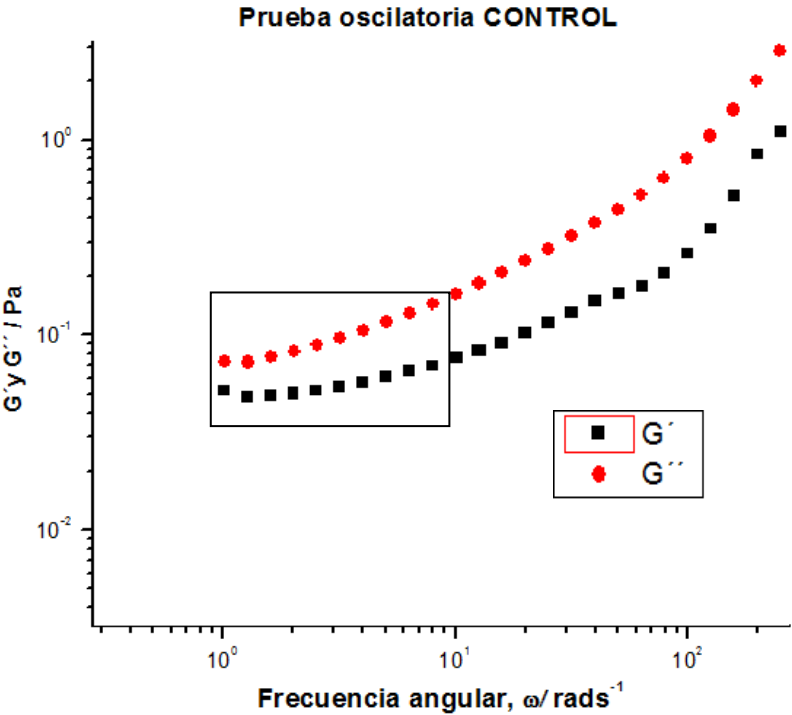


Figura 34. Prueba de cizalla oscilatoria hecha en muestra CONTROL, con colesterol total de 60.13mg/dL.

En la figura 35, bajo el recuadro, se muestra la dependencia del flujo (no hay paralelismo entre los dos módulos), debido al tipo de muestra que se trata, las posibles estructuras que se forman provienen de la interacción entre las mismas nanopartículas y la sangre con nanopartícula (potencial Zeta de 12.6 mV). Siendo dichas estructuras de menor estabilidad, por lo que son influenciadas directamente por la oscilación a la que es sometida.

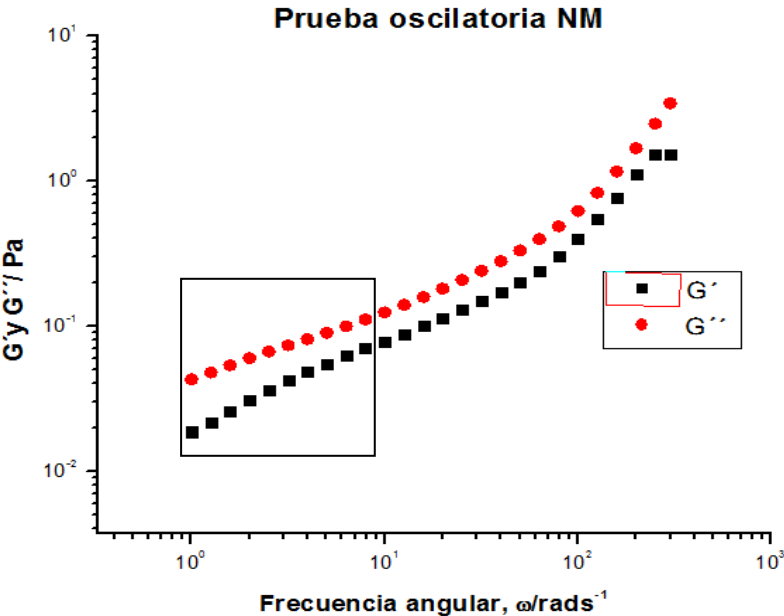


Figura 35. Prueba de cizalla oscilatoria hecha en muestra de sangre con, colesterol total de 35.57 mg/dL.

La Figura 36, perteneciente a la muestra con nanopartículas funcionalizadas con silicatos muestra una independencia al flujo o paralelismo entre módulos (más claramente visible) a bajas frecuencias de oscilación o largos tiempos de observación, lo que indica que en este caso se forman o interactúan estructuras complejas. Éste resultado es congruente con el hecho de que la muestra tiene el mayor contenido de colesterol, resulta interesante observar que a pesar de esto los resultados de esfuerzo de cedencia anteriormente mostrados, presentan el menor valor de τ_0 , o menor esfuerzo de cedencia. Reflejando de esta manera que las posibles estructuras formadas por la interacción entre los grupos silanol expuestos en las nanopartículas y la sangre, no son tan rígidas o son menos estables después de aplicado el esfuerzo de cedencia necesario para que fluya, éste comportamiento es conocido como pseudo-sólido. Siguiendo la evolución de los dos módulos dentro del mismo espectro mecánico, se puede notar de manera clara que hay un punto de cruce a frecuencias angulares más altas, lo que indica y de manera previa confirma que hay un momento en que la sangre se asemeja más a un sólido que a un líquido, debido a una agregación celular y entre nanopartículas.

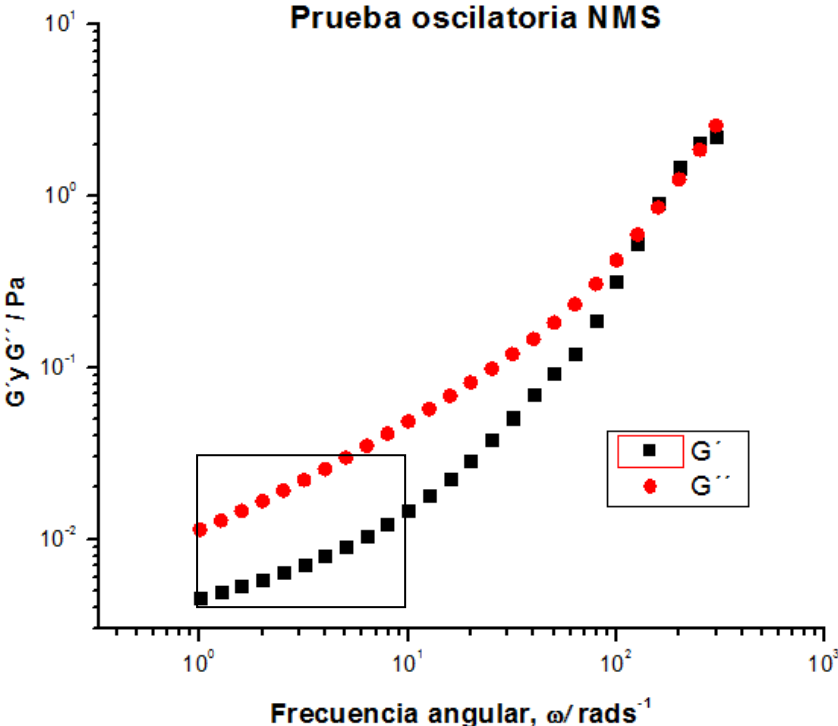


Figura 36. Prueba de cizalla oscilatoria muestra NMS administradas. Colesterol total de 49.88 mg/dL.

La Figura 37, muestra el efecto mecánico sobre la sangre que tiene el recubrimiento polimérico con acrilatos, sin utilizar la doxorrubicina como molécula molde. En el recuadro se muestra la independencia al flujo (paralelismo entre los módulos elástico y viscoso). Una vez más reflejando la interacción o formación de posibles estructuras más complejas, esta vez el colesterol, no contribuye en gran manera ya que como indica la descripción de figura este valor cuantificado fue el menor de todas las muestras medidas, sin embargo, la interacción de la nanopartícula es más visible en éste caso ya que la fuerza en Pa inicial está en el orden de 10^{-2} , valor más alto comparándolo con la muestra de NMS.

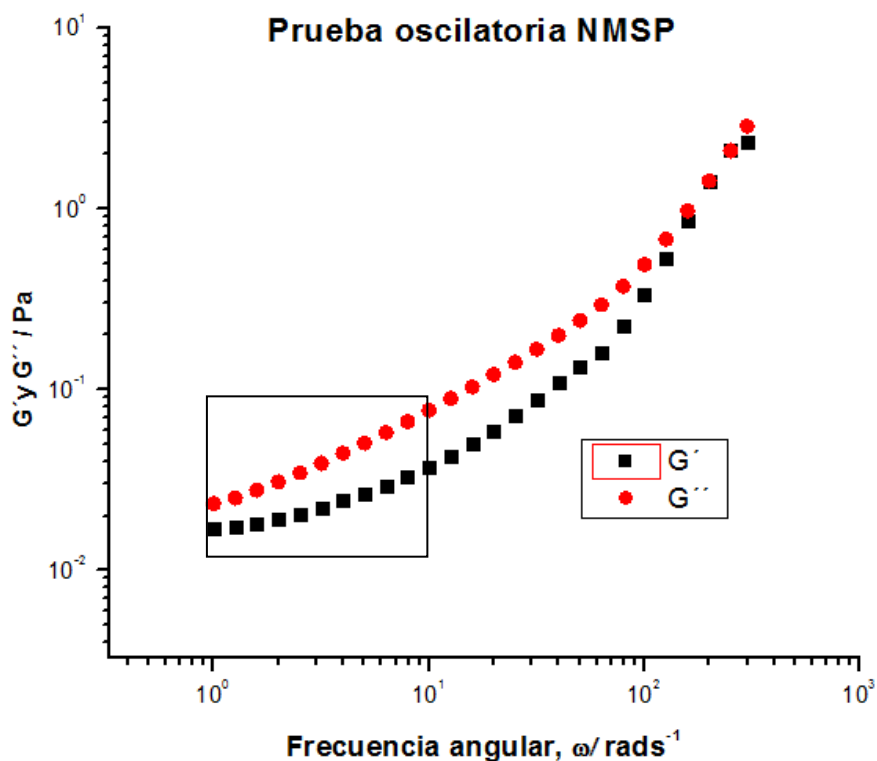


Figura 37. Prueba de cizalla oscilatoria NMSP. Colesterol total de 33.25 mg/ dL (valor más bajo cuantificado).

Por último, la Figura 38 muestra el efecto que tiene la adición de doxorrubicina cuando se utiliza como molécula molde. Según lo que se nota a simple vista, se guarda una independencia con el flujo (existe un paralelismo entre los módulos), al igual que la muestra con NMS y NMSP, esto en principio significa hay interacción o formación de estructuras. Sin embargo, cuando se observan los resultados de esfuerzo de cedencia y se ve que el segundo valor más bajo es el perteneciente a

esta muestra, no se puede entonces afirmar con contundencia que las nanopartículas NMSPD actúan como agente espesante en la sangre. Con respecto a los resultados de esfuerzo de cedencia vemos directamente en esta figura que los valores de los módulos viscoso y elástico, comienzan justo por debajo de 10^{-1} Pa, indicativo de que en ésta muestra se forman las estructuras más rígidas, debidas muy probablemente a la cantidad de colesterol, y su interacción con las nanopartículas.

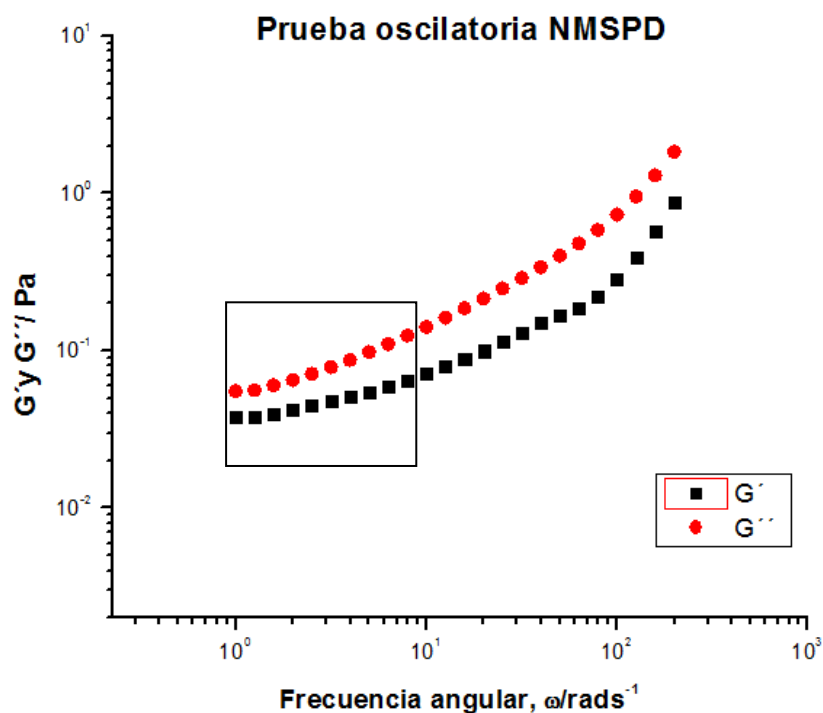


Figura 38. Prueba de cizalla oscilatoria muestra con NMSPD administrada. Colesterol total de 40.98mg/ dL.

7.10 Análisis Termogravimétrico (TGA).

Esta técnica se utilizó para caracterizar térmicamente las muestras de sangre liofilizadas correspondientes a cada uno de los tipos de nanopartículas. En primer lugar, se quería corroborar que las nanopartículas magnéticas estuvieran presentes en la sangre después de veintidós días de la aplicación de la quimioterapia. Posteriormente la detección puntual de la variación en recubrimiento y funcionalización de las nanopartículas, es decir, detección de silicatos en NMS, NMSP y NMSPD; detección de acrilatos en NMSP y la variación de esta señal

cuando el polímero es improntado con doxorrubicina, NMSPD. En todas las muestras se esperaba detectar los cambios del hierro con la temperatura, así como la descomposición de las proteínas características de la sangre.

La Figura 39 muestra el perfil gráfico de todos los eventos exotérmicos y endotérmicos característicos de las nanopartículas funcionalizadas con silicatos (SDTA), la pérdida de peso en cada etapa del proceso (TG) y la cinética que se sigue (DTG). Es importante señalar que se ven las tres señales importantes que se esperaba detectar en ésta muestra.

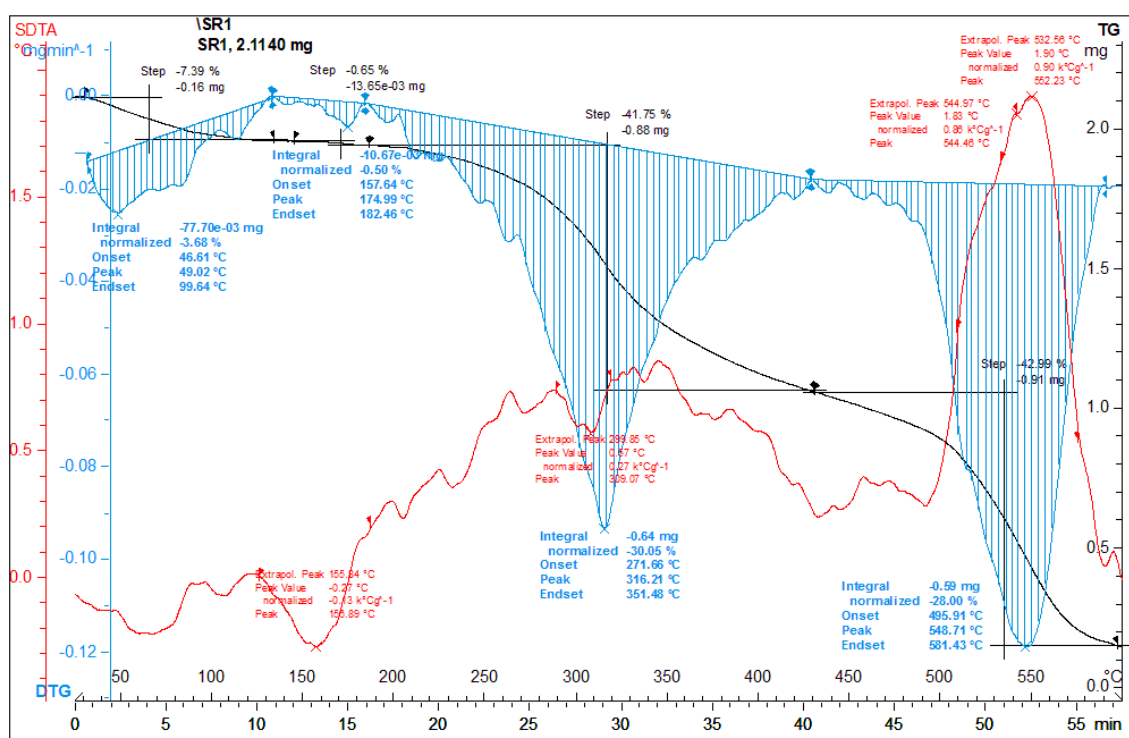


Figura 39. Curvas de análisis térmico de sangre liofilizada con NMS.

Primero, degradación de proteínas de sangre (45-65°C), después presencia de silicatos (alrededor de 340-360°C) y por último la presencia del hierro (400-600°C).

La Tabla 15. presenta con más detalle cada una de las etapas de pérdida de peso por temperatura.

Tabla 15. Análisis de Termograma NMS

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	Peso Perdido (%)	Proceso
1	25-160	7.4	*Degradación de proteínas plasmáticas(45°C) ⁷⁸ *Comienzo de desnaturalización de proteínas(65°C) ⁷⁹ *Eliminación de Etanol (78°C)
2	160-183	0.6	*Eliminación de agua fisisorbida.(175-200°C) ⁸⁰ *Pérdida de silicatos por pérdida de agua en la superficie (150°C) ⁸¹
3	183-351	41.7	*Descomposición de componentes orgánicos (230°C) ⁸² *Descomposición y degradación de silicatos.(341°C) ⁸³
4	351-600	43	*Pérdida de 1.5H ₂ O para la formación de óxido de hierro (364°C) ⁸⁴ *Transformación de α-Fe ₂ O ₃ en γ-Fe ₂ O ₃ (400°C) ⁸⁵ *Transformación de magemita a hematita a temperaturas <600°C ⁸⁶ *Culminación de la descomposición
REMANENTE PESO (%)			
			7.3

La Figura 40, muestra el análisis térmico característico de los núcleos magnéticos de las nanopartículas, es decir, sin ningún tipo de recubrimiento. Por lo que las curvas presentan tres etapas principales de pérdida de peso, de 25-150 °C que es donde se desnaturalizan las proteínas y se evaporan los solventes residuales provenientes de la síntesis de la nanopartícula (en este caso HNO₃ y H₂O) y representan en suma una pérdida en peso de 42.77 %; una segunda etapa que sucede de 200-400 °C donde el hierro principalmente se oxida y representa en suma 53.37% de peso perdido, no quiere decir de manera estricta que la oxidación sea una pérdida de masa, pero sí que la oxidación está en esta zona. La tercera y última etapa que es común en todas las muestras sucede aproximadamente entre 450-600 °C que es la transformación final de hierro de magemita a hematita, cuyo proceso no finaliza en

esta prueba por los límites de temperatura, según Gnanaprakash (2006)⁸⁴, dicho proceso finaliza alrededor de los 750 °C. En la Tabla 16, se muestra con más detalle dichas las etapas.

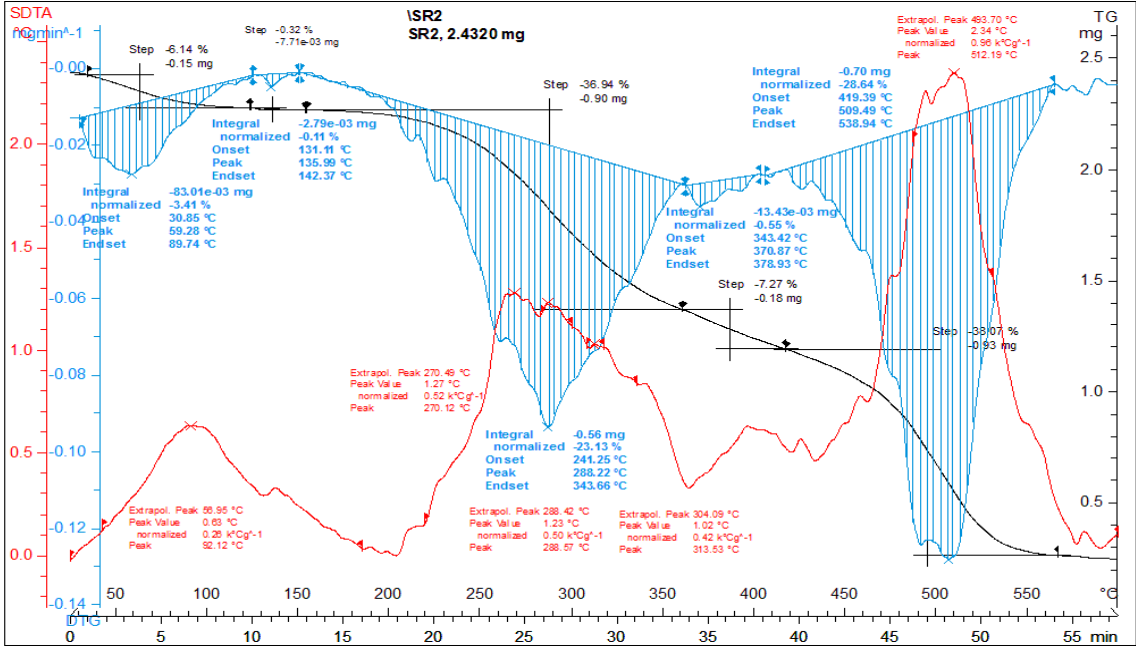


Figura 40. Curvas de análisis térmico de una muestra de sangre liofilizada con NM.

Tabla 16. Análisis de Termograma de NM.

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	Peso Perdido (%)	Proceso
1	25-90	6.13	*Degradación de proteínas plasmáticas(45°C) ⁷⁸ *Comienzo de desnaturalización de proteínas(65°C) ⁷⁹
2	90-142	36.64	*Eliminación de ácido nítrico (121°C)
3	142-344	46.10	*Eliminación de agua fisisorbida. (175-200°C) ⁸⁰ *Descomposición de componentes orgánicos (230°C) ⁸² *Transformación de α -Fe ₂ O ₃ en γ -Fe ₂ O ₃ (400°C) ⁸⁵
4	344-380	7.27	*Pérdida de 1.5H ₂ O para la formación de óxido de hierro.(364°C) ⁸⁴
5	535-600	0.03	*Transformación de magemita a hematita a temperaturas <600°C ⁸⁶ . *Culminación de la descomposición
REMANENTE PESO (%)			
			3.83

La Figura 41, muestra las curvas de análisis térmico características de las nanopartículas cuando se han recubierto con acrilatos, sin utilizar doxorubicina como molde (NMSP). Resalta la etapa de los eventos exotérmicos y endotérmicos que suceden con el polímero mientras que se calienta en una temperatura de 250-400 °C y representan el 43.5 % de pérdida en peso. Inmediatamente después se puede notar la etapa de transformación del hierro de magemita a hematita, por arriba de los 400 °C representando 47.6 % de pérdida en peso, indicando esto último un posible efecto de pérdida de estabilidad térmica y posterior eliminación debida a los acrilatos presentes en el recubrimiento, tal y como lo reportan Brostow (2008),⁸² donde se indica que después de los 400°C incrementa la pérdida de peso notablemente de este tipo de polímeros. La Tabla 17 nos muestra más a detalle las etapas y los fenómenos que suceden.

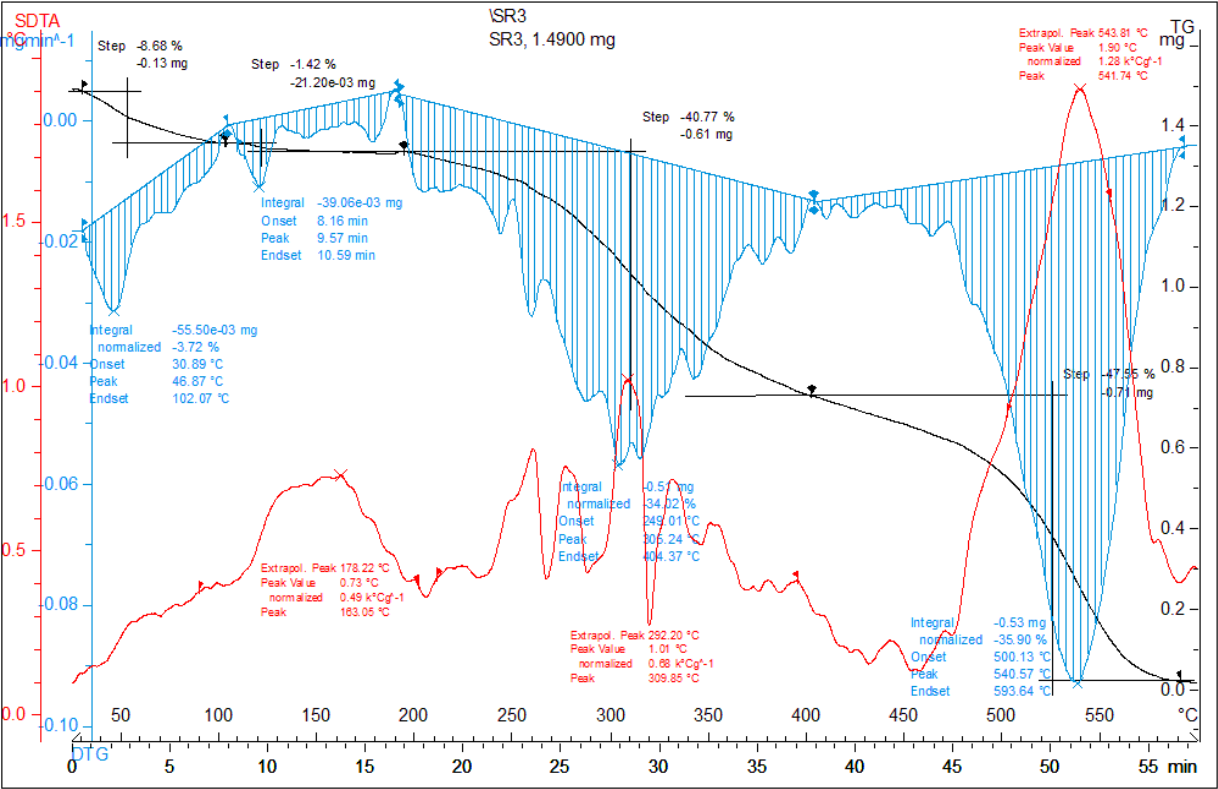


Figura 41. Curvas de análisis térmico de sangre liofilizada con NMSP.

Tabla 17. Análisis de Termograma NMSP

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	Peso Perdido (%)	Proceso
1	25-102	8.7	*Degradación de proteínas plasmáticas(45°C) ⁷⁸ *Comienzo de desnaturalización de proteínas(65°C) ⁷⁹ *Eliminación de acetonitrilo (82°C)
2	102-200	2.7	*Eliminación de agua fisisorbida.(175-200°C) ⁸⁰ * Pérdida de silicatos por pérdida de agua en la superficie (150°C) ⁸¹ *Descomposición, degradación y transformaciones de acrilatos (200-350°C) ⁸²
3	200-404	40.8	*Descomposición de componentes orgánicos (230°C) ⁸³ * Descomposición y degradación de silicatos.(341C) ⁸⁷ *Pérdida de 1.5H ₂ O para la formación de óxido de hierro (364°C) ⁸⁴ *Transformación de α-Fe ₂ O ₃ en γ-Fe ₂ O ₃ (400°C) ⁸⁶
4	404-600	47.6	*Transformación de magemita a hematita a temperaturas <600°C ⁸⁵ . *Culminación de la descomposición
REMANENTE PESO (%)			
			0.2

La Figura 42, nos muestra los eventos térmicos característicos de las nanopartículas cuando se han recubierto de acrilatos y al mismo tiempo se ha utilizado doxorubicina como molécula molde (NMSPD). En particular se ven las variaciones entre estas curvas anteriores, en el rango de temperatura de 200-400 °C, ya que en la figura 41 dicho intervalo de temperatura pertenecientes sólo a los acrilatos se veía como picos más pronunciados y en esta figura los picos son más pequeños y más redondeados, reflejando una posible interacción diferente entre el polímero y la molécula molde utilizada, representando una pérdida en peso de 36.3%. Es importante resaltar que la pérdida total de peso se describe en tres etapas principales, esto con la finalidad de desestimar los valores muy pequeños y casi despreciables en la integración total de la curva DTG. La Tabla 18 describe de manera más detallada los eventos para NMSPD.

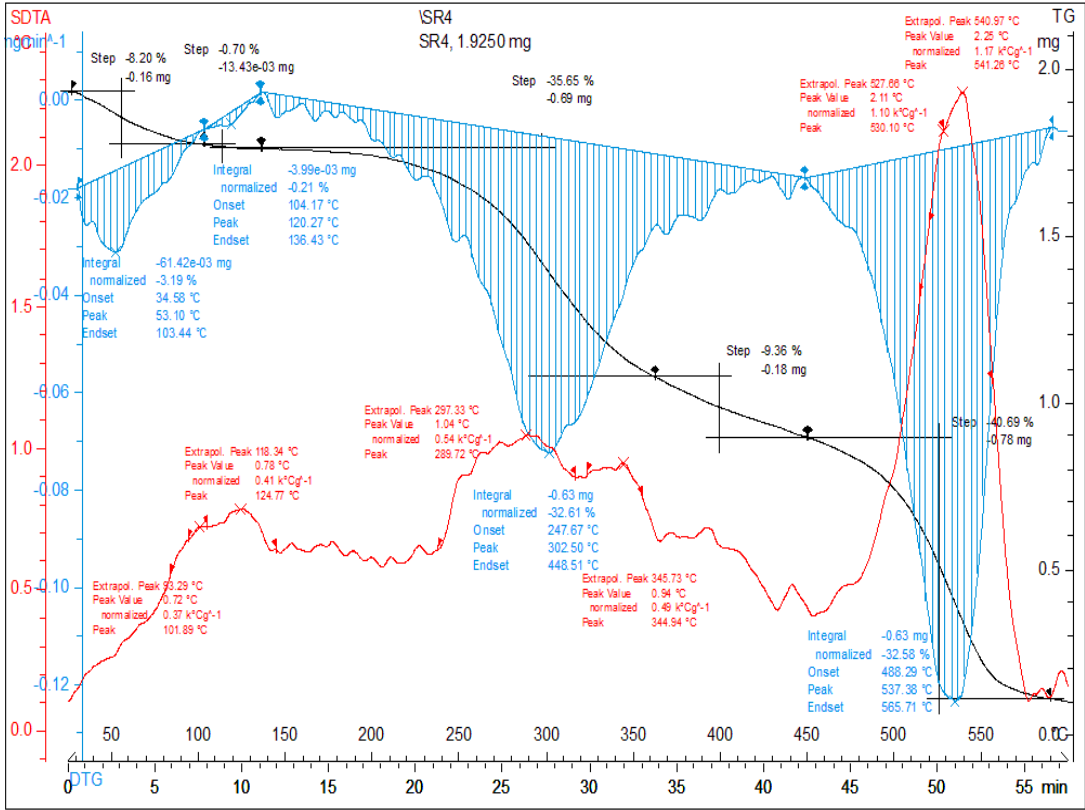


Figura 42. Curvas de análisis térmico de sangre liofilizada con NMSPD.

Tabla 18. Análisis de Termograma NMSPD.

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	Peso Perdido (%)	Proceso
1	25-105	8.2	*Degradación de proteínas plasmáticas(45°C) ⁷⁸ *Comienzo de desnaturalización de proteínas(65°C) ⁷⁹ *Eliminación de acetonitrilo (82°C)
2	105-450	36.3	*Eliminación de agua fisisorbida.(175-200°C) ⁸⁰ * Pérdida de silicatos por pérdida de agua en la superficie (150°C) ⁸¹ *Descomposición, degradación y transformaciones de acrilatos (200-350°C) ⁸² *Descomposición de componentes orgánicos (230°C) ⁸³ *Descomposición y degradación de silicatos.(341°C) ⁸⁷ *Pérdida de 1.5H ₂ O para la formación de óxido de hierro (364°C) ⁸⁴ . *Transformación de α-Fe ₂ O ₃ en γ-Fe ₂ O ₃ (400°C) ⁸⁵
3	450-600	40.7	*Transformación de magemita a hematita a temperaturas <600°C este proceso se puede extender hasta los 750°C ⁸⁷ *Culminación de la descomposición
REMANENTE PESO (%)			
			14.8

En la Figura 43, se observa que la muestra de NMS proporciona una estabilidad térmica ligeramente mayor con respecto a las demás muestras: NM, NMSP y NMSPD, estas son más homogéneas en cuanto a la pérdida de peso con respecto a la temperatura. La muestra NMSP alcanza una pérdida de peso mayor (0.2 % peso remanente), lo que puede indicar que gran parte de esa pérdida de peso es debido a la degradación completa del recubrimiento con silicatos, además del recubrimiento

polimérico de acrilatos, esto último se corrobora en el diagrama de DTG que muestra que desde 150 °C comienza la pérdida de dicho recubrimiento (silicatos) y termina aproximadamente a una temperatura de 341°C. Por otro lado, los eventos exotérmicos y endotérmicos característicos de la descomposición de acrilatos se muestran en el SDTA en el mismo rango de temperatura, Figura 41.

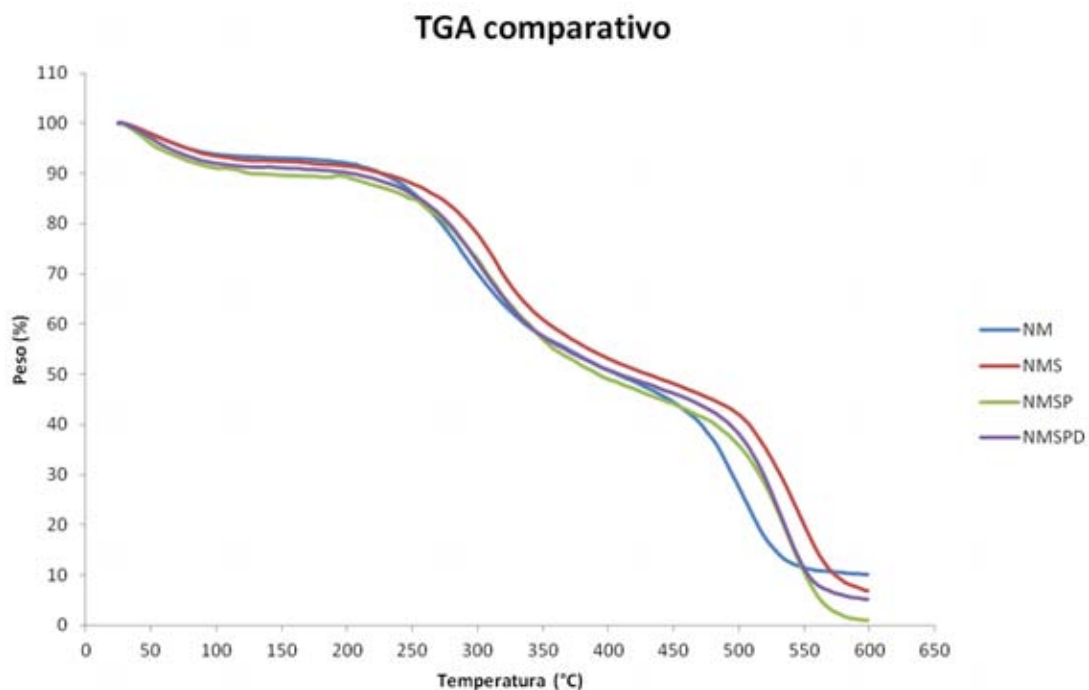


Figura 43. Termograma comparativo entre muestras.

Con referencia a los resultados obtenidos de cizalla oscilatoria en la sección de reología, la independencia con el flujo. NMS, NMSP y NMPSD tuvieron un mayor efecto protector ante la temperatura, ya que estas muestras son las que forman estructuras más rígidas y estables en sangre. Lo anterior confirma que dicha protección no depende de la interacción entre las nanopartículas y la sangre como un todo sino de la naturaleza de los recubrimientos de cada nanopartícula, en este caso los silicatos brindan mayor estabilidad térmica. Estos resultados concuerdan con el trabajo hecho por Brotow⁸² (2008) donde se caracterizaron polímeros de polímetil acrilato con recubrimiento de SiO₂ a diferentes concentraciones. En general, se describe que a mayor concentración de SiO₂ la temperatura de descomposición (Td) aumenta, lo que significa una mayor protección térmica proveniente de silicatos. Sin embargo, después de superada esa temperatura, la velocidad y magnitud de pérdida de peso aumenta.

8 CONCLUSIONES.

1. Se sintetizó y caracterizó nanopartículas magnéticas en diferentes etapas: NM, NMS, NMSP y NMSPD.
2. Todas las nanopartículas presentaron aglomeración, el tamaño de partícula obtenido es alrededor de 172.85 nm.
3. Todas las nanopartículas presentaron adsorción de doxorubicina, y las NMSPD son nanopartículas que más cantidad adsorben por ser específicas a dicha molécula.
4. El sistema de liberación fue administrado correctamente en las ratas según la posología de la doxorubicina.
5. Todas las muestras contienen nanopartículas magnéticas, aún después de veintidós días de la aplicación de quimioterapia (TGA).
6. La sangre es un fluido de reología compleja, que presenta fenómenos de agregabilidad celular donde las células al ser menos deformables aumentan la viscosidad del sistema, esto aunado a las estructuras que se forman cuando el colesterol está presente.
7. La reología de la sangre se modificó por la presencia de nanopartículas. En particular, es interesante el fenómeno que presentan las NMS, NMSP y NMSPD, adelgazante al corte en pruebas de cizalla simple y pseudo sólido en pruebas de cizalla oscilatoria.
8. La muestra de NMS en prueba de flujo oscilatorio presentan un comportamiento pseudo-sólido, es decir, no se observa una dependencia con el flujo a tiempos largos, esto es indicativo que no se forman estructuras internas lo suficientemente estables, fenómeno que se observa semejante para NMSPD y NMSP, corroborado esto último en las pruebas de esfuerzo de cedencia.
9. En base a lo discutido, dichos fenómenos mecánicos sobre la sangre son atribuibles primordialmente a la interacción que tienen los grupos silanol expuestos en la superficie de las nanopartículas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La molécula utilizada en este trabajo fue Doxorubicina, no obstante, es importante destacar que se puede utilizar cualquier molécula susceptible a ser moldeada en un polímero de impresión molecular, lo que abre enormes posibilidades en el campo de la terapéutica contra el cáncer y muchas enfermedades más.

La perspectiva principal y aportación primordial de este trabajo, es el entendimiento más amplio acerca de cómo los grupos silanol pueden ser aplicados en la reducción de la colesterolemia (con base a los resultados y análisis de reología) y así, buscar una aplicación en la terapéutica para este desorden metabólico de manera puntual.

Para corroborar los resultados de éste estudio se debe contar con un método de síntesis de nanopartículas que garantice un tamaño de partícula estable, después de esto hacer la caracterización incluyendo técnicas microscópicas.

Es recomendable también en trabajos futuros hacer una estudio de tipo Corz-Merx para asegurar y darle un significado más profundo a la formación de estructuras internas.

10. REFERENCIAS.

1. Salas, Pedro Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato y recubiertas con acrilatos para uso como vehículo de doxorubicina. *Tesis de Licenciatura*. FES, ZARAGOZA, UNAM, 2013.
2. U.S. Environmental Protection Agency. Characteristics of Particles. Particle Size Categories, *página web de la Agencia Ambiental de los Estados Unidos de América*, 2010, 3.
3. Mingdi Yan, Olof Ramström What is molecular imprinting? *Molecularly Imprinted Materials*, 2005, 3-4 N.Y. U.S.A.
4. Aristides Bakandritsos. Doxorubicin Nanocarriers Base on Magnetic Colloids with a Bio- polyelectrolyte Corona and High Non-Linear Optical Responses: Synthesis, Characterization and Properties. *Advanced Funcional Materials Journal* 2011, 21, 1465-1475.
5. Severine Brulé. Et al. Doxorubicin Release Triggered by Alginate Embedded Magnetic Nanoheaters: A combined Therapy. *Advanced Materials Journal* 2011, 23, 787-790.
6. Doxorubicina. *P.R. Vademecum, Página web de Vademecum*
7. .Quimioterapia Práctica. *Canis et. Felis* [versión electrónica] No. 96.
8. Swarbrick James, Rubino Joseph & Rubino Orapin. Capítulo 22. Dispersiones de partículas Gruesas. Propiedades de interface *Remington Farmacia* 20, 2003, 1, 365-374.
9. Howard A. Barnes, What is flow and deformation *A handbook of elementary rheology* 2000, 5-10.
10. Moggi Luis. Hemorreología y microcirculación. *Artículo de Revisión*. 2011 69, 1, 65-84.
11. Christopher W. Macosko Rheology Principles, Measurements and Applictations. General Linear Viscoelastic Model *Wiley-VCH*. 1994, 111-126
12. Leonardo Moreno. Experimentos reológicos y modelado estructural de un fluido biológico (Sangre humana) *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM*. 2011.

13. Y.C. Fung. Biomechanics. Mechanical properties of living Tissues (2^oEd). *The flow properties of Blood* 1993, 66-108.
14. Targeting Cholesterol Metabolism is one route to treating Cancer. *Herbalzym*.
15. Steven P. Stodghill Thermal Analysis- A review of Techniques and Applications in the Pharmaceutical Sciences. *American Pharmaceutical Review. The review of American Pharmaceutical Business & Technology*. 2010.
16. NIH, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Drug Delivery Systems: Getting Drugs to Their Targets in a Controlled Manner.
17. Vilar, Gemma, Tulla-Puche Judith & Albericio Fernando. Polymers and Drug Delivery Systems. *Current Drug Delivery*. 2012,9,1567-2018.
18. Gaurav Tiwari, Ruchi Tiwar, Birendra Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, et al. Drug Delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig*. 2012, 1, 2-11
19. Gubin Sergey. Magnetic Nanoparticles inside us and everywhere around us. *Magnetic Nanoparticles*. 2009, 4-6.
20. Kewal J. Jain Particulate Drug Delivery Systems. *Drug delivery systems. Humana Press*. 2008, 29.
21. Yashwant Pathak, Deepak Thassu. Recent developments in Nanoparticulate Drug Delivery Systems. Features of nanoparticulate drug delivery systems. *Drug Delivery Nanoparticles formulation and characterization*. 191,1-4
22. Prokop Ales, Davidson Jeffrey. Nanovehicular intracellular Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical science*, 2008, 97(9), 3518-3590
23. *Chemistry explained*. Iron. www.chemistryexplained.com
24. María Mascolo, Yongbei Pei, Terry Ring. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases. *Open Access Materials*. 2013 ,6, 5549-5567.
25. Pankhurst Q, Connolly J, Jones S, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics*, 2003, 36,167-181
26. Larsson Mats, Hill Adrian & Duffy John. Suspension Stability: Why Particle Size, Zeta Potential and Rheology are Important. *Annual Transactions of the Nordic Rheology society*. 2012, 20,209-214

27. R Sharma, C.J. Che. Newer Nanoparticles in hyperthermia treatment and thermometry. *J Nanopart Res.* 2009 ,11, 671-689
28. Malvern Instruments UK. What is zeta Potential *Zeta sizer Nano Series User Manual.* 2004,15,15.1
29. Hildergard Brummer. Particle characterization in excipients, drug products and drug substances. *Life sciences, Technical bulletin.* 2008, 11.
30. Horiba Scientific. Particle characterization. *Particle Characterization in the Pharmaceutical Industry.* Página web.
31. Malvern. Dynamic Light Scattering, Página web.
32. Francesco Puoci, Cirillo Giuseppe, Curcio Manuela, Iemma Francesca, Ilaria Ortensia, Umile Spizzirri, et al. Molecularly Imprinted Polymers
33. Cunliffe, D.; Kirby, A.; Alexander, C Molecularly imprinted drug delivery stems. *Adv. Drug Deliv.* 2005, 57, 1836–1853.
34. Sreenivasan, K. On the Application of molecularly imprinted poly (HEMA) as a template responsive release system. *Journal of Applied Polymer. Science* 1999, 71, 1819–1821.
35. Instituto Nacional de Cáncer, de los institutos Nacionales de Salud de EE.UU Definición de Cáncer 2014. Página web.
36. Rovetto, P. El cáncer, una larga historia humana. (2011). Página web.
37. Priti Bandi et al. Datos estadísticos sobre el cáncer entre los hispanos /Latinos 2009- 2011, Sociedad Americana de Cáncer, 2009, página web.
38. UICC. World Cancer Declaration 2013. TARGET 09 2013, página web.
39. Fundación de Investigación para vencer el cáncer. Tratamientos contra el cáncer en la actualidad. 2014, página web.
40. American Society of Clinical Oncology. ¿Qué es la cirugía oncológica? de *American Society Of Clinical Oncology.* 2014, página web.
41. Instituto Nacional de Cáncer. Radioterapia para cáncer: preguntas y respuestas. *Instituto Nacional de Cáncer .*2013,página web
42. Stanford Medicine Cancer Institute. Hormone Therapy for cancer treatment. What is hormone therapy? *Stanford Medicine Cancer Institute.*2013, página web.
43. Christopher, Li., Kathleen, Malone., Peggy, Porter., Noel, Weiss., Mei-Tzu, Tang., Kara, Cushing-Haugen., et al. Relationship Between Lung durations

- and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer. *American Medical Association*.2003,289
- 44.American Cancer Society. Cancer Immunotherapy. What is cancer immunotherapy? *American Cancer Society*. 2013, página web.
 - 45.Bill & Melinda Gates Foundation. Clinical Trials. 2013, página web.
 - 46.Jesús Honorato. Ensayos Clínicos Fase III. *El ensayo Clínico en España*, 8,137-148.
 - 47.National Cancer Institute. What are clinical Trials? *Why are clinical trials important?* 2014, página web
 - 48.National Center for complementary and Alternative Medicine. El cáncer y los métodos de medicina complementaria y alternativa. *NCAAM*,2014 página web.
 - 49.American Cancer Society. Stem Cell Transplant (Peripheral Blood, Bone Marrow, and Cord Blood Transplants).*American Cancer Society* 2013, página web.
 - 50.Kaushnik J. A fresh approach to Bone Marrow Transplant in Older Patients. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2014, página web.
 - 51.Stanford Medicine Cancer Institute. Chemotherapy drugs and side effects. *Stanford Medicine Cancer Institute*. 2014, página web.
 - 52.Cancer Research UK. How chemotherapy Works? 2014, página web
 - 53.Canadian Cancer Society. Side effects of chemotherapy. 2014, página web.
 - 54.University of Maryland. Characteristics of an Ideal Chemotherapeutic Drug. 2014, página web.
 - 55.Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva. *World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*. 2014, 44, 10. Página web.
 - 56.Estimation Program Interface (EPI). 2009, 4. Página web
 - 57.Doxorubicin Identification. *Drug Bank*. 2014 página web,
 - 58.Anand G Patel, Scott H Kaufmann.Cancer: How does doxorubicin work? *Elifescience*. 2014. Página web.

59. NIH U.S. National Library of Medicine. HSDB: DOXORUBICIN. 2013, página web.
60. US Natl Inst Health; DailyMed. Current Medication Information for Doxorubicin Hydrochloride (doxorubicin hydrochloride) injection, powder, lyophilized, for solution. 2009. Página web.
61. Bethesda, MD. (2009). American Society of Health System Pharmacists; AHFS Drug Information 2009, 1051.
62. Doxorubicin 2mg/mL. *Alpharma S.A.* 2014. Página web.
63. Doxorubicin Dosage, *Drugs.com*. 2013. Página web.
64. Doxorubicina. *Medline Plus*. 2013. Página web.
65. Myocet 50mg polvo. Características del producto. 2013 página web
66. Purina Formulab Diet 5008, *ficha técnica de producto*. 2013, página web
67. Ciriaco Arnaldo, Mendiola Judith, Falcon Dayneris & Cantillo Jorge. Obtención de sangre e inyección intravenosa en roedores por la vía de la vena safena. *Animales de Laboratorio. de Instituto "Pedro Kouri" Cuba*
68. Túnez Isaac, Galván Aurora. Perfil lipídico. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales Edif. Severo Ochoa*. n.d.1-6
69. Hettich Zentrifugen. Determinación del valor de hematocrito mediante centrifugación. *Hettich Lab Technology*: página web. (n.d)
70. Zhang J, Misra R. Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core-shell nanoparticle carrier and drug release response. *Acta Biomaterialia*.2007, 3, 838-50.
71. Soler Terranova, Cecilia Rodríguez, Angarita Vega y Corredor Pereira. Efecto de la dieta sobre lípidos de la sangre y el hígado en ratas. *ORIGINALES Salud Uninorte*.1986, 3,19-29,
72. Poveda, Ayala, Rodríguez, Ordoñez, Baracaldo, Guerra, *et. al.* Efecto del suplemento de aceites vegetales sobre el perfil lipídico en ratas Wistar. *Biomédica*. 2005, 25,101-9.
73. G.J. Ruiz Argüelles. Fundamentos de Hematología. *Editorial Médica Panamericana*. 2009,14

74. Probst, Lim, Bird, Pole, Sato y Claybaugh. Gender Differences in the Blood Volume of Conscious Sprague- Dawley Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2006, 45(2), 49–52.
75. Murashov, Harper y Demchuk. Impact of Silanol Surface Density on the Toxicity of Silica Aerosols Measured by Erythrocyte Haemolysis. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene.* 2006, 3, 718-723.
76. Saffioti, Daniel, Mao, Shi, Williams y Kaighn. Mechanism of Carcinogenesis by Crystalline Silica in Relation to Oxygen Radicals. *Environmental Health Perspectives.* 102, 159-163
77. Avnish, Mohan, Ritu, Vivek, et.al. *Synthesis, Characterization and Magnetic Studies of α -Fe₂O₃ Nanoparticles.* *Journal of Nanotechnology.* 2014, 2014.
78. Vazquez R, Larson D.F. Plasma Protein Denaturation with graded heat exposure NCBI Resources. 2013, 28(6), 557-9.
79. Tybor, Dill, James et.al. Heat denaturalization blood serum proteins measured in saturated sodium chloride. *J. Agric. Food Chem.* 1970, 18 (4), 629-631.
80. Jurikova, Csach, Miskuf et. al.. *Thermal Analysis of magnetic nanoparticles modified with dextran. Proceedings of the European Conference Physics of Magnetism. ACTA PHYSICA POLONICA .* 2011,121.
81. Brotow, Datashvili & Hackenberg. *Synthesis and Characterization of Poly (methyl acrylate) SiO₂ + Hybrids.* *e-Polymers* 2008, 054
82. Xu, Ju, Wang, Zhang, Sun et. al. Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles and its application in Lipase immobilization. *Bull. Korean Chem.* 2013, 34(8).
83. Gnanaprakash, Ayyappan, Jakakumar, Philip and Raj. Magnetic Nanoparticles with enhanced γ -Fe₂O₃ to α -Fe₂O₃ phase transition temperature *Nanotechnology.* 2006, 17
84. Kumar, Sahrma, Kumari, Sheel, et. al. Synthesis, characterization and magnetic studies of α -Fe₂O₃ nanoparticles. *Journal of Nanotechnology* 2014.
85. Yazdimamagami, Pourvala, Motamedi, Fathi, et. al. Synthesis and Characterization of encapsulated Nanosilica particles with an Acrylic Copolymer by in situ emulsion polymerization using thermoresponsive Noionic Surfactant. *Materials.* 2013, 6(9), 3727-3741.

86. Ki, Sung & Hee .Formation and characterization of Silica-Coated Magnetic Nanoparticles by Sol-Gel Method. *J. Ind. Eng. Chem.* 2005, (11), 584-589.
87. Matsui, Akamatsu, Nishiguchi, Miyoshi, Nawafune, Tamaki, *et.al.* Composite of Au Nanoparticles and molecularly Imprinted Polymer as a Sensing Material. *Anal. Chem.* 2004, 76 (5), 1310–1315.
88. Akbarzadeh, Samieei, Woo Joo, Anzaby, Hanifehpour, Tafeyi, *et. al.* Synthesis, characterization and in vitro studies of doxorubicin- loaded magnetic nanoparticles grafted to smart copolymers on A549 lung cancer cell line. *Journal of Nanobiotechnology* 2012, 10:46.
89. Cho, Seob Cho, Choi , Jun Kim, Seok Han, Hee Kim, *et. al.* The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicology Letters.* 2009,189, 3,177-183
90. De Jong, Borm. *et. al.* . Drug delivery and nanoparticles Applications and Hazards. *Int J Nanomedicine.* 2008, 3(2), 133–149.
91. Forge, Roch, Laurent, Tellez, Gossuin, Renaux. *et. al.* Optimization of the Synthesis of Superparamagnetic Contrast Agents by the Design of Experiments Method *J. Phys. Chem. C.* 2008, 112, 19178–19185.
92. Pérez, Agustí, Tornos. Cardiotoxicidad tardía inducida por antraciclinas. *Med Clin (Barc).* 2009, 133(8), 311–313
93. Nash T, Allison, *et. al.* Haemolytic activity of asbestos and other mineral dusts. *Nature* 1967, 214, 522-523.

REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS,

94. Jan Vermant. Rheology and structure of complex fluids. *Department of Chemical Engineering*, K.U Leuven 2014 página web.
95. Lide, D.R. CRC Handbook of Chemistry and Physics 88° Edición. *CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton*, 2007, 3-226.
96. Daily Med. Doxorubicin Hydrochloride injection, solution. Página web.
97. Zytokil solución inyectable. *PLM PISA Farmacéutica*. Página web.
98. Hanaor, D.A.H.; Michelazzi, M.; Leonelli, C.; Sorrell, C.C.. "The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO_2 ". *Journal of the European Ceramic Society* .2012, 32 (1): 235–244.
99. Knaul, Nigenda, Lozano, Arreola-Ornelas, Langer y Frenk Cáncer de mama en México una prioridad apremiante .*Salud Pública de México*. 2009,51 2,335-344
100. Baskurt, Hardeman, Rampling y Meiselman. Handbook of Hemorheology and hemodynamics.*Basic Aspects of Hemorheology Biomedical and health research*. IOS Press 21-34.