

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS CON FOSFOLÍPIDOS COMO
SISTEMA DE LIBERACIÓN MODIFICADA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
BRENDA ESTHER BRAVO VELASCO**



MÉXICO, CDMX

AÑO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: MA GUADALUPE LEMUS BARAJAS

VOCAL: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

SECRETARIO: JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERON

1er. SUPLENTE: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

2° SUPLENTE: CARLOS JUAREZ OSORNIO

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 100 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR EN LA UNIDAD DE POSGRADO, EDIFICIO B Y EL LABORATORIO 001 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA EN EL EDIFICIO F-1 DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. JESUS GRACIA MORA

SUSTENTANTE:

BRENDA ESTHER BRAVO VELASCO

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	5
1.- RESUMEN	6
2.- INTRODUCCIÓN	7
3. ANTECEDENTES	9
3.1 <i>Cáncer</i>	9
3.1.1 Etiología.....	9
3.1.2 Epidemiología.....	10
3.1.3 Cáncer en México.....	12
3.1.4 Desarrollo Clínico.....	13
3.1.4.1 Iniciación.....	13
3.1.4.2 Promoción.....	13
3.1.4.3 Progresión.....	13
3.1.4.4 Metástasis.....	14
3.1.5 Tratamiento.....	14
3.1.5.1 Diagnóstico.....	14
3.1.5.2 Quimioterapia.....	15
3.2 <i>Fármacos intercalantes del DNA</i>	16
3.3 <i>Doxorrubicina</i>	17
3.3.1 Mecanismo de acción.....	18
3.3.2 Farmacocinética.....	19
3.3.2.1 Distribución.....	19
3.3.2.2 Metabolismo.....	19
3.3.2.3 Excreción.....	19
3.3.3 Propiedades fisicoquímicas:.....	20
3.4 <i>Sistema de liberación de fármacos</i>	20
3.4.1 Sistemas convencionales de liberación de fármacos.....	20
3.4.2 Sistemas de liberación modificada.....	21
3.4.3 Sistemas teragnósticos.....	22
3.5 <i>Nanotecnología</i>	23
3.6 <i>Nanopartículas</i>	23
3.6.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas.....	24
3.6.2 Magnetita.....	25
3.7 <i>Magnetismo</i>	26
3.7.1 Teoría de dominios.....	27
3.8 <i>Recubrimiento de nanopartículas</i>	28
3.8.1 Lecitina.....	30
3.8.2 Brij.....	31
3.9 <i>Aplicaciones de las nanopartículas magnéticas</i>	32
3.10 <i>“Targeting” (Vectorización) externo e interno</i>	33

3.10.1 Liberación magnética dirigida de fármacos	34
3.11 Modelos de adsorción	36
3.11.1 Isoterma de Langmuir	36
3.11.2 Isoterma de Freundlich	36
3.11.3 Isoterma de Jovanovic	36
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
5. OBJETIVO GENERAL	38
5.1 Objetivos particulares	38
6. HIPOTESIS.....	39
7. METODOLOGÍA.....	40
7.1 Materiales	40
7.2 Síntesis de nanopartículas hidrofílicas	40
7.3 Recubrimiento de nanopartículas.....	41
7.4 Cuantificación de lecitina	42
7.5 Isoterma de adsorción de lecitina.....	43
7.6 Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas con brij y lecitina	43
7.7 Caracterización	44
7.7.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	44
7.7.2 Espectroscopía de infrarrojo de nanopartículas magnéticas	44
7.7.3 Potencial Z y tamaño de partícula.....	44
7.7.4 Difracción de Rayos X de Polvo.....	44
7.8 Curva de calibración de la Doxorubicina	45
7.9 Cinética de adsorción de doxorubicina sobre las nanopartículas	45
7.10 Isoterma de adsorción de doxorubicina sobre las nanopartículas	45
7.11 Liberación de doxorubicina	46
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
8.1 Síntesis y caracterización NPM, NPMR y NPMRB.....	47
8.2 adsorción y cuantificación de lecitina	53
8.3 isoterma de adsorción de la lecitina	54
8.4 adsorción y liberación de doxorubicina	54
8.4.1 Curva de calibración de la doxorubicina	55
8.4.2 cinética de adsorción	55
8.4.3 isotermas de adsorción de la doxorubicina	56
8.4.4 Estudios de liberación.....	61
9. CONCLUSIONES.....	73
10. REFERENCIAS	74

ABREVIATURAS

ADN/DNA: Ácido desoxirribonucleico

AIC: Menor criterio de Akaike

CME: Concentración mínima efectiva

CMT: Concentración mínima tóxica

DLS: Dispersión dinámica de luz

DOX: Doxorrubicina

ENT: Enfermedades No Transmisibles

EPR: Efecto permeación y retención

FTIR: Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier

GI:Gastrointestinal

IR: Infrarrojo

MSC: Mayor criterio de selección del modelo

MDT: Magnetic Drug Targeting (Liberación magnética dirigida de fármacos)

NPM: Nanopartículas magnéticas

NPMR: Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya

NPMRB: Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya y brij

NMRI: Resonancia magnética nuclear de imagen

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Solución buffer de fosfatos

Rsqr: Coeficiente de correlación

RX: Rayos X

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

UV-Vis: Ultravioleta-Visible

1.- RESUMEN

El cáncer se caracteriza por un crecimiento anormal de células que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular. Su tratamiento consiste mayoritariamente en quimioterapia. Sin embargo, los fármacos utilizados afectan tanto a células sanas como enfermas, conllevando a serios efectos adversos. Actualmente, en el área farmacéutica se está estudiando arduamente el uso de la nanotecnología como modo de obtener acarreadores de fármacos con propiedades únicas para una cesión inteligente. Entre éstos, se encuentran las nanopartículas magnéticas, como las formadas por Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, las cuales muestran relativamente baja toxicidad y propiedades de superparamagnetismo. Además, tienen la posibilidad de ser manipuladas a nivel superficial para obtener propiedades deseadas como hidrofiliidad y/o sensibilidad a la temperatura.

Es conocida también la propiedad de los fosfolípidos de formar bicapas con una característica muy particular, la temperatura de transición de fase, por debajo de la cual el sistema se mantiene rígido y por encima muestra cierta flexibilidad.

En base a lo anterior el objetivo de este proyecto consiste en elaborar nanopartículas superparamagnéticas de doxorubicina a base de óxidos de hierro recubiertas de una mezcla de fosfolípidos/brij 76 para lograr sistemas de liberación termosensibles.

Se elaboraron tres tipos de nanopartículas: hidrofílicas, recubiertas con lecitina y recubiertas con lecitina/brij. Para ello se usó el método de coprecipitación y se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), tamaño de partícula, potencial zeta, espectroscopía de infrarrojo y difracción de rayos X. FTIR mostró que el recubrimiento fue efectivo, mientras que RX dio evidencia de que se mantuvo la estructura de la magnetita y se pudo observar tamaño y morfología mediante TEM. Los tamaños obtenidos oscilaron entre 51.8 y 197.8 nm, siendo más pequeñas las recubiertas, lo que indica que el recubrimiento puede ayudar a estabilizar el sistema desde el punto de vista de la agregación. El potencial Z varió entre -16.6 mV y -28.9 mV, siendo mayor para las partículas sin recubrimiento, lo cual no es de extrañar dado que los fosfolípidos presentan cargas en su parte polar.

Posteriormente se realizó una adsorción isotérmica de doxorubicina sobre los tres tipos de nanopartículas para llevar a cabo la carga de fármaco y su correspondiente evaluación de la liberación de doxorubicina a partir de los sistemas generados imitando condiciones fisiológicas. Los resultados mostraron que la cesión es una difusión tipo fickiano, indicando además que a 37 °C se libera el 100% en 24h, lo que revela que el recubrimiento debe ser modificado para lograr el control de la liberación en función de la temperatura.

2.- INTRODUCCIÓN

La palabra cáncer se utiliza para agrupar aproximadamente 200 enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal de células, situación que es transmitida a células hijas y que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular. De acuerdo con la OMS, el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8.8 millones de defunciones. Casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad, por esto es un área que hay que atender con posibles soluciones.

Por años, el tratamiento del cáncer ha supuesto una serie de problema entre los que destacan la falta de especificidad al tejido enfermo y por lo tanto la aparición de efectos adversos. En particular la doxorubicina es un fármaco antineoplásico de elección en una gran cantidad de neoplasias, sin embargo, su administración supone un serio problema de cardiotoxicidad aunado al alcance de altas concentraciones en sangre.

Por otra parte, la nanotecnología es un área interdisciplinar dedicada al estudio, diseño, creación, manipulación y aplicación de materiales y sistemas funcionales mediante el control de la materia a escala menor que un micrómetro, así como su explotación tanto a escala de laboratorio como industrial. En una de sus ramas, la nanotecnología investiga el diseño de los materiales de tamaño nanométrico que poseen propiedades físicas y químicas muy distintas a las del material masivo; dentro de ellos se encuentran las nanopartículas magnéticas.

En el caso de las partículas magnéticas la reducción de tamaño trae un cambio en su comportamiento magnético. En la literatura se reporta la síntesis de una gran variedad de nanopartículas con comportamiento superparamagnético. Entre los óxidos magnéticos, los óxidos de Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ son los más adecuados debido a su relativamente baja toxicidad y sus propiedades superparamagnéticas.

Las nanopartículas magnéticas ofrecen nuevas y emocionantes oportunidades para desarrollar sistemas eficaces de administración de fármacos, ya que es factible producir, caracterizar y adaptar específicamente sus propiedades funcionales para aplicaciones de administración de fármacos, a la vez que muestran un efecto como medio de contraste por NMRI (Resonancia magnética nuclear de imagen) y efectos de hipertermia al ser sometidas a campos magnéticos alternos o radiofrecuencia.

A su vez, han sido usadas para mejorar el rendimiento terapéutico de algunos agentes quimioterapéuticos y para reducir sus indeseables efectos adversos. Esto porque involucra la unión de fármacos anticancerígenos o cualquier otra biomolécula permitiendo su inyección

en el torrente sanguíneo, así como su acumulación en el sitio del tumor utilizando un campo magnético externo adecuado por lo cual un control estricto en el tamaño. Se ha reportado en la literatura que las nanopartículas con un intervalo de tamaño entre 2 y 100 nm sirven para alterar los procesos de señalización esenciales para las funciones básicas de las células (incluyendo la muerte celular), y las nanopartículas de entre 40 y 50 nm demostraron tener un mayor efecto.¹

Además, es conocido que, si se logra proteger el organismo de la nanopartícula mediante técnicas de recubrimiento, el efecto es mucho mejor. Los fosfolípidos son moléculas no reconocidas como extrañas por el sistema inmune y presentan propiedades térmicas de interés para una liberación controlada en función de la temperatura, por lo cual son candidatas a recubrir las nanopartículas magnéticas.

Así, la administración controlada de fármacos implica la asociación de un fármaco con un sistema portador, permitiendo de este modo la modulación de las propiedades farmacocinéticas y la biodistribución del fármaco. Por lo cual se produjo un sistema compuesto por nanopartículas superparamagnéticas hechas de magnetita, recubiertas con lecitina y brij 76, de tal modo que se obtuviera un acarreador de doxorubicina con posibilidad de direccionamiento, efecto diagnóstico y sensible a la temperatura.

3. ANTECEDENTES

3.1 CÁNCER

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial, el 63% de las muertes anuales son causadas por enfermedades, generalmente crónicas, no transmisibles (ENT).

Las cuatro principales ENT son: enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes y cáncer, que juntas causan aproximadamente 38 millones de defunciones al año. Estas enfermedades, además del impacto físico que suponen, tienen consecuencias socioeconómicas, principalmente en comunidades desfavorecidas socialmente en donde el acceso a servicios de salud es limitado, generando con ello un incremento en el gasto público necesario para hacer frente a los costos de la enfermedad y su duración.^{2,3}

Cáncer es un término genérico para un largo grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo. Otros términos usados son tumores malignos y neoplasias.

De acuerdo a la OMS, el cáncer se define como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células.

Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de los límites normales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos. Este proceso se denomina «metástasis». Las metástasis son la causa principal de muerte por cáncer. El cáncer puede tener consecuencias graves para la salud, y es una causa principal de muerte.²

3.1.1 ETIOLOGÍA

A pesar de que los mecanismos de proliferación de células cancerígenas se encuentran regulados por la traducción de material genético, existen factores ambientales, hábitos de comportamiento y socioeconómicos que se han visto relacionados con este padecimiento, aumentando el número de casos y la intensidad de la proliferación celular.⁴

Algunos de los factores son:

- Tabaquismo
- Consumo de alcohol
- Dieta, obesidad y actividad física: exceso de grasa corporal y poca o nula actividad física contribuyen al control de peso además de que aumenta la probabilidad de varios tipos de cáncer.⁵

- Factores ocupacionales: la exposición a diversas sustancias durante el ejercicio profesional ha demostrado tener ciertos efectos promotores en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer.
- Infecciones: causadas por virus, bacterias y/o microparásitos.⁶
- Factores hormonales reproductivos y de crecimiento: una modificación genética permite la proliferación desmedida llevando a la generación de tumores.
- Radiaciones (ionizantes, ultravioletas y electromagnéticas): se ha demostrado que los distintos tipos de radiación provocan alteraciones en la estructura del DNA celular según la intensidad y tiempo de exposición a dicha radiación.^{7,8}
- Calidad de agua, suelo y aire.⁹
- Exposición a fármacos: algunos fármacos han demostrado poseer potencial para inducir modificaciones genotóxicas que inician o promueven el desarrollo de diversos tipos de cáncer. Entre ellos se encuentran algunos agentes antineoplásicos (bisulfano, clorambucil, ciclofosfamida, etc.), algunos inmunosupresores y agentes hormonales.¹⁰
- Sustancias carcinogénicas naturales: consideradas naturales porque son sintetizadas por bacterias, plantas, hongos y líquenes; los seres humanos se exponen a ellos a través de los alimentos y agua. Algunos de estos compuestos son los antibióticos, quimioterapéuticos, crocistinas, micotoxinas y algunos productos del metabolismo de plantas y líquenes.⁴

3.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer afecta a toda la humanidad, pero hay diferencias marcadas a través de fronteras locales, nacionales y regionales, particularmente cuando se consideran tipos de tumores específicos.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; con aproximadamente unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas en 2012. (Figuras 1 y 2)

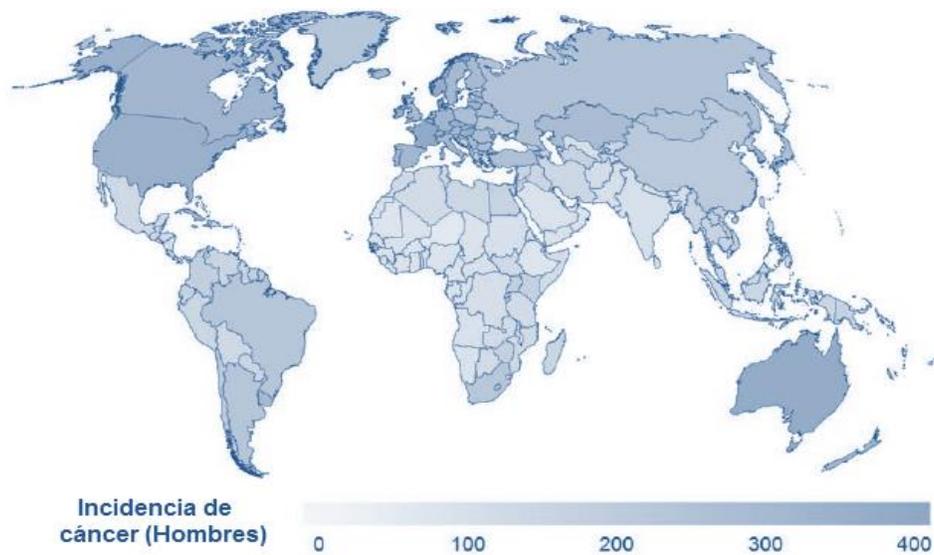


Figura 1. Distribución de la incidencia de cáncer en hombres durante el año 2012.

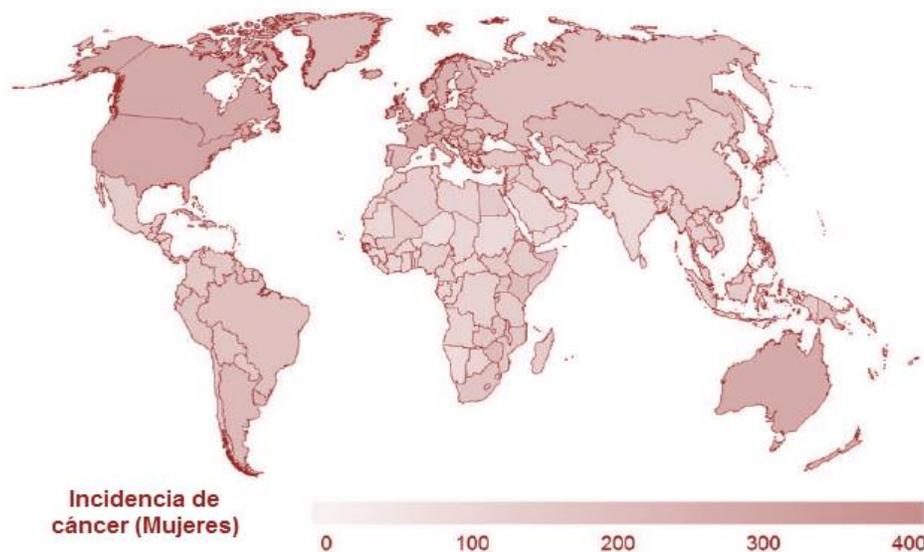


Figura 2. Distribución de la incidencia de cáncer en mujeres durante el año 2012.⁴

En los países en transición epidemiológica los más comunes incluyen cáncer en pulmones, mama, próstata y colorrectal., pero los cánceres de estómago, esófago e hígado siguen siendo altos.

Los datos de países de bajos recursos muestran que el cáncer cervicouterino sigue siendo el más común entre las mujeres. En países de bajos y medios recursos, la incidencia en los tumores es relativamente baja pero los datos de mortalidad correspondiente muestran el reflejo de diagnóstico como última etapa y los pobres resultados clínicos.

En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón (16.7%), próstata (15%), colorrectal (10%), estómago (8.5%) e hígado (7.5%). En la mujer fueron los de mama (25.2% del total), colorrectal (9.2%), pulmón (8.7%), cuello uterino (7.9%) y estómago (4.8%).

En el mundo se estima que el diagnóstico de cáncer en niños (0-14 años) en 2012 fue de 165 000 (95 000 en niños y 70 000 en niñas).

Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo.⁴

Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se deben a cinco factores de riesgo comportamentales y alimentarios (índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de tabaco y alcohol) y, por lo tanto, pueden prevenirse.²

El tabaco se ha asociado con 70% de cáncer de pulmón, 22% de muertes por cáncer y es conocido como factor causante en más de 10 tipos de cáncer, muchos de los cuales podrían ser prevenidos. Más de un tercio de la mayoría de los cánceres puede ser prevenido a través de una dieta nutritiva, manteniendo un peso saludable y realizando actividades físicas regulares.¹¹

3.1.3 CÁNCER EN MÉXICO

En México se registran 160 mil nuevos casos de cáncer cada año, 80 mil fallecimientos y cerca de 70% se diagnostican en etapas avanzadas de la enfermedad, lo que complica el tratamiento e impacta en la supervivencia de los afectados.¹²

Durante 2013, la morbilidad hospitalaria por tumores malignos (población que egresa de un hospital por dicha enfermedad) más alta tanto en mujeres como en hombres menores de 20 años, fue por cáncer de órganos hematopoyéticos. Los tratamientos contra el cáncer en la infancia y adolescencia tienden a ser exitosos; los niños más pequeños generalmente tienen mejores expectativas de sobrevivencia a la enfermedad lo que posiblemente se debe al oportuno diagnóstico y tratamiento.¹³

De acuerdo con la OMS en el 2014 se reportaron 33 900 casos de hombres y 38 000 casos de mujeres de mortalidad por cáncer. El enfoque de México ha sido predominantemente en los factores clave de riesgo del cáncer, en particular mediante la aplicación de la “Estrategia Nacional de Prevención y Control De Sobrepeso y Obesidad”. Como resultado, en 2013, el

gobierno lanzó una serie de estrategias para abordar esto incluyendo: educación pública, sensibilización, un modelo sanitario y normativo y medidas fiscales.¹¹

Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas.

3.1.4 DESARROLLO CLÍNICO

Siendo un proceso que ocurre sólo cuando se han acumulado diversas mutaciones genéticas, el cáncer requiere de largos periodos de tiempo para desarrollarse. Usualmente, existe un periodo de latencia entre la exposición a un agente carcinogénico o un evento de mutación celular y la aparición de células cancerígenas.

El cáncer se desarrolla en tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión, sin embargo, si la proliferación celular en un tejido cancerígeno se expande a otros, se produce una cuarta llamada metástasis.¹⁴

3.1.4.1 INICIACIÓN

En la mayoría de los casos, la activación de oncogenes y/o desactivación de algunos genes supresores llevan a un aumento descontrolado en la rapidez del ciclo celular y la inactivación de los mecanismos apoptóticos. Estos cambios pueden darse al azar o ser propiciados por la exposición a agentes carcinogénicos.¹⁴

3.1.4.2 PROMOCIÓN

Una vez que se ha llevado a cabo una primera exposición es necesaria la exposición a ciertas sustancias que aumentan el daño al material genético, llamados promotores. La acción de dichos promotores puede llegar a ser reversible en una etapa inicial, sin embargo, exposiciones posteriores aumentan la probabilidad de modificaciones al material genético.¹⁴

3.1.4.3 PROGRESIÓN

Durante esta etapa, ocurren una serie de cambios en el material genético de la célula normal lo que se reflejado en su comportamiento, crecimiento y función lo que obtiene como resultado una célula cancerígena. En la célula cancerígena hay un aumento en la rapidez de crecimiento y división celular, aunque puede variar con respecto al tipo de célula y la agresividad del cáncer.¹⁴

3.1.4.4 METÁSTASIS

Una vez que el cáncer se ha establecido en un tejido, si estas células continúan dividiéndose pueden lograr invadir tejidos cercanos. Si la célula cancerígena escapa al sistema de detección del sistema inmune puede ser diseminada a través del cuerpo; lo cual es conocido como metástasis.¹⁴ Metástasis es el término usado para describir la capacidad de tumores sólidos para propagarse a nuevos sitios en el cuerpo y establecer tumores secundarios. Muchos pacientes que mueren de cáncer es por consecuencia de la diseminación metastásica a órganos vitales en lugar de los tumores primarios.¹⁵

3.1.5 TRATAMIENTO

El principal objetivo para un tratamiento es el curar o prolongar considerablemente la vida de los pacientes, y garantizar la mejor calidad de vida posible a quienes sobreviven a la enfermedad.²

El tratamiento del cáncer a menudo abarca más de un enfoque, y la estrategia depende en gran medida de la naturaleza del cáncer y de cuánto se ha progresado. Los principales tratamientos son todavía cirugía, radioterapia, y quimioterapia. Sin embargo, otros enfoques, tales como la terapia fotodinámica (PDT), anticuerpos y vacunas; así como la terapia génica se encuentran aún en desarrollo.¹⁵

3.1.5.1 DIAGNÓSTICO

La primera fase fundamental en el tratamiento del cáncer es el diagnóstico mediante un examen patológico. El cáncer sólo se diagnostica cuando un tumor sólido ha crecido lo suficiente para que el paciente lo pueda notar directamente por su tamaño y ubicación, este puede causar obstrucción; una sensación de presión o dolor (por ejemplo, en mama, esófago, tumores de cabeza y cuello); o mediante síntomas indirectos, como rastros de sangre en la orina o las heces (por ejemplo, en cáncer de vejiga o intestino) o tos intensa (por ejemplo, en el pulmón). Una vez establecido el diagnóstico se deben tomar en cuenta una o varias modalidades de tratamiento principales - cirugía, radioterapia y tratamiento sistémico -, elección que debe basarse en pruebas científicas sobre el mejor tratamiento existente teniendo presentes los recursos disponibles.

Cuando el tumor está localizado y es de pequeño tamaño, es probable que la cirugía, y a veces la radioterapia, alcancen muy buenos resultados por sí solas; esto solo es posible si la metástasis del tumor primario no ha ocurrido.^{2,15}

La quimioterapia por sí sola puede ser eficaz para un pequeño número de tipos de cáncer, como las neoplasias hematológicas (leucemias y linfomas), que por lo general puede considerarse que están extendidas desde el principio.

3.1.5.2 QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia implica el uso de fármacos de bajo peso molecular para destruir selectivamente un tumor o al menos limitar su crecimiento.

Es usada para tratar varios tipos de cáncer; para muchas personas la quimioterapia puede ser considerada el único tratamiento que reciban. El tipo de tratamiento que necesite cada persona depende del tipo de cáncer, si se ha expandido y donde, además de si se tienen otros problemas de salud.

La quimioterapia puede darse por diferentes vías. Algunas de ellas son:

- **Oral:** tabletas, cápsulas y líquidos que se degluten.
- **Intravenosa:** el medicamento va directamente a la vena.
- **Intramuscular o subcutánea:** una sola dosis que se aplica en un músculo del brazo, muslo o cadera, o debajo de la piel en la zona grasa del brazo, pierna.
- **Intratecal:** es inyectada entre las capas de tejido que cubren el cerebro y médula espinal.
- **Intraperitoneal:** va directamente a la cavidad peritoneal, la cual contiene los órganos como estómago, intestino e hígado.
- **Intra-arterial:** se inyecta a la arteria que conduce el cáncer.
- **Tópico:** se administra directamente sobre el lugar de acción, generalmente en la piel.

La frecuencia y duración de quimioterapia varía y generalmente se administra en ciclos.

Un ciclo significa que se hará la administración de quimioterapia seguido por un periodo de descanso.²

Una ventaja de la quimioterapia es que, al darse la administración intravenosa, los fármacos de bajo peso molecular se distribuyen a través de la mayoría de los tejidos del cuerpo y así puede matar células tumorales en áreas protegidas (cerebro, por ejemplo) o aquellas células en el proceso de metástasis. Sin embargo, las desventajas de muchos agentes citotóxicos incluyen desagradables efectos adversos, como supresión de médula ósea, lesiones en tracto GI, pérdida de cabello, náuseas y un rápido desarrollo de resistencia clínica. Estos efectos adversos ocurren porque los agentes citotóxicos, como fármacos que interactúan con DNA, inhibidores de tubulina y antimetabolitos; actúan tanto en células tumorales (a menudo

desencadenando apoptosis) y en células sanas. Sus mecanismos de acción incluyen una captación y una acción más rápidas y diferenciadas en las células cancerosas que se dividen más rápidamente.¹⁵

3.2 FÁRMACOS INTERCALANTES DEL DNA

Un gran número de fármacos anticancerosos ejercen su efecto mediante la interacción con el ADN. Estos agentes son actualmente el grupo más ampliamente utilizado en la práctica clínica. Su forma es plana, que consiste en tres o cuatro anillos aromático condensados, y su mecanismo de acción implica la inserción entre los pares de bases de ADN, perpendicular al eje de la hélice. Una vez en posición, se mantiene en su lugar por las interacciones, incluyendo enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Además, muchos de los intercaladores tienen cadenas laterales ricas en funcionalidades de unión de hidrógeno, por ejemplo, el azúcar de amino de la doxorrubicina o los anillos de pentapéptidos de dactinomicina que se posicionan en ranuras del ADN de menor o mayor, donde estabilizan aún más el aducto mediante la formación de enlaces de hidrógeno y otras interacciones no covalentes. Algunos intercaladores con series de grupos funcionales en cualquier extremo de la molécula sobresalen en ambas de las ranuras menores o mayores y se refieren a veces como agentes de roscado. En términos generales, su mecanismo de acción implica interferir con el ADN de procesamiento, lo que conduce a la muerte celular, por lo general a través de la invocación de la apoptosis.

Al igual que con otras familias de fármacos contra el cáncer, la toxicidad selectiva hacia las células cancerosas puede surgir solamente de la diferencia en la tasa de crecimiento de las poblaciones de las células de cáncer en comparación con las células normales, que también explica sus efectos secundarios principales de toxicidad para la médula ósea y células del tracto GI.

Otra posibilidad es que la selectividad puede surgir a través de una reducción de la capacidad de las células cancerosas para reparar las lesiones del ADN en comparación con las células normales, lo que desencadena la apoptosis.¹⁵

La mayor permeabilidad y el efecto de retención (EPR, por sus siglas en inglés) es un fenómeno único de los tumores sólidos relacionado con sus diferencias anatómicas y fisiopatológicas de tejidos normales. El efecto EPR considera la naturaleza anatómica-fisiopatológica única de los de los vasos sanguíneos del tumor que facilita el transporte de

macromoléculas en los tejidos tumorales y sirve como base para desarrollar terapias anticancerígenas macromoleculares.¹⁶

La familia más grande de agentes de intercalación en el uso clínico son las antraciclinas, que contienen cuatro anillos aromáticos condensados, e incluyen antibióticos de origen natural tales como doxorubicina, daunorrubicina, y aclarrubicina y los análogos semisintéticos relacionados epirubicina e idarrubicina.¹⁵

3.3 DOXORRUBICINA

La doxorubicina es un antibiótico citotóxico de antraciclina aislado de los cultivos de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

Actualmente es uno de los fármacos anticancerígenos más exitosos y ampliamente utilizados debido a su amplio espectro de actividad (Figura 3). Es un fármaco antineoplásico o citotóxico usado para quimioterapia. Utilizado para tratar leucemias agudas, linfomas, y una variedad de tumores sólidos, incluyendo los carcinomas de mama, pulmón, tiroides, y ovario, así como carcinomas de tejidos blandos. La dosis acostumbrada para adultos es de 60 a 75 mg/m² de manera IV una vez durante 21 días debido a que se requiere una dosificación muy exacta de un determinado fármaco por su toxicidad y el estrecho margen terapéutico.

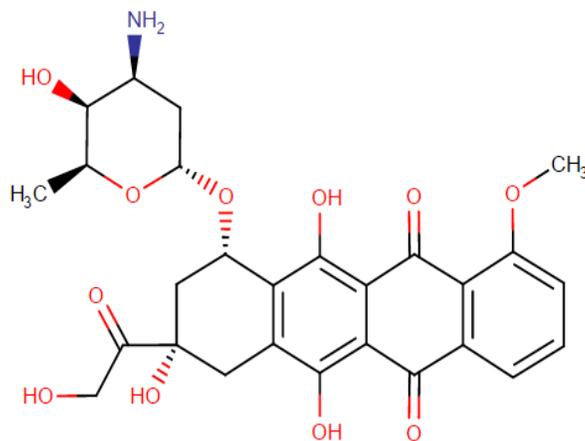


Figura 3. Estructura química de doxorubicina

Algunos de sus efectos adversos incluyen náuseas y vómitos, mielosupresión, mucositis y alopecia. Las dosis más altas acumuladas se asocian con miocardiopatía y puede ocurrir una insuficiencia cardíaca potencialmente fatal. Por lo tanto, la monitorización cardíaca se usa a veces para ayudar en la seguridad limitando la dosificación total. Se presenta una toxicidad irreversible miocárdica grave que conduce a la insuficiencia cardíaca congestiva cuando la

dosis total de doxorubicina se aproxima a 450 mg/m^2 .^{15,17} Al encontrarse en una administración única, la prevención se ha centrado en la limitación de la dosis acumulativa, diagnóstico temprano (como angiocardiografía de radionucleidos o ecocardiografía), una alteración en el horario de administración (sustitución de inyección en bolo por una infusión IV continua y prolongada), el desarrollo de antraciclinas menos cardiotóxicas además del uso de cardioprotectores (como dexrazoxano).

3.3.1 MECANISMO DE ACCIÓN

La doxorubicina se une a ácidos nucleicos por medio de una intercalación específica del núcleo plano de la antraciclina con la doble hélice del DNA (Figura 4). El anillo antraciclínico es lipofílico pero el final se encuentra saturado con abundantes grupos hidroxilos adyacentes al grupo amino de la ribosa, produciendo un centro hidrofílico. La molécula es anfotérica, teniendo funciones ácidas en el anillo por los grupos fenólicos y una función básica en el grupo amino de la ribosa. Se une tanto a membranas celulares como a proteínas del plasma.¹⁷

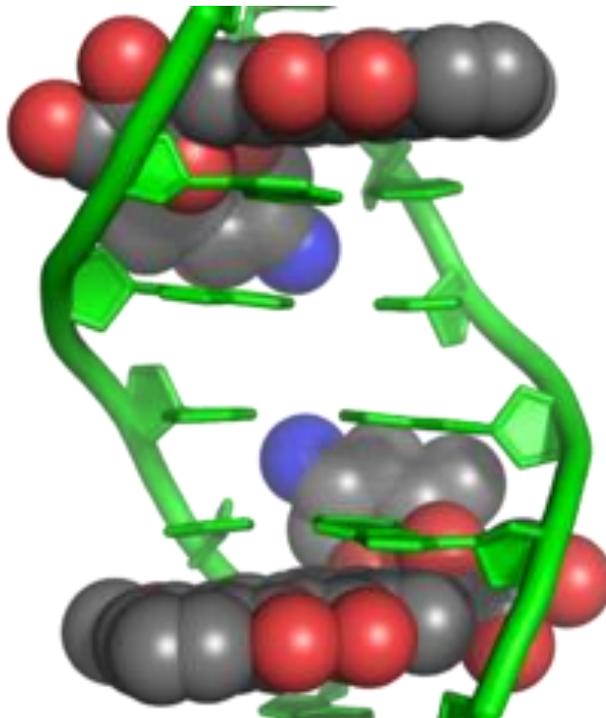


Figura 4. Mecanismo de acción de Doxorubicina como agente intercalante¹⁵

3.3.2 FARMACOCINÉTICA

3.3.2.1 DISTRIBUCIÓN

El tiempo de vida media de distribución inicial es de aproximadamente 5 minutos, lo que sugiere la rápida entrada a los tejidos de la doxorubicina, mientras que su lenta eliminación de los tejidos se refleja en un tiempo de vida media terminal de 20 a 48 horas.

El volumen de distribución en estado estacionario oscila entre 809 a 1214 L/m² y es indicativo de la absorción del fármaco en los tejidos.

La unión de doxorubicina y su mayor metabolito doxorubicinol, a las proteínas del plasma es cerca del 74 al 76% y es independiente de las concentraciones de plasma de doxorubicina mayores a 1.1 µg/mL. La doxorubicina no cruza la barrera hematoencefálica.

3.3.2.2 METABOLISMO

La reducción enzimática de la posición 7 y la escisión del azúcar daunosamina produce agliconas que van acompañadas de formación de radicales libres, la producción local de éstos podría contribuir a la actividad cardiotoxicidad de la doxorubicina.

La disposición de doxorubicinol (DOX-OL) en pacientes es limitada en la formación, siendo la semivida terminal del DOX-OL similar a la de la doxorubicina.

3.3.2.3 EXCRECIÓN

El aclaramiento plasmático está en el intervalo de 324 a 809 mL/min/m² y es predominantemente por la excreción biliar y el metabolismo. Aproximadamente 40% de la dosis aparece en la bilis en 5 días, mientras solo 5 al 12% del fármaco y sus metabolitos aparecen en la orina durante ese mismo periodo. En la orina <3% de la dosis es recuperada como DOX-OL después de 7 días. La doxorubicina se excreta principalmente por bilis, y un nivel elevado de bilirrubina es considerado un marcador para la reducción de la dosis. El aclaramiento sistémico de doxorubicina se reduce significativamente en mujeres obesas con un peso corporal ideal mayor al 130%. Hay una reducción significativa en el aclaramiento sin ningún cambio en el volumen de distribución en pacientes obesos cuando se comparan con pacientes normales con menos del 115% de peso corporal ideal.¹⁸

3.3.3 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS:

En la tabla 1 se encuentran las propiedades fisicoquímicas de la doxorubicina.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de doxorubicina

Fórmula química	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁
Peso molecular	543. 5193 g/mol
Nombre IUPAC	(8S,10S)-10-([(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracene-5,12-dione
Solubilidad en agua	1.18 mg/mL
log P	1.27
Permeabilidad en Caco2	-6.8
pKas	8.94,9.53

3.4 SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

3.4.1 SISTEMAS CONVENCIONALES DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Durante las últimas décadas, el tratamiento de diversos padecimientos ha sido realizado mediante la administración de fármaco al cuerpo humano por medio de diferentes formas farmacéuticas, como las tabletas y cápsulas. La mayor parte de estos sistemas farmacéuticos son formulados para liberar el principio activo inmediatamente después de la administración para obtener una absorción sistémica rápida y completa. Estos sistemas de liberación inmediata resultan en una rapidez de absorción relativamente alta, dando inicio a los efectos farmacodinámicos acompañantes. Sin embargo, después de darse la completa absorción del principio activo, las concentraciones plasmáticas comienzan a disminuir conforme al perfil farmacocinético del mismo. Eventualmente, las concentraciones plasmáticas llegan a ser menores a la concentración mínima efectiva (CME), dando como resultado la pérdida de la actividad terapéutica. Por lo tanto, durante un tratamiento farmacológico será necesaria una administración de una nueva dosis antes de alcanzar la CME para mantener el efecto terapéutico.

Todos estos sistemas tradicionales son comunes en la prescripción diaria para llevar a cabo la práctica hospitalaria; siendo lo más frecuente a nivel mundial. Una alternativa a este tipo de sistemas es la administración de un sistema que provea de una liberación modificada del

principio activo, manteniendo las concentraciones plasmáticas en un tiempo mayor que a los sistemas convencionales y/o logrando ubicación espacial.¹⁹

3.4.2 SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

Los medicamentos de liberación modificada son aquellos en los que la velocidad y/o el lugar de liberación del o los principios activos son diferentes de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía. De esta manera se logran objetivos terapéuticos difíciles de conseguir con las formas tradicionales o tratamientos más cómodos, ya que de este modo se logra reducir el control de la medicación por el paciente.

En los últimos años se han realizado diversos avances en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos; estos avances han tenido uno o varios de los siguientes beneficios:

- Liberación controlada de la cantidad de fármaco a un tiempo deseable
- Control de la concentración de fármaco dentro de la ventana terapéutica
- Maximización de la eficacia en la relación dosis-respuesta
- Reducción de efectos adversos
- Minimización de las dosificaciones frecuentes

De acuerdo a su sofisticación técnica, los sistemas de liberación de fármacos de liberación modificada o controlada, se clasifican en:

1) Sistemas de liberación pre-programada de fármacos:

En este grupo, la liberación de fármacos ha sido preprogramada a perfiles de velocidad específica. Esto se logra mediante el diseño del sistema, que controla la cesión del fármaco a través de una matriz o una membrana.

2) Sistemas modulados por activación:

La liberación del fármaco es activada por algún proceso físico, químico o bioquímico y/o facilitada por estímulos externos. Por lo tanto, la cantidad de fármaco liberado será controlada por el estímulo aplicado.

Los estímulos se pueden clasificar como:

- Físicos: tales como presión osmótica, presión hidrodinámica, presión de vapor, mecánicos, magnéticos, sonoforesis, iontoforesis o hidratación.
- Químicos: pH, hidrólisis, fuerza iónica.
- Bioquímicos: enzimas.

3) Sistemas de suministro por realimentación:

La liberación en este grupo es activada por un agente desencadenante, una sustancia bioquímica en el cuerpo, y es regulada por la concentración mediante mecanismos de retroalimentación. Por ello su liberación estará controlada por la concentración del agente desencante detectado por un sensor. Sistemas de administración dirigidos al sitio (vectorización).¹⁹

En la figura 5 se representa el curso temporal de la concentración plasmática de un fármaco administrado desde distintos sistemas:

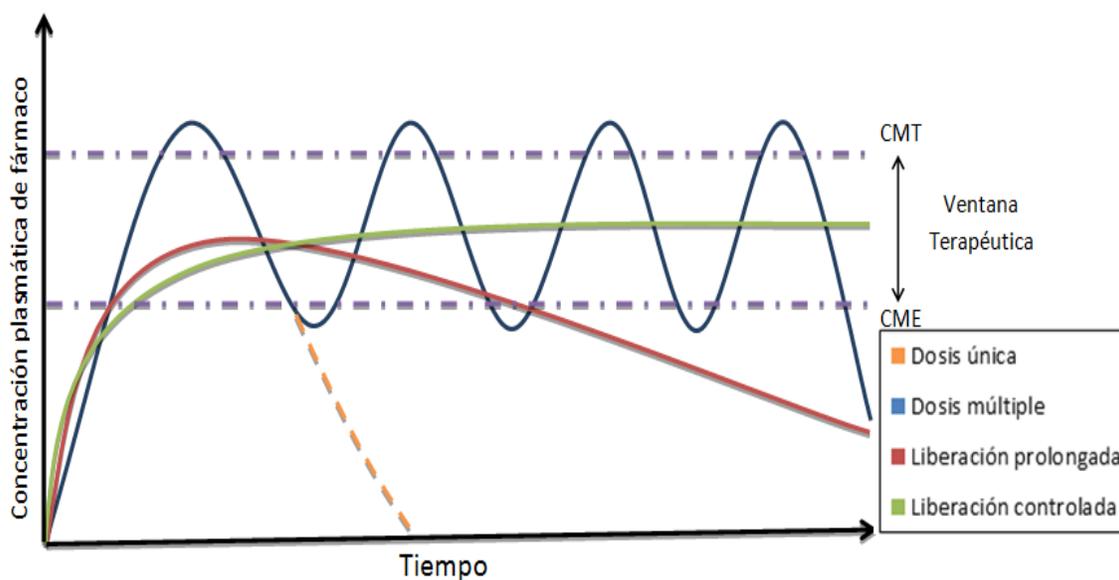


Figura 5. Representación hipotética de la concentración plasmática de fármacos liberados desde distintos sistemas de liberación. (CMT: Concentración mínima tóxica; CME: Concentración mínima efectiva).

La administración modificada de fármacos implica, generalmente, la asociación de un fármaco con un sistema portador, permitiendo de este modo la modulación de las propiedades farmacocinéticas y la biodistribución del fármaco. Un sistema ideal de liberación de fármacos debería liberar al fármaco en el momento deseado, a la velocidad requerida por el cuerpo durante el tiempo de tratamiento y especialmente al sitio de acción.²⁰

3.4.3 SISTEMAS TERAGNÓSTICOS

Los sistemas teragnósticos se caracterizan por su actividad dual en tratamiento y diagnóstico; con el desarrollo de estos sistemas se busca ser capaz de monitorear el avance

de un padecimiento y proveer de una terapia en el mismo momento. Este enfoque busca reducir el tiempo de retraso para la administración de un tratamiento, así como facilitar el cuidado del paciente, e inclusive llevar un control de manera individual del régimen de dosificación. Los sistemas teragnósticos incluyen, pero no se limitan a sistemas de liberación de fármacos acoplados a biomarcadores de diagnóstico molecular, sondas de imagenología y de técnicas de detección temprana y nanoplataformas que incorporan sistemas de contraste y componentes terapéuticos.²¹

3.5 NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es un área interdisciplinar dedicada al estudio, diseño, creación, manipulación y aplicación de materiales y sistemas funcionales mediante el control de la materia a escala menor que un micrómetro, así como su explotación tanto a escala de laboratorio como industrial. La emergencia de la nanociencia y la nanotecnología ha supuesto una gran influencia en un sinnúmero de industrias y particularmente en la industria farmacéutica.

Las herramientas y los materiales desarrollados para otras industrias de nanotecnología también tienen potenciales oportunidades en la industria farmacéutica.

En una de sus ramas, la nanotecnología investiga el diseño de los materiales de tamaño nanométrico que poseen propiedades físicas y químicas muy distintas a las del material masivo; dentro de ellas se encuentran las partículas magnéticas.

El nuevo enfoque que se propone para las herramientas nanotecnológicas clasifica su utilidad en tres grandes categorías farmacéuticas: desarrollo del proceso, desarrollo del producto y medicina personalizada.²²

3.6 NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas (NP) son sistemas submicrónicos (entre 1 y 100 nm de acuerdo a la definición actual, aunque hay ejemplos de NPs de tamaños de varios cientos de nanómetros) hechas de materiales inorgánicos u orgánicos (como polímeros), que pueden ser o no biodegradables. Su importancia se relaciona con el hecho de que las características de las NP son diferentes a los materiales a granel de la misma composición, que se debe principalmente a los efectos de tamaño, las propiedades magnéticas y electrónicas y el fenómeno de superficie que es reducido por su tamaño.²³

Las nanopartículas superparamagnéticas, o sistemas magnéticos en nanoescala, han generado un interés continuo desde el año 1940. Existen diferentes tipos de estas nanopartículas: I) ensambladas por ejemplo con cobalto, níquel o maghemita; II) aisladas únicamente de níquel, cobalto o bien de magnetita.²⁴

El alto potencial de los efectos magnéticos, tamaño pequeño y una alta área superficial de las nanopartículas magnéticas atrajo mucha atención últimamente para considerarlas en diagnósticos terapéuticos y varias aplicaciones biotecnológicas, incluyendo el tratamiento con hipertermia y la liberación de fármacos.²⁵ En particular, las elaboradas con magnetita debido a su alta magnetización y relativamente baja toxicidad.²⁶

El tamaño del nanomaterial influye en la cinética y en la acumulación del tumor. El material necesita ser más pequeño y su tamaño puede influir en varios parámetros que afecten la extravasación al tumor y difusión al intersticio.³

Las nanopartículas ofrecen nuevas y emocionantes oportunidades para desarrollar sistemas eficaces de administración de fármacos, ya que es factible producir, caracterizar y adaptar específicamente sus propiedades funcionales para aplicaciones de administración de fármacos.²⁰ Además ofrecen la posibilidad de encapsular fármacos pocos solubles, protegen moléculas terapéuticas y modifican la circulación sanguínea y los perfiles de distribución en tejidos. Estas propiedades son atractivas en oncología ya que puede encapsular citotóxicos, productos que exhiben una alta toxicidad. La nanotecnología también es atractiva porque puede facilitar la combinación de regímenes que son muy usados en la terapia contra el cáncer, sin embargo la determinación de una terapéutica óptima usando NP es desafiante.³

Algunas otras aplicaciones que pueden llegar a tener las nanopartículas se enlistan más adelante.

3.6.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Las nanopartículas magnéticas se han sintetizado con un número de diferentes composiciones y fases, incluyendo óxidos de hierro como Fe_3O_4 y Fe_2O_3 , metales puros, tales como Fe y Co, espinelas de tipo ferromagnetos como MgFe_2O_4 , MnFe_2O_4 y CoFe_2O_4 , así como las aleaciones de CoPt_3 y FePt . Durante los últimos años, se han descrito rutas sintéticas específicas para dar nanopartículas magnéticas muy estables, monodispersas y de tamaño controlado. Varios métodos populares, como co-precipitación, descomposición térmica y/o reducción, síntesis por el uso de micelas, síntesis hidrotermal y todas las técnicas de pirólisis pueden dirigirse a la síntesis de nanopartículas magnéticas de alta calidad.²⁷

Diversos métodos han sido aplicados para la síntesis de polvos de Fe_3O_4 , algunos ya se mencionaron anteriormente y otros se enlistan a continuación: microemulsión, oxidación de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ con H_2O_2 , irradiación con rayos γ , irradiación de microondas y método de separación de las colas de mineral de hierro.

Las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) se han obtenido en varias dimensiones (< 100 nm) y formas, tales como esferas uniformes, esferas huecas y montajes nano núcleo/corteza.²⁸

Los métodos más usados se describen a continuación:

a) *Método de coprecipitación*: es una manera fácil y conveniente para sintetizar óxidos de hierro (ya sea Fe_3O_4 o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Se parte de una solución acuosa de las sales $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ y se adiciona una base bajo una atmósfera inerte a temperatura ambiente o a temperatura elevada. El tamaño, forma y composición de las nanopartículas magnéticas depende en gran medida del tipo de sal usada (como cloruros, sulfatos, nitratos), el ratio $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, la temperatura de reacción, pH y la fuerza iónica del medio. Con esta síntesis, una vez que todas las condiciones sintéticas son arregladas la calidad de las nanopartículas es completamente reproducible.²⁷

b) *Descomposición térmica*: las partículas magnéticas de este proceso se sintetizan a alta temperatura, mediante la descomposición de precursores de complejos metálicos como los acetilacetatos, cupferronatos y tensocativos como ácidos grasos, ácido oleico y hexadecilamina.²⁹

c) *Microemulsiones*: son ampliamente utilizadas para la síntesis de partículas con tamaño uniforme en una microemulsión w/o. Dentro de las cuales se da la reacción de síntesis, de esta manera se logra mantener el tamaño de partícula con una baja dispersión. La formación de precipitados es controlada por la concentración de tensoactivos en el medio.²⁹

3.6.2 MAGNETITA

La magnetita es un compuesto formado por óxidos de hierro de fórmula Fe_3O_4 , donde el oxígeno forma la red cúbica de cara centrada Y $[\text{XY}]_b\text{O}_4$, $\text{X}=\text{Fe}^{2+}$ y $\text{Y}=\text{Fe}^{3+}$, donde los corchetes denotan los sitios octaédricos (32 espacios) y los restantes los sitios tetraédricos (64 espacios), con dimensiones de celda de 0.839 nm, y con una densidad de 5.18 g/cm. Posee una dureza de 5 ½ en escala de Mohs, siendo un material ferromagnético con temperatura de Curie de 850 K y resistividad eléctrica de 105 $\Omega\cdot\text{cm}$. La magnetita es un

material de color negro, ferromagnético, semiconductor que difiere de otros óxidos de hierro al contener hierro divalente y trivalente.³⁰

La magnetita ha ganado especial interés debido a su alta magnetización y relativamente baja toxicidad. Sin embargo, la síntesis de nanopartículas magnéticas con una morfología y tamaño controlado se ha vuelto un área de estudio desafiante más específicamente en la aplicación biomédica, donde un control estricto en el tamaño es necesario, tal como se mencionó anteriormente.^{26,31}

3.7 MAGNETISMO

El magnetismo es un fenómeno físico mediado por campos magnéticos, corrientes eléctrica y momentos magnéticos. Debido a la composición de la materia por partículas subatómicas cargadas. El comportamiento de los materiales magnéticos describe como los materiales responden a los campos magnéticos y se clasifica en cinco grandes grupos (Figura 6):

- 1) Diamagnético: no tienen momentos magnéticos netos.
- 2) Paramagnético: tienen un momento magnético neto debido a electrones no apareados en orbitales parcialmente llenos. Sin embargo, los momentos magnéticos individuales no están alineados para dar un efecto magnético macroscópico hasta que se presenta un campo magnético.
- 3) Ferromagnético: a diferencia de los momentos paramagnéticos, los momentos atómicos en estos materiales exhiben interacciones muy fuertes. Estas interacciones son producidas por fuerzas de intercambio electrónico y dan como resultado una alineación paralela o antiparalela de los momentos atómicos. Los materiales ferromagnéticos exhiben una alineación paralela de los momentos que da como resultado una magnetización neta grande incluso en ausencia de un campo magnético. Ejemplos de ello son la magnetita.
- 4) Antiferromagnético: En estos materiales existe una disposición atómica que resulta en un momento magnético igual a cero. Como ejemplo de ello se encuentra la hematita, una estructura con iones oxígeno y iones Fe^{3+} en un empaquetamiento hexagonal. Los momentos magnéticos de los iones Fe^{3+} están acoplados en planos-c, pero antiferromagnéticamente acoplados entre planos.
- 5) Ferrimagnético: en compuestos iónicos, como los óxidos, la fuerza neta de los momentos magnéticos considera la estructura cristalina de los compuestos. Un tipo de ordenamiento magnético se denomina ferrimagnetismo, en estos compuestos la estructura está compuesta por distintos iones, de distinto tamaño y/o carga lo que resulta en

momentos magnéticos desiguales. Debido a la disposición de los distintos momentos magnéticos a lo largo de la estructura cristalina el momento magnético del material resulta casi nulo.³²

Las nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas deberán tener como requerimiento el superparamagnetismo. El superparamagnetismo ocurre en materiales magnéticos compuestos de cristales muy pequeños (El tamaño del umbral depende de la naturaleza del material en el caso de la magnetita se convierten en superparamagnéticos a tamaños <25 nm).²³

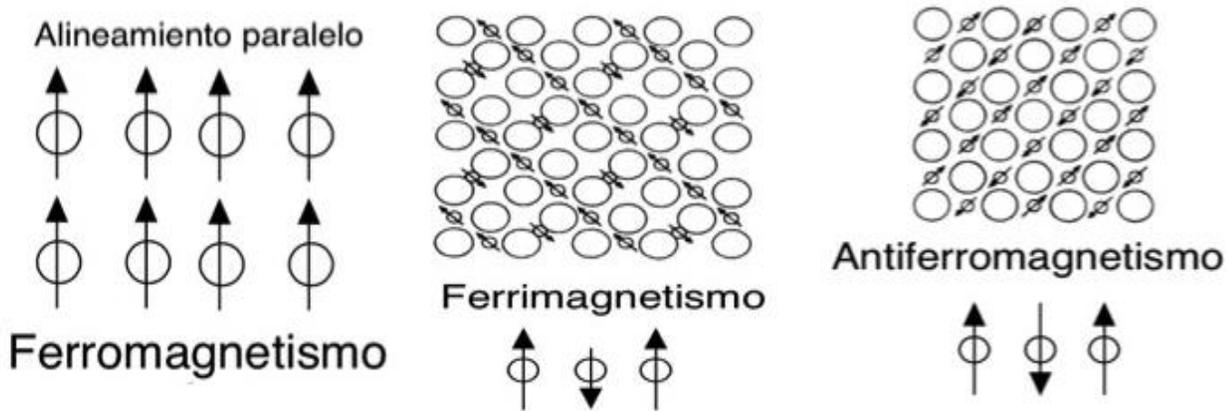


Figura 6. Diferentes comportamientos de los materiales magnéticos³²

3.7.1 TEORÍA DE DOMINIOS

Una propiedad de los materiales ferromagnéticos es poseer una baja magnetización espontánea, la cual puede ser aumentada por la aplicación de campos magnéticos bajos. Lo que permite que este fenómeno ocurra es la composición de los materiales por regiones pequeñas denominadas dominios, donde la magnetización local se encuentra saturada pero no necesariamente paralela, los dominios se encuentran separados por los llamados muros de Bloch, las cuales son un volumen estrecho de transición entre dos dominios magnéticos, y su momento magnético total es igual a cero en ausencia de un campo magnético externo; cuando esto ocurre se considera que se tiene un material con multidominios magnéticos.³³

Cuando un material alcanza un tamaño crítico (Figura 7), en orden nanométrico, no existe la posibilidad de formar transiciones entre dominios, es decir, se obtienen partículas con momentos magnéticos independientes, y se denominan monodominios magnéticos. Diversos investigadores han demostrado y hecho uso de la modificación de las propiedades magnéticas de acuerdo al tamaño de partícula, mediante la síntesis de nanopartículas que

actúan como monodominios magnéticos. Debido a este fenómeno es que los materiales ferromagnéticos, como la magnetita, en partículas de tamaño nanométricos muestran un comportamiento superparamagnético en presencia de campos magnéticos bajos.^{32,33}

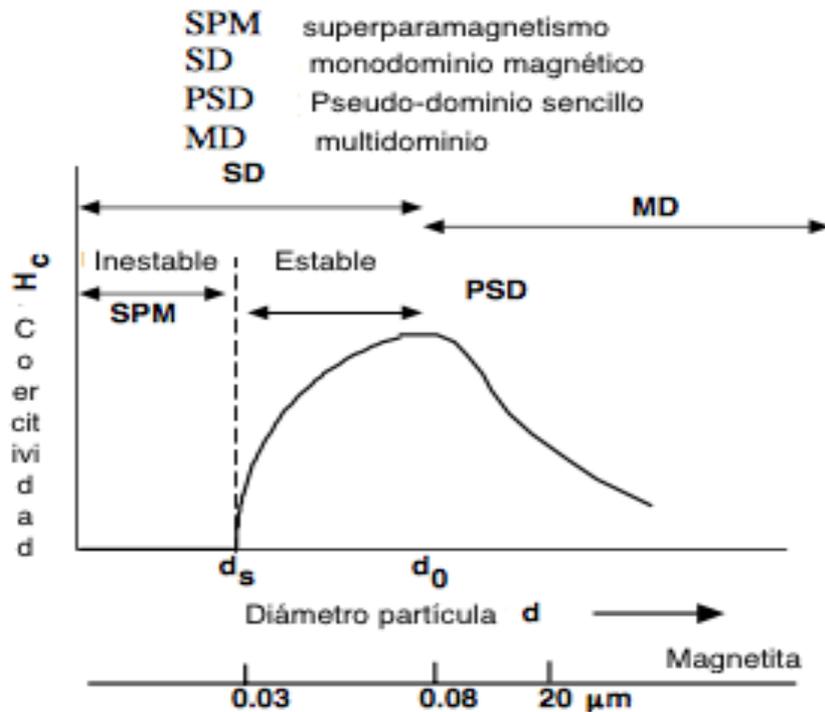


Figura 7. Dependencia de la coercitividad magnética de acuerdo a la teoría de dominios³²

3.8 RECUBRIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS

Rediseñar la superficie química de las estructuras a nanoescala da el potencial para lograr una orientación aún más eficaz y específica que puede ser lograda a partir de una funcionalización con diferentes clases de vectores, como péptidos y proteínas.³⁴

El recubrimiento de nanopartículas abarca una gran cantidad de materiales, incluyendo polímeros naturales y sintéticos.³⁵ Las modificaciones superficiales de las partículas pueden conferir biocompatibilidad y mejorar el tiempo de circulación. Además, la unión de los ligandos de orientación y los fármacos tiene un efecto positivo en conseguir una quimioterapia dirigida de dosis mínima.³⁶ Es por ello que en sus aplicaciones biomédicas, la biocompatibilidad de nanopartículas magnéticas, especialmente en su capa externa, es esencial y por eso el recubrimiento de las nanopartículas juega un papel importante en la interacción con su objetivo.³⁷

Las nanopartículas recubiertas son un grupo específico de nanopartículas, las cuales recientemente han recibido una significativa atención. Este tipo de nanopartículas poseen

varias características únicas adicionales en comparación con NP tradicionales con estructuras uniformes. Por ejemplo, sus propiedades ópticas se ve que son mejoradas debido al recubrimiento de las nanopartículas, también sus propiedades magnéticas tales como el ferromagnetismo, superparamagnetismo o su coercividad. Debido a la capacidad para diseñar libremente y ajustar sus propiedades físicas, las nanopartículas magnéticas tienen un gran potencial para su aplicación en los campos ópticos, eléctricos y biológicos.³⁸ Usando estas nanopartículas también se puede lograr que sean sensibles a temperatura o pH.³⁷

La modificación del área superficial de la partícula permitirá la focalización pasiva o activa al lugar deseado y mejorará la recaptación celular, así como la biodistribución. La funcionalidad de superficie (o recubrimiento) será importante para la interacción que tendrán las nanopartículas y los sistemas biológicos.³⁹

Por otra parte, el uso de las nanopartículas lipídicas como acarreadores de fármacos ha crecido durante los últimos años; esto porque se pueden trabajar tanto con fármacos hidrofóbicos como hidrofílicos, algunos ejemplos son la doxorubicina, metotrexato, sorafenib, 5-fluorouracilo y otro tipo de fármacos como el diclofenaco, isoniazida, ibuprofeno, etc. Estos sistemas de administración se consideran capaces de dirigir los fármacos a ciertos órganos o tejidos y pueden usarse en diversas vías de administración incluyendo la administración oral, ocular y parenteral.⁴⁰

Las matrices lipídicas presentan grandes beneficios con respecto a otro tipo de acarreadores. De hecho, ellas aseguran una liberación controlada de fármacos, protegen al fármaco de la degradación e inactivación metabólica, muestran una alta eficiencia en la carga del fármaco y no son tóxicos a nivel celular ni sistémico. Comparados con los liposomas convencionales, la superficie de las nanopartículas lipídicas puede ser fácilmente modificada por grupos, incluyendo grupos funcionales de amino ($-NH_2$)⁴¹.

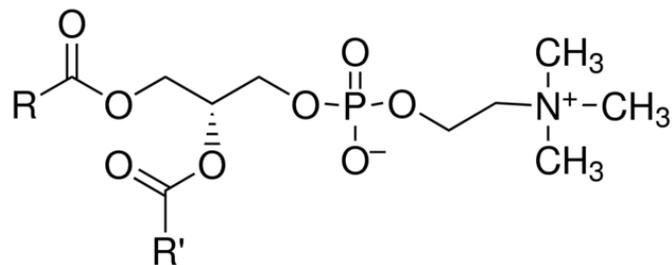
En general, las nanopartículas sólidas lipídicas son empleadas para liberar fármacos lipofílicos para largos periodos de tiempo. Además de la entrega continua, muchas situaciones también requieren, o se beneficiarían de un incremento de la temperatura de manera puntual alrededor de los objetivos. Para abordar esta necesidad, se desarrolló un nuevo esquema que integra elementos de calentamiento magnético en nanopartículas lipídicas para la hipertermia. El calentamiento se realiza alrededor de los 45 °C, así las funciones de muchas proteínas se modifican lo que altera su crecimiento y diferenciación celular y podría potencialmente inducir la apoptosis. Idealmente, el calentamiento magnético

inducido por nanopartículas podría estar bien controlado y altamente localizado, y podría resultar en la ausencia de efectos sistémicos y muy reducidos efectos secundarios para los pacientes, además de lograr liberación solo y exclusivamente bajo un estímulo externo en un tiempo determinado.⁴²

3.8.1 LECITINA

La lecitina es componente de las membranas celulares, puede organizarse como bicapas membranales y por lo tanto se consume como una parte normal de la dieta. La fosfatidilcolina se utiliza para la preparación de suspensiones de vesículas comúnmente llamados liposomas.⁴³ Se ha utilizado en una amplia variedad de aplicaciones farmacéuticas como dispersantes, emulsionantes y agentes estabilizantes y se ha incluido en inyectables intramusculares e intravenosas, formulaciones de nutrición parenteral, así como productos tópicos.⁴⁴

Los fosfolípidos tienen la característica de una excelente biocompatibilidad y una anfifilicidad especial. La anfifilicidad confiere a los fosfolípidos el poder de autoensamblarse y de participar como estructuras emulsionantes y humectantes. La temperatura de transición de fase (T_c) es la temperatura a la cual los fosfolípidos pasan de gel a un estado líquido cristalino y con ello pueden realizar la liberación del fármaco que se encuentra encapsulado, por lo cual son considerados como una estrategia prometedora en el tratamiento de cáncer. Muchos factores afectan dicha temperatura como la naturaleza de la cabeza polar, la longitud de la cadena hidrocarbonada y la cantidad de saturación en la cadena hidrocarbonada. Al tenerlo como el recubrimiento de las nanopartículas se deberán escoger los fosfolípidos adecuados de acuerdo a su T_c . Con la temperatura de transición de fase se puede lograr un sistema termosensible, por lo tanto, sería necesario encontrar una manera que el calentamiento suave (39-42 °C) pueda promover la liberación de fármacos.⁴⁵



R, R' = Residuos de ácidos grasos

Figura 8. Estructura de lecitina soya

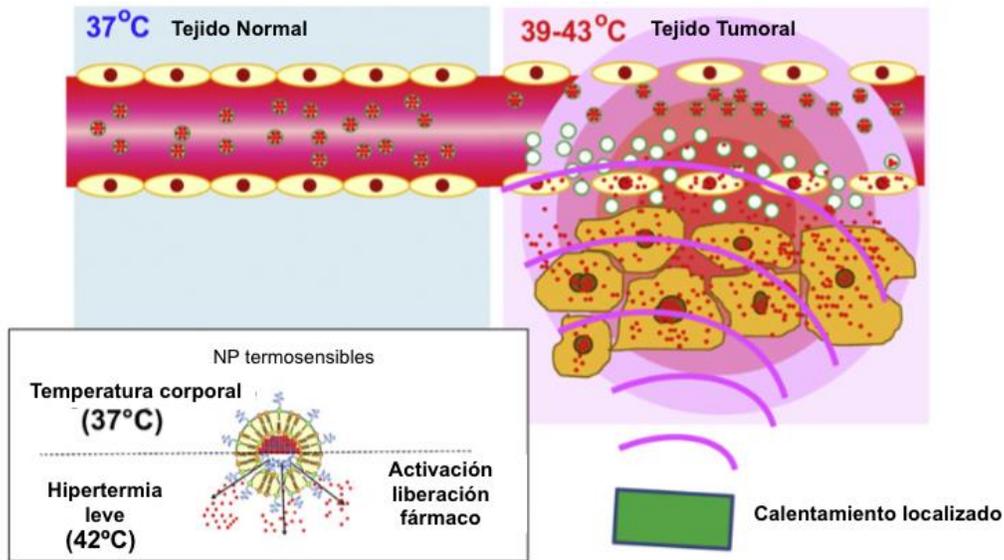


Figura 10. Estímulo de hipertermia aplicado sobre tejido tumoral

3.9 APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Las nanopartículas magnéticas tienen un gran campo de aplicación en cuanto a biomedicina se refiere, debido a sus propiedades superparamagnéticas, biocompatibilidad, biodegradabilidad, tamaño y posibilidad de manipular su superficie. Algunas de las aplicaciones que pueden llegar a tener son:

- ✓ Marcadores celulares/ separación celular
- ✓ Reparación de tejidos
- ✓ Liberación de fármacos: como acarreadores de fármacos para la administración específica de los mismos. El tamaño, carga y superficie química de las nanopartículas son importantes y afectan fuertemente tanto el tiempo de circulación sanguínea como la biodisponibilidad de las partículas dentro del cuerpo. El tamaño para inyección intravenosa óptimo va entre 10 a 100 nm; a su vez éstas demostraron un mayor tiempo de circulación sanguínea. Las partículas en este rango de tamaño son removidas rápidamente a través de extravasación y depuración renal. El acoplamiento del fármaco a las nanopartículas magnéticas puede ser usado para reducir la dosis y los efectos adversos a tejidos sanos además del costo asociado con el tratamiento. El revestimiento actúa para proteger la partícula magnética del entorno circundante y también puede ser funcionalizado fijando grupos carboxilo, biotina, avidina, carbodiimida y otras moléculas con el fin de aumentar el rendimiento hacia la diana. Estas moléculas actúan entonces

como puntos de unión para el acoplamiento de fármacos citotóxicos o anticuerpos diana frente al complejo portador.⁵⁰

✓ Resonancia magnética de imagen

✓ Magnetofección: es un método nuevo y eficiente, el procedimiento implica la asociación de ácidos nucleicos con nanopartículas superparamagnéticas seguida por la aplicación de un campo magnético que genera una concentración en la superficie celular resultando en una mejora significativa del DNA.⁵¹

✓ Hipertermia: la hipertermia por inducción magnética, es una de las terapias del tratamiento para cáncer, significa la exposición de los tejidos cancerígenos a un campo magnético alterno. El campo magnético no es absorbido por los tejidos vivos y puede ser aplicado a la región profunda en el organismo vivo. La cantidad de calor generada depende de la naturaleza del material magnético y los parámetros del campo magnético. Las células cancerígenas se destruyen a temperaturas mayores de 43°C, mientras que las células sanas pueden sobrevivir temperaturas más altas. El calor puede ser generado aplicando un campo magnético apropiado.³⁵ En la hipertermia inducida por campo magnético las partículas transforman la energía de la corriente alterna del campo magnético en calor, lo cual depende en gran medida por el tamaño de la partícula.³¹ Este tipo de tratamiento es usado para tratar varios tipos de cáncer. Puede ser usada tanto en áreas pequeñas del cuerpo o en el cuerpo entero. Además, el calor generado puede ser usado para manipular la liberación de activos, usando materiales termosensibles capaces de cambiar su estructura en base a temperatura. Por ejemplo Moom Sinn Aw y *col.* realizaron nanotubos de titanio recubiertas con micelas poliméricas y al aplicar un campo magnético liberaba el fármaco que estaba encapsulado.⁵² Otro ejemplo son los magnetoliposomas realizados por Yuxin Guo y *col.* donde demuestran que se ve un aumento en la liberación de su fármaco debido a la sensibilidad de la temperatura y por la excelente capacidad de respuesta y vectorización.⁵³

3.10 “TARGETING” (VECTORIZACIÓN) EXTERNO E INTERNO

El targeting o vectorización es la administración de un fármaco a un sitio específico en el cuerpo donde se pueden conseguir efectos deseables sin exponer a otros sitios a una posible toxicidad del fármaco.²⁰

Para lograrlo se realizan las siguientes estrategias:

1. Targeting interno activo, también llamado targeting mediado por ligandos, involucra la afinidad de un ligando en la superficie de las NP para especificar la retención y recaptación por tejidos enfermos. Su capacidad de liberación es directamente relacionada con el material de la nanopartículas y su estructura.³

2. Targeting interno pasivo: el sistema muestra una respuesta con respecto a cambios fisiológicos del tejido blanco, mismos que son propios del estado de enfermedad. Estos cambios fisiológicos pueden ser estímulos físicos o químicos (temperatura, pH, presión, fuerza iónica, etc.) lo que lleva a una modificación del sistema (cambio de tamaño, forma, solubilidad o disposición estructural) para proceder a la liberación.

3. Targeting externo: el sistema es capaz de reconocer únicamente a un estímulo que se da fuera del individuo (hipertermia, campo magnético, corriente eléctrica, ultrasonido), lo que permite su modificación (cambio de tamaño, forma, solubilidad o disposición estructural) para proceder a la liberación.⁵⁴

El targeting es otra herramienta que puede llegar a modificar el paradigma de la lucha contra el cáncer usando nanotecnología. Será interesante ver cómo las ideas obtenidas mediante el estudio de estrategias de targeting tanto pasivas como activas pueden converger para conducir a tratamientos más eficaces.³

3.10.1 LIBERACIÓN MAGNÉTICA DIRIGIDA DE FÁRMACOS

La liberación magnética dirigida de fármacos (MDT, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser de gran interés para el tratamiento de cáncer por características como el tiempo de vida media en torrente sanguíneo prolongado, reducción de la absorción inespecífica y el aumento de la acumulación en tumores mediante efecto EPR.⁵⁵ La liberación magnética dirigida de fármacos es un método prometedor que permite administrar dosis mayores de fármaco en un sitio diana específico. Hay estudios que demuestran que este aumento de la liberación del agente terapéutico puede ser alcanzada por la aplicación de un campo magnético externo por efecto de hipertermia magnética.⁵⁶

El daño innecesario al tejido sano puede ser disminuido usando un campo magnético externo que guíe al sistema magnético junto con el fármaco a las células que necesitan ser tratadas y así liberar el fármaco únicamente al sitio blanco. La eficacia de este sistema puede ser aumentada si se usa en conjunto con otros tratamientos, como la hipertermia; lo cual crearía un ataque dual a las células tumorales combinando el efecto del tratamiento farmacológico con el tratamiento térmico de las células.

Para lograr este tipo de liberación se necesita un conocimiento detallado del comportamiento magnético del material, así como su efectividad. Las propiedades magnéticas intrínsecas de las partículas dependen fuertemente de su forma y tamaño, tal como se ha mencionado con anterioridad.²⁰

Entre los diversos materiales nanoestructurados, las nanopartículas magnéticas son frecuentemente utilizadas como acarreadores de fármacos debido a que estas partículas son biodegradables y biocompatibles.⁵⁷ Los materiales más usados son los óxidos de hierro, más específicamente la magnetita (Fe_3O_4) debido a que ha demostrado ser biocompatible; además de la propiedad ya mencionada anteriormente, el superparamagnetismo, una propiedad que permite la estabilidad y la dispersión individual de las partículas después de que el campo magnético externo haya sido removido.

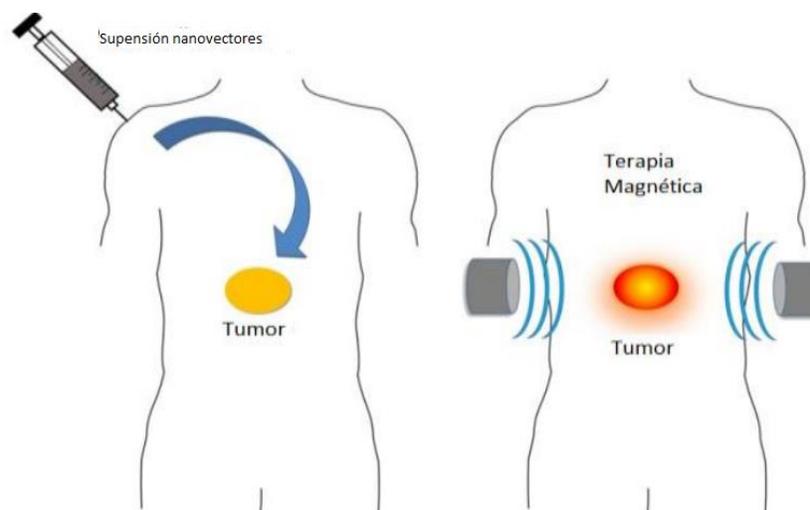


Figura 11. Representación de MDT

Para llevarse a cabo la distribución y liberación de los sistemas terapéuticos MDT un fármaco unido a la nanopartícula magnética, es introducido en el cuerpo y dirigido al sitio deseado mediante un campo magnético externo (Figura 11). Esto conduce a una mayor dosis del agente quimioterapéutico en la región del tumor con una dosis global reducida, reduciendo efectos adversos y maximizando la eficacia.⁵⁸ Este tratamiento es altamente deseado porque no solo libera el fármaco en la localización correcta en el cuerpo, también es un método no invasivo.⁵⁹

3.11 MODELOS DE ADSORCIÓN

El proceso de adsorción se presenta cuando una especie química (adsorbato) se une a una superficie (adsorbente) mediante diferentes interacciones. De acuerdo al tipo de interacciones entre el adsorbato y el adsorbente, existen dos clases de adsorción: la primera, cuando las interacciones son débiles (por ejemplo, fuerzas de Van der Waals) la adsorción se considera física o fisisorción, y cuando las interacciones son fuertes (covalentes) la adsorción es química o quimisorción. Este fenómeno generalmente es descrito mediante isotermas, donde la cantidad de la especie que se adsorbe (B) está en función de la concentración del adsorbato (C) (o de la presión cuando es gas) a una temperatura constante. La expresión general es:

$$B=Ck$$

Donde k es una constante de adsorción. Cuando la isoterma no es lineal existen otras aproximaciones para describir el fenómeno; las más utilizadas son las de Langmuir y Freundlich.

Los tipos de isotermas se describen a continuación:

3.11.1 ISOTERMA DE LANGMUIR

La teoría de Langmuir asume sitios de enlace homogéneos, energéticamente equivalentes y una vez que el adsorbato ha ocupado un sitio no existe interacción entre otras moléculas adsorbidas en sitios vecinos. Sin embargo, la isoterma de Langmuir ignora la posibilidad de formación de capas de fisisorción sobre la inicial. Si se admite la posibilidad de formación de multicapas, el crecimiento podría ser indefinido. La isoterma más usada para analizar la adsorción en multicapas se debe a S. Brunauer, P. Emmett y E. Teller (1938) denominada isoterma BET

3.11.2 ISOTERMA DE FREUNDLICH

Es una función empírica para adsorciones no ideales en superficies heterogéneas, es buena para describir fenómenos de adsorción multicapa.

3.11.3 ISOTERMA DE JOVANOVIC

La isoterma de Jovanovic ha sido derivada a partir de datos de cinéticas y en contraste con el modelo de Langmuir, esta toma en cuenta las interacciones entre el adsorbato adsorbido y el libre.⁶⁰

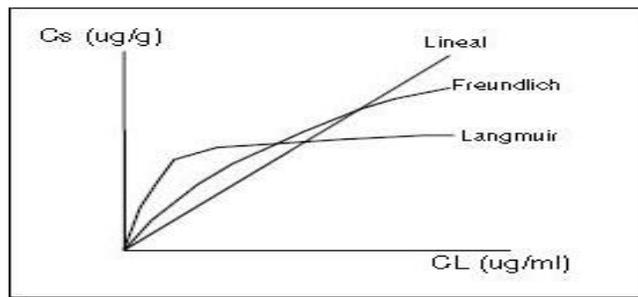


Figura 12. Tipos de isoterma de adsorción

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, se estima que el número de nuevos casos aumente en un 70% en las siguientes dos décadas; por ello ésta es un área que se debe atender y que tiene posibles soluciones o posibilidades de mejora.

El tratamiento del cáncer se basa principalmente en quimioterapia. Sin embargo, la falta de especificidad del fármaco hacia el tejido enfermo conlleva a importantes efectos secundarios. Además, la terapia suele ser sumamente invasiva y el alcance de dosis tóxicas es común, como por ejemplo en el caso de la doxorubicina.

Por otra parte, el uso de nanomateriales y materiales nanoestructurados ha generado un gran interés en los últimos años en el campo de la medicina, más específicamente en el desarrollo de agentes terapéuticos y de diagnóstico. En particular, pueden facilitar la combinación de comportamientos que son comúnmente aplicados para la terapia del cáncer. Entre los muchos materiales usados, las nanopartículas superparamagnéticas pueden ser usadas como base de recubrimientos termosensibles capaces de cargar fármacos y además, presentan características interesantes como la posibilidad de ser vectorizadas mediante un campo magnético externo; también, este comportamiento puede llevar a un aumento de la temperatura del sistema, logrando así daño de la célula tumoral por hipertermia y a su vez favoreciendo la liberación del fármaco por medio del estímulo térmico.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema termosensible de liberación de doxorubicina compuesto por nanopartículas magnéticas a base de magnetita recubiertas con lecitina y brij

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Sintetizar nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) con el método de coprecipitación.
- Realizar el recubrimiento de las nanopartículas magnéticas con las diferentes concentraciones de fosfolípidos y brij a temperatura constante.
- Adsorber de manera isotérmica la doxorubicina en los diferentes sistemas de nanopartículas magnéticas.
- Caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas de acuerdo a tamaño de partícula, espectroscopía IR, DSC, potencial Z y difracción de RX de polvos.
- Estudiar la liberación de la doxorubicina

6. HIPOTESIS

Si se logran sintetizar nanopartículas magnéticas recubiertas de fosfolípidos/brij y cargadas con doxorubicina, entonces se podrá tener una liberación controlada del fármaco en función de la temperatura.

7. METODOLOGÍA

7.1 MATERIALES

Cloruro ferroso tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), L- α -fosfatidilcolina (lecitina de soya) y Brij 76 fueron comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); hidróxido de sodio (NaOH) y acetona fueron comprados de Distribuidora Química ALVI (Edo. México, Mex.); etanol y metanol fueron adquiridos de J.T. Baker. Todos los anteriores se usaron sin purificación previa. El agua desionizada fue obtenida mediante un equipo Nanopure Diamond (Barnstead®), La doxorrubicina fue amablemente donada por Merck.

7.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS HIDROFÍLICAS

Se llevó a cabo la síntesis de óxidos de hierro mediante el método de coprecipitación. En un tubo de ensayo se colocaron 0.1844 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.5004 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en una relación 1:2 mol/mol con 9 mL de agua.

La mezcla de cloruros férricos se agitó y se purgó con N_2 para tener condiciones de atmósfera inerte, posteriormente la reacción se calentó hasta alcanzar los 80°C y se añadieron 3.7 mL de NaOH 2M obteniendo un precipitado negro, que fue decantado mediante precipitación magnética (Figura 12).

El precipitado se lavó varias veces con agua desionizada hasta alcanzar un pH de 7, finalmente se dejó secar a temperatura ambiente.

La reacción que tuvo lugar para la formación de los óxidos es la siguiente:



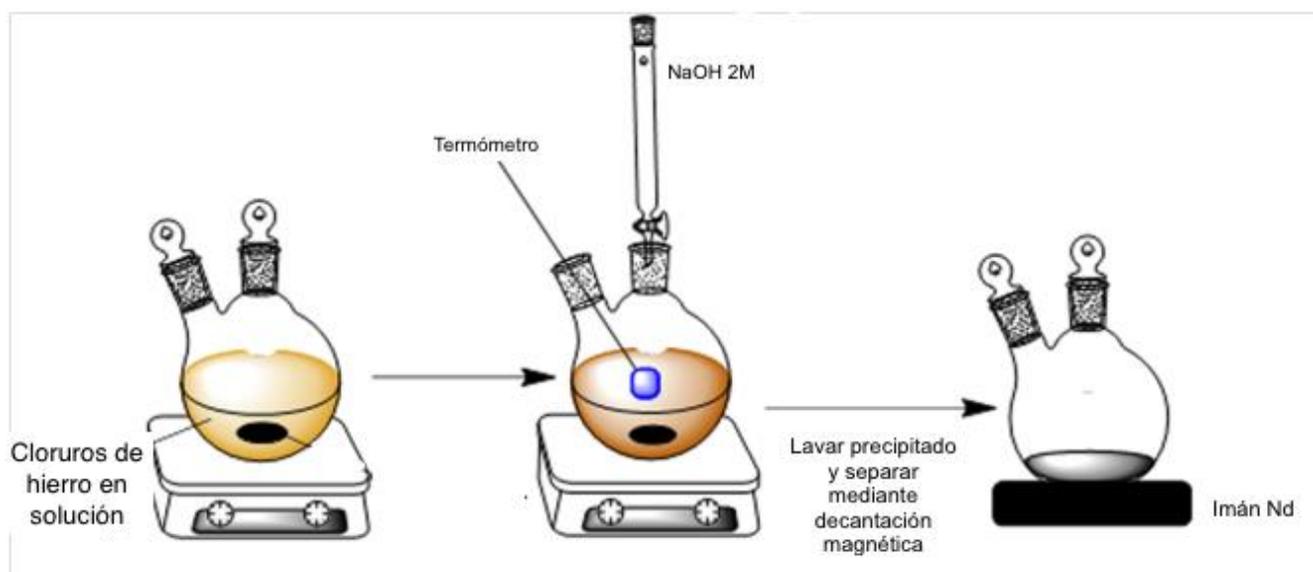


Figura 13. Método coprecipitación²⁶

7.3 RECUBRIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS

Una vez obtenidas las nanopartículas magnéticas se llevó a cabo el recubrimiento con diferentes cantidades de lecitina de soya (L- α -fosfatidilcolina); se realizó mediante dos metodologías diferentes.

La primera fue con la técnica de reflujo donde se pesaron 2, 2.5 y 3 g de lecitina de soya y 50 mg de nanopartículas magnéticas. Estas cantidades fueron elegidas mediante un cálculo teórico llevado a cabo en base al volumen y área superficial de una esfera, la densidad de la magnetita, así como el tamaño y proyección superficial de la parte polar de los fosfolípidos. Una vez pesada la cantidad correspondiente de lecitina se le añadieron 80 mL de etanol hasta que la lecitina de soya estuviera disuelta mediante sonicación.

Posteriormente se colocaron los 50 mg de NPM en un matraz bola, se le añadió la solución de lecitina de soya y se comenzó el reflujo durante 12h. Se repitió el mismo procedimiento con las 3 diferentes cantidades.

La segunda técnica fue mediante la técnica de coprecipitación; donde se realizó la síntesis de óxidos de hierro: en un tubo de ensayo se colocaron 0.1844 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.5004 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en una relación 1:2 con 9 mL de agua, además se preparó una disolución de lecitina de soya con el equivalente de 3g en 15 mL de Metanol.

La solución de lecitina de soya fue agregada gota a gota a la solución de los cloruros de hierro con ayuda de agitación magnética; una vez terminada la adición de la solución de lecitina de soya se mantuvo en agitación durante 15 minutos más.

La reacción se colocó bajo una atmósfera inerte de nitrógeno; la reacción se calentó hasta alcanzar una temperatura entre 60-85 °C y una vez alcanzada esa temperatura se añadieron 5 mL de NaOH gota a gota hasta obtener un precipitado color café posiblemente porque el recubrimiento se llevó a cabo.

Una vez obtenido el precipitado se dejaron 5 minutos más y se removió del calor, con ayuda de un imán se eliminó el sobrenadante.

Subsecuentemente se realizaron lavados de las nanopartículas magnéticas recubiertas (NPMR): 2 con agua, 1 con acetona y finalmente los últimos 2 con metanol.

7.4 CUANTIFICACIÓN DE LECITINA

Se realizó una curva de calibración de lecitina de soya, teniendo 8 diferentes concentraciones a partir de una solución stock la cual fue preparada tomando 10 mg de lecitina de soya y llevándola a 100 mL con CHCl_3 .

Una vez que la solución stock estaba lista se tomaba una alícuota dependiendo la concentración requerida y se llevaba a un volumen final de 5 mL con CHCl_3 .

Tabla 2. Concentraciones usadas para hacer la curva de calibración de la lecitina

Concentración (mg/mL)	Vol. Solución stock (mL)
0.02	1
0.03	1.5
0.04	2
0.06	3
0.07	3.5
0.08	4
0.09	4.5

Posteriormente se tomaban 2 mL de la solución clorofórmica por cada concentración y se añadían 2 mL de ferrotiocianato de amonio para llevar a agitación durante 2 minutos con un agitador tipo vórtex, una vez que terminaba de agitarse toda la solución la fase clorofórmica era leída en el espectrofotómetro ($\lambda=488$ nm) en un tiempo no mayor a 10 minutos después de formar el complejo colorido, el ferrotiocianato forma un complejo con la lecitina de soya el

cual es soluble en cloroformo. Esta técnica fue usada posteriormente en la cuantificación de la lecitina no adsorbida sobre las NPM.⁶¹

7.5 ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE LECITINA

Se realizaron disoluciones a diferentes concentraciones de lecitina de soya en etanol para poder realizar una isoterma de adsorción sobre las nanopartículas magnéticas y así determinar la cantidad adsorbida.

Las cantidades usadas fueron 100, 500 mg, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 g de lecitina de soya disueltas en 80 mL de etanol; una vez que se tenía la disolución se le añadía la misma cantidad de NPM a cada disolución (50 mg). La mezcla se agitaba con ayuda de un agitador de propela a 175 rpm durante 4 horas; la reacción se monitoreaba cada hora tomando 2 mL de solución, separando las nanopartículas por medio de un imán, para posteriormente leer su absorbancia en el espectrofotómetro con la técnica mencionada en el inciso 7.4.

Una vez que se terminaba el tiempo de reacción se decantaban magnéticamente y el sobrenadante era cuantificado con ayuda de la reacción con ferrotiocianato de potasio.

La cuantificación se llevaba a cabo con 2 mL de la solución etanólica para llevarla a sequedad y reconstituirla con 2 mL de CHCl_3 ; una vez que se tenía la solución clorofórmica se añadían 2 mL de ferrotiocianato de potasio. Posteriormente se agitaba durante 2 minutos con un agitador tipo vórtex, una vez que terminaba de agitarse toda la solución la fase clorofórmica era leída en el espectrofotómetro ($\lambda=488$ nm) en un tiempo no mayor a 10 minutos después de formar el complejo colorido.

7.6 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS CON BRIJ Y LECITINA

La técnica utilizada para la síntesis fue por coprecipitación: en un tubo de ensayo se colocaron 0.1844 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.5004 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en una relación 1:2 mol/mol con 10 mL de agua. Por otra parte, se pesó 94 mg de Brij 76 y 564.5 mg lecitina de soya para tener una relación 10:90 mol/mol manteniendo la equivalencia de 3g de lecitina y se disolvieron en 15 mL de metanol.

La solución de lecitina de soya/Brij 76 fue agregada gota a gota a la solución de los cloruros de hierro con ayuda de agitación magnética; una vez terminada la adición de la solución metanólica se mantuvo en agitación durante 15 minutos más.

La reacción se colocó bajo una atmósfera inerte de nitrógeno y se calentó hasta alcanzar una temperatura entre 60-85 °C, una vez alcanzada esa temperatura se añadieron 5 mL de NaOH gota a gota hasta obtener un precipitado color café.

Una vez obtenido el precipitado se dejaron 5 minutos más y se removió del calor, con ayuda de un imán se eliminó el sobrenadante.

Subsecuentemente se realizaron lavados de las nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina y brij (NPMRB): 2 con agua, 1 con acetona y finalmente los últimos 2 con metanol. Y el excedente de lecitina se cuantificaba mediante la reacción colorimétrica con ferrotiocianato de amonio.

7.7 CARACTERIZACIÓN

Una vez obtenidas las dos nanopartículas magnéticas (con y sin recubrimiento) se llevó a cabo la caracterización por medio de tamaño de partícula, IR, análisis térmico, rayos X y microscopía.

7.7.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La determinación se realizó utilizando un equipo JEOL JEM-2010 en una rejilla de cobre como soporte para las muestras.

7.7.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO DE NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS

La determinación se realizó utilizando un espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer de 4000 a 450 cm^{-1} .

7.7.3 POTENCIAL Z Y TAMAÑO DE PARTÍCULA

La determinación se realizó utilizando un equipo Zetasizer Nano Zen 3600 a un ángulo de 173 ° con un láser a 633nm. Se midieron las muestras de magnetita dispersada en diferentes medios a una temperatura de 25°C.

7.7.4 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO

Se llevó a cabo mediante un difractómetro de rayos X de polvos, modelo D8 ADVANCE DAVINCI en modo Theta-Theta.

7.8 CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA DOXORRUBICINA

Se realizó una curva de calibración de doxorubicina con 6 diferentes concentraciones; esto se hizo a partir de una solución stock de 25.0 mg de doxorubicina en 25 mL de agua destilada. Posteriormente se tomaba la cantidad requerida para preparar la concentración deseada y se llevaba al aforo (5 mL) con agua destilada.

Tabla 3. Concentraciones usadas para hacer la curva de calibración de la doxorubicina

Concentración (mg/mL)	Vol. Solución stock (mL)
0.01	0.05
0.02	0.1
0.04	0.2
0.06	0.3
0.08	0.4
0.1	0.5

Se hizo la curva de calibración a 3 diferentes longitudes de onda ($\lambda=454, 488$ y 494 nm).

7.9 CINÉTICA DE ADSORCIÓN DE DOXORRUBICINA SOBRE LAS NANOPARTÍCULAS

La cinética se llevó a cabo con doxorubicina y NPM, se pesaron 55 mg del fármaco y se disolvieron en 50 mL de agua destilada; se adicionaron 50 mg de nanopartículas y se colocaban en agitación con ayuda de un agitador de propela tomando muestras a diferentes de 100 μ L a diferentes tiempos, se llevaban a 2 mL con agua destilada. Las muestras se separaban magnéticamente y el sobrenadante se medía en un espectrofotómetro UV-Vis a $\lambda=488$ nm. El experimento se siguió por 10 horas.

7.10 ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE DOXORRUBICINA SOBRE LAS NANOPARTÍCULAS

Se realizaron estudios de adsorción con doxorubicina para los 3 diferentes sistemas (NPM, NPMR, NPMRB) con 6 diferentes concentraciones del fármaco y en todas las concentraciones la misma cantidad de nanopartículas (50 mg).

Se pesaron 10, 20, 30, 40, 50 o 60 mg de doxorubicina y se disolvieron en 50 mL de agua desionizada; una vez disueltas se colocaron junto con los 50 mg de nanopartículas y se tomó una alícuota de 100 μ L llevándola a 2 mL con agua destilada para leer su absorbancia inicial con ayuda del espectrofotómetro a $\lambda=488$ nm.

La reacción se dejó en agitación durante 4 horas, según lo obtenido en la cinética de adsorción, con un agitador termostático (BioBase, BJPX-100B) a temperatura controlada (25°C) y una vez terminada la reacción se tomaba una alícuota de 100 µL llevándola a 2 mL con agua destilada para leer su absorbancia.

Una vez terminado el tiempo de agitación se realizó una decantación magnética para remover el exceso de disolvente y llevarse a sequedad con vacío y temperatura controlados.

7.11 LIBERACIÓN DE DOXORRUBICINA

El estudio de liberación se realizó por triplicado en solución PBS a pH 7.4, 37°C y con agitación orbital (Digital Orbital Shaker, DSR-10) a 250 rpm. Se colocaron 10 mg de cada sistema, con una cantidad de fármaco conocida, en 50 mL de medio.

Para determinar la cantidad de fármaco liberada se tomaron 2 mL del medio a distintos tiempos durante 30 horas (0,30, 60, 120, 240, 360, 1440, 1560, 1800 minutos), se precipitaban con ayuda de un imán de neodimio y después de su medición fueron regresados al vaso donde se realizó el experimento.

Finalmente, se cuantificó la doxorubicina mediante espectroscopía UV-Vis a 488 nm. Los resultados obtenidos se analizaron para encontrar el modelo más adecuado de liberación mediante el macro DDSolver 1.0 para Excel. Para llevar a cabo la selección del modelo se considera el mayor coeficiente de correlación (R^2), más cercano a 1, el mayor criterio de selección del modelo (MSC) y el menor criterio de Akaike(AIC).⁴⁷

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN NPM, NPMR Y NPMRB

Se sintetizaron tres diferentes clases de nanopartículas, hidrofílicas y recubiertas con lecitina de soya y lecitina de soya/brij. Éstas fueron observadas por TEM, mostrando que las partículas individuales son esféricas y de tamaño pequeño; no obstante, se encuentran aglomeradas al ser aisladas en sólido. De igual manera se observa el recubrimiento con lecitina y/o brij (Figura 14).

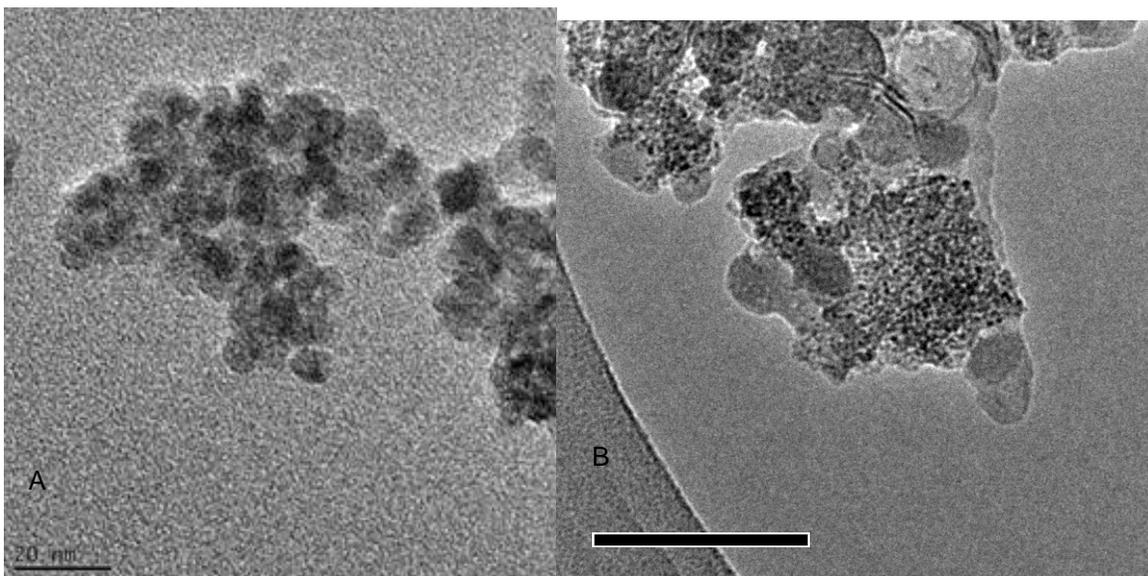


Figura 14. Microscopía TEM- NPM A: sin recubrir B: partículas sin recubrir

En la Tabla 4 y en la figura 15 se muestran, respectivamente, los resultados de potencial zeta y tamaño de partícula donde el dato es promedio de 4 mediciones.

Tabla 4. Resultados tamaño partícula, potencial Z

Muestra	Tamaño partícula (nm)	Potencial Z (mV)
NPM	100-250±81.2	-16.6±1.11
NPMR	154.3±58.57	-28.9±1.94
NPMR-realizadas con reflujo	1847±60.7	-11.4±0.651
NPMRB	52.9±4.3	-24.9±0.361

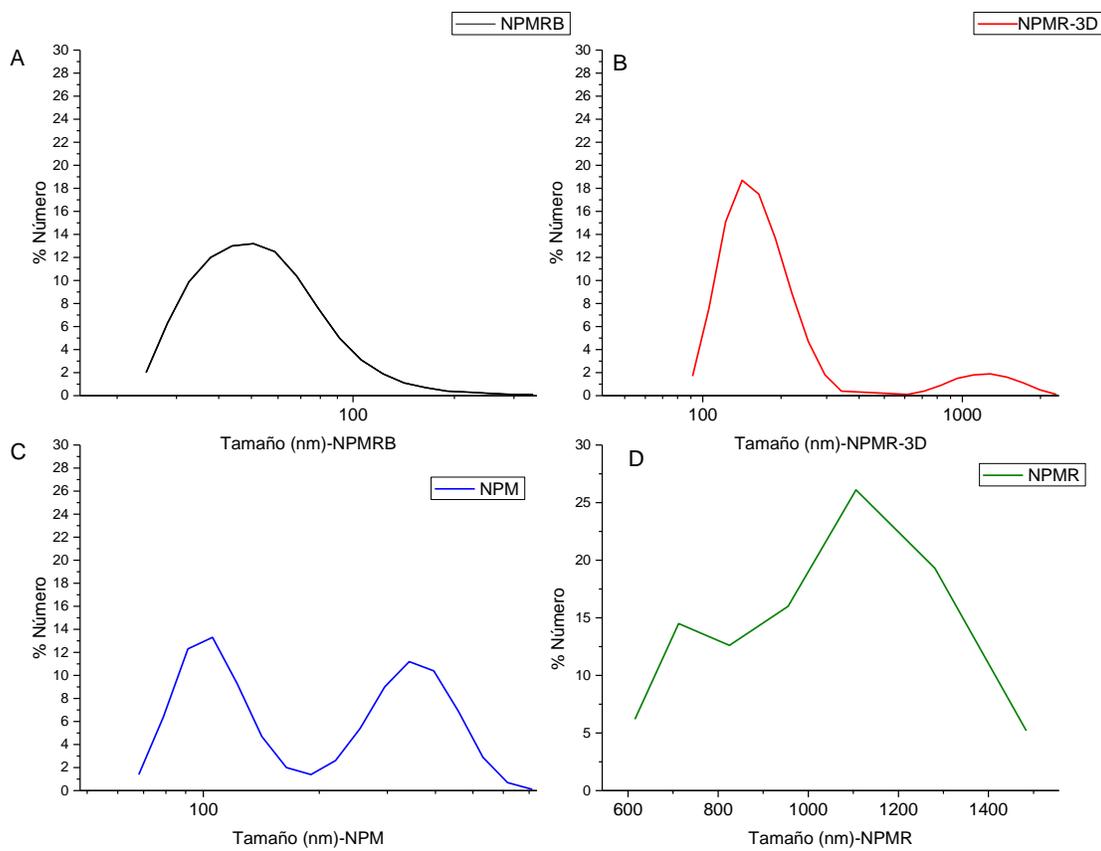


Figura 15. Distribución tamaño partícula de diferentes sistemas

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 15 y en la tabla 4, se puede observar que el tamaño de las nanopartículas sin recubrimiento (15 C) tienen un tamaño mayor al reportado a la literatura que va de 2-8 nm²⁷, lo cual, probablemente, es debido a que forman aglomerados entre ellas. Las partículas de mayor homogeneidad de tamaño son las que se encuentran recubiertas con lecitina de soya/brij (15 A), ya que el 50% de la población presentan un tamaño promedio de 52.9 nm, siendo también este sistema el que presenta un menor tamaño y por tanto una menor agregación debido a su recubrimiento y a la adición del tensoactivo (brij 76). Lo anterior se confirma al analizar el potencial zeta, en cual fue de -24.9 mV, que demuestra la estabilidad física de la dispersión coloidal.

Las NPMR (15 B) muestran un tamaño aproximado de 150 nm por lo cual se prevé una aglomeración entre ellas, este tamaño resultó menor al de las partículas sintetizadas por el método de reflujo (15 D) el cual fue de 1847 nm, lo que demuestra que el método de recubrimiento más eficiente fue el de coprecipitación.

Por otra parte, se aprecia que las NPM muestran un potencial z muy bajo (-16.6 mV) y por ello las partículas tienden a aglomerarse lo cual es congruente con los resultados de tamaño de partícula encontrados. Las nanopartículas recubiertas por el método de reflujo mostraron un potencial z similar al sistema anterior (NPM), sin embargo, cuando son recubiertas por coprecipitación, se observa un aumento de casi el doble del potencial z con respecto a las nanopartículas sin recubrir, encontrándose cercanos a -30 mV, lo que de acuerdo a la escala son consideradas moderadamente estables. Es de esperarse que al tener un potencial z mayor el tamaño que presentan sea menor debido a que no se forman tantos aglomerados entre ellas y se muestre el tamaño real de las nanopartículas. También con el potencial z que presentan todos los sistemas, no serán tóxicas para el organismo y podrían llegar a ser permeables en membranas.^{62,63}

En la figura 16 se observan los espectros de FTIR para lecitina de soya, NPM y NPMR. Se puede ver en el espectro de NPM las bandas correspondientes a 3300 cm^{-1} , 552 cm^{-1} , 509 cm^{-1} , en el de la lecitina picos en 2900 cm^{-1} , 1281 cm^{-1} , 825 cm^{-1} y en el de NPMR es evidente una combinación entre la lecitina de soya y las NPM. La banda de absorción que se encuentra en todos los espectros alrededor de 3300 cm^{-1} corresponde a los grupos hidroxilos (-OH). Las bandas que se encuentran en 2900 cm^{-1} son atribuidos a la vibración asimétrica y simétrica del metileno (-CH₂) así como el metilo correspondiente a la lecitina de soya cargada isoeléctricamente, estos picos se encuentran presentes en NPMRB lo cual nos indica que el recubrimiento se ha llevado a cabo. En la lecitina de soya se encuentra una banda en 1281 que se atribuye al gripo PO₂⁻ simétrico y asimétrico. Las bandas entre 800 y 700 cm^{-1} pueden asignarse a las vibraciones tipo estiramiento simétricas y asimétricas de los grupos P-O-C presentes en la lecitina de soya, como se puede apreciar en la figura 16 estas bandas son muy pequeñas en la lecitina de soya y las NPM no lo presentan es por ello que en el espectro de NPMR esto casi no se alcanza a apreciar claramente; las bandas alrededor de 600 - 500 cm^{-1} se deben a la vibración de flexión en el plano de los grupos PO₂⁻ esta banda se encuentra en ambos espectros.⁶⁴ Finalmente los espectros correspondientes a NPM y NPMR muestran un pico intenso por 550 - 579 cm^{-1} los cuales se deben a la vibración tipo estiramiento asociado a la banda de absorción relacionada a la unión metal- oxígeno (en este caso la unión Fe-O en la estructura cristalina de Fe₃O₄). Esto ocurre debido a que se encuentran bandas de vibración de estiramiento relacionadas con el metal en los sitios tetra y octaédricos de la estructura del óxido.⁶⁵

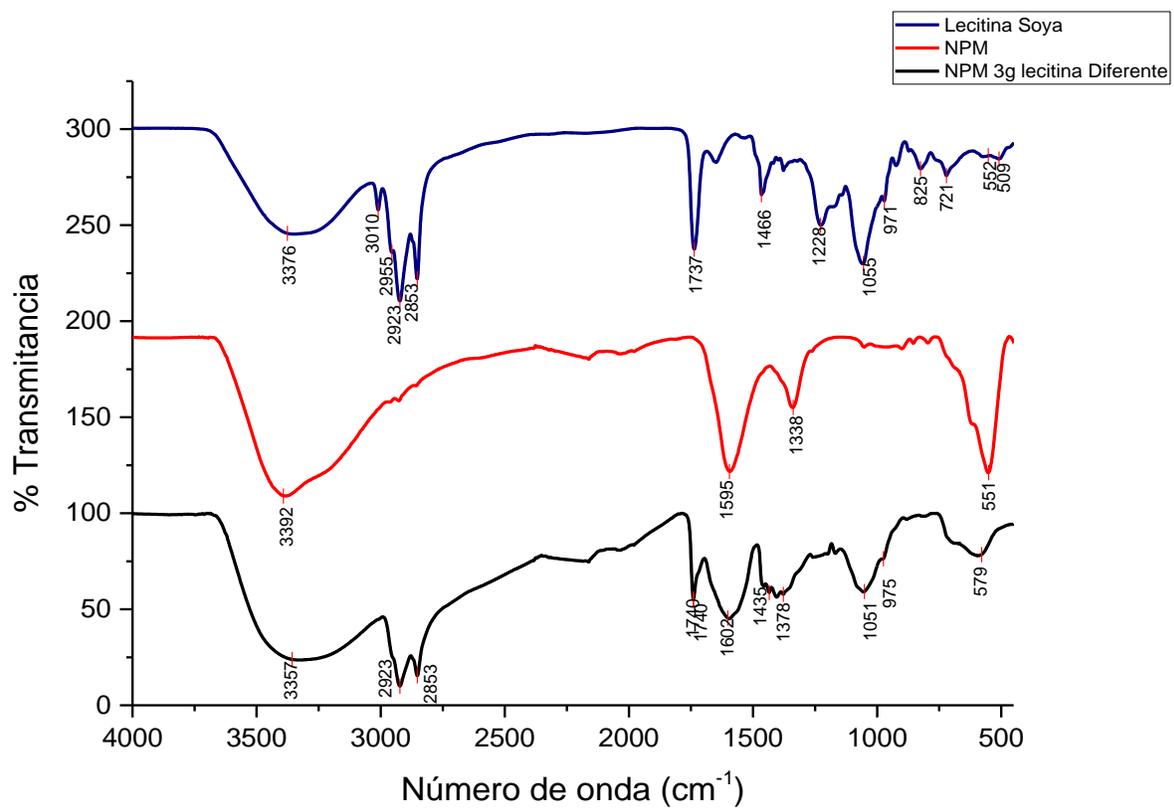


Figura 16. IR Lecitina Soya, NPM y NPMR.

En la figura 17 se muestran los espectros de infrarrojo correspondientes a Lecitina de soya, NPM, Brij 76 y NPMRB donde se muestran las bandas características para cada molécula.

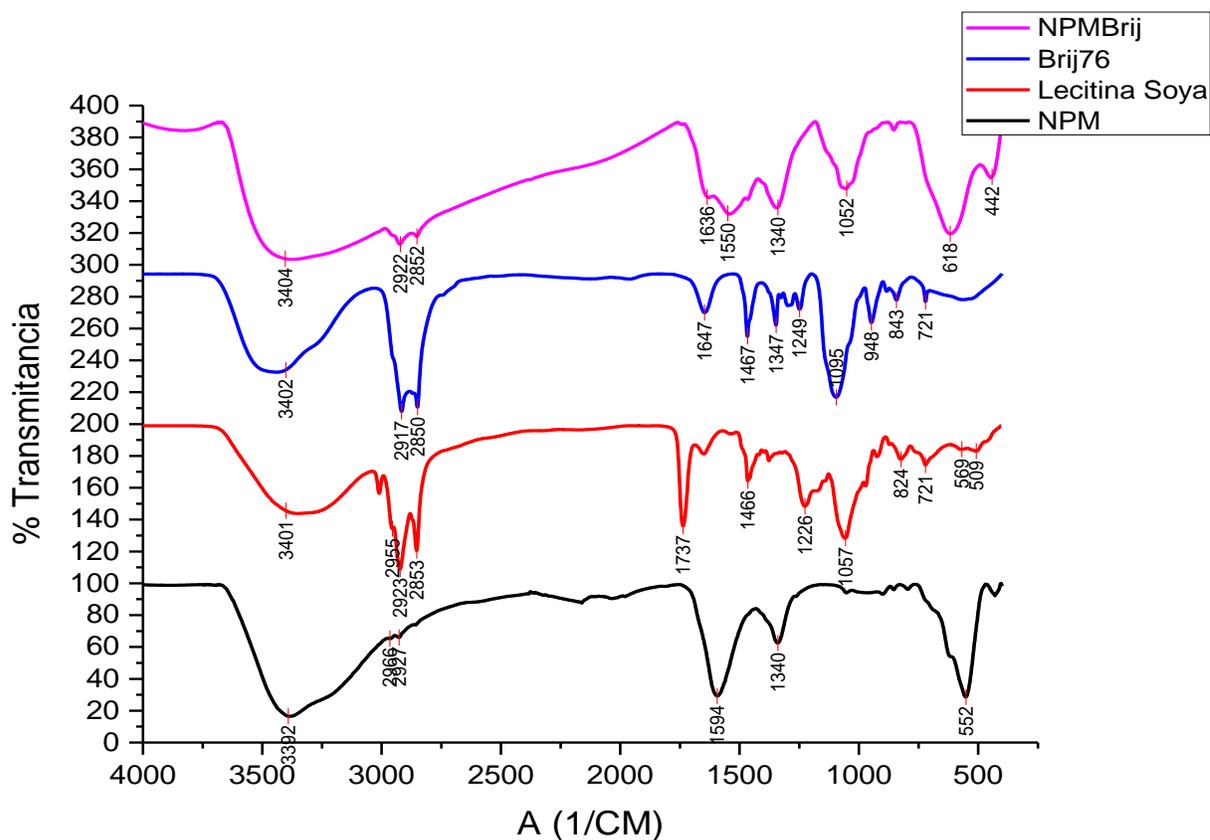


Figura 17. IR Lecitina Soya, NPM, Brij 76 y NPMRB.

Al realizar la caracterización por medio de FT-IR de las NPMRB donde se observa que el espectro correspondiente a NPMRB es una combinación entre la lecitina de soya, Brij 76 y las NPM. De igual manera que en el espectro anterior, la banda de absorción que se encuentra en todos los espectros alrededor de 3300 cm^{-1} es observada por la presencia de grupos hidroxilos (-OH). Las bandas que se encuentran alrededor de 2900 cm^{-1} son atribuidos a la vibración asimétrica y simétrica del metileno (-CH₂) así como el metilo correspondiente a la lecitina de soya cargada isoelectricamente, al estar presente en el espectro de NPMRB indica que el recubrimiento se ha llevado a cabo. De igual manera se puede comprobar la interacción entre las NPM y su recubrimiento por los picos presentes por grupos polares entre $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. En la lecitina de soya se encuentra una banda entre 1200 que se atribuye al dióxido de fósforo (PO₂⁻) simétrico y asimétrico. Las bandas entre 800 y 700 cm^{-1} pueden asignarse a las vibraciones tipo estiramiento simétricas y asimétricas de los grupos P-O-C presentes en la lecitina de soya, como se puede apreciar en la figura 12 estas bandas son muy pequeñas en la lecitina de soya y en el Brij 76 mientras que en NPMRB estas bandas llegan a perderse. Por último, las bandas alrededor de $600\text{-}500\text{ cm}^{-1}$

se deben a la vibración de flexión en el plano de los grupos PO_2^- esta banda se encuentra en ambos espectros. Como se puede apreciar en ambos espectros (figura 16 y 17) tanto las NPMR como NPMRB poseen bandas de lecitina de soya puro, así como magnetita pura. Esto apoya la presencia de lecitina de soya absorbida sobre la magnetita.^{31,64} Nuevamente en el espectro correspondiente a NPMRB se encuentra un pico intenso entre $550\text{-}579\text{ cm}^{-1}$ que como ya se mencionó anteriormente se deben a la vibración tipo estiramiento asociado a la banda de absorción relacionada a la unión metal- oxígeno (en este caso la unión Fe-O en la estructura cristalina de Fe_3O_4).⁶⁵

La figura 18 muestra los difractogramas de polvos de Rx.

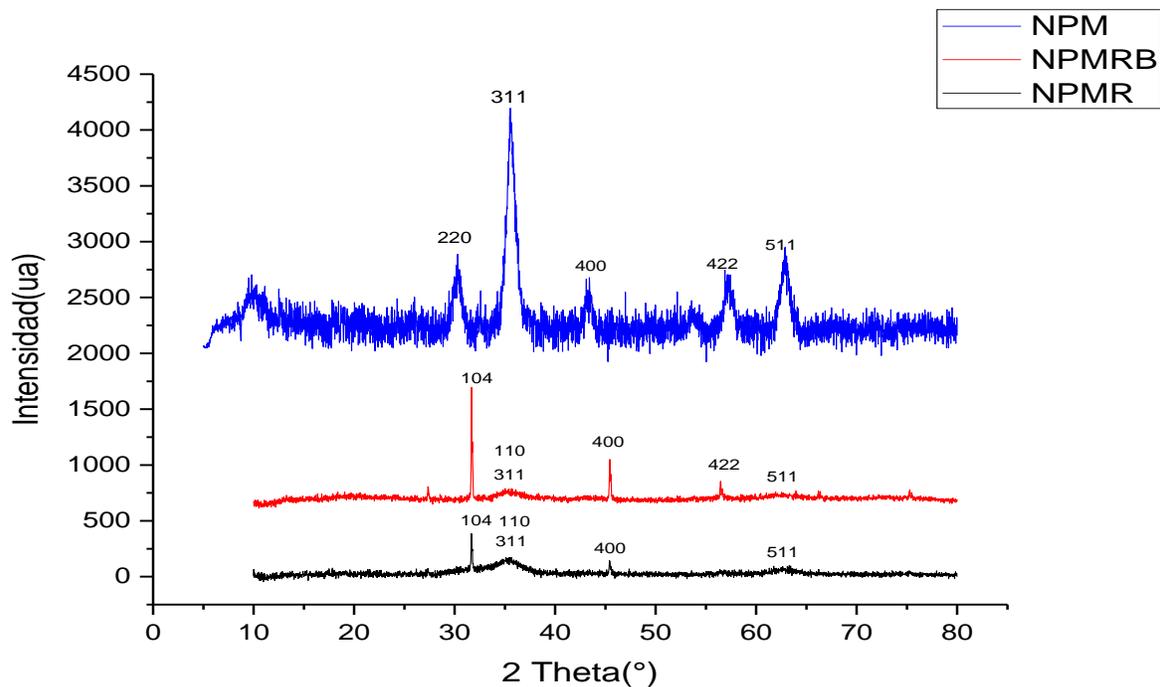


Figura 18. Difracción de rayos X de polvos de NPMs de magnetita con y sin recubrimiento

Los difractogramas de rayos X muestran los picos característicos de las nanopartículas, el primero contiene una mayor intensidad de señal en 35.5° (311) y otras señales (220, 422, 511) los cuales son característicos de la magnetita y de una celda unitaria cúbica. Por otra parte, en los difractogramas correspondientes a NPMR y NPMRB muestran las señales mencionadas anteriormente características de la magnetita y otras dos señales, una de intensidad alta (104) y otra en 110 las cuales son propias de la hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Un problema con la síntesis de nanopartículas es la tendencia de reacción a formar compuestos de hierro no magnéticos; esto es principalmente causado como resultado del efecto del

oxígeno disuelto en las soluciones por lo cual sería recomendable almacenarlas bajo atmósfera inerte.⁶⁶ Como cabía esperar la presencia de lecitina y Brij 76 no supone un cambio en la estructura cristalina de las nanopartículas, ya que la magnetita permanece en su forma cristalina.

Al mismo tiempo, el tamaño de partícula puede ser predicho con los difractogramas de rayos X y mediante la ecuación de Debye-Scherrer: $t = \frac{0.9\lambda}{B \cos\theta}$ donde λ = longitud de onda del haz de rayos X, B es el ancho completo a media máxima del pico de mayor intensidad y θ es el ángulo de difracción del pico que satisface la ley de Bragg y t es el tamaño cristalino.

Siendo así, las NPM muestran un tamaño de 8.07 nm, NPMR de 20 nm y NPMRB de 61.9 nm; teniendo un incremento en el tamaño de partícula cuando estas se encuentran recubiertas. En la técnica realizada por rayos X se estudia el tamaño de una sola partícula con lo que se tienen valores más reales a comparación de la técnica de DLS donde el tamaño de partícula es aproximado debido a la formación de agregados.⁶⁷

8.2 ADSORCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LECITINA

La figura 19 muestra la curva de calibración de la lecitina cuantificada por medio de la formación de un complejo colorimétrico con ferrotiocianato de amonio, a 492 nm mediante espectroscopía UV-Vis.

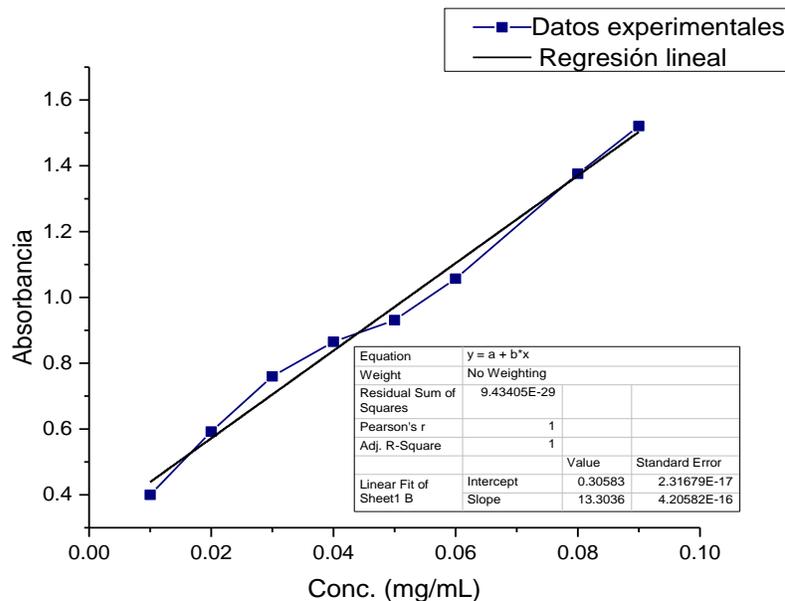


Figura 19. Curva calibración de lecitina de soja

8.3 ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE LA LECITINA

Posteriormente se realizó una isoterma de adsorción de lecitina de soya para determinar cuál era la cantidad adecuada para el recubrimiento de las nanopartículas y se cuantificaban después de haber formado un complejo con ferrotiocianato de amonio y leyendo mediante espectroscopía UV-Visible a 492 nm en un tiempo no mayor a 10 minutos. Como cabía esperar, a medida que incrementa la cantidad de lecitina incrementa la cantidad adsorbida.

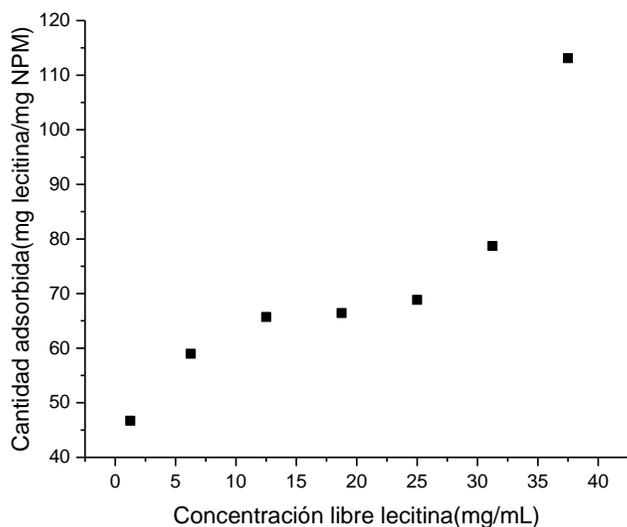


Figura 20. Isotherma adsorción lecitina de soya.

En la figura 20 se puede ver que la adsorción de lecitina sobre las nanopartículas magnéticas se lleva a cabo mediante una isoterma tipo BET; la cual es un modelo para adsorciones multicapas. Se asume que las multicapas que se forman sobre la nanopartícula magnética son para formar una bicapa con la lecitina. Se ve que en una cantidad menor a 30 mg/mL se tendrá únicamente una capa de recubrimiento por lo cual la cantidad ideal para el recubrimiento será de 3 g de lecitina para que se adsorba la cantidad necesaria en la nanopartícula y lo demás que no fue adsorbido se quede en el medio.

8.4 ADSORCIÓN Y LIBERACIÓN DE DOXORRUBICINA

Para llevar a cabo su evaluación como sistema terapéutico se llevó a cabo la adsorción de doxorubicina a temperatura constante, utilizando soluciones acuosas de distintas

concentraciones para cuantificar la cantidad presente en el sistema mediante los modelos matemáticos de isotermas, así como su desorción en solución PBS pH 7.4 a 37°C simulando condiciones fisiológicas para cuantificar la liberación del fármaco mediante los modelos matemáticos de liberación.

8.4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA DOXORRUBICINA

Para llevar a cabo la cuantificación del fármaco adsorbido o liberado del sistema se realizó una curva de calibración mediante espectroscopia UV-Visible, donde se determinó un pico máximo de absorción a 488 nm.

La curva de calibración de la doxorrubicina a 488nm es mostrada en la figura 21. La ecuación de la curva de calibración es: $y=0.03287x+18.13$. Se eligió dicha longitud de onda debido a que es la que muestra una mayor r^2 con respecto a las otras dos longitudes de onda.

La que te sale en función de la absorbancia y la concentración

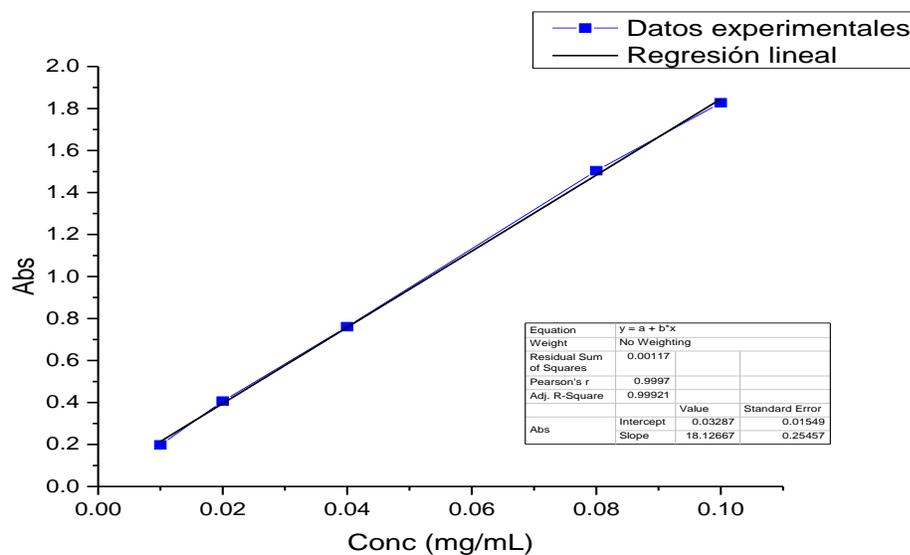


Figura 21. Curva de calibración de la doxorrubicina mediante espectroscopia UV-Vis a 488 nm

8.4.2 CINÉTICA DE ADSORCIÓN

En la figura 22 puede observarse la velocidad de adsorción de la doxorrubicina en cada uno de los tres sistemas elaborados. Es claro el hecho de que el activo se adsorbe en mayor cantidad en presencia de lecitina y aún mayor en presencia del brij. Esto es evidente considerando la superficie hidrofóbica de la doxorrubicina que favorece la unión a las cadenas hidrofóbicas de la lecitina y/o del brij.

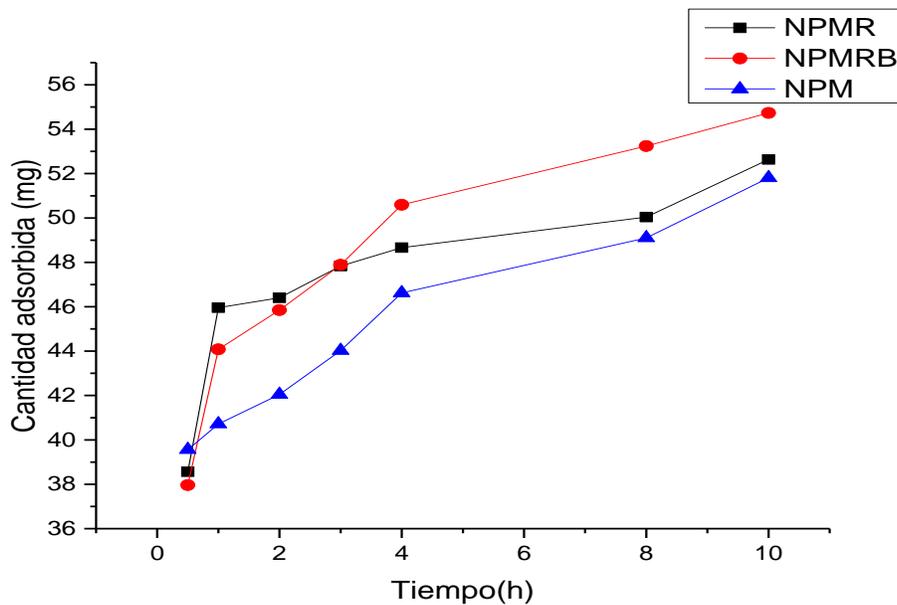


Figura 22. Cinética de adsorción de doxorubicina

Una vez realizada la cinética se decidió que el tiempo adecuado para llevar a cabo la adsorción era de 4 horas.

8.4.3 ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE LA DOXORRUBICINA

Las figuras 23, 24 y 25 muestran los datos experimentales y los ajustes matemáticos a diferentes modelos de adsorción de la doxorubicina a los tres sistemas estudiados.

Los modelos de adsorción seleccionados fueron los siguientes:

- **Modelo de Langmuir:** describe el equilibrio de adsorción-desorción de un adsorbato en un adsorbente a temperatura constante de manera dependiente de la concentración de adsorbato. Este modelo considera lo siguiente:
 - a. La superficie que contiene los sitios de adsorción es perfectamente plana y no contiene irregularidades. (Es homogénea).
 - b. El adsorbato se adsorbe en un estado inmóvil
 - c. Todo sitio de unión adsorbato-adsorbente es equivalente.
 - d. Cada sitio puede ser ocupado solo por una molécula de adsorbato.
 - e. No existen interacciones entre el adsorbato y las moléculas en sitios adyacentes.

La ecuación que describe el modelo es:

$$y = \frac{q_s * b * x}{1 + b * x}$$

Donde y representa la cantidad de adsorbato adsorbido (mg/mg), q_s es la máxima cantidad de adsorbato en la monocapa (mg/mg), b es la constante de afinidad en la isoterma de Langmuir (L/mg) y x la concentración de adsorbato al equilibrio (mg/L).

- **Modelo de Langmuir-Freundlich:** a pesar de que el modelo de Langmuir presenta una buena aproximación al fenómeno de la adsorción, sus postulados se desvían de la realidad en muchos casos, debido a que las superficies no son perfectamente homogéneas y a que no considera las interacciones adsorbato-adsorbato. Por lo que Freundlich introdujo un término a la ecuación que sirve como factor de corrección para materiales sin superficie homogénea.

$$y = \frac{N * (K^m) * (x^m)}{1 + (K^m) * (x^m)}$$

y = cantidad de adsorbato adsorbido (mg/g), N es el número de sitios de unión disponibles por gramo de adsorbente, K es la constante de afinidad (L/mg), m el índice de heterogenicidad y x la concentración de adsorbato al equilibrio (mg/L).

- **Modelo de Jovanovic-Freundlich:** al igual que el modelo anterior el modelo de Jovanovic-Freundlich considera que existen interacciones adsorbato-adsorbato en superficies heterogéneas, pero además considera las interacciones laterales de las moléculas de adsorbato.

$$y = N * (1 - (e^{(-K*x^m)}))$$

Donde y = cantidad de adsorbato adsorbido (mg/g), N el número de sitios de unión disponibles por gramo de adsorbente, K es la constante de afinidad (L/mg), m el índice de heterogenicidad y x la concentración de adsorbato al equilibrio(mg/L).⁶⁸

- **Modelo de Freundlich:** es buena para describir adsorciones no ideales en superficies heterogéneas. Se expresa con la siguiente ecuación:

$$B = aC^m$$

Donde B es la cantidad de adsorbato adsorbida al equilibrio, a es el coeficiente de adsorción de Freundlich (relacionado con la capacidad de adsorción N_t , y el promedio de la afinidad K_0), m es la constante de Freundlich que representa el índice de heterogeneidad y tiene valores entre 0-1(valores cercanos a uno indican mayor homogeneidad), C es la concentración del adsorbato al equilibrio.⁶⁰

Los modelos evaluados se presentan a continuación:

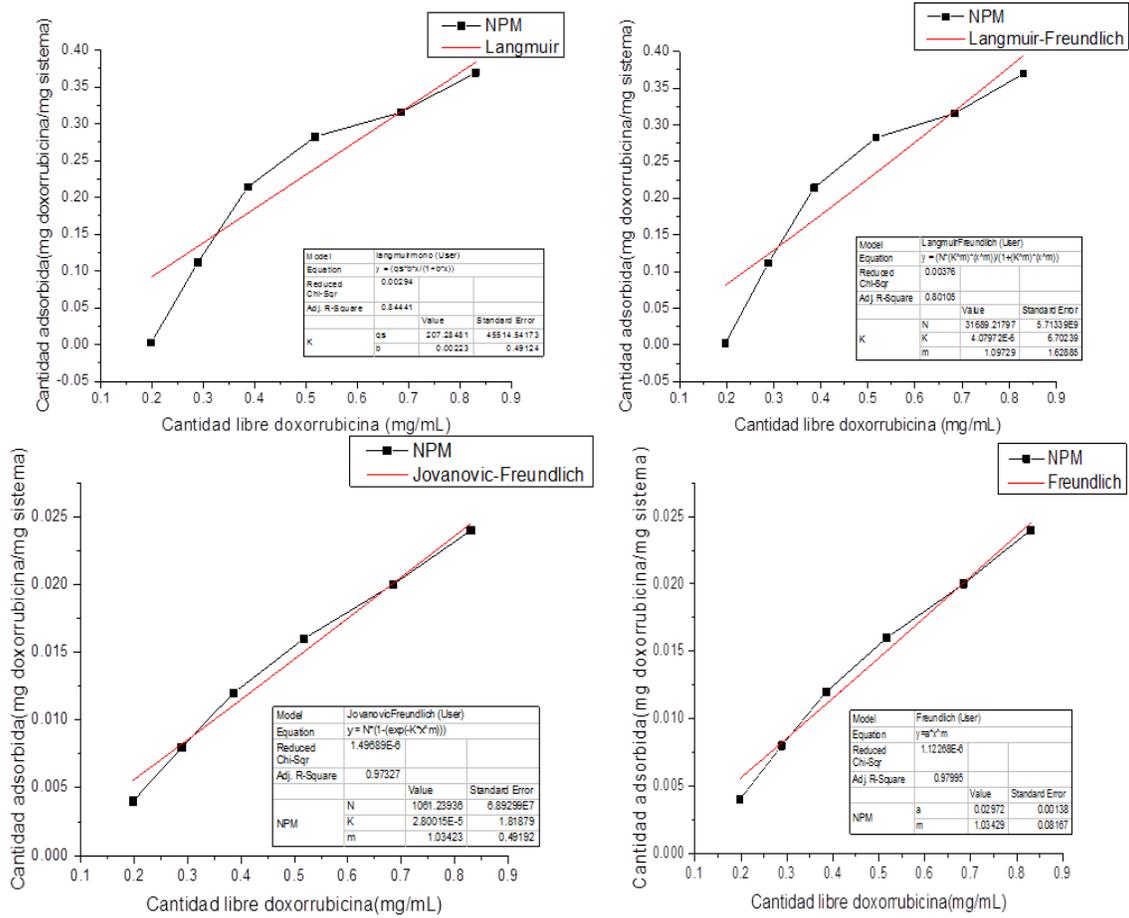


Figura 23. Modelos de adsorción de doxorubicina en NPM

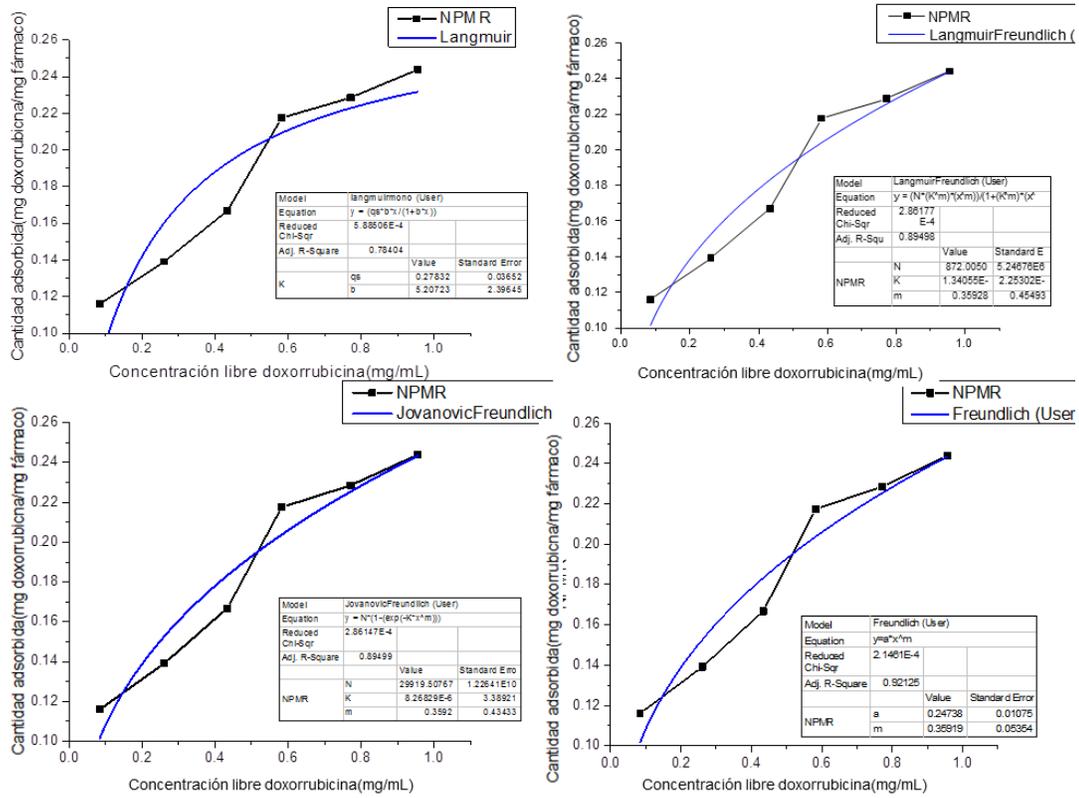


Figura 24. Modelos de adsorción de doxorubicina en NPMR

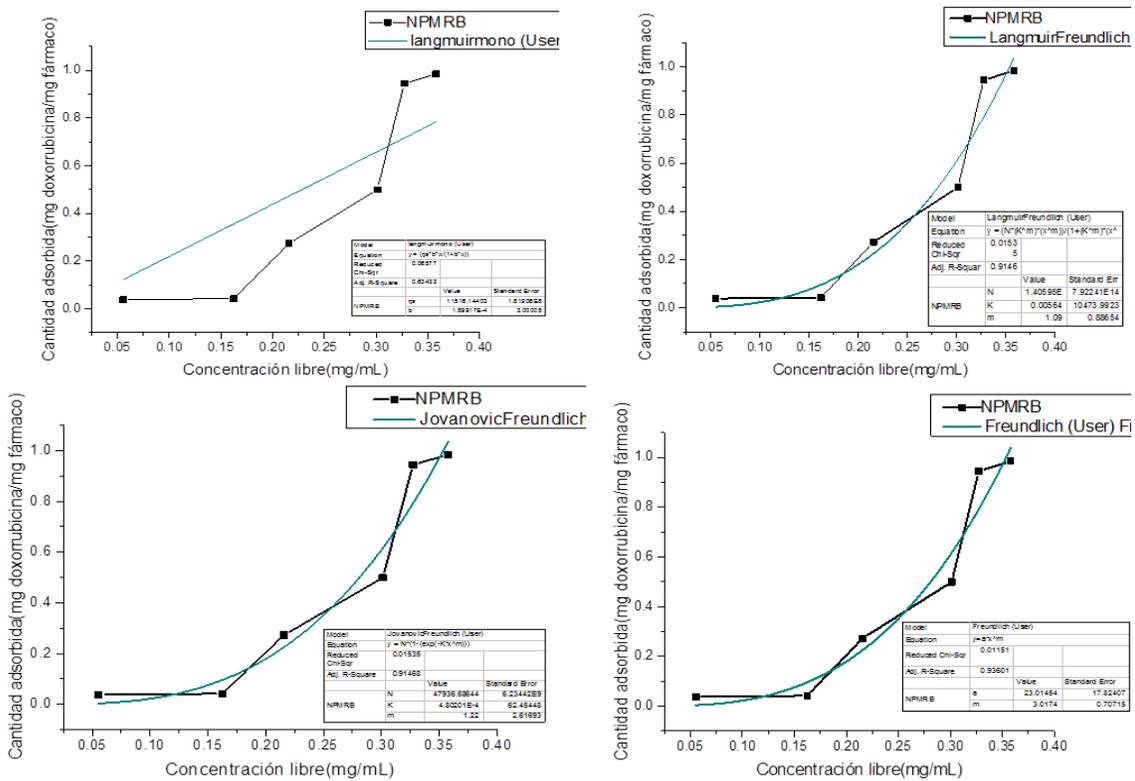


Figura 25. Modelos de adsorción de doxorubicina en NPMRB

Para caracterizar la capacidad de adsorción de doxorubicina se tomaron en cuenta varios factores para seleccionar el modelo adecuado tales como un coeficiente de correlación (Rsqr) cercano a 1 y con la menor chi cuadrada (Chi-Sqr). En la tabla 5 se presentan los parámetros asignados para cada modelo de adsorción, así como las constantes asignadas a cada modelo de adsorción.

Tabla 5. Parámetros de los modelos de adsorción de los modelos de adsorción de doxorubicina en los sistemas generados.

Nanopartículas magnéticas (NPM)					
Modelo	Constantes determinadas			Parámetros estadísticos	
Langmuir	Qs	b		Rsqr	Chi-sqr
	207.284	0.00223		0.84441	0.00294
Langmuir- Freundlich	N	K	m	Rsqr	Chi-sqr
	29919.50	4.079	1.097	0.801	0.00376
Jovanovic-Freundlich	N	K	m	Rsqr	Chi-sqr
	1061.24	2.80	1.03	0.97327	1.49
Freundlich	a	m		Rsqr	Chi-sqr
	0.002	1.09		0.9799	1.122
Nanopartículas magnéticas recubiertas (NPMR)					
Modelo	Constantes determinadas			Parámetros estadísticos	
Langmuir	Qs	b		Rsqr	Chi-sqr
	0.2783	5.207		0.784	0.00058
Langmuir- Freundlich	N	K	m	Rsqr	Chi-sqr
	31689.217	$1.34 \cdot 10^{-10}$	0.466	0.9216	$2.87 \cdot 10^{-4}$
Jovanovic-Freundlich	N	K	m	Rsqr	Chi-sqr
	872	$8.2 \cdot 10^{-6}$	0.359	0.894	$2.86 \cdot 10^{-4}$
Freundlich	a	m		Rsqr	Chi-sqr
	0.247	0.359		0.894	$2.1 \cdot 10^{-4}$
Nanopartículas magnéticas recubiertas con fosfolípidos y Brij (NPMRB)					

Modelo	Constantes determinadas		Parámetros estadísticos		
Langmuir	Qs	b		Rsqr	Chi-sqr
	11516.14	1.89*10 ⁻⁴		0.631	0.065
Langmuir- Freundlich	N	K	m	Rsqr	Chi-sqr
	1.45*10 ⁹	0.0056	1.09	0.93	0.0153
Jovanovic-Freundlich	N	K	m	Rsqr	Chi-sqr
	47936.4	4.8*10 ⁻⁴	1.22	0.901	0.015
Freundlich	a	m		Rsqr	Chi-sqr
	23.01	3.01		0.91	0.011

Los resultados muestran una mayor correlación con el modelo de Langmuir-Freundlich, el cual se aplica para adsorciones no ideales y como bien se sabe las superficies de los sistemas no son homogéneas, esto se confirma por la constante *m* la cual indica el índice de heterogenicidad; cuando el valor sea cercano a 1 indica que el sistema es homogéneo. En todos los casos esta constante es cercana a 1 por lo cual nos indica que la superficie adsorbente es heterogénea. Con respecto a N, la cual indica el número de sitios de unión disponibles por gramo de adsorbente se ve que aumenta cuando las nanopartículas están recubiertas por lo cual se ve que este recubrimiento ayudará a que las nanopartículas magnéticas se funcionalicen de mejor manera y que la interacción que tengan con el fármaco, en este caso la doxorubicina sea mayor.⁶⁹

8.4.4 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN

Las figuras 26, 27 y 28 muestran la cinética de liberación de la doxorubicina desde las NPM, así como diferentes ajustes a modelos cinéticos. La diferencia entre ellas radica en la cantidad inicial de doxorubicina, 0.2, 0.8 y 1.2 mg/mL respectivamente.

Las tablas 6,7 y 8 muestran los valores de k, n y los datos estadísticos.

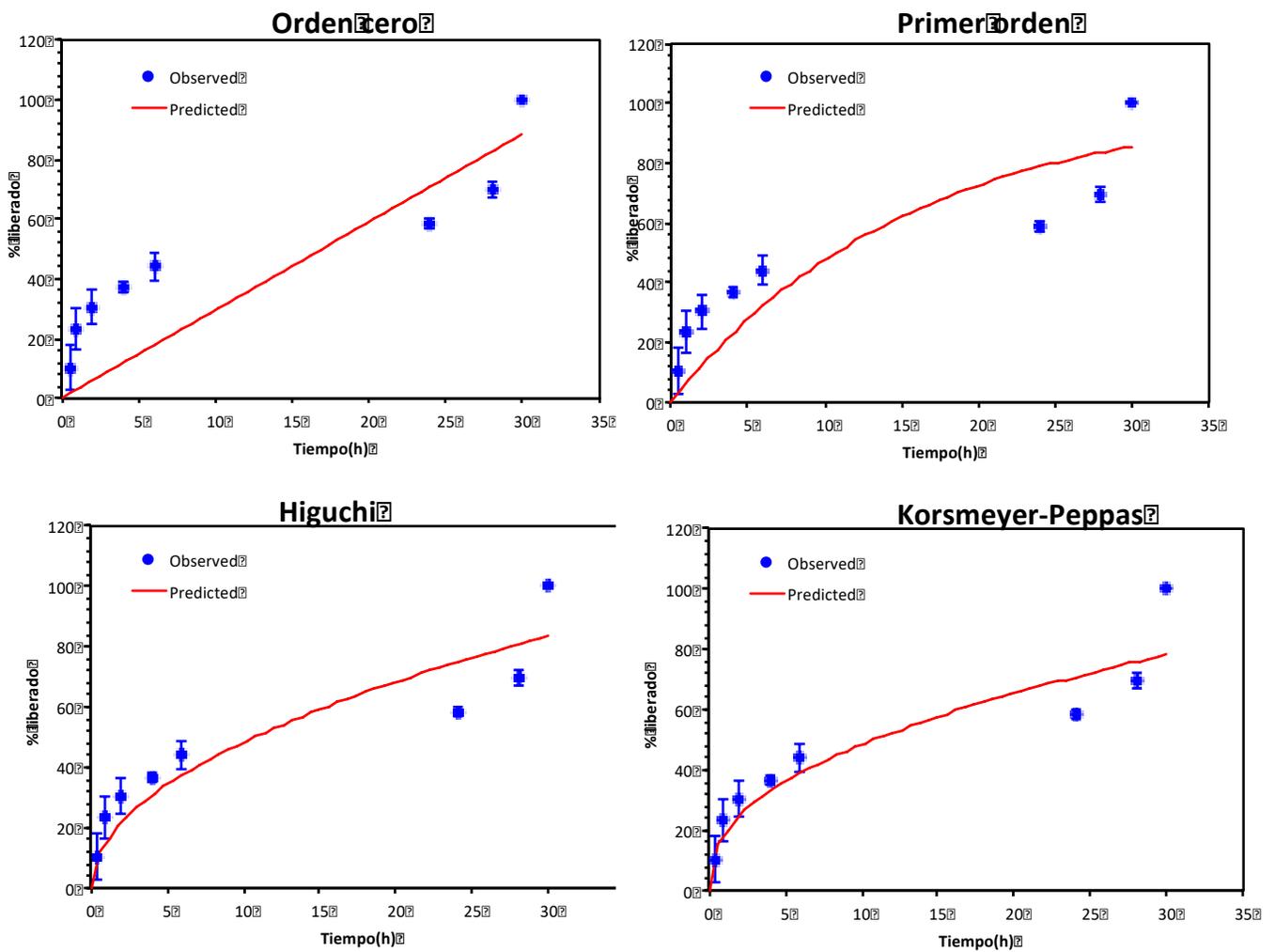


Figura 26. Modelos cinéticos de liberación NPM 0.2 mg/mL

Tabla 6. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de NPM 0.2 mg/mL

	Nanopartículas magnéticas			
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Parámetros	k_0	k_1	k	$K_{1,n}$
Rsqr	0.4725	0.6529	0.8227	0.8119
AIC	0.4215	0.8672	1.5265	1.2267
MSC	65.9607	62.3962	57.1215	59.5205

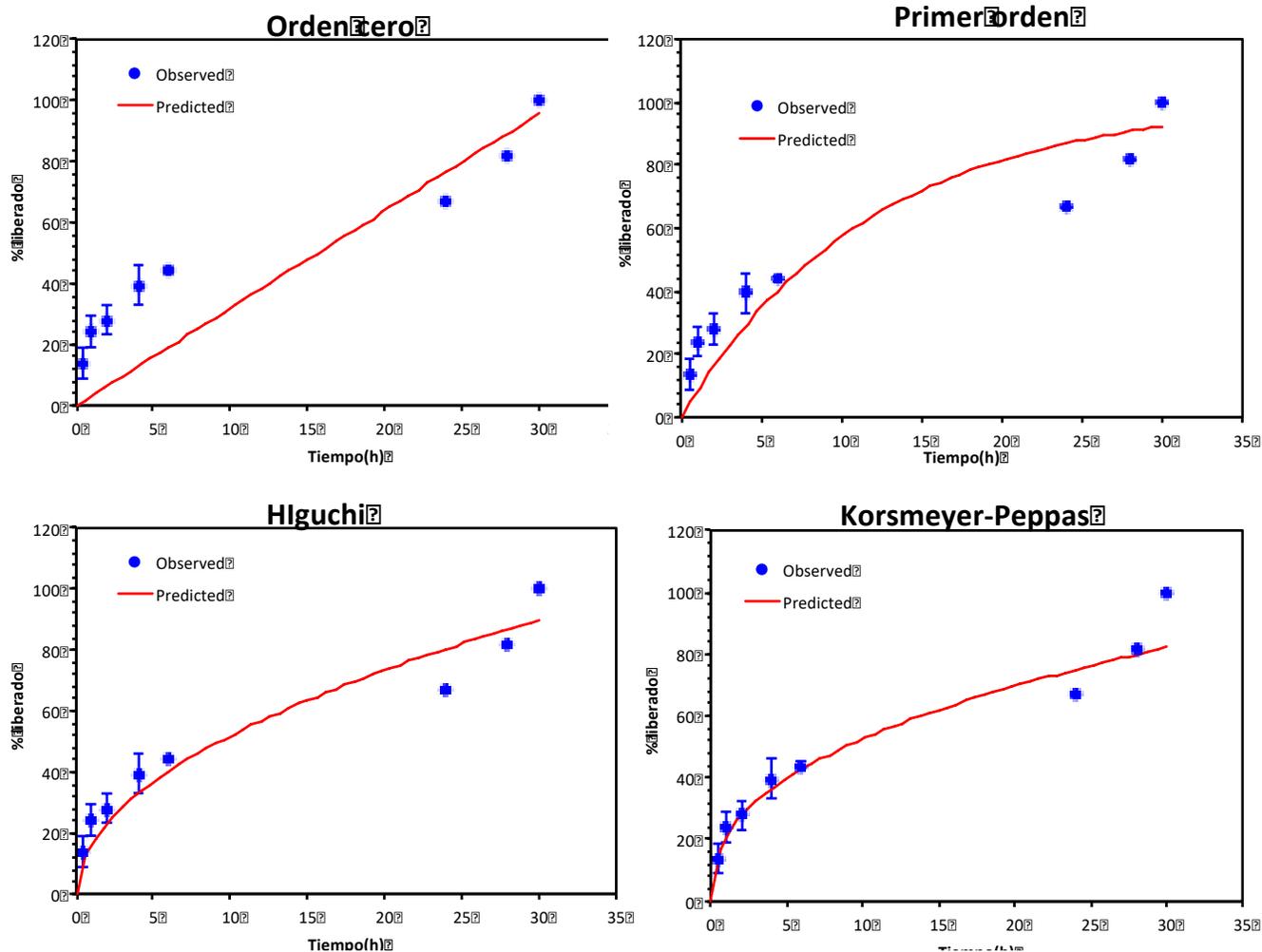


Figura 27. Modelos cinéticos de liberación NPM 0.8mg/mL

Tabla 7. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de NPM 0.8 mg/mL

	Nanopartículas magnéticas			
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Parámetros	k_0	k_1	k	$k_{1,n}$
Rsqr	0.5862	0.8015	0.9154	0.9144
AIC	0.6561	1.3996	2.2535	2.0066
MSC	64.9130	58.9655	52.1337	54.1094

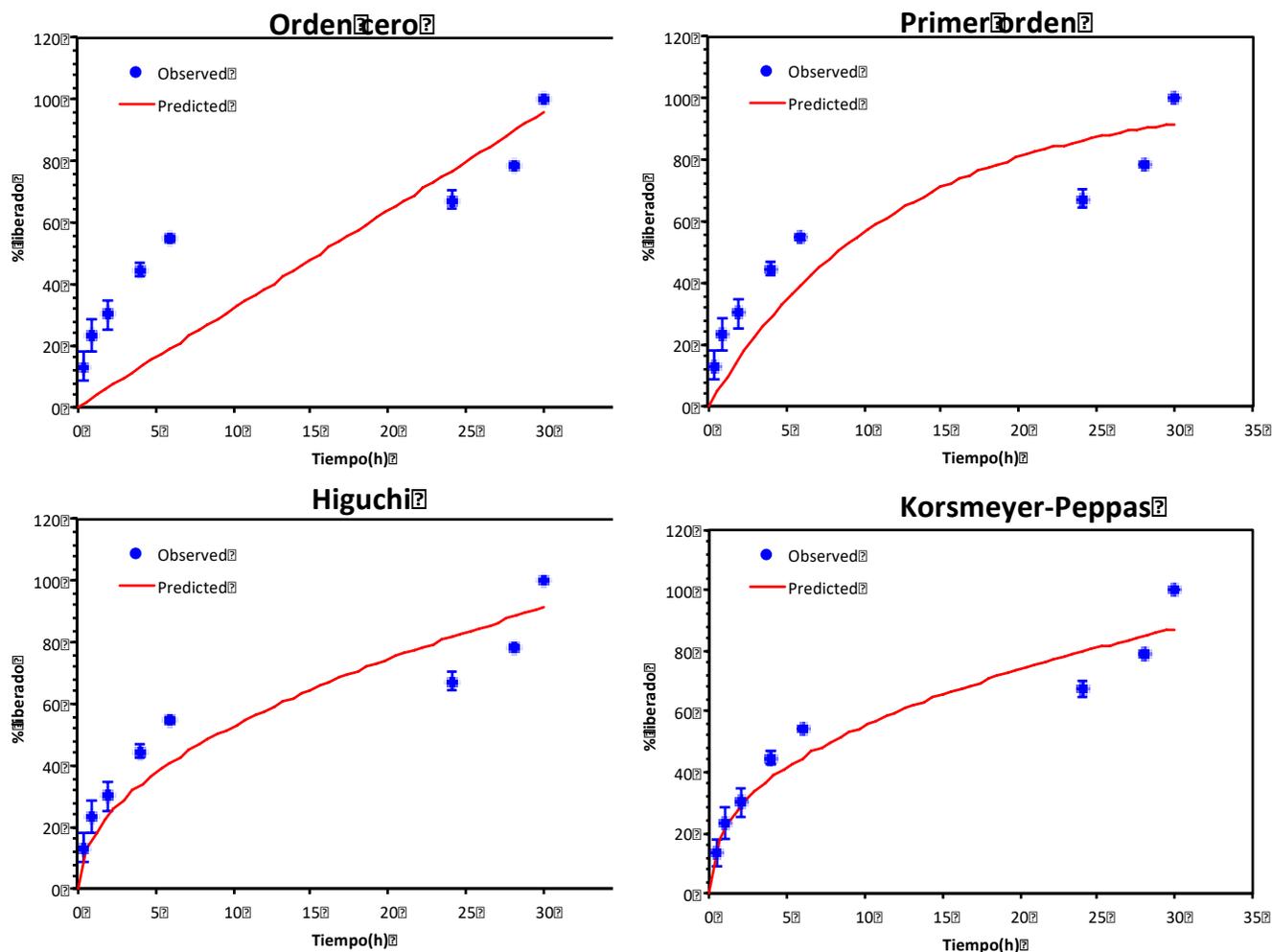


Figura 28. Modelos cinéticos de liberación NPM 1.2 mg/mL

Tabla 8. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de NPM 1.2 mg/mL

	Nanopartículas magnéticas			
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Parámetros	k_0	k_1	k	$k_{1,n}$
Rsqr	0.4092	0.7318	0.8812	0.8994
AIC	0.2779	1.0664	1.7578	1.8001
MSC	67.5979	61.2896	55.7589	55.4202

Como era de esperarse, independientemente de la cantidad de doxorubicina inicial, el comportamiento de los tres sistemas es muy similar e indica que la liberación se da mediante difusión tipo Fick.

Las figuras 29.30 y 31 muestran la cesión de doxorubicina desde las NPMR. En las tablas 9, 10 y 11 se aprecian los datos estadísticos correspondientes a los distintos ajustes matemáticos, así como los valores de k y n .

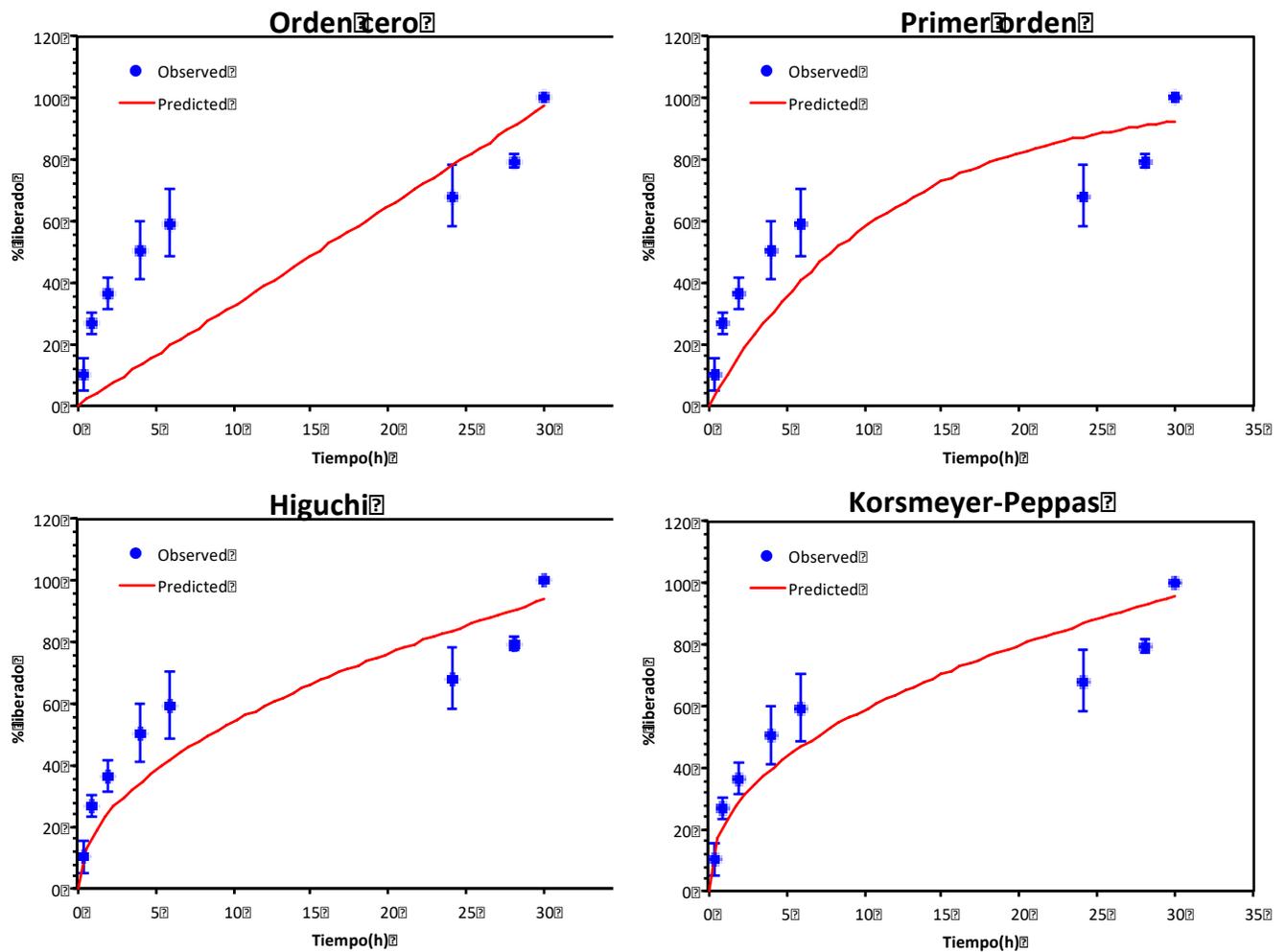


Figura 29. Modelos cinéticos de liberación NPMR 0.2 mg/mL

Tabla 9. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de NPMR 0.2 mg/mL

Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya				
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Parámetros	k_0	k_1	k	$k_{1,n}$
Rsqr	0.3334	0.6296	0.8369	0.8165
AIC	0.1576	0.7484	1.2635	1.2724
MSC	69.8528	63.8165	59.6960	59.6247

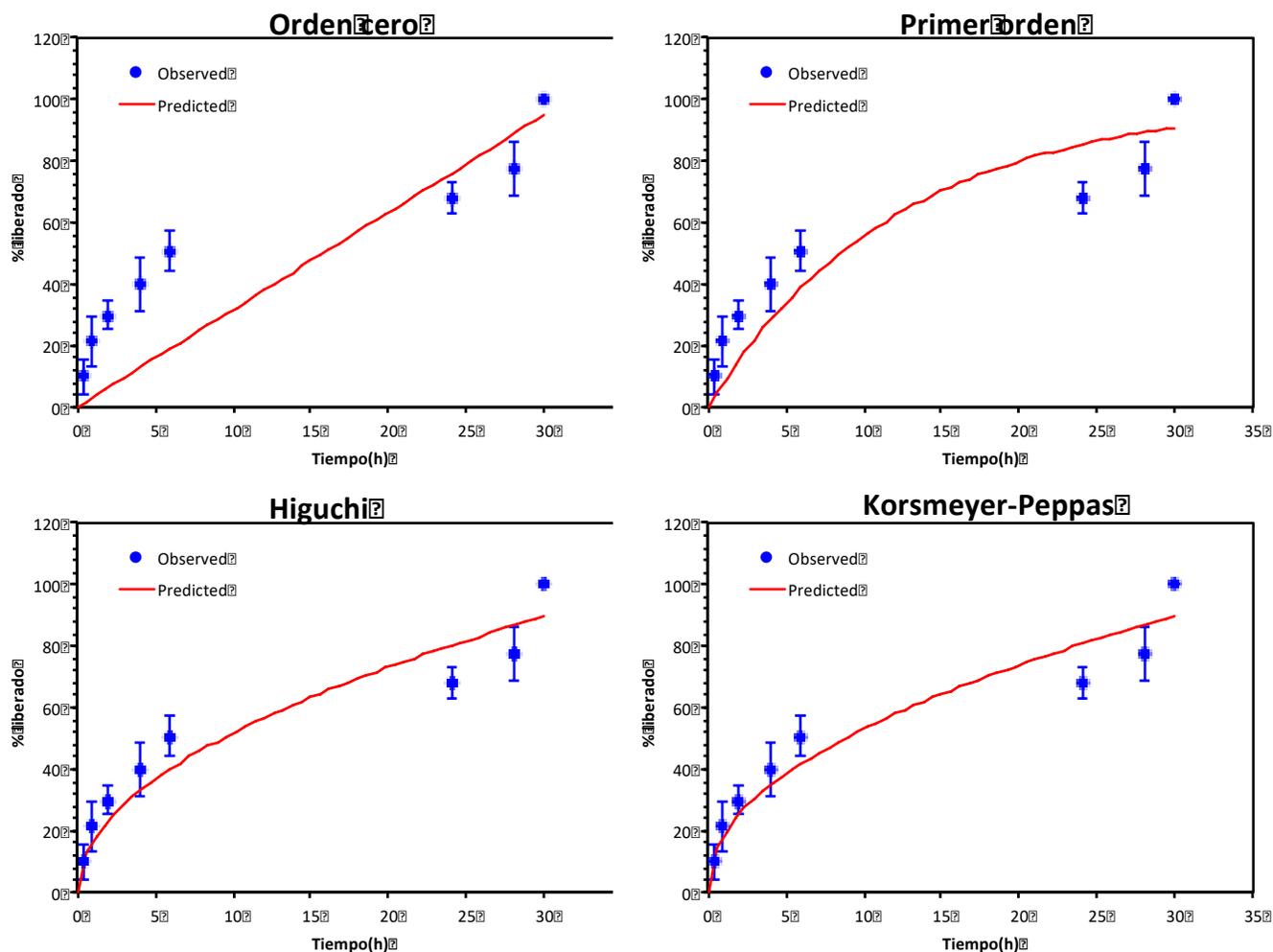


Figura 30. Modelos cinéticos de liberación NPMR 0.8 mg/mL

Tabla 10. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de NPMR 0.8 mg/mL

	Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya			
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Parámetros	k_0	k_1	k	$k_{1,n}$
Rsqr	0.5166	0.7798	0.8854	0.8954
AIC	0.5683	1.3627	1.9831	1.7692
MSC	65.7765	59.4214	54.4581	56.1690

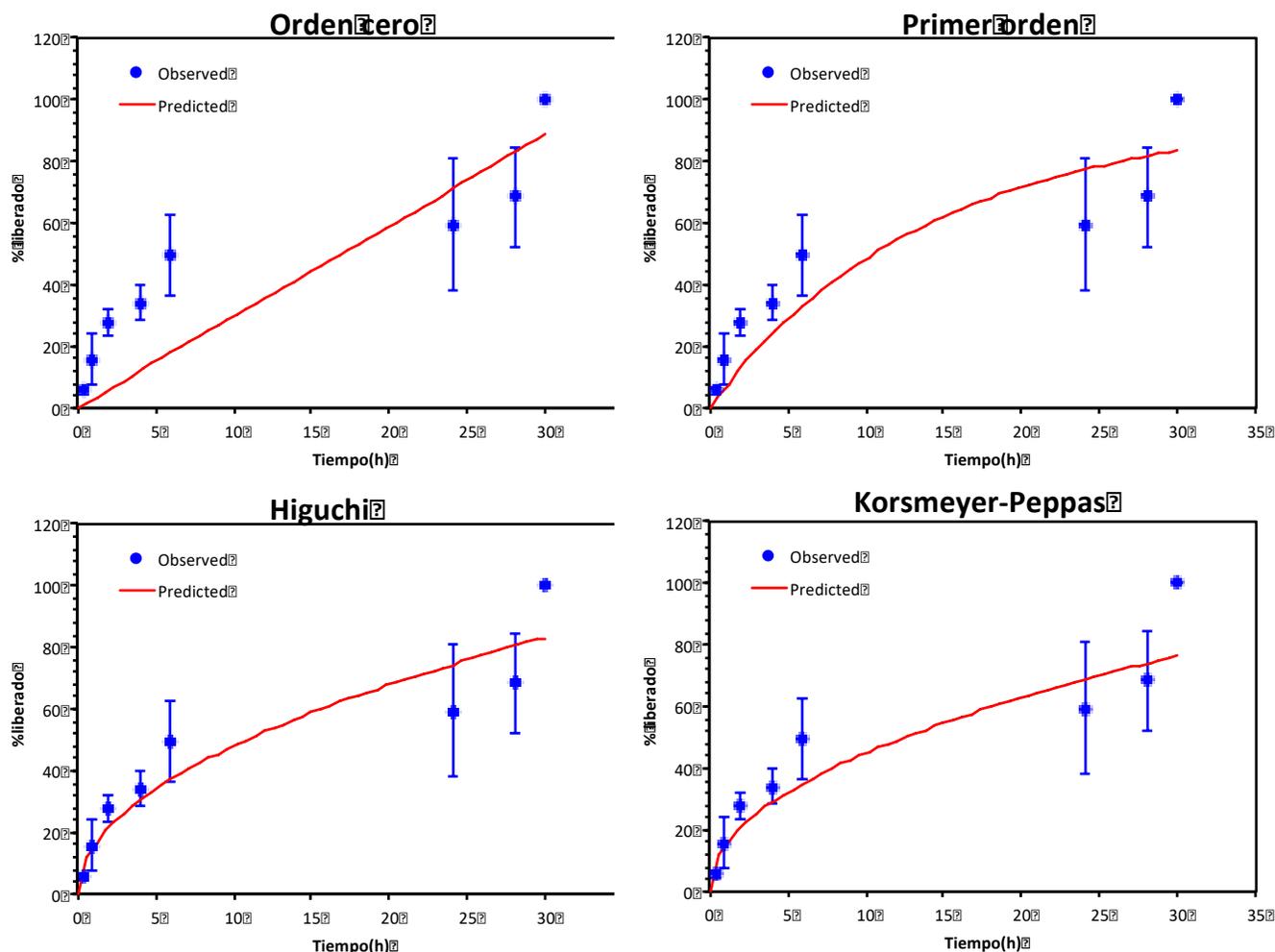


Figura 31. Modelos cinéticos de liberación NPMPR 1.2 mg/mL

Tabla 11. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de NPMPR 1.2 mg/mL

	Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya			
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Parámetros	k_0	k_1	k	$k_{1,n}$
Rsqr	0.5534	0.7268	0.9395	0.8744
AIC	0.5939	1.2849	1.6542	0.9796
MSC	65.9670	60.4389	57.4852	62.8815

El modelo que ajusta mejor los datos experimentales es el de Higuchi y esto quiere decir que la liberación se lleva a cabo mediante difusión a favor de gradiente.

Finalmente las figuras 32, 33 y 34, así como las tablas 12, 13 y 14 corresponden a los estudios de cesión de la doxorubicina desde NPMRB.

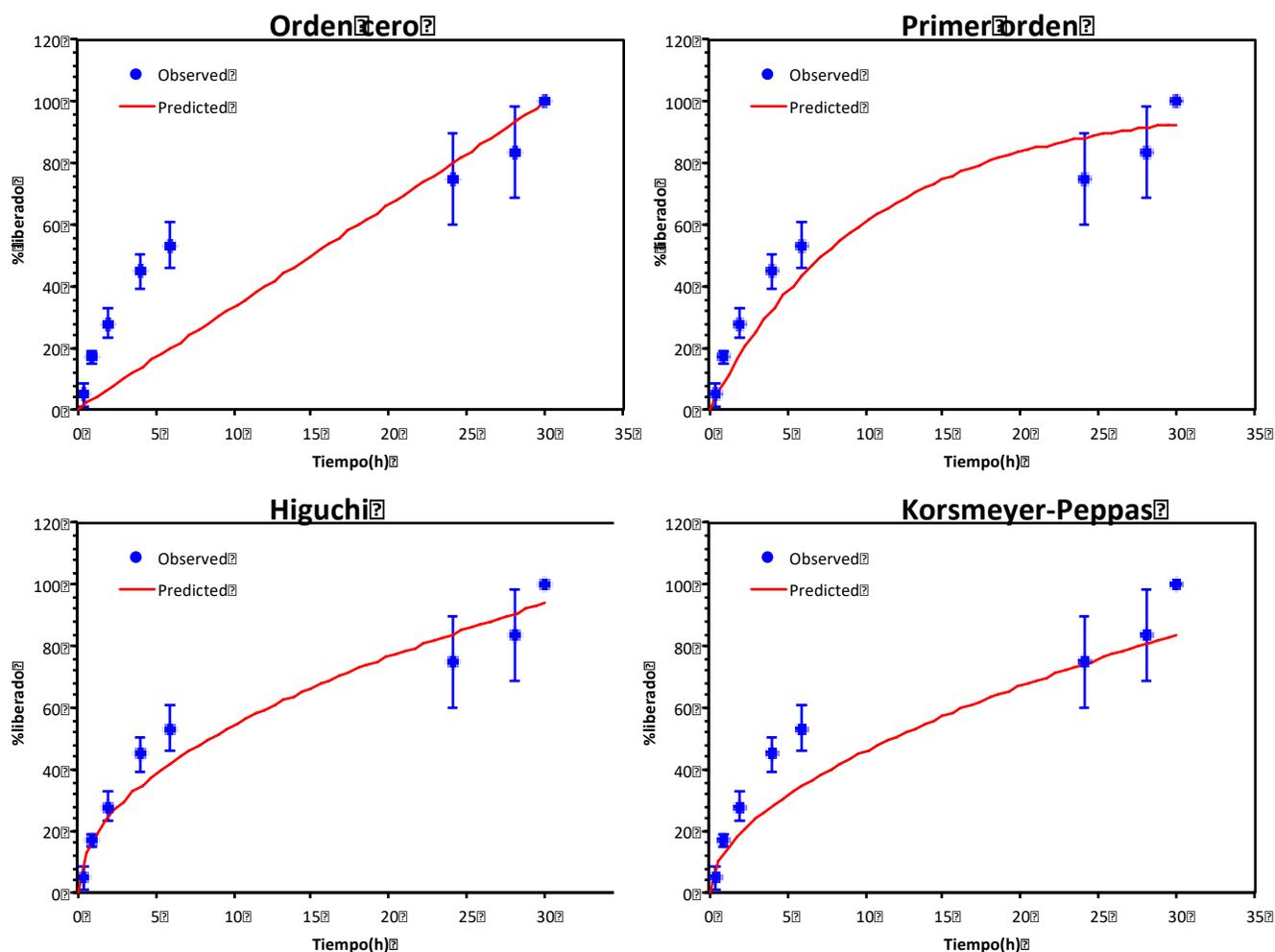


Figura 32. Modelos cinéticos de liberación NPMRB 0.2mg/mL

Tabla 12. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de NPMRB 0.2 mg/mL

	Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya/brij			
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Parámetros	k_0	k_1	k	$k_{1,n}$
Rsqr	0.6190	0.8734	0.9169	0.8786
AIC	0.7194	2.2084	2.3036	0.8162
MSC	66.1138	54.2021	53.4408	65.3399

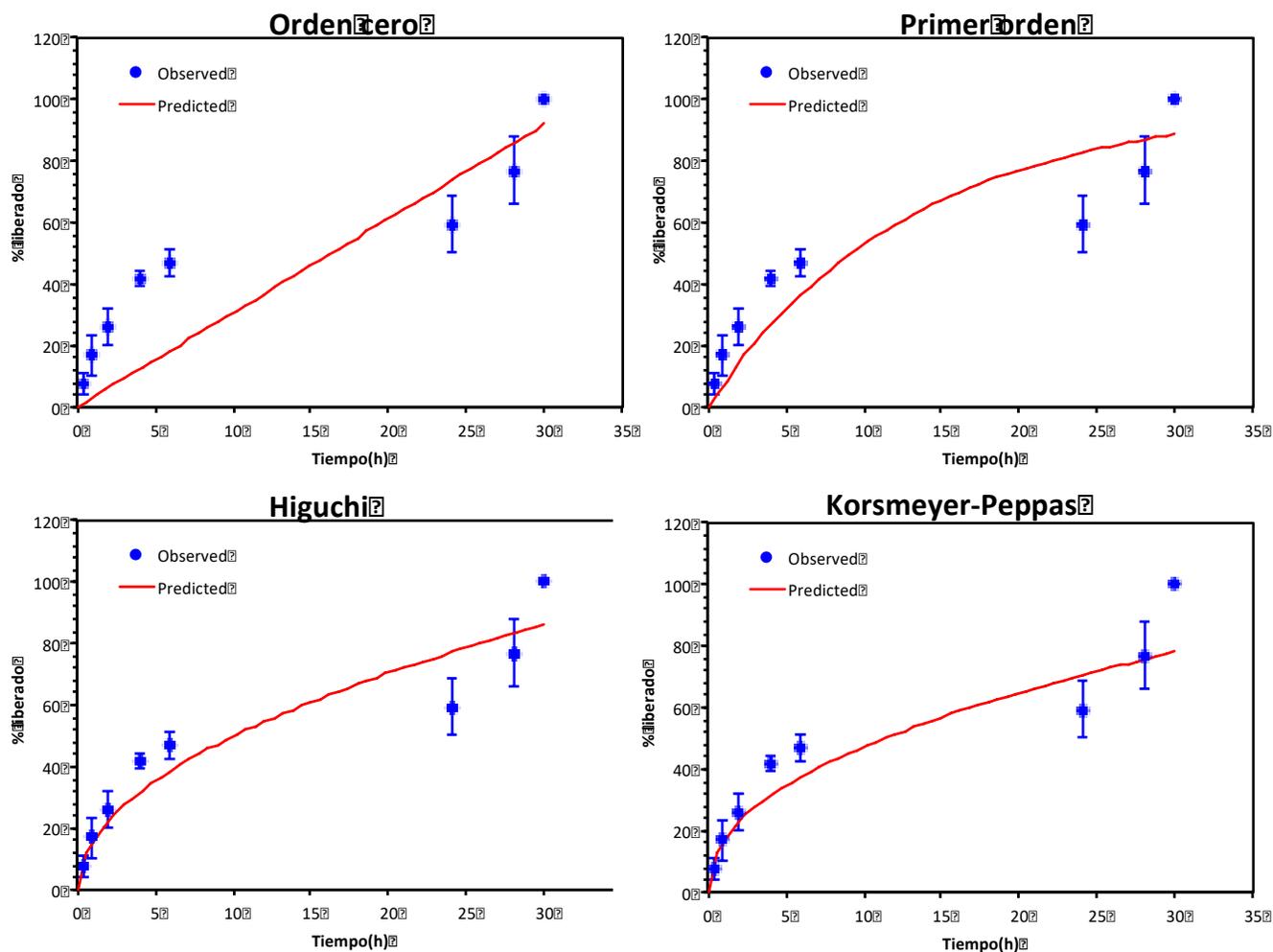


Figura 33. Modelos cinéticos de liberación NPMRB 0.8 mg/mL

Tabla 13. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de NPMRB 0.8 mg/mL

Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya/brij				
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Parámetros	k_0	k_1	k	k_1, n
Rsqr	0.5738	0.7481	0.8585	0.8354
AIC	0.6681	1.3660	1.87	1.3198
MSC	65.3313	59.7480	55.7157	60.1174

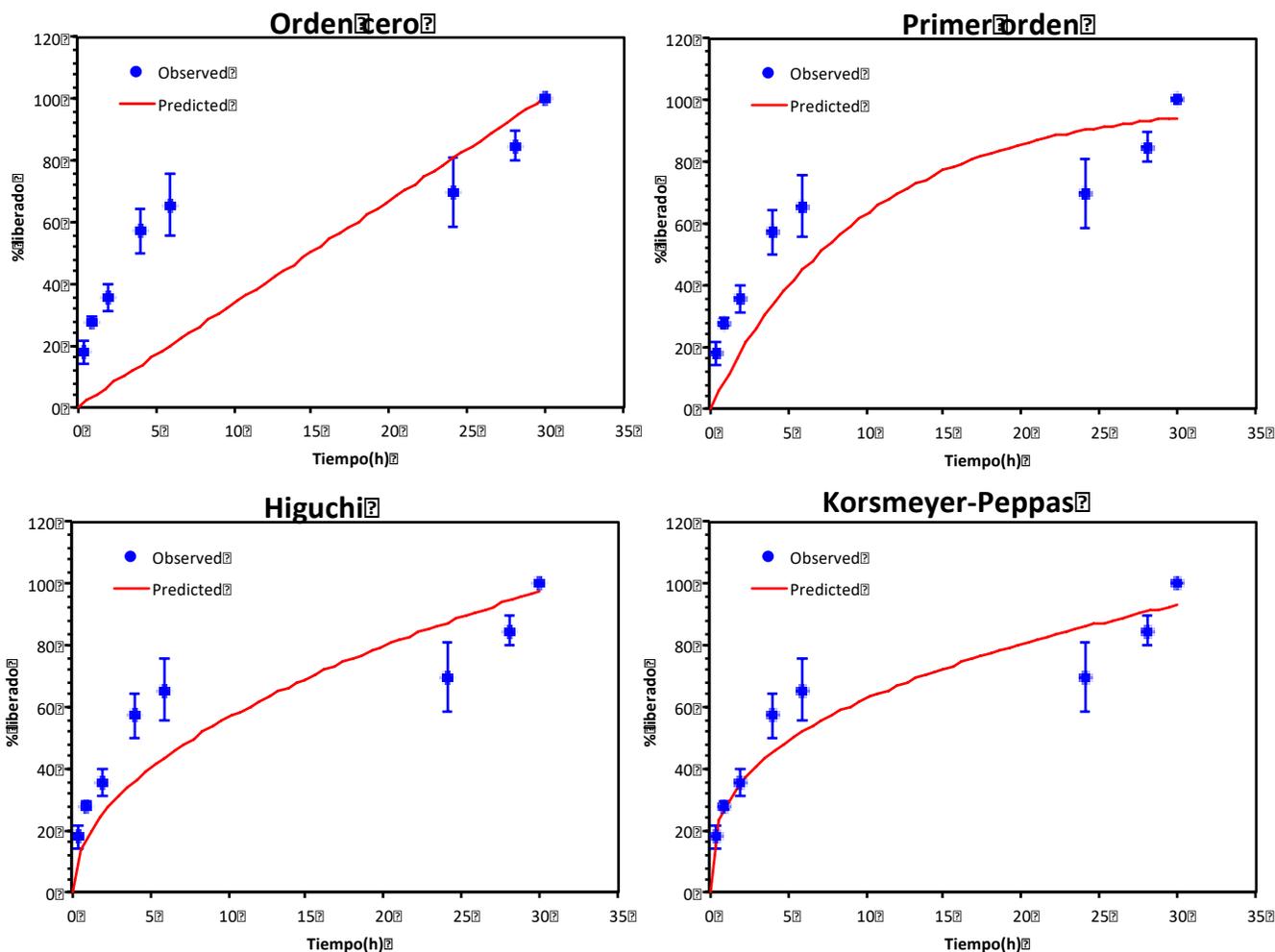


Figura 34. Modelos cinéticos de liberación NPMRB 1.2 mg/mL

Tabla 14. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de NPMRB 1.2 mg/mL

	Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya/brij			
Modelo	Cinética de orden cero	Cinética de primer orden	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Parámetros	k_0	k_1	k	$k_{1,n}$
Rsqr	0.0502	0.5801	0.8148	0.9314
AIC	-0.2692	0.6421	0.9920	1.3279
MSC	71.5042	64.2144	61.4146	58.7274

Los resultados asemejan los anteriormente mencionados, no hay una influencia por parte de la cantidad inicial y el modelo que simula el comportamiento de liberación es Korsmeyer Peppas con una $n < 0.5$, por lo cual la liberación se da por difusión tipo Fickiana.

En la tabla 15 se resumen los resultados de k y n para cada modelo.

Tabla 15. Modelos de liberación con un mejor ajuste en los sistemas evaluados a diferentes concentraciones

Nanopartículas magnéticas							
Modelo	Ecuaciones	Constantes determinadas					
		0.2 mg/mL		0.8 mg/mL		1.2 mg/mL	
Higuchi	$f_t = Q = A\sqrt{D(2C - C_s)C_s t}$	kH		kH		kH	
		15.285		16.401		16.678	
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n$	kKP	n	kKP	n	kKP	n
		18.853	0.431	20.851	0.405	21.409	0.413
Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya							
Modelo	Ecuaciones	Constantes determinadas					
		0.2 mg/mL		0.8 mg/mL		1.2 mg/mL	
Higuchi	$f_t = Q = A\sqrt{D(2C - C_s)C_s t}$	kH		kH		kH	
		17.116		16.368		15.188	
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n$	kKP	n	kKP	n	kKP	n
		21.354	0.445	18.285	0.478	14.841	0.474
Nanopartículas magnéticas recubiertas con lecitina de soya/brij							
Modelo	Ecuaciones	Constantes determinadas					
		0.2 mg/mL		0.8 mg/mL		1.2 mg/mL	
Higuchi	$f_t = Q = A\sqrt{D(2C - C_s)C_s t}$	kH		kH		kH	
		17.140		15.750		17.851	
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n$	kKP	n	kKP	n	kKP	n
		13.176	0.543	16.610	0.455	27.759	0.356

Estos modelos muestran que el mecanismo de liberación por el cual se libera el fármaco es mediante la difusión, el modelo de Higuchi tiene varias hipótesis que concuerdan con todos los sistemas. Como se mencionó anteriormente la doxorrubicina tiene una baja solubilidad en agua por lo cual la concentración inicial en todos los sistemas será mayor que su solubilidad, al estar adsorbido el fármaco es coherente que la difusión de dicho fármaco sea en un solo

sentido además de que la difusión es constante y se confirma que se tuvieron las condiciones sink adecuadas.

Esto se confirma con el modelo de Korsmeyer-Peppas el cual menciona que el fármaco se libera mediante una forma unidimensional, como bien se sabe la n caracteriza la manera en la cual se libera el fármaco, en todas los sistemas se ve que dicha liberación es dada mediante difusión tipo Fick ya que $n < 0.5$.

En resumen, se encontró que todas las nanopartículas pueden adsorber doxorubicina y liberar el fármaco mediante difusión tipo Fick lo cual se confirmó con ambos modelos de liberación (Higuchi y Korsmeyer-Peppas).⁷⁰

El sistema que mostró una mayor capacidad de adsorción fue NPMRB, esto debido posiblemente a la estructura que presenta y por tener la constante de afinidad mayor a los otros sistemas. Dadas las característica hidrofóbicas de la doxorubicina, así como las de la bicapa formada, ésta podrá acomodarse entre medio de las cadenas alifáticas de la lecitina de soya y brij. Por otra parte, la difusión que se da de manera más rápida es desde NPM, ya que al no tener algún recubrimiento o una modificación en su superficie no tendrá nada que pueda retener el fármaco y así será más fácil liberarlo al medio.

Se hicieron a 37 °C, lo cual indica que si hay liberación a esta temperatura por lo que habría que modificar la composición de la bicapa para que a temperatura corporal no liberasen, sino que hubiera que aumentar al menos a 40 grados para que se diera la cesión y así aprovechar la propiedad del superparamagnetismo en el incremento de temperatura al ser sometido a un campo magnético externo. No obstante, es una primera aproximación a este tipo de sistemas.⁷⁰

9. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron nanopartículas magnéticas esféricas de magnetita, desnudas y recubiertas con lecitina de soya y lecitina de soya/brij adsorbidos en su superficie.
- El tamaño que presentan los diferentes sistemas varía entre tamaños que van entre 51.48 nm hasta los 530 nm, siendo un mejor método de síntesis el realizado por coprecipitación.
- El potencial z que presentan los sistemas van desde -11.4 hasta -28.9 mV; se ve que hay una relación con respecto al tamaño de partícula ya que al aumentar el potencial de las nanopartículas habrá una disminución de tamaño.
- Se logró adsorber doxorubicina a los tres sistemas generados, siendo la mayor cantidad cargada 1.2 mg/mL para NPM, NPMR y NPMRB respectivamente. La isoterma de adsorción responde al modelo de Langmuir-Freundlich, en el caso de los sitios de unión se ve que hay un incremento en las nanopartículas recubiertas en comparación con las nanopartículas sin recubrir, comprobando que el recubrimiento ayuda a que las nanopartículas se funcionalicen; en cuanto al brij se ve que disminuyen los sitios de unión para DOX.
- Los estudios de liberación *in vitro* de la doxorubicina indican que se trata de un proceso gobernado por difusión tipo *Fick*, liberando el 100% de la carga en un tiempo de 30 horas, siendo ligeramente más lenta desde los sistemas recubiertos.

10. REFERENCIAS

- 1 Jiang, W., Kim, B. Y., Rutka, J. T. & Chan, W. C. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature nanotechnology* **3**, 145-150, doi:10.1038/nnano.2008.30 (2008).
- 2 OMS. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>> (2015).
- 3 Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O. C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews* **66**, 2-25, doi:10.1016/j.addr.2013.11.009 (2014).
- 4 Organization, W. H. World Cancer Report 2014. (Lyon, France, 2014).
- 5 Han, J. *et al.* Dietary Fat Intake and Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PloS one* **10**, e0138580, doi:10.1371/journal.pone.0138580 (2015).
- 6 Lucchini, R. G. & London, L. Global Occupational Health: Current Challenges and the Need for Urgent Action. *Annals of Global Health* **80**, 251-256, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.006> (2014).
- 7 Ozasa, K. Epidemiological research on radiation-induced cancer in atomic bomb survivors. *Journal of radiation research* **57 Suppl 1**, i112-i117, doi:10.1093/jrr/rrw005 (2016).
- 8 Cardis, E. *et al.* The 15-Country Collaborative Study of Cancer Risk among Radiation Workers in the Nuclear Industry: estimates of radiation-related cancer risks. *Radiation research* **167**, 396-416, doi:10.1667/rr0553.1 (2007).
- 9 Boffetta, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutation research* **608**, 157-162, doi:10.1016/j.mrgentox.2006.02.015 (2006).
- 10 Grosse, Y. *et al.* A review of human carcinogens--Part A: pharmaceuticals. *The Lancet. Oncology* **10**, 13-14 (2009).
- 11 UICC. World Cancer Declaration Progress Report 2016. (Unión Internacional Contra el Cáncer, 2016).
- 12 Abelardo Meneses García, I. N. C. A. N., (Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Cancerología, 2016).
- 13 INEGI. (Aguascalientes, 2016).
- 14 McGregor, D. (ed John H. Duffus & Howard G.J. Worth) 90-100 (The Royal Society of Chemistry, 1996).

- 15 Thurston, D. D. *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs* (2007).
- 16 Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 136-151, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009> (2011).
- 17 Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research* **34**, D668-672, doi:10.1093/nar/gkj067 (2006).
- 18 NLM. *Doxorubicin*, <<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=51500#Pre-GeriUse>> (2017).
- 19 Chien, Y. W. *Novel Drug Delivery Systems*. Second, Revised and Expanded edn, Vol. 50 797 (1992).
- 20 Anil Bajpai, S. S., Rajesh Saini, Atul Tiwari. *Stimuli Responsive Drug Delivery Systems - From Introduction to Application*. (2010).
- 21 Chen, X. & Wong, S. T. C. in *Cancer Theranostics* 3-8 (Academic Press, 2014).
- 22 Kumar, C. S. S. R. Nanotechnology tools in pharmaceutical R&D. *Materials Today* **12, Supplement 1**, 24-30, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70142-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70142-5) (2010).
- 23 Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M. R. & Santamaría, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* **2**, 22-32, doi:[https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(07\)70084-1](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70084-1) (2007).
- 24 Dino, F. *Surface Effects in Magnetic Nanoparticle.*, (2005).
- 25 Esmaili, A. & Alizadeh Hadad, N. Preparation of ZnFe₂O₄-chitosan-doxorubicin hydrochloride nanoparticles and investigation of their hyperthermic heat-generating characteristics. *Ceramics International* **41**, 7529-7535, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.02.075> (2015).
- 26 Azcona, P., Zysler, R. & Lassalle, V. Simple and novel strategies to achieve shape and size control of magnetite nanoparticles intended for biomedical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **504**, 320-330, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.064> (2016).
- 27 Lu, A.-H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 1222-1244, doi:10.1002/anie.200602866 (2007).

- 28 Ramadan, W., Zaki, M. I., Fouad, N. E. & Mekheimer, G. A. H. Particle characteristics and reduction behavior of synthetic magnetite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **355**, 246-253, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2013.12.006> (2014).
- 29 Mahmood Ahmad, M. U. M., Muhammad Sohail, Muhammad Faisal, Haroon Rashid. Comprehensive Review on Magnetic Drug Delivery Systems: A Novel Approach for Drug Targeting. *Journal of Pharmacy and Alternative Medicine* **2**, 13-21 (2013).
- 30 Joseph L. Kirschvink, D. S. J., Bruce J. MacFadden. *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism*. (1985).
- 31 Giri, J., Guha Thakurta, S., Bellare, J., Kumar Nigam, A. & Bahadur, D. Preparation and characterization of phospholipid stabilized uniform sized magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **293**, 62-68, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.044> (2005).
- 32 Moskowitz, B. M. *Hitchhiker's Guide to Magnetism*. (1991).
- 33 Mnyukh, Y. Magnetization of Ferromagnets. *American Journal of Condensed Matter Physics* **4**, 78-85 (2014).
- 34 Coxon, T. P., Fallows, T. W., Gough, J. E. & Webb, S. J. A versatile approach towards multivalent saccharide displays on magnetic nanoparticles and phospholipid vesicles. *Organic & Biomolecular Chemistry* **13**, 10751-10761, doi:10.1039/C5OB01591J (2015).
- 35 Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995-4021, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012> (2005).
- 36 Mattingly, S. J., O'Toole, M. G., James, K. T., Clark, G. J. & Nantz, M. H. Magnetic nanoparticle-supported lipid bilayers for drug delivery. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **31**, 3326-3332, doi:10.1021/la504830z (2015).
- 37 Banerjee, S. S. & Chen, D. H. Multifunctional pH-sensitive magnetic nanoparticles for simultaneous imaging, sensing and targeted intracellular anticancer drug delivery. *Nanotechnology* **19**, 505104, doi:10.1088/0957-4484/19/50/505104 (2008).
- 38 Young Kyong, J. & Sy-Bor, W. Direct generation of core/shell nanoparticles from double-pulse laser ablation in a background gas. *Journal of Physics D: Applied Physics* **44**, 305301 (2011).

- 39 Alwi, R. *et al.* Silica-coated super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) as biocompatible contrast agent in biomedical photoacoustics. *Biomedical Optics Express* **3**, 2500-2509, doi:10.1364/BOE.3.002500 (2012).
- 40 Igartua, M. *et al.* Development and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with magnetite. *International Journal of Pharmaceutics* **233**, 149-157, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00936-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00936-X) (2002).
- 41 Wen, X. *et al.* Brain-targeted delivery of trans-activating transcriptor-conjugated magnetic PLGA/lipid nanoparticles. *PloS one* **9**, e106652, doi:10.1371/journal.pone.0106652 (2014).
- 42 Ming-Huang, H., Chung-Yu, L. & Yu-Chuan, S. in *2008 3rd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*. 788-791.
- 43 Rowe, R. C., Paul J. Sheskey, Paul J. Weller. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. . 6th edn, (Pharmaceutical Press, 2003).
- 44 Cui, Z., Qiu, F. & Sloat, B. R. Lecithin-based cationic nanoparticles as a potential DNA delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* **313**, 206-213, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.042> (2006).
- 45 Li, J. *et al.* A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **10**, 81-98, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004> (2015).
- 46 Tagami, T., May, J. P., Ernsting, M. J. & Li, S.-D. A thermosensitive liposome prepared with a Cu²⁺ gradient demonstrates improved pharmacokinetics, drug delivery and antitumor efficacy. *Journal of Controlled Release* **161**, 142-149, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.023> (2012).
- 47 Sowmiya, M., Tiwari, A. K. & Saha, S. K. Fluorescent probe studies of micropolarity, premicellar and micellar aggregation of non-ionic Brij surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* **344**, 97-104, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.12.021> (2010).
- 48 Ying, X.-Y., Du, Y.-Z., Hong, L.-H., Yuan, H. & Hu, F.-Q. Magnetic lipid nanoparticles loading doxorubicin for intracellular delivery: Preparation and characteristics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **323**, 1088-1093, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.12.019> (2011).

- 49 Tagami, T. *et al.* MRI monitoring of intratumoral drug delivery and prediction of the therapeutic effect with a multifunctional thermosensitive liposome. *Biomaterials* **32**, 6570-6578, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.029> (2011).
- 50 Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S. & Sen, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 24-46, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.006> (2011).
- 51 Govindarajan, S. *et al.* Gene delivery into human cancer cells by cationic lipid-mediated magnetofection. *International Journal of Pharmaceutics* **446**, 87-99, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.055> (2013).
- 52 Aw, M. S., Addai-Mensah, J. & Losic, D. Magnetic-responsive delivery of drug-carriers using titania nanotube arrays. *Journal of Materials Chemistry* **22**, 6561-6563, doi:10.1039/c2jm16819g (2012).
- 53 Guo, Y. *et al.* Light/magnetic hyperthermia triggered drug released from multifunctional thermo-sensitive magnetoliposomes for precise cancer synergetic theranostics. *Journal of Controlled Release*, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.028>.
- 54 Urban, M. W. *Handbook of Stimuli-Responsive Materials*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011).
- 55 Deok Kong, S. *et al.* Magnetic field activated lipid-polymer hybrid nanoparticles for stimuli-responsive drug release. *Acta Biomaterialia* **9**, 5447-5452, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.006> (2013).
- 56 Bai, J., Wang, J. T.-W., Mei, K.-C., Al-Jamal, W. T. & Al-Jamal, K. T. Real-time monitoring of magnetic drug targeting using fibered confocal fluorescence microscopy. *Journal of Controlled Release* **244**, Part B, 240-246, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.026> (2016).
- 57 Kim, J.-E., Shin, J.-Y. & Cho, M.-H. Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Archives of Toxicology* **86**, 685-700, doi:10.1007/s00204-011-0773-3 (2012).
- 58 Alexiou, C. *et al.* Cancer therapy with drug loaded magnetic nanoparticles—magnetic drug targeting. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **323**, 1404-1407, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.11.059> (2011).

- 59 Cherry, E. M. & Eaton, J. K. A comprehensive model of magnetic particle motion during magnetic drug targeting. *International Journal of Multiphase Flow* **59**, 173-185, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2013.11.007> (2014).
- 60 Tafoya Olivos, H. M. *Síntesis y caracterización de polímeros de impresión molecular para liberación prolongada de ivermectina* UNAM, (2010).
- 61 Stewart, J. C. M. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry* **104**, 10-14, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90269-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9) (1980).
- 62 Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **235**, 337-351, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017> (2016).
- 63 Clogston, J. D. & Patri, A. K. in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (ed Scott E. McNeil) 63-70 (Humana Press, 2011).
- 64 Zhao, S., Zhang, Y., Han, Y., Wang, J. & Yang, J. Preparation and Characterization of Cisplatin Magnetic Solid Lipid Nanoparticles (MSLNs): Effects of Loading Procedures of Fe₃O₄ Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* **32**, 482-491, doi:10.1007/s11095-014-1476-2 (2015).
- 65 Javier A. Lopez, F. G. I., Flavio A. Bonilla, Gustavo Zambrano, Maria E. Gómez. Synthesis and Characterization of Fe₃O₄ Magnetic Nanofluid. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* **30**, 60-66 (2010).
- 66 Akbaba, H., Karagöz, U., Selamet, Y. & Kantarcı, A. G. Synthesis and characterization of cationic lipid coated magnetic nanoparticles using multiple emulsions as microreactors. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **426**, 518-524, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.126> (2017).
- 67 Brundavanam Krishna Ravi , P. J. E., Fawcett Derek Modelling the Crystal Structure of a 30 nm Sized Particle based Hydroxyapatite Powder Synthesised under the Influence of Ultrasound Irradiation from X-ray powder Diffraction Data. *American Journal of Materials Science* **3**, 84-90 (2013).
- 68 Quiñones, I. & Guiochon, G. Derivation and Application of a Jovanovic–Freundlich Isotherm Model for Single-Component Adsorption on Heterogeneous Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **183**, 57-67, doi:<http://dx.doi.org/10.1006/jcis.1996.0518> (1996).

- 69 Jeppu, G. P. & Clement, T. P. A modified Langmuir-Freundlich isotherm model for simulating pH-dependent adsorption effects. *Journal of Contaminant Hydrology* **129–130**, 46-53, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2011.12.001> (2012).
- 70 Suvakantha Dash, P. N. M., Lilakanta Nath and Prasanta Chowdury. Kinetic Modeling On Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research* **67**, 217-223 (2010).