



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

*“ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA DE
LIBERACIÓN CONTROLADA DE CASIOPEINA III-ia.”*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERÓN



TUTOR: DRA MA. JOSEFA BERNAD BERNAD

AÑO: 2012



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: Dra. Lena Ruiz Azuara
Vocal: Dr. David Quintanar Guerrero
Vocal: Dra. Helgi Jung Cook
Vocal: Dra. Luz María Melgoza Contreras
Secretario: Dra. Elizabeth Piñón Segundo

Laboratorio de Investigación en Nuevos Sistemas de Liberación de Fármacos,
Edificio F laboratorios 002-003.

Departamento de Farmacia. Facultad de Química C.U., U.N.A.M.

Asesora del tema:

Dra. María Josefa Bernad Bernad

Sustentante:

M. en C. Jorge Esteban Miranda Calderón

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por las facilidades para llevar a cabo este trabajo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico, con numero **191839**, otorgado durante el periodo de elaboración del presente trabajo.
- A la Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad por la oportunidad de trabajar en su equipo.
- Al jurado por sus valiosos comentarios y observaciones que han mejorado la calidad del trabajo.
- A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación por la facilidad en el uso de sus equipos.
- A la M en C. Isabel Gracia Mora, la M en C. Lucia Macías Rosales y la M en C. Mabel C. Tinoco Méndez, por el apoyo brindado en la Unidad de Experimentación Animal.
- A la Dra. Ma. Elena Bravo Gómez quien amablemente sintetizó y proporcionó la Casiopeína III-ia para este trabajo.
- Al M en C. Iván Puente Lee por su valiosa colaboración en el procesamiento de las muestras en el microscopio electrónico de barrido.
- Al Dr. Jesús Gracia Mora y al Dr. Rafael Moreno Esparza por sus valiosas aportaciones en la interpretación de resultados.
- Al Dr. Luis Medina Torres por su apoyo en el uso e interpretación de resultados del reómetro.
- Al Dr. Alejandro Solano Peralta por la realización de los espectros de Espectroscopía Paramagnética Nuclear.

Dedico todo mi trabajo a Dios, a mi Familia y familiares y a mi pueblo querido Liberaltepec, Gro.

***“Busca primero el reino de Dios y su justicia divina y por añadidura lo demás se te dará”
(Cf Mt 5, 33).***

CONTENIDO

A. RESUMEN	i
B. ABSTRACT	iii
1. ANTECEDENTES	
1.1. Cáncer	2
1.1.1. Generalidades	2
1.1.2. Definición del Cáncer	4
1.1.3. Tratamiento	6
1.1.4. Desarrollo Farmacéutico en Cáncer	6
1.2. Casiopeínas[®]	14
1.2.1. Mecanismo de acción	15
1.2.2. Casiopeína III-ia	16
1.3. Nanofarmacia	19
1.3.1. Nanotecnología Farmacéutica	19
1.3.2. Nanopartículas Poliméricas	21
1.3.3. Métodos de Formación	23
1.3.4. Caracterización de Nanopartículas	27
1.4. Vectorización de fármacos anticancerígenos	31
1.4.1. Vectorización pasiva	32
1.4.2. Vectorización activa	34
1.4.3. Vectorización vía folato	36
1.5. Nanopartículas de Quitosán	39
1.5.1. Quitosán	39
1.5.2. Métodos de preparación de Nanopartículas de Quitosán	42
1.5.3. Aplicaciones de Nanopartículas de Quitosán	43
1.5.4. Fabricación de Nanopartículas por el método de coacervación	44
1.5.5. Fabricación de Nanopartículas por complejación de polielectrolito	44
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1. Hipótesis	47
2.2. Objetivo general	47
2.3. Objetivos específicos	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. Materiales	49
3.2. Métodos	49
3.2.1. Interacción Casiopeína III-ia-Quitosán	49
3.2.1.1. Mediciones Reológicas	49
3.2.1.2. Mediciones Espectrofotométricas	49
3.2.1.3. Análisis por Resonancia Electrónica Paramagnética	50
3.2.1.4. Análisis por IR, DSC y DPR-X	50

CONTENIDO

3.2.2. Preparación de Nanopartículas	51
3.2.3. Viabilidad celular de las mezclas fármaco-polímero	54
3.2.4. Índice de sobrevida en ratones trasplantados con tumor de melanoma B16	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Interacción Quitosán-Casiopéina III-ia	57
4.1.1. Mediciones reológicas	57
4.1.1.1. Curvas de viscosidad del Quitosán	57
4.1.1.2. Curvas de viscosidad Quitosán-Cas III-ia	59
4.1.2. Espectrofotometría UV-Vis	60
4.1.2.1. Estabilidad de la Cas III-ia en medio ácido	61
4.1.2.2. Estabilidad de la Cas III-ia-Quitosán en medio ácido	63
4.1.2.3. Estabilidad de la Cas III-ia en medio básico	66
4.1.3. Resonancia Paramagnética Electrónica	68
4.1.4. Actividad <i>in vitro</i>	69
4.1.5. Discusión	70
4.2. Formulación de nanopartículas	73
4.2.1. Efecto de la base	73
4.2.2. Efecto de la concentración del polímero	74
4.2.3. Efecto del agente estabilizante	76
4.2.4. Efecto de la Cas III-ia en la formación de Nanopartículas	78
4.2.5. Porcentaje de encapsulación	79
4.2.6. Discusión	80
4.3. Caracterización instrumental	83
4.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido	83
4.3.2. Difracción de Rayos X de Polvos	85
4.3.3. Análisis Térmico	87
4.3.4. Espectroscopía de Infrarrojo	89
4.4. Evaluación in vivo de las nanopartículas	91
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	
5.1. Conclusiones	94
5.2. Perspectivas	95
6. BIBLIOGRAFÍA	96
7. ANEXOS	
7.1. Artículo publicado	105
7.2. Presentación en congresos	111

CONTENIDO

Lista de abreviaturas

OMS	Organización Mundial de la Salud
SSA	Secretaria de Salud
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
NP	Nanopartículas
MF	Mezcla Física
MFL	Mezcla Física Liofilizada
SLF	Sistemas de Liberación de Fármacos
PACA	Poli Alquil-Cianoacrilato
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
CasIII-ia	Casiopeína III-ia
DL ₅₀	Dosis Letal al 50% de la Población
K _{el}	Constante de Eliminación
Vd'	Volumen de Distribución
Cl	Aclaramiento
Min	Minutos
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Adquirida
PLGA	Copolímero de Ácido poli-Láctico-Glicólico
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
DT	Drug Targeting
EPR	Aumento de la Permeabilidad y Retención
SRE	Sistema Reticuloendotelial
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
TNF- α	Factor de Crecimiento de Fibroblastos tumoral α
VEGFR	Factor de Crecimiento Endotelial Vasculares
AF	Ácido Fólico
IL	Interleucina
PEC	Complejo Polielectrolito
5-FU	5-Fluoro Uracilo
EDC	Etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida clorhidrato
PVA	Alcohol Polivinílico
P407	Poloxámero 407
AA	Ácido Acético
CS	Citrato de Sodio

CONTENIDO

DMSO	Dimetil Sulfoxido
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
IR	Infrarrojo
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
TGA	Análisis Termogravimétrico
DPRX	Difracción de Polvos de Rayos-X
REP	Resonancia Electrónica Paramagnética
IC ₅₀	Inhibición de Crecimiento 50
PDI	Índice de Polidispersión
TPP	Tri-Polifosfato
TG	Termogravimetría

El cáncer es un padecimiento que causa un alto índice de mortalidad a nivel mundial. Las opciones de tratamiento incluyen la quimioterapia, radioterapia y cirugía. El tratamiento más común es la quimioterapia, sin embargo la terapia antineoplásica tiene dos grandes limitaciones; su escasa especificidad y la forma de administración. La lucha contra el cáncer ha llevado cada día a descubrir nuevas moléculas que sean capaces de contrarrestar esta enfermedad, un grupo de ellas son las denominadas Casiopeínas[®], las cuales son compuestos de coordinación con Cu (II) como centro metálico, mismas que han sido sintetizadas en la Facultad de Química de la U.N.A.M. Estas moléculas han mostrado mayor potencia antineoplásica que el cisplatino en estudios *in vitro* e *in vivo*. La Casiopeína III-ia es una de las más estudiadas y tiene gran potencial como futuro fármaco anticancerígeno.

En el ámbito farmacéutico es de especial interés conseguir formulaciones que sean capaces de liberar el principio activo de manera controlada en tiempo y espacio, cediendo el fármaco directamente en la zona afectada para mejorar el tratamiento de las enfermedades y disminuir efectos tóxicos y adversos como aquellos que se pueden suscitar en la quimioterapia contra el cáncer. Esta meta se puede conseguir por medio de sistemas novedosos de liberación de fármacos, los cuales son capaces de dirigir el fármaco específicamente al sitio requerido y mantener las concentraciones necesarias por periodos de tiempo adecuados. Existen numerosos sistemas de liberación de fármacos, uno de los más comunes para la vectorización de activos terapéuticos son las nanopartículas. Las nanopartículas poliméricas aumentan la biodisponibilidad de fármacos anticancerígenos mediante mayores tiempos de circulación comparados con el fármaco libre y mejor captación en el tumor. El Quitosán es un polímero de gran interés para liberación de fármacos y ha sido ampliamente utilizado en la formación de micro y nanopartículas.

La realización de este trabajo ha tenido por objeto la preparación de nanopartículas de quitosán cargadas con Casiopeína III-ia por el método de coacervación. El Quitosán es un polímero ampliamente usado para la formación de micro y nanopartículas. Los estudios han demostrado que mediante el método de coacervación es posible alcanzar este objetivo. La interacción Quitosan-Cobre (II) ha sido reportada y como se ha mencionado con anterioridad la molécula activa es un compuesto de coordinación, el cual puede

interaccionar con grupos funcionales del polímero requerido para modular la liberación causando el posible rompimiento de la molécula.

La investigación realizada se enfocó en tres aspectos fundamentales: estudiar la interacción fármaco-polímero con la finalidad de asegurar la estabilidad de la molécula activa durante el proceso de formación de nanopartículas por el método de coacervación, determinar las condiciones de reacción para llevar a cabo la formación de nanopartículas y la evaluación *in vivo* de las mismas para verificar la eficacia de las formulaciones propuestas.

Los resultados obtenidos demuestran que entre la Casiopeína III-ia y el Quitosan se presenta una interacción débil, no covalente, de magnitud menor a las reportadas para un complejo Quitosan-Cobre (II), por lo que se determina que la molécula es estable durante el proceso de formación de las nanopartículas, además la actividad de inhibición celular en la línea HeLa no se ve alterada por la interacción con el Quitosán. También se observó que mediante el método de coacervación es posible la formación de nanopartículas de quitosán cargadas con el activo, sin embargo el éxito en la obtención de tamaños menores a 1 μm depende del tipo de estabilizante utilizado, así como del control del pH del medio de reacción y la velocidad de agitación. Finalmente la respuesta biológica de las nanopartículas cargadas con la Casiopeína III-ia, en ratones trasplantados con melanoma B16, es mejor comparada contra la Casiopeína III-ia sola, ya que el tiempo de supervivencia aumenta preferencialmente en aquellos que se les administró las nanopartículas cargadas con el fármaco.

Cabe resaltar, por último, que la investigación básica y aplicada en el estudio y caracterización de un sistema de liberación de fármacos es de suma importancia para transportar fármacos antineoplásicos de manera selectiva, esto es, que liberen el activo preferencialmente en las células tumorales.

Cancer is a disease that causes a high rate of mortality worldwide. Treatment options include surgery, chemotherapy and radiotherapy. The most common treatment is chemotherapy, however antineoplastic therapy has two major limitations, its low specificity and route of administration. The fight against cancer has led every day to discover new molecules that are able to counteract this disease; a group of them are called Casiopeínas[®], which are coordination compounds with Cu (II) as metal center, which have been synthesized at the Faculty of Chemistry, UNAM. These molecules have shown greater antineoplastic potency than cis-platin on *in vitro* and *in vivo* studies. Casiopeína III-ia is one of the most studied and it has a promising future as anticancer drugs.

In the pharmaceutical field is of special interest to get formulations that are capable of releasing the active ingredient in a controlled way, this means in time and space, delivering the drug directly into the affected area in order to improve the treatment of diseases and reduce toxic and adverse effects as those that occur in cancer chemotherapy. This scope can be achieved by means of novel drug delivery systems which are capable of directing the drug specifically to the required place and maintain the concentrations required for suitable periods of time. There are numerous drug delivery systems, one of the most common to direct drugs are nanoparticles. Polymeric nanoparticles enhance bioavailability of anticancer molecules by longer circulation times compared with the drug alone and better tumor uptake. Chitosan is an important polymer of interest for drug delivery and has widely been used as a micro and nanoparticle vehicle.

The aim of this work was to develop CasIII-ia-loaded chitosan nanoparticles by coacervation method. Studies have showed that using the coacervation method it is possible to achieve this objective. Chitosan-copper (II) interaction has been reported and as mentioned before Casiopeína III-ia is a coordination compound, which can interact with functional groups of polymer required to modulate the release possibly causing breakage of the molecule. The research focused on three aspects: first was to study the drug-polymer interaction in order to ensure the stability of the active molecule during the formation of nanoparticles by coacervation method, second to determine the reaction conditions to carry out the nanoparticle formation and finally to carry out *in vivo* evaluation in order to verify the effectiveness of the proposed formulations.

The results obtained show that between Casiopeína III-ia and chitosan presents a weak interaction, non-covalent, of magnitude lower than those reported for a complex Chitosan-Copper (II), therefore it is determined that the molecule is stable during formation process of nanoparticles; in addition the activity of against HeLa cell line is not altered by interaction with Chitosan. Also was observed that using the coacervation method it is possible to form chitosan nanoparticles loaded with active, however success in obtaining sizes less than 1 μm depends on the type of stabilizer used and the pH control of the reaction medium and stirring speed. Finally, the biological response of nanoparticles loaded with Casiopeína III-ia, in mice transplanted with B16 melanoma, is better compared against Casiopeína III-ia alone, because the percent of span life increases preferentially in those who were administered the nanoparticles loaded with the drug.

It is worth noting that the basic and applied research in the study and characterization of a drug delivery system is critical to transport antineoplastic drugs selectively, that is, they release the active preferentially in tumor cells.

1
ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

1.1.1. Generalidades

El cáncer es un padecimiento que causa un alto índice de mortalidad a nivel mundial, tan solo más de 11 millones de personas son diagnosticadas cada año y se estima que para el año 2030 la cifra alcance los 16 millones por año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que, de no mediar intervención alguna, 84 millones de personas morirán de cáncer entre 2005 y 2015¹.

En México la Secretaría de Salud (SSA) reporta que del egreso hospitalario por cáncer en 2008 (Tabla 1.1), la leucemia tuvo mayor presencia (8.7%), seguida del cáncer de mama (5.8%), de cuello de útero (3.3%) y ovario (2.1%). La leucemia afecta principalmente a los hombres (15.2%), mientras que el cáncer de mama a las mujeres (8.3 por ciento). De acuerdo al estudio realizado por la OMS en 2005, es posible prevenir el 30% de los casos de cáncer a través de la disminución de factores de riesgo². Por ello, como resultado de las recomendaciones internacionales, en México se llevan a cabo programas encaminados a prevenir los principales tipos de cáncer, a través de estrategias de prevención y detección oportuna.

El cáncer generalmente se nombra en relación al tipo de tejido del cual proviene, por ejemplo, el termino sarcoma refiere a un tumor surgido del tejido mesodérmico el cual incluye tejido conectivo, cartílago, músculo entre otros. Osteosarcoma se refiere al cáncer de huesos.

Tabla 1.1. Distribución porcentual de egresos hospitalarios por tipo de tumor maligno total, hombre y mujeres en México 2008 (Ref ²).

Tipo de tumor maligno	Total	Hombres	Mujeres
Total	100.0	100.0	100.0
Leucemias	8.7	15.2	5.6
Mama	5.8	0.4	8.3
Cuello del útero	3.3	0.0	4.8
Ovario	2.1	0.0	3.1
Tráquea, bronquios y pulmón	2.0	4.1	1.0
Próstata	1.9	6.0	0.0
Del estómago	1.8	3.1	1.1
Del colon	1.8	3.2	1.2
Higado	1.2	1.9	0.8
Del rectosigmoides, recto y ano	1.1	2.0	0.7
Vejiga	1.0	2.2	0.4
Labio, cavidad bucal y faringe	0.9	1.9	0.5
Páncreas	0.9	1.5	0.7
Cuerpo del útero	0.8	0.0	1.1
Melanoma y otro tumores de la piel	0.5	0.6	0.3
Esófago	0.4	1.1	0.1
Otros	65.8	56.8	70.3

1.- ANTECEDENTES

El carcinoma se refiere a los tumores de los tejidos epiteliales, como las membranas mucosas y las glándulas incluyendo cáncer de mama, ovarios y pulmones. Los cánceres de células de médula ósea se denominan mielomas y en el mieloma múltiple (cáncer de médula ósea más común), se incluye un clon de células plasmáticas. Los cánceres de la sangre o tejido hematopoyético se conocen generalmente como blastomas y estos tumores pueden incluir las células linfoides, eritroides o mieloides. Adicionalmente los diferentes tipos de cáncer se pueden denominar agudos o crónicos ³.

El cáncer es la principal causa de mortalidad a escala mundial⁴. Se le atribuyen 7,6 millones de defunciones (aproximadamente el 13%) ocurridas en todo el mundo en 2008. Los principales tipos de cáncer son los siguientes: Pulmonar (1,4 millones de defunciones), gástrico (740 000 defunciones), hepático (700 000 defunciones), colorrectal (610 000 defunciones) y mamario (460 000 defunciones). Más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. En nuestro país los tumores malignos ocupan el tercer lugar en la lista de las principales causas de defunción y representaron el 12.9% del total de muertes en 2008⁵. La tasa de defunción por tumores tiende a aumentar.

De 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes; entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que entre los hombres, de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes (Figura 1.1). El incremento en dicha tasa es aproximadamente de diez puntos; sin embargo, esta tendencia resulta preocupante por sus implicaciones sobre los años de vida perdidos en el proceso de la enfermedad, así como por la capacidad de las instituciones para dar atención adecuada y oportuna, y por el impacto que tiene dicha enfermedad en la familia. En 2008, según la tasa de mortalidad observada de tumores malignos para la población de 60 años y más, los tumores en tráquea, bronquios y pulmón presentan la tasa más alta seguidos por los tumores de hígado y de las vías biliares intrahepáticas, y los de estómago.

Resalta el hecho de que la población masculina presente la tasa de defunciones por tumores más alta, por la elevada mortalidad por tumor de próstata (121.57 por cada 100 mil hombres) mientras que en las mujeres, el cáncer del cuello del útero tiene una tasa de 41.82 por cada 100 mil mujeres, siendo también la tasa más alta en la población femenina de 30 a 59 años (10.24 por cada 100 mil mujeres).

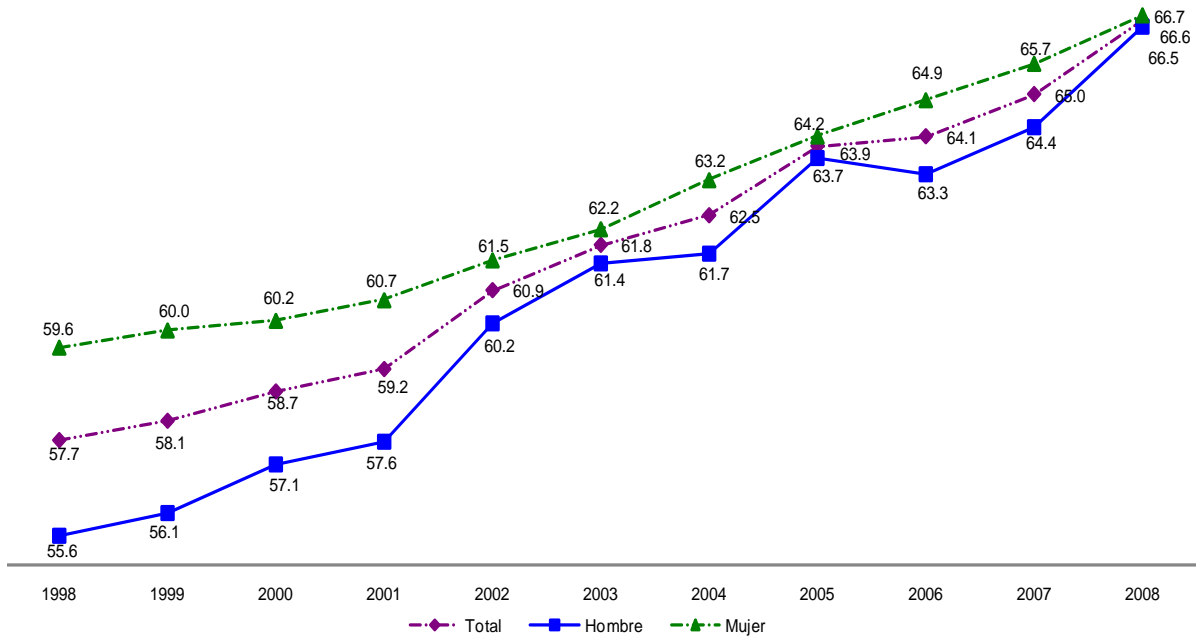


Figura 1.1. Tasa observada de defunciones por tumores malignos en hombres y mujeres por cada 100000 habitantes en México de 1998 a 2008 (Ref ²).

De acuerdo con las defunciones por tumores malignos en 2008, entre los hombres, el mayor porcentaje de lesiones malignas fue en la próstata (8.1%), seguido por los tumores de tráquea, bronquios y pulmón (7.0%), enfermedad asociada al consumo de tabaco; y entre las mujeres, el cáncer de mama (7.6%), seguido por los tumores malignos de ovarios (6.4 por ciento).

1.1.2. Definición del cáncer

El cáncer es un término que se utiliza para nombrar un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo¹. La transformación de una célula normal en una tumoral es un proceso que abarca varias fases y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y tres categorías de agentes externos: físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes; químicos, como los componentes del humo de tabaco; y biológicos, causadas por determinados virus, bacterias o parásitos^{3,6}. El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta con la edad, muy probablemente porque se van

1.- ANTECEDENTES

acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación celular, los cuales van perdiendo eficacia con la edad.

Un tumor (o neoplasia) es una masa de tejido anormal o un crecimiento que resulta de una neoplasia, un estado en el cual los mecanismos de control que gobiernan el crecimiento comienzan a ser deficientes, llevando a una proliferación celular. En etapas tempranas del crecimiento del tumor, las células cancerosas generalmente reemplazan las células de las cuales derivan, sin embargo en etapas avanzadas pierden la apariencia y la funcionalidad original³. En los tejidos normales las tasas de crecimiento de nuevas células y la muerte de células viejas se mantienen en balance. En el caso del cáncer, este balance se altera y es importante mencionar que sólo se requiere un ligero incremento en la velocidad de proliferación de las células cancerosas para generar una masa tumoral. Esta alteración puede ocurrir como resultado de un crecimiento celular descontrolado o de la pérdida de una habilidad de la célula de someterse a suicidio celular mediante un proceso conocido como apoptosis. La apoptosis es el mecanismo mediante el cual las células viejas o dañadas normalmente se autodestruyen.

El cáncer comienza como resultado de una anomalía en los genes de una o más células del cuerpo, ésta anomalía puede ser hereditaria o adquirida. Los tipos de genes que participan de forma directa y que han sido identificados en la formación del cáncer son los oncogenes y los genes supresores de tumor^{3,7}. Cuando un oncogén muta se provoca una alteración en la división celular y la consecuente aparición de cáncer. El gen supresor de tumor regula el proceso de la replicación celular, manteniendo el ciclo bajo control, sin embargo cuando muta el control se pierde y se provoca la división celular de forma incontrolada dando lugar a la formación del cáncer, es decir, el cáncer se origina por una pérdida de control del crecimiento normal.

Los cánceres son capaces de diseminarse a través de todo el cuerpo mediante dos mecanismos: invasión y metástasis. La invasión se refiere a la migración y penetración directas de las células cancerosas en los tejidos vecinos. La metástasis se refiere a la habilidad de las células cancerosas para penetrar dentro de los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente sanguíneo y después invadir los tejidos normales

en otras partes del cuerpo. Muchos pacientes que mueren de cáncer es a consecuencia de la metástasis hacia órganos vitales más que del tumor primario inicial.

1.1.3. Tratamiento

El tratamiento tiene por objeto curar a los pacientes, prolongarles la vida y mejorar la calidad de ésta. Los principales métodos de tratamiento son cirugía, radioterapia y quimioterapia³. Existe un cuarto tratamiento llamado *terapia biológica*, que incluiría la hormonoterapia, inmunoterapia, terapia génica⁸ y nuevas dianas terapéuticas no citotóxicas. Una diana terapéutica es una sustancia localizada en cualquier parte de la célula como la membrana celular, el citoplasma o el núcleo, capaz de reconocer un fármaco y producir una respuesta celular. Estos nuevos medicamentos están dirigidos a inhibir el mecanismo de transmisión de señales de las células cancerígenas y así detener el crecimiento tumoral y favorecer la muerte de las células malignas.

El término quimioterapia suele reservarse para los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas que tienen como función el impedir la reproducción de las células cancerosas. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. Las desventajas de la quimioterapia es la administración por perfusión intravenosa^{9,10}, inevitable en algunos casos, la cual causa incomodidad y malestar en el paciente y por otro lado la falta de especificidad hacia los tejidos tumorales³. Estas desventajas provocan que el paciente se deprima ya que en muchas ocasiones los efectos secundarios asociados a la quimioterapia son insostenibles⁷.

1.1.4. Desarrollo Farmacéutico en Cáncer

Debido a la alta mortalidad, la terapia del cáncer ha estado bajo investigación vigorosa por parte de entidades académicas e industriales. Sin embargo, los avances en el tratamiento han sido limitados por la falta de distinguir aquellas propiedades bioquímicas y biológicas que distinguen a las células cancerosas de las células normales. El enfoque tradicional en el diseño de nuevos fármacos ha sido dirigido hacia compuestos que interfieren con el funcionamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN). Actualmente la mayoría de los fármacos usados para el tratamiento del cáncer son moderadamente citotóxicos y además generan resistencia celular^{11,12}.

1.- ANTECEDENTES

Los primeros agentes contra el cáncer fueron descubiertos principalmente por casualidad o la inhibición de las vías metabólicas esenciales para la división celular³. Su mecanismo exacto de acción a menudo fue un tema de investigación retrospectiva¹². Por ejemplo, el uso de análogos de ácido fólico para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda fue reportado en 1948, mientras que su mecanismo de acción, la inhibición de la dihidrofolato reductasa, fue reportado por diez años después⁹. Aunque esta estrategia ha logrado un éxito significativo, los recientes desarrollos en biología molecular y el conocimiento de la farmacología del cáncer a nivel molecular han logrado que el diseño de fármacos sea basado en alcanzar sitios específicos que inhiban o modifiquen marcadores moleculares de importancia en la detección, crecimiento o metástasis de los tumores. La mayoría de los nuevos fármacos con propiedades anticancerígenas se encuentran en estudios preclínicos y clínicos, y tan solo unos cuantos han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos^{9,13}.

En la actualidad se sintetizan una gran variedad de fármacos con potencial anticancerígeno, sin embargo algunas de ellos presentan limitaciones terapéuticas y toxicológicas dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas¹¹. La generación de un agente anticancerígeno comienza con la adquisición de la nueva entidad química, subsecuentemente será llevado a cabo el desarrollo farmacéutico de acuerdo a la siguiente secuencia: Síntesis inicial, farmacología y síntesis en larga escala, formulación inicial, toxicología animal, farmacocinética preclínica y estudios clínicos de fase I, II y III¹⁴. El nuevo compuesto es sometido a pruebas de evaluación de actividad citotóxica *in vivo* en líneas celulares de leucemia L1210 o P388 y en tumores murinos¹⁵. Posteriormente los compuestos con resultados prometedores se producen en cantidades suficientes para caracterizar el perfil químico, físico y farmacológico para proponer una formulación inicial antes de realizar la evaluación toxicológica y los estudios clínicos en cualquiera de sus fases. Una vez que alguna formulación ha sido aceptable y optimizada se fabrica un lote piloto para investigar la estabilidad y compatibilidad del producto bajo las condiciones de producción. Hasta el año de 1996 solo existían dos productos a base de sistemas coloidales doxorubicina (Doxyl[®]) y daunorubicin (DaunoXome[®])¹⁵.

La mayoría de los compuestos antineoplásicos poseen muy baja solubilidad en agua y son muy poco estables, por ende el principal obstáculo ha sido hallar una formulación

1.- ANTECEDENTES

estable la cual sea bien tolerada sin toxicidad asociada al vehículo⁹. Raramente un fármaco es administrado sin vehículo alguno, casi todas las sustancias activas son administradas en algún tipo de formulación. La formulación puede ser definida como el proceso mediante el cual una materia prima de cualquier fármaco es transformada en un producto farmacéutico que es adecuado para su uso en humanos.

El desarrollo de formas de dosificación farmacéutica de moléculas anticancerígenas es muy parecido al de otros fármacos. Dado que cualquier componente de la formulación puede contribuir o modificar la toxicidad es importante desarrollar una formula tan simple como sea posible⁹. En algunos casos los excipientes no son del todo inertes y pueden influenciar la absorción del fármaco. A diferencia de otro tipo de compuestos, los anticancerígenos tienen un estrecho índice terapéutico y generalmente se administran en dosis que producen algún efecto tóxico^{12,16}. En general son formulados como preparados para vía IV¹⁰. Este tipo de vía se prefiere por varias razones: la administración IV lleva a una inmediata biodisponibilidad, lo cual es de suma importancia ya que administrados por vía oral no lograrían tener el efecto terapéutico deseado; la velocidad de administración puede ser fácilmente manipulada; se evita la aparición de efectos secundarios generados por vía oral; si se presenta un efecto secundario o respuesta tóxica la administración puede ser detenida en el momento. No obstante, también tiene sus desventajas ya que la mayoría de los antineoplásicos provocan irritación en tejidos y puede presentarse la aparición de trombosis o sepsis⁷. En general en oncología se prefiere una vía IV en las etapas iniciales del desarrollo de medicamento^{9,15}.

El desarrollo exitoso de un sistema de liberación de fármacos o cualquier forma de dosificación depende de la dosis, las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la molécula¹⁷. Los fármacos para combatir el cáncer tienen generalmente grandes volúmenes de distribución y tiempo de vida media cortos¹⁷. Debido a que la biodistribución es función de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, altas concentraciones son necesarias y gran parte se distribuye hacia otros tejidos además del sitio blanco trayendo consigo toxicidad, la cual es una de las desventajas de la quimioterapia¹⁷⁻¹⁹. Adicional a lo anterior la mayoría de los agentes anticancerígenos son liposolubles, o dicho de otra forma, poseen una muy escasa solubilidad en agua, por lo que el enfoque clásico de formulación se orienta hacia las técnicas de solubilización de fármacos, las cuales emplean el uso de cosolventes, mismos

1.- ANTECEDENTES

que tienen significativa toxicidad, surfactantes, formación de complejos o bien el uso de sistemas coloidales^{9,17,20}. Los sistemas coloidales tales como liposomas, micropartículas o nanopartículas pueden aumentar la solubilidad y estabilidad debido a sus características de encapsulación, además pueden proveer una liberación más específica en comparación con las técnicas convencionales de solubilización^{14,17}.

La nanomedicina es un campo emergente que tiene un gran potencial para intervenir con el cáncer a escala molecular y para suministrar dosis potentes de agentes terapéuticos a las células cancerosas con mayor especificidad y toxicidad reducida. En el centro de la nanomedicina está el desarrollo de sistemas nanoparticulados (ej. Nanopartículas lipídicas, poliméricas y magnéticas, liposomas, dendrímeros, nanotubos de carbono, etc.) que funcionan como acarreadores para fármacos²¹. Las nanopartículas (NP) en el campo de la medicina han sido diseñadas para la aplicación terapéutica permitiendo a los investigadores mejorar la terapia del paciente. El incremento en los sistemas de liberación de fármacos basados en nanotecnología ha llevado a un cambio particularmente en el campo de la oncología. Los recientes avances en nuestra comprensión de la invasión de las células cancerosas han creado nuevas oportunidades para desarrollar NP diseñadas para controlar, monitorear y tratar la invasión del cáncer y la metástasis²². Es interesante el hecho que en los sistemas de liberación de fármacos (SLF) se incorporan materiales biodegradables que son capaces de incorporar gentes liposolubles. Las NP pueden tener la posibilidad de liberar específicamente a los fármacos a los sitios blanco en las células cancerosas o el microambiente del tumor minimizando el efecto en tejido sano, producir tiempos prolongados de circulación en plasma²³, controlar la cinética de liberación y la capacidad de administrar de dosis superiores para la mejora en el cumplimiento de la terapia por parte del paciente.

El cáncer es una enfermedad donde la aplicación de la nanomedicina tiene el potencial de proporcionar a los médicos la capacidad de superar muchas deficiencias existentes en la detección y el tratamiento¹⁴. Los SLF con nanopartículas puede ser una respuesta a los retos que se presentan al formular fármacos anticancerígenos. Con el uso de estrategias basadas en nanoingeniería se pueden manipular las propiedades físicas (tamaño, carga, biocompatibilidad, solubilidad) de las NPs para modular su comportamiento en los sistemas biológicos¹⁴. A través de estos enfoques, propiedades farmacocinéticas críticas

1.- ANTECEDENTES

tales como el tiempo de vida media, biodistribución, absorción no específica, la degradación prematura, y la toxicidad se puede modificar favorablemente²³.

Los liposomas fueron de los primeros SLF usados para la quimioterapia. Los fármacos, doxorubicina y daunorrubicina fueron los primeros en aplicarse en SLF en oncología. Estos fármacos presentan citotoxicidad por la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y han sido utilizados en una amplia variedad de tumores. Las formulaciones fueron modificadas con la idea de disminuir los efectos cardiotóxicos debido a la dosis. La terapia con doxorubicina causa daño al corazón, además de ser limitada por la mielosupresión, estomatitis y otros efectos adversos²⁴. El uso de liposomas ha logrado una formulación más segura y eficaz, ya que datos de estudios de fase clínica demostraron que las formulaciones liposomales del fármaco presentan un incremento en la concentración plasmática y disminución de la mielotoxicidad¹⁰. La mejora en la biodisponibilidad se basa en el hecho de que el liposoma provee protección frente al metabolismo y dosis más altas son toleradas por parte del paciente. Además también se observó una reducción de los efectos secundarios como alopecia, náuseas y emesis.

En los inicios de la aplicación de nanopartículas poliméricas para una terapia anticancerígena se encuentra el desarrollo de NP de poli alquil-cianoacrilato (PACA) cargadas con doxorubicina²⁵⁻²⁸. Los estudios *in vitro* han indicado que las NP de PACA pueden superar la resistencia a fármacos en las células tumorales que expresan las bombas de resistencia a múltiples fármacos tipo 1. El mecanismo de acción está relacionado a la adherencia de las NP de PACA a la membrana celular de las células del tumorales, que inicia la degradación de las partículas generando un gradiente de concentración de doxorubicina y la difusión de la misma a través de la membrana seguido de la formación de un par iónico entre la doxorubicina con carga positiva y el ácido cianoacrílico (un producto de degradación de las NP de PACA) con carga negativa. Estas observaciones indican claramente que la liberación del fármaco y la degradación de las nanopartículas se producen simultáneamente, produciendo un complejo de tamaño adecuado con propiedades fisicoquímicas para la correcta difusión a través de la membrana plasmática.

El metotrexato, un fármaco potente contra el cáncer, ha sido acoplado con nanopartículas de poli (butil cianoacrilato) de diferentes tamaños (70-345 nm) y evaluado para determinar su capacidad de cruzar la barrera hemato-encefálica en el tratamiento del

cáncer de cerebro. Este estudio mostró que nanopartículas de poli (butil cianoacrilato), cubiertas con polisorbato 80, de diámetro inferior a 100 nm puede efectivamente cruzar dicha barrera²⁹.

Como se ha mencionado la nanotecnología contribuye a mejorar la selectividad de las moléculas anticancerígenas, algunos ejemplos de formulaciones comerciales o disponibles en el mercado con sistemas coloidales se mencionan a continuación.

a) Doxil[®]

Doxil es una formulación liposomal de doxorubicina, tiene un tiempo de vida media en plasma de 45 horas, mientras que el tiempo de vida media para el medicamento con el fármaco libre es de 5 minutos. Doxil[®] es una formulación de doxorubicina encapsulada en más del 90% en liposomas estéricamente estabilizados con un tamaño de 80-90 nm. Los liposomas están constituidos por fosfatidilcolina de soya y colesterol lográndose la estabilización por fijación de las cadenas de metoxipolietilenglicol 2000 al 1,2 diestearoilglicero 3-fosfoetanolamina. La formulación comercializada se presenta en forma de una dispersión rojiza en viales de 10 ml (20 mg de doxorubicina) o de 30 ml (50 mg de doxorubicina); además contienen sulfato de amonio y ácido clorhídrico o hidróxido de sodio para conseguir un pH de 6.5 y glucosa como agente isotónico. Los viales deben conservarse en refrigeración y la dosis a administrar se debe diluir exclusivamente en suero glucosado (250 ml para dosis inferiores a 90 mg o 500 ml para dosis superiores); esta solución para perfusión es estable durante 24 h en refrigeración. La perfusión debe iniciarse lentamente (1 mg/min) pudiéndose incrementar la velocidad para realizarla en 1 hora. Las indicaciones aprobadas para Doxil[®] son: cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi relacionado con HIV y mieloma múltiple¹⁰.

b) Depocyt[®]

Es una formulación de citarabina encapsulada en nanopartículas lipídicas multivesiculares que contiene 10 mg/ml de principio activo. En su composición intervienen colesterol, trioleína, dioleilfosfatidilcolina y dipalmitoil-fosfatidilglicerol así como cloruro de sodio como agente isotónico, siendo el pH entre 5.5 y 8.5. La tecnología utilizada en esta formulación se conoce con el nombre de DepoFoam[®] (SkyePharma). La velocidad de liberación del principio activo se controla en función de los componentes lipídicos,

1.- ANTECEDENTES

excipientes acuosos y modificación de ciertos parámetros durante la producción del sistema. DepoCyt[®] tiene aprobada la indicación para el tratamiento de la meningitis linfomatosa administrándose dosis de 50 mg³⁰.

c) Abraxane[®]

Es una suspensión de nanopartículas (con un tamaño medio de 130 nm) de albúmina y paclitaxel que se presenta en un vial que contiene un liofilizado con 100 mg de principio activo y unos 900 mg de albúmina humana. Estas nanopartículas, desarrolladas según la tecnología de la American Biosciences no contienen los disolventes utilizados para disolver el paclitaxel lo cual permite que la infusión dure sobre 30 minutos en lugar del largo tiempo que se utiliza con la formulación convencional; por otra parte se pueden utilizar equipos de infusión estándar en lugar de los equipos especiales que se requieren para administrar el paclitaxel. El vial conteniendo el liofilizado se conserva a temperatura ambiente y su reconstitución se realiza adicionando 20 ml de suero fisiológico. Esta suspensión es estable durante 8 h en refrigeración y la dosis necesaria de paclitaxel se diluye en suero fisiológico y se administra en una perfusión durante 30 minutos. La mayor eficacia de Abraxane sobre la clásica formulación de paclitaxel (Taxol[®]) fue atribuida, en principio, al hecho de que los pacientes podían recibir dosis más elevadas debido a la ausencia de Cremophor[®]; sin embargo estudios posteriores han demostrado que la albúmina interacciona con dos proteínas que la transportan, y con ello aumenta la concentración de paclitaxel en las cercanías de la masa tumoral. La primera proteína, llamada gp60, se localiza en la superficie de las células del endotelio vascular y a consecuencia de esta interacción tienen lugar una serie de procesos bioquímicos que determinan que las nanopartículas se acumulen en el fluido intersticial que rodea el tumor. La segunda proteína, denominada SPARC (secreted protein acidic rich in cysteine) u osteonectina, se encuentra en la superficie de muchas células tumorales e interacciona con la albúmina lo que da lugar a una mayor concentración de paclitaxel en estas células. La terapia con Abraxane está indicada en el tratamiento del cáncer de mama metastásico. La dosis de Abraxane[®] es de 250 mg/m²³¹.

Un análisis fármaco-económico realizado en los ensayos clínicos en oncología ha señalado recientemente que en la práctica, el uso de medicamentos diseñados bajo ingeniería nanotecnológica puede ser altamente competitivo con la mayoría de las

1.- ANTECEDENTES

quimioterapias tradicionales. De hecho en algunos casos, el costo total de una quimioterapia llevada cabo con medicamentos existentes como Doxil[®] fue inferior a la quimioterapia clásica, ya que requiere una administración menos frecuente y se presentan menos problemas de toxicidad. Por lo tanto, se puede esperar que el uso de la nanotecnología en la terapia clínica aumente cuando exista la necesidad de vectorizar un medicamento para beneficiar tanto a la eficacia del tratamiento como la reducción de efectos secundarios. De esta manera es posible impulsar el mercado de la nanotecnología en el tratamiento de cáncer.

1.2. Casiopeínas[®]

Los compuestos metálicos antitumorales juegan un papel importante en la quimioterapia del cáncer. Históricamente, la investigación en este campo se ha enfocado en los compuestos de platino y la vectorización hacia el ADN. No obstante el campo de investigación de fármacos contra el cáncer puede ser ampliado para incluir otros compuestos metálicos con diferente modo de acción que resulta en perfiles citotóxicos de respuesta muy diferentes³². La gran variedad de funciones biológicas y químicas de los metales de transición ha estimulado la innovación de nuevos metalo-fármacos como alternativas al Cis-platino. En las últimas tres décadas se ha puesto gran interés en la investigación de este tipo de fármacos contra el cáncer a fin de mejorar la eficacia clínica del tratamiento³³.

El interés en la investigación en compuestos a base de cobre se basa en la teoría de que al ser un metal endógeno generará menor toxicidad³³. Las propiedades del cobre le permiten tomar parte en una variedad de funciones biológicas tal como la transferencia de electrones, catálisis, conformación estructural y la capacidad de intercambiar su estado de oxidación entre +1 y +2.

En México, la búsqueda de nuevas moléculas que muestren una mayor eficacia y seguridad en el tratamiento contra el cáncer ha llevado al diseño y síntesis de una Familia de compuestos de coordinación llamada Casiopeínas[®] las cuales se han desarrollado en la Facultad de Química de la U.N.A.M. bajo el liderazgo de la Dra. Lena Ruiz³². A estas moléculas se les ha evaluado su actividad *in vitro* con resultados alentadores³⁴, los cuales han confirmado que tienen actividad citostática, citotóxica y antineoplásica³⁵⁻³⁷.

Las Casiopeínas[®] son compuestos de coordinación sintetizados a partir de una base orgánica y un metal. Están formadas por un metal Cu (II) en la esfera de coordinación, un ligante bidentado del tipo diimina (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o bien un donador por oxígeno de tipo (O-O). El diseño de las moléculas fue hecho teniendo en cuenta varios factores, tales como la existencia de un metal esencial para disminuir la toxicidad; la existencia de quelatos que favorecen la configuración cis alrededor del ion metálico, favorecer complejos más estables y por último el compuesto debe poseer diferentes niveles de hidrofobicidad³⁸. Estas características se reflejan en las propiedades que estos compuestos presentan, en términos de solubilidad, potencial electroquímico,

capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad³⁴, de tal manera que se lleve a cabo una interacción de los compuestos con el ADN, entre otras posibilidades de mecanismo de actividad. Actualmente existen más de 100 Casiopeínas[®] que ya han sido caracterizadas y se agrupan en subfamilias de la I a la IX (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Subfamilias y fórmulas generales de las Casiopeínas[®].

Subfamilia	Fórmula general
Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína III	[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)(O-O)]NO ₃
Casiopeína IV	[Cu(4,4-dimetil-bipiridina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína V	[Cu(5,6-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VII	[Cu(fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína IX	[Cu(bipiridina)(O-N)]NO ₃

1.2.1. Mecanismo de acción

La citotoxicidad de las Casiopeínas[®] no es específica, sino diferencial³⁹. La toxicidad selectiva de un compuesto no sólo resulta de las diferencias en la distribución (farmacocinética), sino que también puede ser el resultado de una diferencia en la bioquímica entre células normales y células cancerosas. Las células tumorales proliferan más rápidamente y tienen mayores niveles de estrés oxidativo³⁵. Estos compuestos toman ventaja de estas dos características con el fin de causar algún grado de toxicidad selectiva³⁹. Las Casiopeínas[®] provocan daño en el ADN, cuyo rompimiento ocurre en presencia de un agente reductor por lo que el mecanismo más probable sea través de la oxidación generada por las especies ROS debido a la reducción del cobre⁴⁰. Un modelo menciona que las Casiopeínas pueden participar en las reacciones óxido-reducción de tipo Fenton y Haber-Weiss en las que el cobre puede estar involucrado provocando daño por la generación de radicales libres⁴⁰. Las Casiopeínas[®] pueden sobreproducir especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante reacción tipo Fenton y toxicidad mitocondrial, incrementando un preexistente estrés oxidativo sobre las células tumorales, las cuales tienen un metabolismo

más activo que las células normales⁴¹. Los complejos de cobre pudieran contribuir a intensificar el desbalance redox por activación de H₂O₂ provocando daño celular y la consecuente muerte celular por apoptosis u otro mecanismo. Adicionalmente el grupo bipyridina y fenantrolina de las Casiopeínas[®] permite la interacción con el ADN a través de la intercalación^{42,43}, este tipo de interacción provoca un daño sobre las células con rápida proliferación, la cual es una característica de las células tumorales. Estudios han demostrado que el tercer anillo aromático en los complejos con grupo phen es necesario en el ligante diimina para aumentar la actividad del complejo. Estos dos ligantes diimina, libres o como una parte de un complejo metálico, son capaces de unirse al ADN por las interacciones intercalativas y no intercalativas. El anillo aromático más extendido de la fenantrolina podría ser la razón de la mayor actividad de los complejos, lo cual permite aumentar la afinidad de unión al ADN³⁴.

Estudios *in vitro* han mostrado que el crecimiento de las líneas tumorales HeLa (humano) y AS-30D (roedor) son altamente sensibles (IC₅₀= 0.5μM) mientras que la viabilidad y proliferación sobre linfocitos humanos no fue afectada significativamente (IC₅₀>30μM)³⁵.

1.2.2. Casiopeína III-ia

La figura 1.2 muestra la representación estructural de la Casiopeína III-ia (CasIII-ia), [Cu(N-N) (O-O)]NO₃·H₂O, cuyo nombre químico es aqua nitrato de 4-4'-dimetil, 2-2'-bipyridina, acetilacetato cobre (II) (C₁₇H₂₁O₆N₃Cu). Posee un peso molecular de 444.93 g/mol (con dos moléculas de agua). Es un polvo cristalino de color azul intenso. A temperatura ambiente es soluble en agua, metanol, etanol y soluciones fisiológicas. La actividad biológica se ha evaluado en líneas tumorales como carcinoma cérvico-uterino, pulmón, ovario, colon y mama⁴⁴. También se ha realizado estudios farmacocinéticos, los cuales indican que presenta una dosis letal 50 de 14.6 mg/Kg vía intraperitoneal, una constante de eliminación (K_{el}) de 0.012 min⁻¹, un tiempo de vida media (t_{1/2}) de 12.46 min, un volumen de distribución (Vd') de 0.118 L y una depuración (Cl) de 0.115 mL/min.

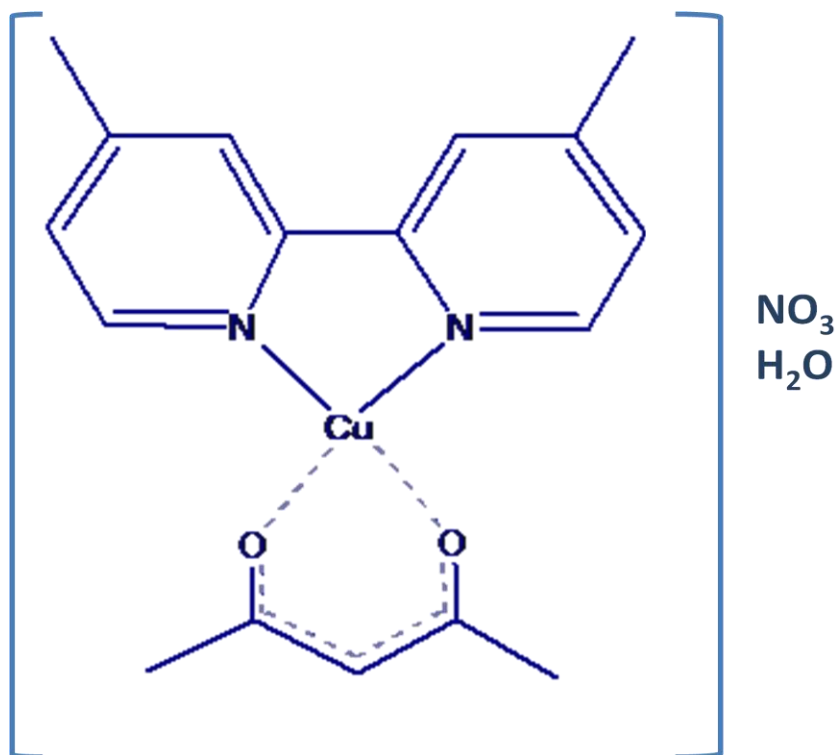


Figura 1.2. Representación estructural de la CasIII-ia®.

La actividad *in vitro* de la CasIII-ia evaluada en células de carcinoma de colon HCT-15 mostró que el efecto es dosis-dependiente de 5 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induciendo apoptosis lo cual está relacionado al aumento de los niveles Bax y la activación de las caspasas, no obstante no influye en la duración de las distintas etapas del ciclo celular⁴⁵. Por otro lado estudios en méduloblastoma humano han demostrado que la actividad de la CasIII-ia es mayor cuando es comparada con el Cis-platino, es decir la muerte celular es alcanzada con una concentración de CasIII-ia (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) menor a la del compuesto de referencia (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La actividad *in vivo* de la CasIII-ia en ratones xenotrasplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon humano HCT-15 demostraron que el volumen relativo tumoral es menor en comparación con el testigo. Adicionalmente el grupo tratado con CasIII-ia retrasó el incremento en peso a consecuencia del crecimiento del tumor⁴⁴.

La actividad *in vivo* de la CasIII-ia evaluada en diferentes líneas tumorales de ratón B16 muestra que el índice de supervivencia para un esquema 1, 5, 9, 6 mg/Kg es de 21. El mecanismo de acción de las CasIII-ia está relacionado con alteraciones en el ADN. Un modelo *in vitro* propuesto es la interacción con las bases nitrogenadas de los ácidos

1.- ANTECEDENTES

nucleicos, ésta interacción está dada a través de un apilamiento pi de los sustituyentes bipyridina y fenantrolina del complejo metálico⁴², el mecanismo de apilamiento entre la CasIII-ia y la adenina se puede explicar como una redistribución electrónica in la supramolécula, la cual estabiliza el aducto de adenina⁴³.

En un estudio realizado por Leal-García et al⁴⁶., se observó que la DL₉₉ de las CasIII-ia induce muerte de forma aguda y que tal eventualidad es causada por edema pulmonar después de un periodo de 30 a 50 min. Los resultados de la autopsia y las pruebas histopatológicas indican claramente que la muerte se produce debido a edema pulmonar. Los datos histopatológicos no revelaron ningún tipo de toxicidad cardiaca directa. Sin embargo, la microscopía electrónica de transmisión reveló un daño directo mitocondrial en las células del miocardio.

1.3. Nanofarmacia

1.3.1. Nanotecnología farmacéutica

El primer concepto escrito acerca de la posibilidad de manipular la materia en la escala nanométrica fue propuesta por Richard Feynman, quien durante su conferencia "*En el fondo hay espacio de sobra*" (*There's Plenty of Room at the Bottom*), planteó la idea de las posibilidades de la nanociencia y la nanotecnología⁴⁷. Sin embargo, el campo de la nanotecnología fue establecido por el trabajo de Eric Drexler, Richard Smalley y Chad Mirkin en el ámbito de la bionanotecnología⁴⁸. Se considera que la nanotecnología y la nanociencia tienen un amplio potencial de traer beneficios hacia varias áreas de investigación y aplicaciones y atraen cada vez más inversiones de los gobiernos y de la iniciativa privada en muchas partes del mundo^{14,21}.

La nanotecnología ha sido definida por la Royal Society and Royal Academy of Engineering como el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas en forma y tamaño en escala nanométrica. La nanotecnología involucra el uso de materiales con uno o más componentes que tienen al menos una dimensión en la escala de 1-100nm⁴⁹. El rápido crecimiento de la nanotecnología ha provocado un gran impacto en el área de la medicina. Se ha definido como nanomedicina a la aplicación de la nanotecnología para el tratamiento, diagnóstico, monitoreo y control de sistemas biológicos^{50,51}.

Los nanomateriales difieren significativamente de los sistemas macro debido principalmente al área superficial aumentada en sistemas nanoparticulados. Esto provoca cambios en el comportamiento *in vivo* el cual puede incrementar la absorción y mejorar la biodisponibilidad de algún fármaco, o bien, puede provocar una alta toxicidad de los materiales utilizados²¹.

En los últimos años, el crecimiento rápido de la nanotecnología ha promovido un reto en innovaciones en el campo farmacéutico que se encuentra en el proceso de revolucionar la liberación de los compuestos biológicamente activos. Uno de los objetivos principales es permitir la entrega específica en tiempo y espacio. Así, el concepto de la bala mágica propuesto hace un siglo por Paul Ehrlich se acerca a la realidad con la aparición de varias aplicaciones de fármacos dirigidos para el tratamiento de algunos tipos de cáncer y otras enfermedades. Entre los sistemas nanotecnológicos más importantes, desarrollados

1.- ANTECEDENTES

con aplicación en la medicina ya sea para el tratamiento o diagnóstico, se encuentran las nanopartículas lipídicas, poliméricas y metálicas, liposomas, micelas y dendrímeros¹⁷. Existe una gran variedad de sistemas propuestos los cuales se encuentran en fase de experimentación⁹.

Un sistema de liberación de fármacos ideal, basado en un enfoque nanotecnológico, sería capaz de navegar por sí mismo, buscar, encontrar y destruir únicamente las células enfermas o reparar los órganos dañados sin afectar los tejidos sanos. Estos efectos se traducen en una alta eficiencia del fármaco y la disminución de efectos no deseados. Otra ventaja de los sistemas nanoparticulados es que ofrece una alternativa para superar los problemas de baja solubilidad asociados al diseño de nuevos fármacos^{14,50}.

El desarrollo farmacéutico está dirigido hacia la elaboración de SLC, los cuales ofrecen mayores ventajas con respecto a las formas farmacéuticas convencionales^{17,20,21,52}. Las ventajas de estos sistemas de liberación son muchas, destacando la disminución de los efectos secundarios, la posibilidad de disminuir la dosis y el aumento de los tiempos de dosificación⁵³. Desde el punto de vista tecnológico un SLC está constituido por una plataforma o soporte que contiene el o los principios activos y que a su vez modula su liberación y en algunos casos su ubicación espacial^{51,54-56}.

La Tecnología Farmacéutica clásica poco tiene que ver con los retos que plantea la Nanomedicina, por ello es que se ha acuñado el término de Nanotecnología Farmacéutica como ciencia y tecnología de los sistemas nanoparticulados farmacéuticos teniendo una base científica, cada vez más biológica, que se apoya en los nuevos aspectos biofarmacéuticos como son la fusión con la membrana celular, proteínas transportadoras de membrana, tráfico de los sistemas y moléculas a través del citosol, paso a través de la membrana nuclear, etc. La nanotecnología farmacéutica se enfoca al desarrollo de formulaciones de agentes terapéuticos en nano-complejos biocompatibles entre los que se cuentan las nanopartículas, sistemas micelares y liposomas, los dendrímeros, fulerenos o nanoestructuras de carbono, las huellas cuánticas, los nanocomponentes derivados de la bioimitación o biomimética y los productos conjugados derivados de los anteriores^{17,57}. Estos sistemas se podrían utilizar para dar dirección al suministro de los fármacos, hacia un tipo de células o tejido específicos. También se podrían utilizar para mejorar la biodisponibilidad oral, para sostener el efecto de fármacos o genes en un tejido

seleccionado, para solubilizar fármacos para una administración intravascular y para mejorar la estabilidad de los agentes terapéuticos contra la degradación enzimática de las nucleasas y proteasas, especialmente en el caso de los fármacos en forma de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos.

El desarrollo de la nanofarmacia requiere de aumentar los conocimientos acerca del escalamiento de los procesos de manufactura y acerca de la caracterización de los materiales que permitan asegurar su reproducibilidad, un control de calidad efectivo y la eficiencia en los costos. Se considera que el desarrollo durante la próxima década estará centrado en la necesidad de generar nuevos materiales capaces de soportar múltiples procesos y de sistemas combinados que permitan el diagnóstico y el suministro de fármacos a la vez. De cualquier manera, la nanotecnología farmacéutica seguirá requiriendo, aunque con nuevos argumentos, las técnicas tradicionales como el desarrollo de formas de dosificación, validación de métodos analíticos y los estudios de estabilidad.

1.3.2. Nanopartículas poliméricas

Las NP son definidas como partículas individuales con un diámetro menor a 100nm, variando en términos de forma y tamaño⁴⁹. En el ámbito farmacéutico se considera a las NP como sistemas coloidales en el rango de tamaños entre 10 y 1000 nm²¹. Están hechas de material macromolecular, preferentemente biodegradable, en el cual el activo está disuelto, atrapado o encapsulado, el cual puede ser adsorbido o unido a este material^{54,55}. La elección del polímero, tamaño y método de preparación dependerá de la bioaceptabilidad del mismo, las propiedades fisicoquímicas del fármaco y del polímero y de la meta terapéutica.

El tamaño nanométrico de las NP ofrece ciertas ventajas en la liberación de fármacos. Gracias a su tamaño sub-celular pueden penetrar hacia el interior de capilares finos y son eficientemente embebidas por las células. Esto permite una eficiente liberación de los agentes terapéuticos a los sitios blancos del cuerpo. En comparación con sistemas microparticulados, las NP son embebidas en mayor proporción, además se ha encontrado en estudios *in vivo* que son capaces de penetrar a través de la capas de la submucosa.

Los polímeros utilizados para la administración parenteral deben ser biodegradables, una serie de diferentes materiales han sido evaluados incluyendo aquellos de origen natural y sintético. Los polímeros biodegradables son ventajosos en muchos aspectos frente a otros materiales para su uso en sistemas de administración de fármacos

1.- ANTECEDENTES

como las nanopartículas, ya que se pueden fabricar en diferentes formas y tamaños, manipular la morfología de los poros, propiedades mecánicas adecuadas y cinética de degradación para adaptarse a una variedad de aplicaciones. Seleccionando el tipo de polímero, peso molecular y la proporción de la mezcla de copolímero, la rapidez de degradación de las nanopartículas pueden ser controlados para lograr el tipo y la velocidad de liberación deseadas del fármaco encapsulado.

Las NP poliméricas están constituidas por un material de soporte que modula la liberación del activo, ya sea en tiempo, espacio o ambas. Los materiales utilizados en la preparación de nanopartículas pueden ser clasificados en polímeros sintéticos y naturales. Dentro de los primeros se encuentra comúnmente el copolímero ácido poli-láctico-glicólico (PLGA)⁵⁷ y en el segundo caso el más común es el quitosán⁵⁸⁻⁶⁰. Dependiendo del proceso seguido en su elaboración se pueden obtener dos tipos de estructuras: nanoesferas o nanocápsulas^{22,55}. Las primeras tienen una estructura tipo matriz polimérica, en la que el principio activo se encuentra dispersado, mientras que las segundas poseen un núcleo de carácter oleoso, que contiene el fármaco, rodeado de una cubierta polimérica. Las nanopartículas conteniendo el fármaco pueden ser obtenidas a través de la incorporación de un activo durante o después de la preparación de una dispersión polimérica. Los componentes activos se disuelven, incluyen o son adsorbidos a la superficie de las nanopartículas debido a la elevada superficie específica de estos sistemas.

Los diferentes parámetros que pueden ser controlados externamente para producir partículas de características físicoquímicas deseadas, tal como la eficiencia de encapsulamiento y las propiedades de liberación del fármaco, son la naturaleza y la solubilidad de fármaco a encapsular, tipo de polímero y concentración, peso molecular, composición de los copolímeros, las concentraciones de fármacos a cargar, tipo y volumen de disolvente orgánico, el volumen de la fase acuosa, el pH, temperatura, concentración, los tipos de surfactantes o agentes estabilizantes, velocidad y tipo de agitación mecánica⁶¹. El comportamiento *in vitro* e *in vivo* a partir de las nanopartículas son influenciados por sus diferentes propiedades, tales como el tamaño de partícula y distribución de tamaño, morfología de la superficie, porosidad, potencial zeta, la estabilidad del fármaco, eficiencia de la encapsulación, cinética de liberación entre otras⁶².

1.3.3. Métodos de formación^{54,55}

Muchos métodos para la preparación de nanopartículas incluyen dos pasos principales, la preparación de un sistema de emulsión que corresponde a la primera etapa y las nanopartículas se forman durante la segunda etapa del proceso. Este segundo paso se realiza ya sea por la precipitación o gelificación de un polímero o por polimerización de monómeros. En general, el principio de esta segunda etapa le da nombre al método. En algunos casos, las nanopartículas se forman al mismo tiempo que se forma el sistema de emulsión inicial. Los sistemas de emulsión de los que se parte pueden ser emulsiones, mini-emulsiones, nano-emulsiones y microemulsiones.

Algunos otros métodos no requieren la preparación de una emulsión antes de la obtención de las nanopartículas. Estos se basan en la precipitación de un polímero en condiciones de formación espontánea de la dispersión o por la agregación de macromoléculas para formar nanogeles o complejos de polielectrolitos a partir de una solución de polímero.

Los métodos de preparación de nanopartículas son desarrollados sobre la base de dos diseños racionales, ya sea ingeniería de arriba hacia abajo o de abajo hacia arriba de cada uno de componentes⁴⁹. El proceso de arriba hacia abajo implica empezar con un objeto más grande y dividirlo en nanoestructuras a través de trituración o molienda. La fabricación a microescala o macroescala a menudo se logra en el proceso de arriba hacia abajo. Sin embargo, el método consume mucho tiempo y muchas veces se genera una distribución de tamaño de partículas muy amplia. La técnica de abajo hacia arriba se refiere a la síntesis basada en la construcción átomo por átomo o molécula por molécula de una manera controlada, la cual es regulada por las condiciones del medio. Durante la última década, los métodos para preparar los sistemas emulsionados han evolucionado considerablemente. A pesar de que aún requieren dos fases inmiscibles y un surfactante, los métodos utilizados para lograr la dispersión de una fase en la otra se han diversificado. Una nueva forma de generar nano-emulsiones se propuso haciendo uso del método de temperatura de inversión de fase, que utiliza las propiedades específicas de los agentes surfactantes polietoxilados de modificar su coeficiente de partición en función de la temperatura. La fase bicontinua formada a una temperatura cercana a la temperatura de inversión de fase se rompe por dilución y el descenso de temperatura genera nano-

emulsiones aceite en agua. La mayoría de los nuevos métodos de emulsificación se basan en procesos mecánicos y están relacionados con técnicas de alta energía, que permiten la preparación de emulsiones con una fase interna de tamaño uniforme que se puede escalar fácilmente para producir grandes cantidades. Por ejemplo, el diseño de los molinos coloidales permite transformar una emulsión gruesa en una emulsión fina con gotas de tamaño bien definido y una distribución de tamaño estrecha. Otros métodos hacen uso de diferentes equipos para la preparación de emulsiones con tamaño de gota calibrado con métodos basados en un proceso de extrusión. En estas máquinas, la fase dispersa se ve obligada a permear a través de un dispositivo de microfiltración que permite la extrusión de las gotas de tamaño uniforme de la fase dispersa en la fase continua. Se espera que los avances sobre estas técnicas provengan del área de microfluidos, para permitir la preparación de las gotas de la emulsión de tamaño muy pequeño con características bien definidas, de forma paralela al desarrollo de nuevas técnicas mecánicas de emulsificación. También se han hecho avances para entender mejor los métodos de emulsificación existentes. Por ejemplo, se demostró que el tamaño de la gota, D , de una emulsión preparada con un microfluidizador es directamente proporcional a la viscosidad de la solución orgánica de polímero que se dispersa en una fase acuosa.

$$D \propto \mu^\beta$$

En esta ecuación μ corresponde a la viscosidad de la solución polimérica y β depende de la naturaleza del polímero. El coeficiente β incluye muchos factores tales como la temperatura, los parámetros de la agitación (velocidad y la geometría del aparato), la viscosidad de la fase continua, las propiedades de los polímeros y de sus interacciones con el disolvente y el surfactante. Debido a que durante la preparación de las emulsiones todos estos parámetros se mantienen constantes a excepción de la naturaleza del polímero, se deduce que β sólo refleja el efecto del polímero en condiciones experimentales⁶³.

Algunos de los métodos más comunes de forma resumida son los siguientes:

a) Emulsificación- evaporación⁶⁴⁻⁶⁶

El polímero y el fármaco se disuelven en un medio orgánico inmiscible con el agua. Esta disolución se adiciona a una disolución acuosa, la cual incluye surfactantes, para formar una emulsión. La agitación con alta velocidad de corte u otro mecanismo disminuye

el tamaño del glóbulo y también evita la coalescencia de la fase orgánica. La eliminación del disolvente orgánico mediante vacío, calor o ambos, permite la formación de finas partículas, el resultado es la formación de una dispersión de nanoesferas. Estas pueden ser colectadas por centrifugación, lavadas para remover el estabilizante y liofilizadas para su almacenamiento⁶⁵. Este procedimiento se limita a fármacos hidrofóbicos, una variante para aplicarlo en moléculas hidrofílicas es el uso de una doble emulsión del tipo agua en aceite en agua⁶⁷.

b) Desplazamiento del disolvente

Se disuelve el polímero, el fármaco, y en ocasiones, un estabilizador en un medio semipolar miscible con el agua, por ejemplo: acetona, etanol o metanol. Se adiciona la mezcla a una disolución acuosa con un estabilizante (generalmente alcohol polivinílico) manteniendo agitación. El solvente orgánico difunde rápidamente hacia la fase externa seguido por una precipitación del polímero y el fármaco. Las nanopartículas se forman inmediatamente cuando el solvente es eliminado. La velocidad a la cual el solvente es removido y por ende la nucleación, son clave para la obtención de partículas de tamaños nanométricos. Una alternativa es el uso de fluidos supercríticos⁶⁸.

c) Emulsificación-difusión

Se puede considerar una modificación del método anterior. Se disuelve el polímero en un disolvente parcialmente miscible con agua, el cual ha sido previamente saturado en agua. Se adiciona la fase anterior a una disolución acuosa que contiene un estabilizante. Se adiciona más agua, lo que hace que haya un proceso de difusión y se formen las nanopartículas.

d) Coacervación compleja

La coacervación compleja es un proceso de separación espontáneo de dos fases líquidas en sistemas coloidales, que resulta de la interacción de dos polielectrolitos de carga opuesta al mezclarlos en una solución acuosa. El proceso conduce a la formación de partículas coloidales de tamaño micro o nanométrico, en función de las variables de proceso, tales como el pH, temperatura, peso molecular, la fuerza iónica, la concentración de polielectrolito, entre otras. Sin embargo, este método presenta la baja estabilidad del fármaco y menor eficiencia de carga la cual se puede mejorar mediante el entrecruzamiento

de los complejos con agentes, tales como glutaraldehído o tripolifosfato de sodio. Ejemplos típicos de nanoesferas obtenidos a partir de complejos de polielectrolitos son los formados entre las poliaminas y ácidos nucleicos, gracias a la complementaridad de carga. Estas nanoesferas, también llamado nanoplejos, se han desarrollado mucho como acarreadores de fármacos para hacer posible la liberación in vivo de los ácidos nucleicos, plásmidos, siARN y otros. La estructura interna del poliplejo puede ser descrita como un gel, estructura en la que las cadenas de polielectrolitos complejos están hinchadas por las moléculas de agua. Policationes típicos utilizados para preparar poliplejos son poli-etilenimina, poli-lisina, dendrímeros o quitosán.

e) Spray-drying

Algunos de los desafíos que enfrenta esta técnica incluyen la producción de nanopartículas de tamaño pequeño y la necesidad de métodos innovadores para aumentar la eficiencia de encapsulamiento de fármacos. Sin embargo, en comparación con otros métodos, se proporciona una técnica de producción relativamente rápida y que es fácil de escalar, implica condiciones suaves de procesamiento y tiene una dependencia relativamente menor de las características de solubilidad del fármaco y el polímero. En este método, una solución o dispersión de un fármaco en un disolvente orgánico (w/o) que contiene el polímero es rociado de la boquilla de un secador por aspersión y posteriormente es secada para producir las nanopartículas. Los parámetros del proceso que pueden variar son las temperaturas de entrada y salida, flujo de aire comprimido (representado como el volumen de la entrada de aire), entre otros. Una mayor eficiencia de encapsulación de fármacos hidrofílicos se puede lograr con el método de secado por aspersión con soluciones acuosas. Con el objetivo de evitar la pérdida de producto debido a la adhesión de nanopartículas en la pared interior del secador por aspersión, así como para evitar la agregación de las nanopartículas, se desarrollo un método con doble boquilla junto con el uso de manitol como antiadherente. En esta técnica, la solución o suspensión del fármaco en la solución de polímero se rocía desde una boquilla, mientras que al mismo tiempo una solución acuosa de manitol se rocía desde otra boquilla. En este proceso, la superficie de las nanopartículas secadas por aspersión son recubiertas con el manitol y el grado de aglomeración se reduce.

f) Fluidos Supercríticos

Esta tecnología tiene la ventaja de que el uso de un solvente orgánico y surfactante puede ser evitados o minimizados, por lo tanto se puede producir nanopartículas que estén libres de impurezas tóxicas. El dióxido de carbono es ambientalmente aceptable y el CO₂ supercrítico puede ser fácilmente obtenido por presión y el calentamiento del sistema a un mínimo de 73.8 bares y 31.05 C, respectivamente. En la técnica de rápida expansión de soluciones supercríticas, el soluto se disuelve en CO₂ supercrítico y esta solución se rocía a través de una boquilla dentro de una cámara de recolección en condiciones atmosféricas. Al expandirse, el CO₂ se evapora inmediatamente y el soluto precipita como un coprecipitado del fármaco integrado en la matriz polimérica. Distintos parámetros que afectan al tamaño y la morfología de las partículas resultantes son la temperatura y presión antes y después de expansión, la geometría de la boquilla y la concentración de la solución. Las desventajas de este método incluyen el uso de temperaturas más altas para formar precipitados más homogéneos y la limitada solubilidad de los polímeros y los fármacos que se traducen en un bajo rendimiento de encapsulación.

1.3.4. Caracterización de Nanopartículas

La Nanometrología es la ciencia de las mediciones en la escala nanométrica y su aplicación subyace en toda la nanociencia y la nanotecnología. La capacidad de medir y caracterizar los materiales, así como determinar su forma, tamaño y propiedades físicas a escala nanométrica es de vital importancia para los nanomateriales y dispositivos. Estos tienen que ser producidos con un alto grado de precisión y fiabilidad, para realizar de forma correcta las aplicaciones de las nanotecnologías. Nanometrología incluye longitud o el tamaño (en donde las dimensiones son por lo general en nanómetros), así como la medición de propiedades como la fuerza, masa, carga eléctrica de superficie y entre otras. Algunas técnicas utilizadas son: dispersión de luz, microscopía electrónica de transmisión y de barrido, microscopía de fuerza atómica, microscopía de tunelaje, la espectroscopía de absorción óptica, espectroscopía infrarroja y Raman, difracción de rayos X, espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, métodos ópticos entre otros.

Más que cualquier otra característica que define a las nanopartículas, como tal, es su pequeño tamaño. Por lo tanto, la cuantificación de este valor es el primero en la lista de propiedades de caracterizar. La distribución de tamaño de partícula se define no sólo por el

tamaño de la promedio, sino por la forma en que se define. Además, la propia distribución poblacional puede ser definida por el número o el volumen de las partículas presentes.

a) Dispersión dinámica de luz

Dispersión dinámica de luz o DLS por sus siglas en inglés (Dynamic light scattering) también conocida como espectroscopía de correlación fotónica registra la variación de la intensidad de la luz dispersada en la escala de tiempo de microsegundos. Esta variación resulta de la interferencia de la luz dispersada por las partículas individuales bajo la influencia del movimiento browniano y se cuantifica mediante la compilación de una función de autocorrelación. Esta función se ajusta para un crecimiento exponencial, con la correspondiente constante de caída que está relacionada con el coeficiente de difusión o alguna combinación o modificación de los mismos. El tamaño puede ser calculado a partir de este coeficiente utilizando supuestos de la dimensión esférica, baja concentración, tamaño de las partículas y viscosidad conocida del medio. Las ventajas del método son la velocidad de análisis y la sensibilidad a las partículas submicrométricas. DLS mide la velocidad de una partícula en movimiento y se correlaciona esta velocidad con el tamaño. Una luz láser se utiliza como fuente de radiación y se detecta la variación de la frecuencia de la luz dispersada. El desplazamiento de la frecuencia debido al movimiento de las partículas está directamente relacionado con la velocidad de la partícula y se utiliza para calcular el tamaño de las partículas basándose en la teoría del movimiento browniano. Una distribución de frecuencias de desplazamiento se utiliza para construir una distribución de tamaño de partículas.

b) Microscopía Electrónica

La microscopía electrónica juega un papel importante en la visualización del tamaño, la evaluación de la forma y la morfología de las partículas, en gran medida por las limitaciones de los microscopios ópticos. Puesto que los efectos de difracción restringen la resolución de la microscopía óptica, las estructuras más pequeñas que $1\mu\text{m}$ no puede ser observada con luz. Por lo tanto, si se requiere las imágenes con una resolución mucho mayor, la radiación electromagnética de longitudes de onda más corta debe ser utilizada. Los haces de electrones presentan esta posibilidad cuando un haz de electrones interactúa con una muestra, muchas señales medibles son generadas y los electrones pueden ser

1.- ANTECEDENTES

transmitidos, dispersados y difractados. La microscopía electrónica de transmisión (MET) usa la transmisión de electrones para formar una imagen de la muestra, mientras que la microscopía electrónica de barrido (MEB) utiliza los electrones dispersados y los electrones secundarios emitidos por la muestra. Dependiendo del espesor de la muestra, los electrones transmitidos pasan a través de ella sin sufrir pérdida significativa de energía. Dado que la atenuación de los electrones depende en gran medida de la densidad y el grosor de la muestra, los electrones transmitidos forman una proyección bidimensional de la muestra. Esta es la base de obtención de imágenes por MET. Finalmente, los electrones en el haz primario pueden chocar con los átomos de la muestra y ser dispersados hacia atrás o, a su vez, remover más electrones de los átomos (electrones secundarios). Estos dos procesos (dispersión y la generación de electrones secundarios) son más eficaces cuando el número atómico del átomo aumenta. Si el haz de electrones primario está dirigido sobre la superficie de la muestra y el rendimiento de los electrones secundarios o dispersados se representa como una función de la posición del haz de electrones primario, es posible obtener imágenes tridimensionales de las muestras analizadas, este método es la base de la MEB. La microscopía electrónica, de transmisión y de barrido, proporciona una forma de observar directamente las nanopartículas.

Microscopía electrónica de barrido (MEB) utiliza el haz de electrones que se enfoca a un punto de diámetro de aproximadamente 1 nm en la superficie de la muestra y escaneado repetidamente por toda la superficie. Ello muestra que la topografía superficial de la muestra con la mejor resolución espacial que se consigue es del orden de 1 nm.

Esta técnica requiere que la muestra esté seca junto con un agente de contraste aplicado a la superficie. El agente de contraste suele ser de oro o paladio, que se añade a la superficie a través de recubrimiento metalizado a alto vacío. No obstante la adición del agente de contraste o el proceso de secado puede cambiar la morfología y el tamaño de las partículas durante la visualización, que es una de las desventajas del uso de esta técnica.

MEB es, hasta cierto punto, una herramienta limitada para caracterizar las nanopartículas. El principal problema con la aplicación de la MEB para la caracterización de nanopartículas es que a veces no es posible diferenciar claramente las nanopartículas a partir del sustrato. Los problemas son aún más agravados cuando las nanopartículas en estudio tienen tendencia a adherirse para formar aglomerados. En contraste con MET, MEB

1.- ANTECEDENTES

no puede resolver la estructura. Sin embargo, MEB puede proporcionar información valiosa acerca de la pureza de una muestra de nanopartículas, así como una idea de su grado de agregación. Por otra parte, cuando las nanopartículas son parte secundaria o terciaria de las nanoestructuras, MEB se convierte en una herramienta valiosa para evaluar su ubicación. Además, MEB pueden revelar claramente el grado de dispersión y la uniformidad de nanopartículas metálicas.

Microscopía electrónica de Transmisión (MET) tiene un límite de detección de tamaño más pequeño, es una buena validación de otros métodos, además de ofrecer información estructural mediante difracción de electrones, pero por lo general se requiere tinción. Datos de imágenes muy detalladas pueden resultar de los enfoques por criofractura por congelación. Partículas de tamaño nanométrico se presentan comúnmente en muchos diferentes tipos de materiales y el uso de MET permite la recopilación de información sobre el tamaño de las partículas, forma y las capas superficiales.

Esta técnica se lleva a cabo en alto vacío y requiere que la muestra se encuentre seca después de la preparación. MET proporciona imágenes de mayor resolución en comparación con el MEB y se puede resolver en aumentos mayores. La adición de un agente de contraste no es necesaria para esta técnica. Sin embargo, los agentes de tinción pueden ser utilizados para mejorar el contraste entre los componentes de una mezcla

En los últimos años, un gran número de nuevos y novedosos desarrollos se han hecho en el campo de la microscopía electrónica para la nanotecnología. Esto incluye las nuevas técnicas como la microscopía *in situ* utilizadas para la resolución de procesos dinámicos, el mapeo químico cuantitativo, formación de imágenes holográficas de campos eléctricos y magnéticos, entre otros, por ejemplo, el estudio de las nanopartículas puede ser mejorado con el uso de lentes con corrección de aberraciones, lo que permite resoluciones de imagen en los niveles más bajos que 1\AA .

1.4. Vectorización de fármacos anticancerígenos

El objetivo que motiva el desarrollo de sistemas de nanopartículas para la administración de fármacos es alcanzar un control perfecto de la biodisponibilidad del fármaco en el lugar donde se necesita la actividad terapéutica⁵⁴. Esto implica que el acarreador tiene que ser programado para llegar a los tejidos deseados de las células del cuerpo, e incluso en algunos casos, el compartimento intracelular pertinente. Una forma de lograr este objetivo es el control de interacciones que ocurren entre los acarreadores y las barreras biológicas para que un máximo de la dosis del fármaco administrado se libere hasta el sitio de acción. El número y tipo de barreras que el activo tiene que cruzar para llegar a su objetivo blanco depende de la vía de administración⁶⁹.

El comportamiento de las partículas coloidales depende de tres factores: tamaño de partícula, carga de la partícula e hidrofobicidad de la superficie⁴⁹. Partículas con tamaños menores a 100nm, baja densidad de carga y una superficie hidrofílica no son reconocidos fácilmente por el sistema fagocítico mononuclear y por tanto tienen una vida media prolongada en circulación sistémica⁵⁷. En general, la naturaleza y concentración del tensoactivo son importantes en las características ya mencionadas⁵².

En algunas ocasiones la carga de fármacos en sistemas nanoparticulados no es suficiente para obtener concentraciones terapéuticas satisfactorias debido al rápido aclaramiento por el sistema reticuloendotelial. Por tal motivo se diseñaron los sistemas denominados *drug targeting* (DT)⁷⁰. Los sistemas de liberación de fármacos vectorizados o *drug targeting* se define como la localización selectiva del activo en el lugar de acción. En un sentido muy general, DT se entiende como la capacidad del fármaco para acumularse en el órgano o tejido diana de forma selectiva y cuantitativa, independientemente del lugar y el método de administración. Lo ideal sería que bajo estas condiciones la concentración local del activo en el lugar de acción debe ser alta, mientras que su concentración en los órganos y tejidos no objetivo debe estar por debajo de ciertos niveles mínimos para evitar reacciones secundarias negativas. De esta forma se consigue maximizar los efectos terapéuticos disminuyendo los efectos secundarios. La vectorización de un fármaco o acarreador se puede conseguir por métodos químicos, físicos o biológicos. Este tipo de sistemas tienen la ventaja de que son diseñados para alcanzar un sitio específico con las finalidades de mejorar la seguridad; eficacia y conformidad del paciente. Una forma muy

simple de alcanzar un sitio específico es la administración local, por ejemplo si el sitio deseado es la piel basta con aplicar una loción, ungüento o crema, o bien si se desea liberar el fármaco en el intestino, sólo se necesita aplicar un recubrimiento entérico a un comprimido. Sistemas más sofisticados tecnológicamente están disponibles para vía oral y parenteral, sin embargo, la tecnología aún no es lo suficientemente avanzada para diseñar en su totalidad la bala mágica.

Diversos factores físicos, endógenos y exógenos, han demostrado mediar la administración dirigida de productos farmacéuticos. Un enfoque utiliza, por ejemplo, las diferencias en los valores de pH y temperatura entre los tejidos normales y las áreas patológicas⁷¹ (tumores, inflamación, etc.) que se caracteriza por acidosis⁷² (disminución del pH) e hipertermia. Con esto en mente, se ha propuesto cargar diversos fármacos en acarreadores sensibles al pH o la temperatura, los cuales pueden cambiar sus propiedades y liberar el agente encapsulado cuando son llevados a las áreas con menor pH o la temperatura más alta⁷³. La ventaja de este enfoque es que a pesar de que el acarreador de fármacos se distribuye uniformemente dentro de la circulación, éste se degrada y libera el fármaco sólo en el área objetivo.

Las tecnologías más avanzadas son aquellas utilizadas por vía parenteral incluyendo el uso de acarreadores solubles, sistemas particulados y sistemas acoplados a entidades de reconocimiento como son anticuerpos, carbohidratos o lecitinas entre otros⁷⁴. En drug targeting se distinguen dos estrategias denominadas vectorización pasiva y activa.

1.4.1. Vectorización pasiva

Los sistemas pasivos utilizan dos procesos: la internalización de moléculas por endocitosis y el llamado aumento de la permeabilidad y retención (EPR por sus siglas en inglés). En el primer caso el sistema es liberado y reconocido por los macrófagos y otras células del sistema inmune. Las partículas coloidales son retiradas de la circulación sanguínea por los macrófagos que pertenecen a este sistema, dependiendo de su tamaño y de sus características superficiales. En concreto, se ha demostrado que partículas coloidales con un tamaño por encima de 500 nm, con gran carga eléctrica superficial y con una naturaleza fuertemente hidrófoba son rápidamente retiradas del plasma y concentradas en los órganos del sistema reticuloendotelial (SRE). Esto lleva a una degradación del sistema y una liberación gradual del fármaco hacia la sangre o en el interior mismo del tejido⁷⁵. Esta biodistribución es benéfica para la terapia de tumores localizados en las cercanías del

1.- ANTECEDENTES

sistema fagocítico mononuclear por ejemplo hepatocarcinomas o metástasis hepática que surge del tracto gastrointestinal o cánceres ginecológicos. Puesto que este sistema no es exclusivo del hígado, también es posible la terapia en casos de tumores broncopulmonares, mieloma y leucemia.

El segundo proceso de relevancia en vectorización pasiva se suscita principalmente en el caso del cáncer. El efecto EPR es el resultado del incremento de la permeabilidad de los capilares del sistema vascular del tumor hacia las macromoléculas circulantes combinada con un drenado linfático limitado del intersticio del tumor^{18,19}. La angiogénesis o desarrollo de vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente, no sólo es importante en diversos procesos fisiológicos sino también en situaciones patológicas como la progresión tumoral y metástasis. La angiogénesis se induce cuando las células tumorales se multiplican, se agrupan y alcanzan un tamaño de 2-3 mm para atender a las demandas cada vez mayores de nutrición y oxígeno que se presentan durante el crecimiento del tumor. Esta neovasculatura difiere mucho de la de los tejidos normales en la arquitectura anatómica y microscópica. Por ejemplo, los vasos sanguíneos en el tumor son de forma irregular, dilatada, con fugas y las células endoteliales están mal alineadas o desorganizadas, con grandes fenestraciones. Los nuevos vasos sanguíneos en un tumor sólido son más permeables que la vasculatura normal por lo que permite la infiltración de células tumorales en la vascularización sanguínea. Esta deficiencia anatómica, junto con alteraciones funcionales, resulta en la extensa fuga de componentes del plasma sanguíneo, como macromoléculas, nanopartículas y partículas lipídicas, hacia el tejido tumoral. Por otra parte, el lento retorno venoso en el tejido tumoral y el bajo aclaramiento linfático provoca que las macromoléculas sean retenidas en el tumor, mientras que la extravasación en el intersticio del tumor continúa. Lo anterior significa que un sistema acarreador es ineficientemente removido y por tanto se acumula en el tumor, provocando un aumento en la concentración del fármaco previniendo de efectos adversos a órganos sanos. Para ello es necesario evitar el SRE por lo que cualquier vehículo transportador de principios activos debe tener una superficie lo más hidrofílica posible para retardar su identificación por el SRE, mediante procesos de opsonización y captura por los macrófagos, esto puede lograrse principalmente recubriendo la superficie con un polímero hidrófilo. Es importante

mencionar que en muchas situaciones patológicas la integridad del endotelio vascular no se ve afectada y por tanto no hay oportunidad de que se pueda presentar el efecto EPR.

1.4.2. *Vectorización activa*

El targeting pasivo no siempre consigue una acumulación efectiva en el tejido u órgano específico. Por tanto para incrementar la especificidad del acarreador y las células blanco es necesario diseñar un sistema targeting activo para incrementar la cantidad liberada en el sitio deseado¹³. La mayoría de los sistemas activos utilizan el concepto de entidades de reconocimiento, es decir hay un acoplamiento del fármaco a un ligando capaz de ser reconocido por el sitio que se desea o se pretende alcanzar, o bien al acarreador que transporta el fármaco. Cualquiera que sea la vía seleccionada para acoplar la entidad reconocedora al acarreador, la reacción empleada tiene que ser sencilla, rápida, eficiente y reproducible. Además el método debe formar un producto estable y con enlaces no tóxicos. En la vectorización activa el sistema puede llevar a una alta concentración del fármaco en el lugar de acción. En el caso ideal la dosis puede ser la exacta, reduciendo la posibilidad de presentar efectos secundarios^{16,76}.

Para lograr una efectiva liberación tumor-específica de fármacos es importante reconocer las diferencias morfológicas y fisiológicas entre los tejidos malignos y normales. El crecimiento rápido de las células cancerígenas requiere la formación inmediata de nuevos vasos sanguíneos. La principal característica fisiológica de las células cancerosas es su elevada actividad metabólica, lo que provoca hipoxia de las células induciendo el metabolismo anaeróbico, lo que resulta en la formación de lactato y por lo tanto reducción del pH intracelular^{16,72,77}. El rápido crecimiento de un tumor requiere de diversos nutrientes y vitaminas. Por lo tanto, las células tumorales sobreexpresan muchos receptores específicos, que pueden ser utilizados como blanco para la entrega de agentes citotóxicos en los tumores¹⁶.

Los sitios blanco del cáncer para sistemas de nanopartículas se pueden clasificar de varias formas, por ejemplo de acuerdo a la naturaleza química del ligando, de acuerdo a ciertas características biológicas del crecimiento del tumor y la metástasis. En este último caso la vectorización anticancerígena puede ser orientada hacia la vasculatura de la angiogénesis, el crecimiento incontrolado de células y la orientación directa hacia un tumor específico¹³.

a) Vectorización asociada a angiogénesis¹³

La vectorización hacia la angiogénesis se ha convertido en una gran área para la terapéutica del cáncer. El crecimiento de los tumores sólidos depende de la capacidad de generar un suministro adecuado de sangre circulante. Al atacar el incremento del suministro de sangre, el tamaño y la capacidad metastásica de los tumores pueden ser regulados. Las células del tumor se infiltran en la estructura del nuevo y desarrollado lumen y secretan una variedad de factores pro-angiogénicos, que consiste en el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos tumoral α (TNF- α). Los enfoques anti-angiogénesis son eficaces para limitar el crecimiento del tumor, con las células endoteliales de la neovasculatura transformadas como los principales objetivos. Kumar et al. señalaron cuatro principales ventajas de dirigir la vasculatura del tumor en comparación con las terapias convencionales^{78,79}.

La barrera fisiológica que prohíbe la difusión de las nanopartículas a través del tumor es superada por vectorización hacia la vasculatura, la destrucción de la vasculatura disminuye el crecimiento y la capacidad metastásica del tumor, las células endoteliales neovasculares son menos capaces de experimentar variaciones fenotípicas, disminuyendo la resistencia adquirida a fármacos que se presenta en las terapias convencionales, la vasculatura del tumor no es específica para el tipo de cáncer. Los blancos angiogénicos principales que han sido explorados por los sistemas de nanopartículas para el beneficio terapéutico incluyen los receptores de factor de crecimiento endotelial vasculares (VEGFR)⁸⁰, los receptores de matriz de las metaloproteinasas (MMP)^{81,82} y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1)⁸³.

b) Vectorización hacia el crecimiento celular incontrolado

El ciclo celular es un mecanismo continuo a lo largo del crecimiento de los seres vivos que tiene por objeto mantener el número exacto de células que conforman cada uno de los órganos del cuerpo y por tanto las células están siendo constantemente remplazadas. El cáncer se desarrolla cuando las células de algún órgano escapan de este control y comienzan a crecer y reproducirse en mayor cantidad de las que deberían. Los componentes clave del ciclo celular son los factores de crecimiento y sus receptores. Un factor de crecimiento es un compuesto químico que circula en la sangre y se une a un receptor específico que se encuentra generalmente sobre la superficie celular. El resultado de esta

interacción activa la cascada de reacciones que estimula el crecimiento. Los defectos en los genes modificados afectan el sistema factor de crecimiento-receptor causando sobreproducción de los factores de crecimiento o bien, sobre-expresando los receptores para dichos factores.

Los marcadores de proliferación celular son un sitio blanco importante para la terapéutica del cáncer, ya que muchos de estos marcadores están sobreexpresados en las células de ciertos tumores. Las nanopartículas activamente vectorizadas han seguido los patrones de anticuerpos monoclonales para acceder al sitio blanco de los receptores de la proliferación celular. Los cuatro criterios básicos de vectorización de anticuerpos monoclonales para la aplicación terapéutica de cáncer son los siguientes: el antígeno de interés se expresa en exceso por las células tumorales, el antígeno participa como componente principal en la progresión de la enfermedad, el antígeno es estable en su forma actual en la superficie de las células tumorales, y el antígeno se expresa en un gran porcentaje de las células tumorales y una gran variedad de tumores⁸⁴.

A diferencia de los antígenos de superficie enunciados para esquemas con anticuerpos monoclonales, los sitios blanco de proliferación celular son los receptores que se encuentran en la superficie de las células, los más utilizados en la vectorización activa de nanopartículas son los receptores humanos endoteliales^{85,86}, los receptores de la transferrina⁸⁷ y los receptores de folato^{13,88,89}.

1.4.3. Vectorización vía folato

Los sistemas nanoparticulados han mostrado una mejora en el tratamiento del cáncer^{10,30,31}. Para mejorar la eficacia de estos sistemas se ha propuesto la modificación de la superficie con un sustrato para receptores específicos y de esta manera poder vectorizar la liberación de tal forma que un alto porcentaje del fármaco administrado sea cedido en las células blanco provocando con ello una disminución de los efectos adversos asociados a la quimioterapia. En el caso de algunos fármacos las ventajas que presenta el uso de estos conjugados son baja inmunogenicidad rápida permeación, alta especificidad y relativamente simplicidad en el proceso de conjugación¹³.

El ácido fólico (AF), folacina o ácido pteroil-L-glutámico (la forma aniónica se llama folato), también conocido como vitamina B9 o vitamina B10 es una vitamina hidrosoluble necesaria para la formación de proteínas estructurales y hemoglobina¹⁶. El

1.- ANTECEDENTES

ácido fólico no posee actividad coenzimática, pero sí su forma reducida, el ácido tetrahidrofólico, representado frecuentemente como FH₄. Actúa como transportador intermediario de grupos con un átomo de carbono, especialmente grupos formilo, que se precisa en la síntesis de purinas, compuestos que forman parte de los nucleótidos, sustancias presentes en el ADN y el ARN, y necesarias para su síntesis durante la fase S del ciclo celular, y por lo tanto para la división celular; también actúa en la transferencia de grupos metileno.

Como ya se ha mencionado el ácido fólico es una vitamina esencial para la replicación celular. El transporte de folato es mediado por el acarreador folato reducido y el receptor de folato, el cual es una glicoproteína de membrana llamada glicosil-fosfatidilinositol de 38 kDa. El receptor facilita la captación de folato mediante endocitosis. Debido a la sobreexpresión en células tumorales, el receptor de folato representa un blanco prometedor en el diseño de un sistema vectorizado en contra de células cancerígenas. Como ligando, el ácido fólico tiene ciertas ventajas como son: alta especificidad, baja inmunogenicidad, rápida extravasación, permeación en el tumor, resistencia a la desnaturalización, conjugación química sencilla, económica y definida.

Un sistema de vectorización con ácido fólico presenta algunas ventajas: el ácido fólico es un compuesto de bajo peso molecular, comparado contra proteínas o antígenos, es estable y económico y químicamente no es complicada la síntesis de un conjugado. Como resultado de lo anterior los conjugados de ácido fólico se han usado ampliamente en vectorización de sistemas de liberación de fármacos hacia tumores. Los tumores que sobreexpresan el receptor folato son pulmones, próstata, ovarios, glándulas mamarias y cerebro.

Los fármacos o nanopartículas conjugadas con ácido fólico usan la endocitosis mediada por receptor para la penetración celular y poder evitar las bombas de eflujo de fármacos en las células cancerígenas y así superar el efecto de resistencia a múltiples fármacos. La captación de los conjugados de ácido fólico se da como resultado de una secuencia de pasos que inician con la unión en el receptor para ácido fólico en la superficie celular, después ocurre la invaginación de la membrana, se forma entonces una vesícula llamada endosoma y posteriormente el pH ácido al interior del endosoma provoca la ruptura del conjugado o del sistema acarreador, finalmente se rompe el endosoma dando

1.- ANTECEDENTES

como resultado el fármaco libre para ejercer su acción y la membrana con el receptor de AF vuelve a la superficie celular para mediar la entrada de más AF.

1.5. Nanopartículas de Quitosán

1.5.1. Quitosán

La quitina es el segundo polímero más abundante en el mundo después de la celulosa⁹⁰ y bajo un proceso de desacetilación, como el esquematizado en la figura 1.4, se obtiene el Quitosán (QS). La quitina se obtiene fácilmente a partir de las capas externas de los crustáceos, como son el camarón y el cangrejo. El procesamiento básico de estas capas involucra la remoción de proteínas y la disolución de carbonato de calcio presente y simultáneamente la parcial desacetilación de la quitina. Posteriormente se somete a condiciones básicas en presencia de NaOH al 40 % a 120 °C durante 1-2 hrs, repitiéndose este paso para obtener Quitosán con un 80-95 % de desacetilación⁹¹.

El Quitosán posee un intervalo amplio de aplicaciones, además de su uso en farmacia se emplea en el tratamiento de aguas, cromatografía, cosmética, fotografía, entre otras. El interés del quitosán como un biomaterial, es en parte debido a su diversidad de formas en que podemos encontrarlo, tales como, polvo, fibras, hojuelas, etc.

Es un polímero biocompatible y biodegradable^{92,93} Es degradado por varias hidrolasas incluyendo lisozimas, pectinasas, celulasas y amilasas⁹⁴.

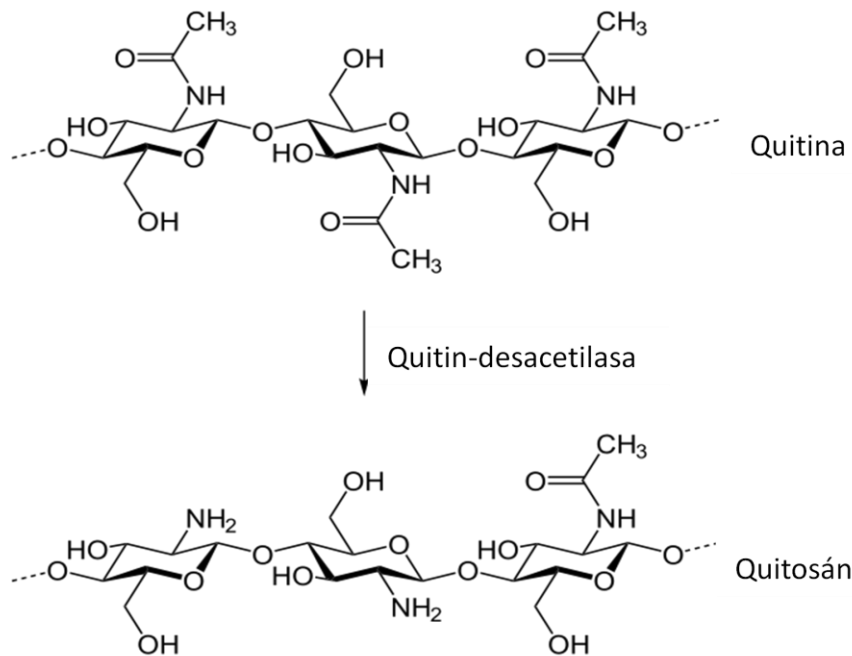


Figura 1.4. Reacción de desacetilación de la quitina para producir quitosán.

1.- ANTECEDENTES

Químicamente, el término quitosán define a una familia de heteropolisacáridos lineales que están formados por monómeros de 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa y 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 4) y comprende una serie de polímeros con pesos moleculares de 50 KDa hasta 2000 KDa y porcentaje de desacetilación del 75 al 98 %. La tabla 1.3 muestra algunas de sus propiedades físicas y químicas.

Tabla 1.3. Propiedades físicas y químicas del quitosán.

Tamaño de partícula.	30-300 μ m.
Densidad.	1.35-1.40 g/mL.
Temperatura de transición vítrea.	203 °C.
pKa.	6.5-7.5
Solubilidad.	En medio ácido (pH<6.5).
Viscosidad.	Variable.
DL ₅₀	16 g/Kg.

El quitosán es una amina primaria alifática que puede ser protonada en presencia de ácidos. Si bien estructuralmente el quitosán es parecido a la celulosa, éste posee diferentes características considerando la presencia del nitrógeno como cuarto elemento; por ejemplo su cationicidad⁹⁵, su habilidad para formar complejos con polielectrolitos^{96,97} y la modificación química de acuerdo a la química del grupo amina primario^{90,98,99}. El polímero obtenido del tendón de crustáceo tiene una estructura cristalina con una celda unitaria de dimensiones *a*) 0.828, *b*) 0.862, and *c*) 1.043 nm⁹⁸. La celda unitaria comprende cuatro unidades de glucosamina, dos cadenas pasan a través de la celda con un empaquetamiento antiparalelo. Los enlaces de hidrógeno que se presentan son intramoleculares (O3---O5) e intermoleculares (N2---O6)¹⁰⁰.

Generalmente el quitosán es prácticamente insoluble en medio básico y neutro, sin embargo, dependiendo del grado de desacetilación logra ser soluble hasta pH de 9. La solubilidad del quitosán en ácidos inorgánicos es menor en comparación con ácidos orgánicos comunes. La solubilidad también puede verse influenciada por la adición de sales a la solución, la adición de electrolitos en altas concentraciones provoca un efecto de salting-out y conlleva a la precipitación del quitosán de la solución¹⁰¹.

1.- ANTECEDENTES

La viscosidad de las soluciones de quitosán es dependiente de la concentración. Las soluciones de polímeros presentan diferentes comportamientos cuando se evalúa la viscosidad como función de la velocidad de corte aplicado. Para caracterizar este comportamiento es común utilizar algunas ecuaciones que denotan la curva de viscosidad (Tabla 1.4)¹⁰². Las soluciones de quitosán se comportan generalmente como un típico fluido no-Newtoniano adelgazante, con un valor del parámetro n menor a 1¹⁰³. La viscosidad aumenta de manera proporcional con la concentración de quitosán, el porcentaje de desacetilación y disminuye con la temperatura^{103,104}. Además, el quitosán tiene la habilidad de formar geles con polianiones⁹⁶. La adición de surfactantes a la solución, así como, la variación en el pH, no altera de manera significativa la viscosidad¹⁰⁵. La temperatura de transición vítrea es de 203 °C¹⁰⁶.

En Farmacia se le utiliza como excipiente en formas farmacéuticas convencionales⁹³, para la formación de sistemas de liberación controlada^{107,108}, en la formación de micro y nanopartículas^{59,109}, entre otros.

La bicompatibilidad del quitosán le permite ser utilizado en varias aplicaciones biomédicas o diferentes rutas de administración, por ejemplo; tópica, ocular, mediante implantación o por inyección⁵⁸.

Tabla 1.4. Curva de viscosidad como función de la velocidad de corte y las ecuaciones que explican el comportamiento de la viscosidad.

	$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{1 + (K\dot{\gamma})^m}$
	$\sigma = k\dot{\gamma}^n \text{ or } \eta = k\dot{\gamma}^{n-1}$
	$\eta = k\dot{\gamma}^{n-1} + \eta_{\infty}$
	<p>Ecuación del modelo de Cross.</p> <p>Ecuación del modelo de la ley de la potencia.</p> <p>Ecuación del modelo de Sisko.</p>

Además se ha reportado que el quitosán es promotor de la absorción ya que provoca la apertura de las uniones de las células epiteliales¹¹⁰. Debido a su carga positiva en pH fisiológico le confiere bioadhesividad la cual incrementa el tiempo de retención en el sitio de aplicación¹¹¹.

Una propiedad del quitosán es que también es capaz de mostrar efecto inhibitorio sobre células cancerígenas y en cierta forma extender la apoptosis de células tumorales de la vejiga vía activación de caspasa 3 o algún otro mecanismo desconocido⁶.

El quitosán es un polímero abundante en la naturaleza y su producción es de bajo costo⁹⁶. Cabe mencionar que más del 50% del número total de solicitudes de patentes registradas en 2006 que reivindican el uso de este biopolímero como una parte sustancial de la invención están relacionadas con la liberación de fármacos, ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas.

1.5.2. Métodos de preparación de Nanopartículas de Quitosán

El quitosán tiene muchas ventajas especialmente para el desarrollo de micro y nanopartículas, por ejemplo su capacidad para controlar la liberación de agentes activos, evita el uso de disolventes orgánicos durante la fabricación, es un polímero que contiene un número de grupos amino libres que están disponibles para entrecruzamiento, su naturaleza catiónica permite reticulación iónica con aniones multivalentes, tiene carácter mucoadhesivo el cual aumenta el tiempo en el sitio de absorción, etc^{58,59}. Por otra parte las tecnologías de nanopartículas de quitosán están diseñadas para la administración de principios activos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, por ejemplo, péptidos, proteínas, polisacáridos y plásmidos de ADN o siARN, los cuales son protegidos al ser encapsulados en su interior. Las nanopartículas de quitosán son mucoadhesivas y tienen un tamaño sub-micrométrico permitiendo una mayor superficie de contacto con las mucosas lo que favorece la absorción del principio activo y su biodisponibilidad⁷¹. Las nanopartículas de quitosán son tomadas por los endosomas permitiendo al fármaco penetrar las células evitando la barrera que el epitelio supone. Las nanopartículas de quitosán proveen de protección contra la degradación enzimática asegurando que los genes o el fármaco se liberan directamente en el núcleo de la célula¹¹².

Las nanopartículas a base de quitosán se forman de acuerdo a una aproximación de tipo 'bottom-up' como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en

virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente⁶⁰. En estas nanopartículas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida (o semi-sólida). Es importante señalar que a pesar de la diversidad de métodos documentados y agentes químicos disponibles para obtener nanopartículas a base de quitosán, sólo unos cuantos de éstos ofrecen potencial real para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas debido al estricto marco regulatorio que deben cumplir los excipientes para la liberación de fármacos. Las metodologías más comunes mediante las cuales es posible preparar nanopartículas a base de quitosán son^{58,59}:

Coacervación Compleja (Complex Coacervation Method)

Complejo por polielectrolito (Polyelectrolyte Complex Method)

Gelación ionotrópica (Iontropic Gelation Method)

Entrecruzamiento en emulsión (Emulsification-Cross Linking Method)

Coprecipitación (Coprecipitation Method)

Evaporación del solvente (Solvent Evaporation Method)

1.5.3. Aplicaciones de Nanopartículas de Quitosán

Alonso y colaboradores reportaron un método de preparación de nanopartículas basado en gelación iónica con polímeros hidrofílicos. El procedimiento es sencillo e involucra la mezcla de dos fases acuosas a temperatura ambiente. En una de ellas se encuentra el polímero de quitosán y poli-óxido de etileno y en la otra tripolifosfato de sodio. Los autores mencionan que el tamaño de las nanopartículas es de 200-1000nm y el potencial zeta de +20 a +60 mV¹⁰⁰.

Por otra parte Mitra et al¹¹³. encapsularon la doxorubicina en nanopartículas de quitosán entrecruzado utilizando el método de micelas inversas. El efecto antitumoral de las nanopartículas resultantes se evaluó en células tumorales J774A.1 macrófagos implantadas por vía subcutánea en ratones. El fármaco encapsulado en las nanopartículas mostró mayor regresión tumoral que el fármaco solo y la formulación de nanopartículas obtuvo un mejor desempeño en relación con la esperanza de vida. Ta et al¹¹⁴. formularon recientemente un hidrogel inyectable de doxorubicina basado en quitosán para el tratamiento del osteosarcoma. El hidrogel liberó el fármaco durante 19 días, inhibiendo de manera efectiva

el crecimiento del tumor primario y la metástasis hasta 1,5 veces mayor que la doxorubicina libre, mientras que también disminuye la toxicidad sistémica asociada a este fármaco.

Para aumentar la capacidad del Quitosán como un sistema nanoacarreador ideal, ha sido modificado química y físicamente para mejorar su biocompatibilidad, solubilidad, biodistribución y el tiempo de circulación, entre otras. El Quitosán puede ser modificado fácilmente con una variedad de ligandos para aumentar el reconocimiento y la captación de los sistemas nanoparticulados en las células a través de endocitosis mediada por receptor¹¹⁵. El AF se ha utilizado como ligando por su capacidad de dirigirse a los receptores de la superficie celular que se sobreexpresan particularmente en las células cancerosas^{16,115}.

1.5.4. Fabricación de Nanopartículas por el método de coacervación

La palabra coacervación es un término utilizado para describir la formación de un coacervado o aglomerado, relacionado a la fase de separación de un coloide. A fin de obtener un producto, tal como micropartículas, por método de coacervación es necesario seleccionar el polímero que producirá una apropiada matriz o cubierta y que además controle la liberación del fármaco. El método consiste en disolver el polímero en un solvente compatible, es decir que el polímero sea completamente soluble. Posteriormente se provoca la coacervación por la modificación de algunos factores tales como pH, temperatura y concentración de sales¹¹⁶. Estas modificaciones promueven la formación de la nueva fase. Las partículas formadas son colectadas y lavadas con un solvente apropiado para purificarlas. Algunos de los factores que se deben de considerar son la solubilidad del polímero, solubilidad del fármaco, tamaño deseado del producto, viscosidad del medio, entre otras. Este proceso ocurre bajo condiciones suaves, en consecuencia es un método de elección para la encapsulación de moléculas lábiles o fácilmente degradables bajo otro tipo de metodologías que involucran calor y solventes orgánicos^{97,117}.

1.5.5. Fabricación de Nanopartículas por complejación de polielectrolito

Otro procedimiento implica la formación de un complejo polielectrolito (PEC). En este caso además de quitosán sólo se requiere un polianión, no se necesita ninguna molécula catalizadora o iniciadora de la reacción, lo cual representa una ventaja frente a un entrecruzamiento mediante enlaces covalentes favoreciendo la biocompatibilidad y

evitando y la purificación o remoción de solventes orgánicos previo a la administración. Para la formación del agregado o coacervado es necesario que ambos polímeros se encuentren con carga opuesta, esto implica que la reacción es dependiente de pH y se suscita en valores cercanos al pKa^{96,99}.

La red está formada por interacciones iónicas y se caracteriza por un microambiente hidrofílico con un alto contenido de agua y densidad de carga eléctrica. La atracción electrostática entre los grupos catiónicos amino del quitosán y los grupos aniónicos del otro polielectrolito es la interacción principal que conduce a la formación del PEC. La elaboración del PEC requiere, además de quitosán, sólo un polímero polianiónico. No se necesitan moléculas auxiliares, tales como catalizadores o iniciadores y la reacción se realiza generalmente en solución acuosa, lo que representa la principal ventaja sobre los entrecruzamientos de forma covalente y por lo tanto favorece la biocompatibilidad y evita la purificación antes de la administración.

Con el fin de formar un PEC, los dos polímeros tienen que estar ionizados y soportar las cargas opuestas. Esto significa que la reacción sólo puede ocurrir a valores de pH en las proximidades del pKa de los dos polímeros, en el caso del quitosán es de aproximadamente 6.5. Durante la formación de complejos, polielectrolitos puede formar coacervados o formar un hidrogel más o menos compacto. Sin embargo, si las interacciones iónicas son muy fuertes puede haber una precipitación. La precipitación puede ser evitada si la atracción electrostática se ve debilitada por la adición de sales, tales como NaCl. La presencia de la sal reduce la atracción entre los polielectrolitos de carga opuesta por la contribución del contra-ión al ambiente.

La complejación de polielectrolitos ha recibido considerable atención como sistemas acarreadores para la liberación de fármacos y genes. El quitosán ha sido investigado como portador de 5-fluorouracilo mediante la formación de PEC nanopartículas con la sal sódica del ácido poliaspártico. Las nanopartículas cargadas con el fármaco mostraron una liberación sostenida de 5-FU, tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con la solución de 5-FU puro¹¹⁸. En ensayos en animales se encontró que la tasa de inhibición del tumor de PEC nanopartículas es mucho mayor que la de 5-FU solo.

2

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

2.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las nanopartículas son acarreadores novedosos para fármacos que tienen la ventaja de aumentar la biodisponibilidad y ser direccionadas hacia los receptores de superficie de las células tumorales y provocar menor daño a las células sanas. Por lo tanto:

Si la CasIII-ia es formulada en un sistema de nanopartículas de quitosán entonces se observará un efecto de inhibición de crecimiento celular en comparación con la molécula libre. Además, si el quitosán es conjugado con ácido fólico, previo a la formación de nanopartículas, entonces el sistema se dirigirá preferencialmente a las células tumorales.

2.2. Objetivo general

Desarrollar un sistema acarreador (o vectorizado) de CasIII-ia mediante la formación de nanopartículas de QS y QS-AF para aumentar la respuesta biológica *in vivo*, de la CasIII-ia.

2.3. Objetivos específicos

- a) Analizar la interacción entre CasIII-ia y Quitosán mediante curvas de viscosidad, mediciones espectrofotométricas en la región visible y EPR para verificar la estabilidad de la CasIII-ia
- b) Realizar la reacción de conjugación de ácido fólico con quitosán para la preparación de nanopartículas de quitosán direccionadas, preferentemente, hacia células tumorales.
- c) Fabricar nanopartículas de quitosán cargadas con CasIII-ia por medio de la técnica de coacervación para comparar la respuesta biológica en comparación con la molécula libre
- d) Caracterizar nanopartículas de Quitosán cargadas con CasIII-ia por medio de microscopía, dispersión dinámica de luz, difracción de rayos X de polvos, análisis térmico e infrarrojo para verificar la inclusión de la molécula en las nanopartículas.
- e) Evaluar el comportamiento *in vivo* de las nanopartículas con CasIII-ia de las nanopartículas mediante el índice de sobrevivencia y el incremento en peso de ratones transplantados con melanoma B16 para corroborar el aumento en la actividad de la CasIII-ia.

3

**M
A
T
E
R
I
A
L
E
S**

Y

**M
É
T
O
D
O
S**

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

El quitosán fue obtenido a través de Sigma-Aldrich grado RA con un 85 % de desacetilación, el etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida clorhidrato (EDC), el polóxamero 407 (P407) y el alcohol polivinílico (PVA) fueron comprados a Sigma-Aldrich México. El Ácido acético (AA), citrato de sodio (CS), hidróxido de sodio (NaOH) y dimetil sulfóxido (DMSO), todos grado RA, fueron comprados a JT Baker. El ácido fólico fue comprado a Fluka. El disolvente utilizado fue agua grado inyectable de laboratorios PISA y agua desionizada obtenida en el laboratorio a través de un sistema NANOPURE®. Finalmente la CasIII-ia fue sintetizada y amablemente donada por la Dra. Ma. Elena Bravo. Todos los materiales fueron utilizados sin purificación posterior a su compra.

3.2.Métodos

3.2.1. Interacción Casiopeina III-ia-Quitosan

3.2.1.1.Mediciones reológicas

Las soluciones de QS en diferentes concentraciones (0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.5 % y 0.7 %, p/v) fueron preparadas disolviendo la cantidad de polímero requerida en agua con la mínima cantidad de ácido acético para disolver el polímero.

Las mezclas CasIII-ia-QS fueron preparadas en la misma forma que se menciona anteriormente con la adición de fármaco en una concentración de 10 mg/mL.

Las mediciones reológicas se llevaron a cabo en un reómetro de esfuerzo controlado modelo TA-Instruments AR-2000 usando una geometría de doubles cilindros concéntricos a temperatura controlada de 25 y 37 °C. Se usó un flujo unidireccional con esfuerzos de 0.1 a 1000 s⁻¹. Todas las mediciones se hicieron por duplicado.

3.2.1.2.Mediciones espectrofotométricas

Se prepararon soluciones acuosas de Casiopeína III-ia en concentración 1, 2, 3, 4 y 5 mM. Las mezclas CasIII-ia-QS fueron preparadas disolviendo la cantidad requerida de QS en diferentes concentraciones (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 mM con respecto al monómero), en agua con la mínima cantidad de ácido acético para disolver el polímero y se adicionó la cantidad suficiente de fármaco para obtener soluciones 5 mM, el pH de las soluciones fue de 4.0-4.5. A todas las muestras se les midió la absorbencia en la

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

región Visible y una $\lambda_{\text{max}} = 610$ nm utilizando un espectrofotómetro Ocean Optics S2000. La interacción fármaco-polímero se determinó mediante la metodología de espectroscopía directa UV-Vis usando la ecuación de Benesi-Hildebran, a partir de los datos de las mezclas CasIII-ia-QS. Los experimentos se hicieron a 20, 25, 30, 37 y 40 °C.

Para evaluar la estabilidad química de la CasIII-ia en medio ácido en presencia del polímero se prepararon soluciones de ácido acético (0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 M), ácido clorhídrico (1.0 M) y una mezcla de ambos en concentración 1.0 M. Una vez hechas las soluciones se adicionó la cantidad requerida de fármaco para obtener concentraciones de 5 mM y se midieron inmediatamente por medio de UV-Vis a temperatura ambiente.

Para evaluar la estabilidad química de la CasIII-ia en medio básico se prepararon soluciones de citrato de sodio al 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 % p/v. Una vez hechas las soluciones se adicionó la cantidad requerida de fármaco para obtener concentraciones de 5 mM y se midieron inmediatamente por medio de UV-Vis a temperatura ambiente.

3.2.1.3. Análisis por Resonancia Electrónica Paramagnética.

El análisis de EPR se llevó en líquido en un equipo ELEXSYS E500 a una frecuencia de banda X de 9.5 GHz. Las muestras para REP se prepararon de la siguiente manera: Se pesó la cantidad suficiente de CasIII-ia para obtener soluciones acuosas 1, 2, 3, 4 y 5 mM. De igual forma se prepararon soluciones 1, 3 y 5 mM de CasIII-ia en medio ácido, con la adición equivalente de ácido acético para obtener concentraciones de 1 M. Las mezclas CasIII-ia-QS fueron preparadas disolviendo la cantidad requerida de QS en concentración de 0.15 % p/v en agua con la mínima cantidad de ácido acético para disolver el polímero y se adicionó la cantidad suficiente de fármaco para obtener soluciones 5 mM.

3.2.1.4. Análisis por IR, DSC, DPR-X.

Las mezclas CasIII-ia-QS fueron preparadas disolviendo la cantidad requerida de QS para preparar una solución 5 mM de monómero en agua con la mínima cantidad de ácido acético para disolver el polímero y se adicionó la cantidad suficiente de fármaco para obtener soluciones 5 mM. Las muestras se sometieron a liofilización y el sólido resultante se dividió en varias fracciones para su análisis por IR, DSC-TGA, y DRXP. El análisis de difracción de rayos X de polvos se hizo en un equipo Siemens D5000 con anticátodo de Cu con $\lambda=1.5406$ Å Software Diffractt AT 3.3 a 35KV y 30 mA con detector de centello. La

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

caracterización térmica se realizó en un equipo DSC 321 METTLER TOLEDO a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min con flujo de nitrógeno. El análisis de IR se hizo en un Espectrofotómetro FTIR Perkin-Elmer Modelo RX-I mediante la formación de pastilla con bromuro de potasio.

3.2.2. Preparación de Nanopartículas

3.2.2.1 Nanopartículas de QS

El método de formación de nanopartículas utilizado es el de coacervación. Para ello se partió de dos soluciones acuosas.

La solución A se prepara disolviendo la cantidad equivalente del polímero para obtener una concentración de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 % p/v con ácido acético al 0.25 % v/v. Se mide el pH de la disolución preparada para verificar el proceso.

La solución B se prepara a partir de una solución básica de hidróxido de sodio (0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 M) o citrato de sodio (0.05, 0.07 y 0.17 M) a la cual se le adiciona alcohol polivinílico (0.1, 0.2, y 0.5 % p/v) o poloxámero 407 (0.1 % p/v.)

Para llevar a cabo la coacervación se adiciona 1 volumen de la solución A a 10 volúmenes de la solución B y se mezcla con homogeneizador (Modelo T18 Basic-W IKA WORKS, INC) a 14000 rpm de 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Se verifica el proceso mediante la medición del tamaño de partícula y el potencial zeta en un equipo ZETASIZER ZS 3600 Malvern Instrument Co. UK. Además se llevó a cabo análisis por microscopía en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 5900LV) con resolución de 4 nm, con sistema de resolución de 20 a 60 eV y de 4 a 6 repeticiones. Inmediatamente después el producto se liofilizó y se almacenó el sólido para caracterizar por IR, DSC, DPR-X y evaluar la actividad *in vivo*.

3.2.2.2 Nanopartículas de con CasIII-ia

Las nanopartículas con CasIII-ia fueron preparadas como se describe en el punto anterior con la adición de cantidad suficiente de CasIII-ia para tener una concentración de 8 mg/mL en la solución A.

La solución A se prepara disolviendo la cantidad equivalente del polímero para obtener una concentración de 0.2% p/v con ácido acético al 0.25% v/v, posteriormente se adiciona la cantidad suficiente de Casiopeina III-ia para tener una concentración de

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

8mg/mL. Se mide el pH de la disolución preparada para verificar el proceso. La solución 2 se prepara adicionando la cantidad suficiente de citrato de sodio para obtener una concentración de 2% p/v con alcohol polivinílico al 0.1% p/v. Para llevar a cabo la coacervación se adiciona 1 volumen de la solución A a 10 volúmenes de la solución B y se mezcla con homogeneizador (Modelo T18 Basic-W IKA WORKS, INC) a 14000 rpm de 1 a 2 minutos a temperatura ambiente. Se verifica el proceso mediante la medición del tamaño de partícula y el potencial zeta en un equipo ZETASIZER ZS 3600 Malvern Instrument Co. UK. Además se llevó a cabo análisis por microscopía en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 5900LV) con resolución de 4 nm, con sistema de resolución de 20 a 60 eV y de 4 a 6 repeticiones. Liofilizar inmediatamente el producto y almacenar el sólido para caracterizar por IR, DSC, DPR-X, EPR y evaluar la actividad in vivo.

Para el cálculo del porcentaje de encapsulación se lleva a cabo por medio de la ecuación 3.1.

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{C_i - C_l}{C_i} \times 100\% \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde C_i es la concentración total de fármaco presente y C_l es la concentración de fármaco libre disuelto en la fase acuosa. La cuantificación de fármaco libre se realiza mediante espectroscopía UV-Vis a una $\lambda = 610\text{nm}$ y se obtiene inmediatamente después de filtrar las nanopartículas a través de una membrana de $0.050 \mu\text{m}$ con presión positiva con nitrógeno.

3.2.2.3 Reacción de conjugación entre el Quitosán y el ácido fólico.

La reacción siguiente tiene por objeto llevar a cabo la conjugación del quitosán con el ácido fólico entre el grupo amino del quitosán y el grupo carboxilo del ácido fólico, de acuerdo a la reacción de la figura 3.1.

- Disolver 1080 mg de AF en 50 mL de DMSO y adicionar 90 mg de EDC. Adicionar poco a poco la cantidad de agua necesaria para llegar a un volumen aproximado de 200 mL. Dejar en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Por separado disolver 800 mg de QS en 200 mL de agua con ácido acético al 1 % v/v. Medir el pH y ajustar con NaOH a un pH de 4.7-5.0.

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

- Una vez disuelto el polímero adicionar esta disolución a la mezcla del paso inicial y dejar en agitación a 400 rpm, durante 2 días y sin exposición a la luz.
- Una vez transcurrida la reacción filtrar la mezcla con el embudo büchner y matraz kitasato con filtros watman de fibra de vidrio (GF/F). Desechar el filtrado.

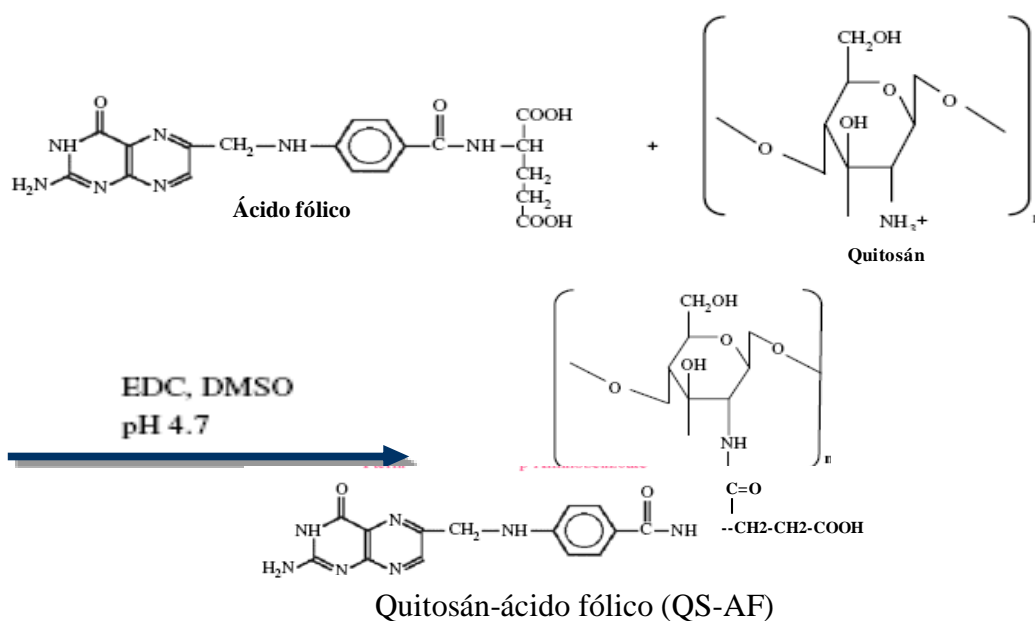


Figura 3.1. Reacción de conjugación entre el Quitosán y el ácido fólico. Modificado de et al.¹¹⁵

- Adicionar cantidad suficiente de NaOH para ajustar pH=8-9 y filtrar nuevamente en las mismas condiciones que el paso anterior. Desechar la disolución y recuperar el filtrado.
- Pasar a un vidrio de reloj o caja petri y secar en la liofilizadora a -20 °C y 0.04mPa, al menos durante 48 horas.
- Una vez seco realizar 2 lavados con agua destilada para remover AF libre y nuevamente colocar en el desecador.

3.2.2.4 Nanopartículas de QS-AF.

La preparación de las nanopartículas con el polímero conjugado (QS-AF) se realizó de la misma manera que el punto 3.2.2.2, únicamente se sustituyó el quitosán por el conjugado QS-AF.

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.3. Viabilidad celular de las mezclas fármaco-polímero

3.2.3.1 Obtención del cultivo stock y confluencia

- Sembrar la línea celular HeLa en las botellas de cultivo de acuerdo a la capacidad de éstas.
- Incubar a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ y 5 % de CO_2 durante 30 minutos a 2 horas.
- Después de éste tiempo hacer cambio de medio de cultivo.
- Revisar diariamente el cultivo para estimar el porcentaje de confluencia.
- Cambiar el medio de cultivo cada 48 h.
- Al tener el cultivo entre el 70 y 90 % de confluencia se realiza la tripsinización.

3.2.3.2 Viabilidad y Cuantificación celular.

- En un tubo eppendorf colocar 20 μl de la suspensión de células y 80 μl de la solución de azul de tripano.
- Se mezcla perfectamente y se transfiere a las dos secciones de la cámara de Neubauer.
- Contar el número de células teñidas y no teñidas por mm^2 (objetivo 10X); se recomienda realizar la cuenta entre 100 y 500 células por mm^2 . (Se cuentan los cuatro cuadros grandes y se saca un promedio).
- Calcular la viabilidad y el número de células por mL de suspensión.

$$C = \bar{N} \times 10^4$$

Donde:

C = células por mL

\bar{N} = promedio de las células contadas

10^4 = factor de conversión de la cámara

Porcentaje de viabilidad = $[(A - B)/A] \times 100$

Donde:

A = total de células contadas

B = células teñidas

3.2.3.3 Ensayo de inhibición de la proliferación celular

- Preparar una dilución celular de 10^6 células/ml.

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

- Adicionar 100 µl de medio de cultivo suplementado en cada pozo de las placas para cultivo.
- Colocar 20 µl de la dilución celular en cada pozo.
- Incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h, para que se recupere de la tripsinización.
- Aspirar el medio y adicionar 90 µl de medio con SFB y 10 µl de cada una de las concentraciones de los fármacos (Tabla 1).

3.2.4. Índice de sobrevida en ratones trasplantados con tumor de melanoma B16.

Las nanopartículas obtenidas en el punto 3.2.2 se administraron a ratones con tumor de melanoma B16 y se evaluó el incremento en el tiempo de vida con respecto a controles sin tratamiento, así como las variaciones de peso.

Para obtener las células tumorales se hizo un cultivo de melanoma B16 murino. Se hace crecer el tumor en ratones C57BL y se dejan crecer 15 días (aprox 1g de tumor). El tumor se extirpa y se trasplanta a ratones CB6F1 de aprox. 6 semanas. La administración y evaluación de las muestras se realiza bajo el siguiente esquema.

1. CasIII-ia disuelta en agua. 6 mg/Kg qd 4x3, días 1,5 y 9. Por vía I.P.
2. CasIII-ia encapsulada en nanopartículas. 6 mg/Kg qd 4x3, días 1,5 y 9. Por vía I.P.
3. Nano partículas vacías. 0 mg/Kg qd 4x3, días 1, 5, 9. Por vía I.P.
4. CasIII-ia encapsulada en nanopartículas con ácido fólico conjugado. 6 mg/Kg qd 4x3, días 1,5 y 9. Por vía I.P.
5. Ciclofosfamina por 9 días, qd 9. Por vía I.P.
6. Testigo. Agua inyectable por vía I.P.

4

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Interacción quitosán-Casiopéina III-ia

El quitosán es uno de los polímeros que ha recibido gran atención durante los últimos años dentro de la investigación farmacéutica. Este polímero tiene varias ventajas para el desarrollo de micro y nanopartículas y puede ser procesado por diferentes técnicas, sin embargo la elección dependerá de las características y estabilidad del fármaco a formular. En el desarrollo farmacéutico los estudios de preformulación son importantes para garantizar la estabilidad del fármaco durante la fabricación del producto y dado que la coacervación implica cambio de pH es necesario estudiar la estabilidad del fármaco en las condiciones de formación de nanopartículas por lo que se realizó la caracterización de la interacción fármaco-excipiente.

4.1.1. Mediciones reológicas

El quitosán es un polímero capaz de aumentar la viscosidad del medio hasta formar geles por debajo de su valor de $pK_a=6.5$ a causa del aumento de las repulsiones electrostáticas que se presentan entre los grupos amino cargados por presencia de ácido ⁹⁶. Las mediciones reológicas han sido utilizadas para comprobar las interacciones de algunos polímeros con sales o surfactantes¹¹⁹. Se sabe que el quitosán en solución acuosa presenta un comportamiento pseudoplástico en concentraciones mayores al 1 % (p/v), en éste caso se trabajaron concentraciones desde 0.01 % hasta 0.7 % (p/v) cuyo comportamiento no ha sido reportado.

Las figuras 4.1 a la 4.4 muestran el comportamiento de viscosidad en medio ácido del quitosán solo y quitosán-CasIII-ia como función del esfuerzo aplicado a 25 y 37°C. Las figuras permiten observar que cualquiera que sea el caso la viscosidad incrementa con el aumento de la concentración del polímero y disminuye con el aumento de la temperatura.

4.1.1.1. Curvas de viscosidad del Quitosán

La Figura 4.1 muestra los datos obtenidos de las soluciones poliméricas sin la presencia de fármaco. Las curvas de viscosidad muestran un perfil de comportamiento correspondiente a un fluido pseudoplástico, no obstante en concentraciones diluidas parece comportarse como Newtoniano. Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de viscosidad de Cross.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

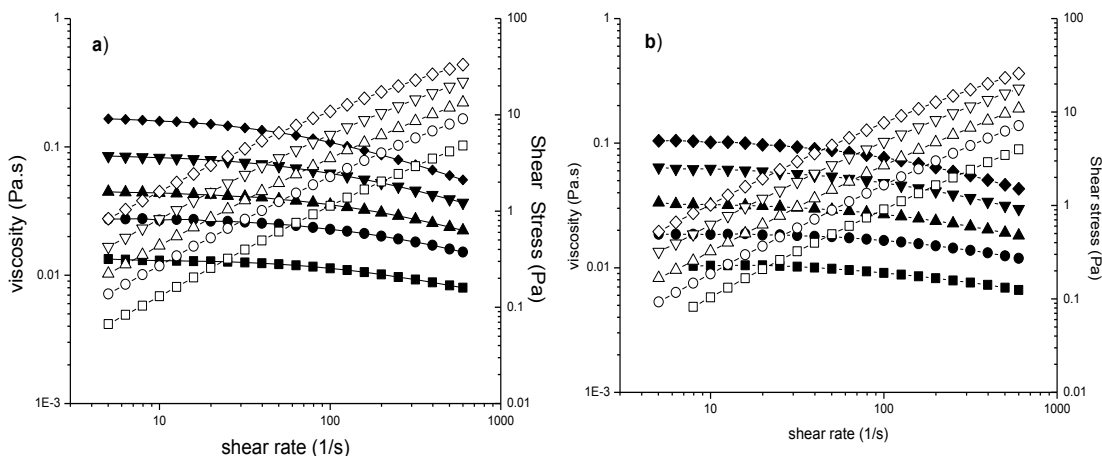


Figura 4.1. Curvas de flujo de las soluciones acuosas de quitosán con ácido acético a 25°C (a) y 37°C (b). Los valores de viscosidad se marcan en relleno negro y el esfuerzo cortante blanco. ■ □ 0.1% w/v, ● ○ 0.2% w/v, ▲ △ 0.3% w/v, ▼ ▽ 0.5% w/v and ◆ ◇ 0.7% w/v.

Se ha reportado que en concentraciones de quitosán mayores al 1% (p/v) los datos se ajustan a la ley de la potencia, no obstante éste no fue el caso. Además algunas soluciones macromoleculares de polisacáridos han sido representadas por la ecuación del modelo de viscosidad de Cross¹²⁰ (1).

$$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{(1 + (K\dot{\gamma})^m)} + \eta_\infty \quad \text{Ecuación de viscosidad de Cross} \quad (1)$$

Como se ha mencionado anteriormente las soluciones de quitosán muestran un comportamiento dependiente de la concentración. A concentraciones menores al 0.1 % p/v se comportan como simples fluidos Newtonianos, concentraciones de 0.1 a 0.7% p/v se muestran como fluidos adelgazantes, es decir, la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de corte. En la figura 4.1 la línea continua representa el comportamiento teórico de acuerdo al modelo de viscosidad de Cross (Eq. 1) donde η es la viscosidad en esfuerzo estacionario γ es un tiempo de relajación estructural, m es un exponente relacionado con el comportamiento adelgazante, η_0 es la viscosidad límite a velocidades de corte cercanas a cero y η_∞ es la viscosidad límite a velocidad de corte infinita. Con valores de m cercanos a cero se describen un fluido de tipo newtoniano, mientras que un carácter más adelgazante se obtiene cuando m es cercano a la unidad¹²⁰. En este caso el parámetro m varía de 0.755 a

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

0.834 cuando la concentración cambia de 0.1 a 0.7% describiendo cambios importantes en el nivel de pseudoplasticidad.

4.1.1.2. Curvas de viscosidad Quitosán-Cas III-ia

Las Figuras 4.2 y 4.3 muestran el comportamiento en solución del quitosán solo y en presencia de la CasIII-ia (10 mg/mL) a 25 y 37 °C. Independientemente de la temperatura el comportamiento fue similar, esto es, la viscosidad observada fue menor para los sistemas en cuyo caso está el fármaco presente. Este tipo de comportamiento es congruente con el conocimiento general de que la viscosidad de una solución polimérica disminuye en presencia de sales, en esta caso se muestra que hay diferencias entre el quitosán solo y en presencia de CasIII-ia.

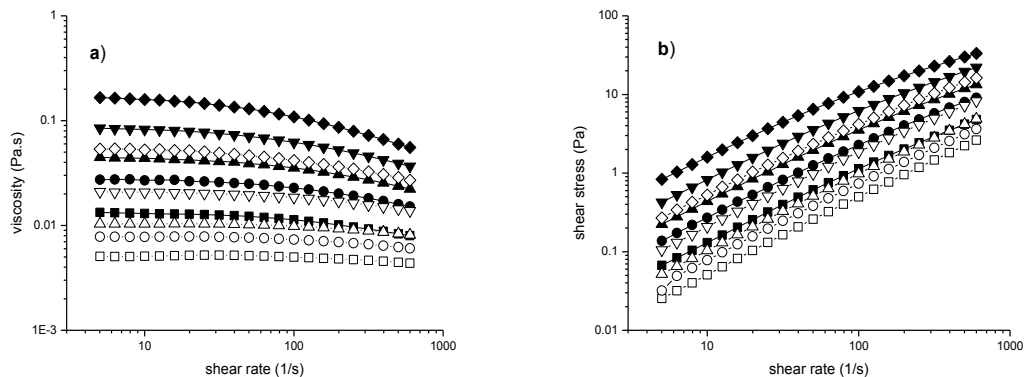


Figura 4.2. Curvas de flujo de soluciones acuosas de quitosán y quitosáno-casiopaina a 25°C. Quitosán solo ■ 0.1% w/v, ● 0.2% w/v, ▲ 0.3% w/v, ▼ 0.5% w/v y ◆ 0.7% w/v. Quitosán- Cas III-ia □ 0.1% w/v, ○ 0.2% w/v, △ 0.3% w/v, ▽ 0.5% w/v y ◇ 0.7% w/v.

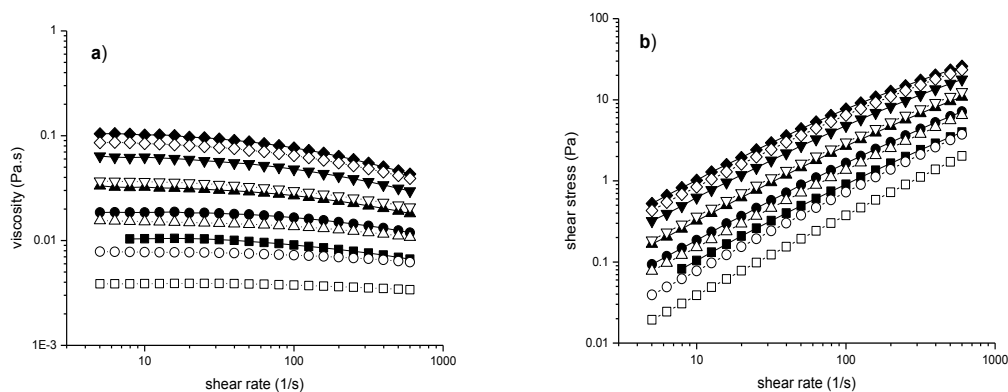


Figura 4.3. Curvas de flujo de soluciones acuosas de quitosán y quitosáno-casiopaina a 37°C. Quitosán solo ■ 0.1% w/v, ● 0.2% w/v, ▲ 0.3% w/v, ▼ 0.5% w/v y ◆ 0.7% w/v. Quitosán- Cas III-ia □ 0.1% w/v, ○ 0.2% w/v, △ 0.3% w/v, ▽ 0.5% w/v y ◇ 0.7% w/v.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de CasIII-ia afecta la estructura interna del gel, ya que el comportamiento adelgazante es menos marcado en su presencia, indicando probablemente una mayor estructuración del sistema por leves interacciones fármaco-quitosán.

El análisis de las curvas demuestra que a bajas velocidades de corte la viscosidad es constante y tiende a disminuir cuando se incrementa o se tienen altas velocidades de corte hasta alcanzar nuevamente un valor constante. Estas dos regiones donde la viscosidad es constante se denominan como baja y alta regiones Newtoniana respectivamente de acuerdo al modelo de viscosidad de Cross¹⁰².

Al igual que la mayoría de los fluidos se observó que la viscosidad disminuye con el incremento de la temperatura debido al aumento del movimiento browniano y de sus moléculas constituyentes, por ejemplo la viscosidad del agua disminuye el 3% por cada grado Celsius de aumento. El comportamiento se presentó tanto en las muestras con y sin fármaco.

4.1.2. Espectrofotometría UV-Vis

La CasIII-ia es un compuesto de coordinación que contiene cobre (II) como centro metálico en la esfera de coordinación, presenta un ligante bidentado del tipo diimina (N-N = bipi) y otro donador (O-O = acac). Dichos ligantes pueden ser sustituidos o desplazados por el QS, el cual tiene grupos -OH y -NH₂. Esto podría influir en el desempeño del fármaco, por ello se estudia la interacción que se puede presentar entre la CasIII-ia y el QS durante la formación de las NP, y se verifica la estabilidad química del complejo en medio ácido y básico, que son las condiciones utilizadas en la formación de las nanopartículas.

Los espectros de UV-Vis de la CasIII-ia sola en agua a 25 °C en diferentes concentraciones son mostrados en la Figura 4.4. Se observa que los espectros muestran una banda ancha en la región visible con máximo en 610nm que corresponde a las transiciones d-d y un hombro que corresponde al fenómeno de transferencia de carga en una $\lambda=410$ nm³⁸. La absorbencia aumenta linealmente con la concentración.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

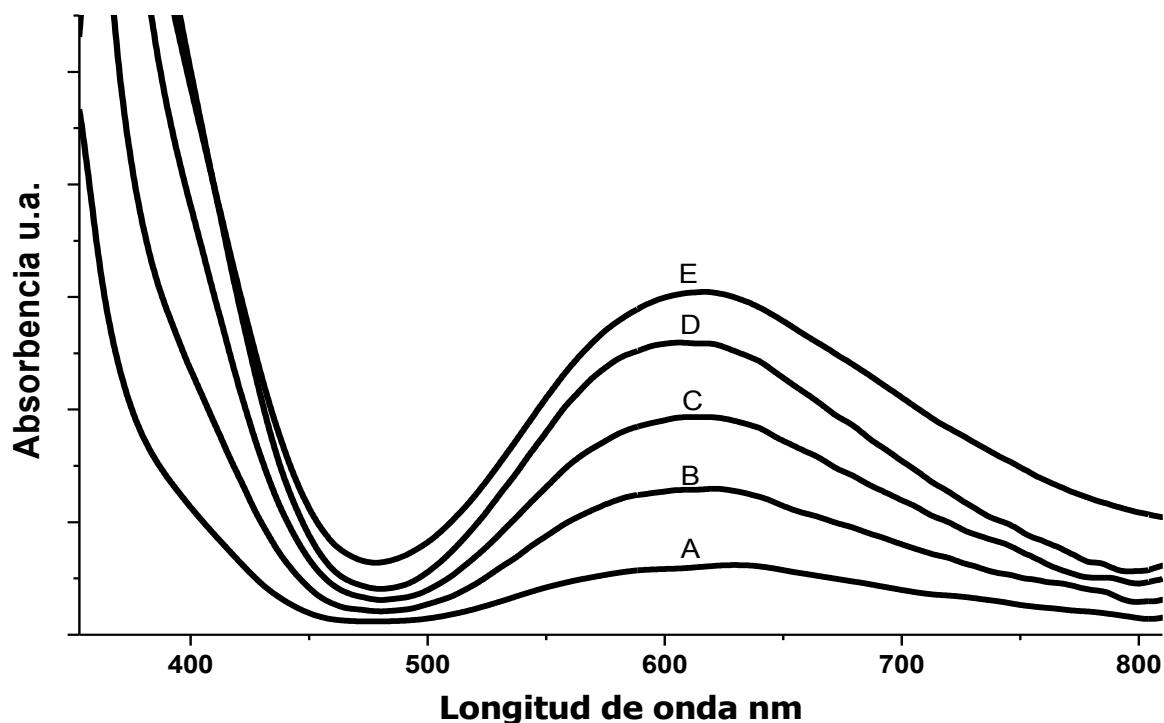


Figura 4.4. Espectros de UV-Vis de Cas III-ia en solución acuosa a diferentes concentraciones molares. A (1 mM) B (2 mM), C (3 mM), (4 mM) y E (5 mM)

4.1.2.1. Estabilidad de la Cas III-ia en medio ácido

La figura 4.5 muestra los espectros de la CasIII-ia en medio ácido. Se puede observar que todas las soluciones ácidas causan una modificación en el compuesto de coordinación. Los espectros muestran desplazamientos en el máximo de absorción correspondiente a las transiciones d-d y el hombro que corresponde al fenómeno de transferencia, las cuales claramente indican una modificación en la esfera de coordinación del catión Cu^{2+} . Se ha reportado que la presencia de H^+ favorece la pérdida del ligando de la Casiopeína³⁸. Estos cambios se presentan con ácidos débiles como el ácido acético, o bien ácidos fuertes como el ácido clorhídrico. La tabla 4.1 muestra el pH en función de la concentración de ácido.

Tabla 4.1. Mediciones de pH de soluciones acuosas de Casiopeína III-ia en diferentes concentraciones de ácido.

Ácido	S/ácido	HCl	Ácido acético					
Conc. ácido	0	1.0M	0.1M	1.0M	2.5mM	5mM	10mM	15mM
pH	6.79	0.75	3.19	2.57	4.46	4.73	4.42	4.30

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 4.5 se muestra que a mayor concentración de ácido y que en presencia de un ácido fuerte la degradación es mayor, sin embargo en las condiciones de preparación de la técnica propuesta para la preparación de nanopartículas la cantidad de ácido es 0.001 M, por lo que también se hicieron estudios de interacción en condiciones ácidas diluidas. En trabajos realizados por el grupo de trabajo de la Dra Lena Ruiz se ha determinado que, en un intervalo de pH de 4.5-8.5, la estabilidad de la Casiopeina III-ia se mantiene, por lo que los datos presentados confirman dicho estudio¹²¹.

La Figura 4.6 muestra los espectros de la CasIII-ia en presencia de ácido acético en diferentes relaciones molares con $\text{pH}=4.40\pm 0.1$, en dicha figura se demuestra que el espectro del fármaco permanece sin cambios considerables a diferencia de lo que se observa en la figura 4.5. Los espectros obtenidos sugieren que la CasIII-ia conserva la estructura, es decir, mantiene sin modificaciones aparentes la esfera de coordinación del catión Cu^{2+} , por lo que se garantiza la estabilidad del activo durante la primera etapa del método de formación de nanopartículas por coacervación, la cual involucra condiciones ácidas diluidas. Por otra parte, mientras más elevada es la temperatura más pronunciado es el cambio en los espectros. (Resultados no mostrados).

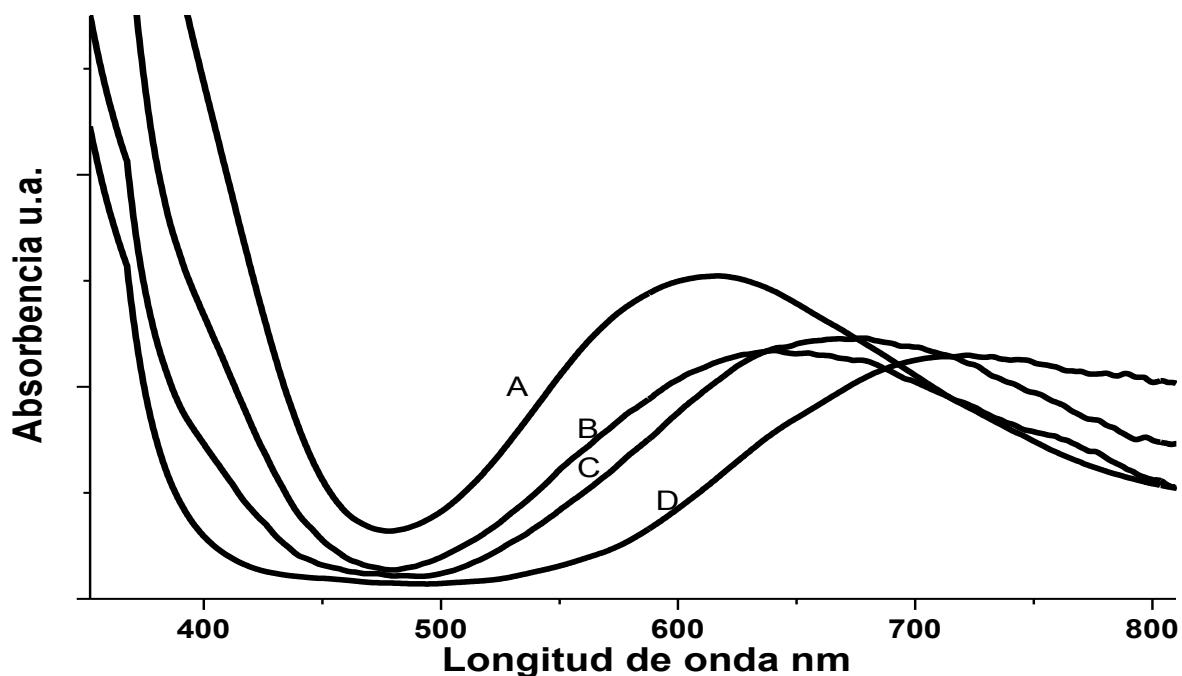


Figura 4.5. Espectros de UV-Vis de la Casiopeína III-ia en medio de ácido. **A** (Cas III-ia sola) **B** (ácido acético 0.1M), **C** (ácido acético 1M) y **D** (HCl 1M).

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

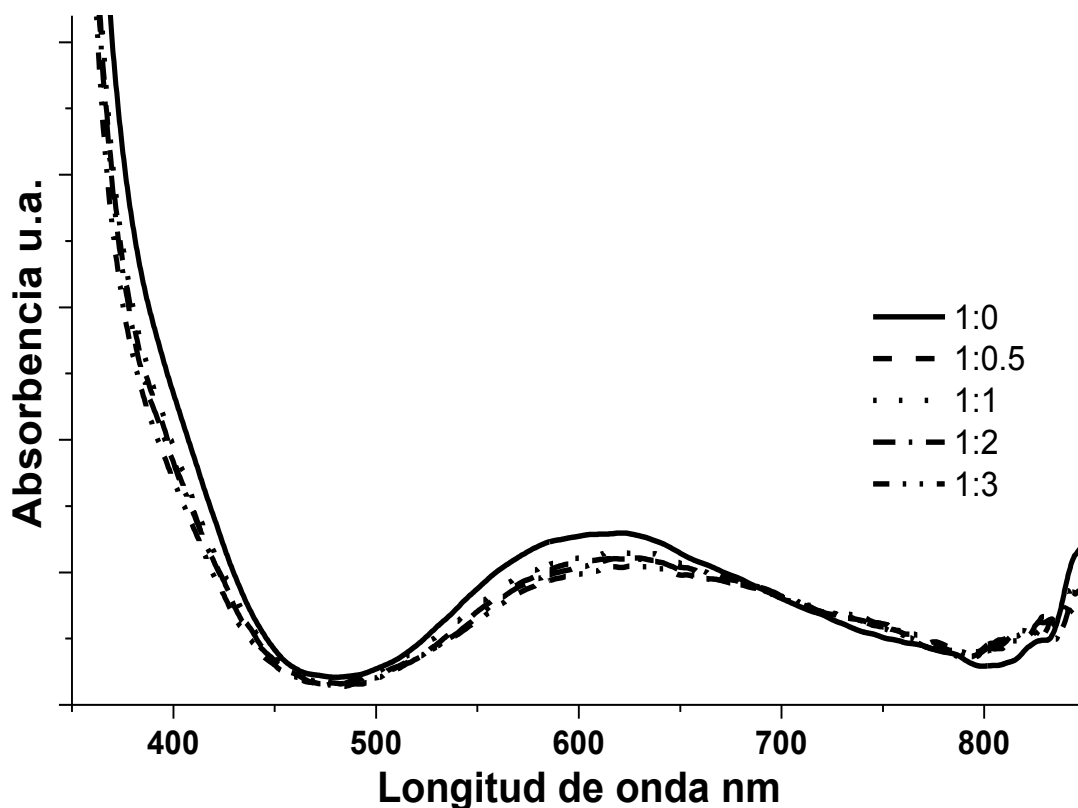


Figura 4.6. Espectros de Casiopeína III-ia 5mM (Cas III-ia) con diferentes relaciones molares de ácido acético (AA). (— Cas III-ia-AA 1:0), (- - Cas III-ia-AA 1:0.5), (... Cas III-ia-AA 1:1), (- . - Cas III-ia-AA 1:2 y (-.- Cas III-ia-AA 1:3)

4.1.2.2. Estabilidad de la Cas III-ia-Quitosán en medio ácido

La adición de ácido acético causa una modificación en el espectro que presupone el rompimiento del complejo, o bien alguna modificación en la estructura cuando se usa en concentraciones mayores a 0.1 M. Sin embargo cuando se realizan los estudios con el QS en solución acuosa con ácido acético con $\text{pH}=4.30\pm 0.2$ (figura 4.7) se observa que las modificaciones son menores, indicando que el efecto es casi nulo en comparación al observado con el ácido en mayor concentración, así mismo se observa que los cambios son parecidos o inclusive menores a los observados bajo condiciones diluidas o de trabajo para la obtención de las nanopartículas. Estos hechos sugieren que el ácido acético interacciona con el quitosán mediante una reacción de ácido-base y por ende el fármaco parece permanecer estable. Únicamente cuando el quitosán se encuentra presente en concentraciones mayores al fármaco, el espectro de este último es modificado muy ligeramente indicando que se presentan algunas interacciones de tipo no covalente, no obstante son menores a las que se observan sin polímero en medio ácido.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

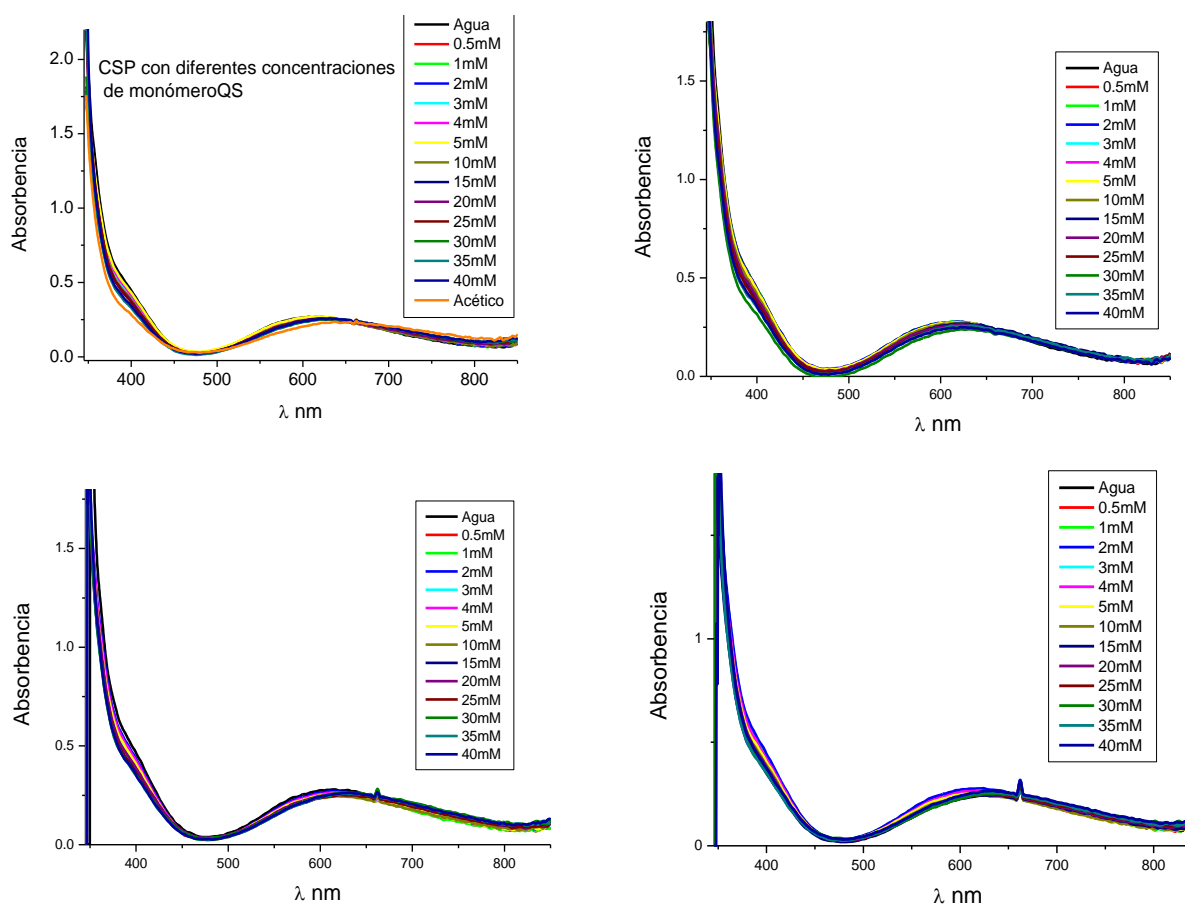


Figura 4.7. Espectros de Casiopeína III-ia 5mM con diferentes relaciones molares de quitosán y ácido acético a 20, 25, 30 y 37°C.

Los espectros de UV-Vis soportan la idea de que existen algunas interacciones débiles entre el quitosán y la CasIII-ia, si bien, parece no haber rompimiento o modificación de la esfera de coordinación del catión puesto que las bandas de las transiciones d-d y de transferencia de carga permanecen como si el fármaco se encontrase solo en solución acuosa³⁸; mientras que si hubiese algún tipo de sustitución esta se manifestaría con la aparición de una nueva banda o quizá con cambios batocrómicos. Además se ha establecido que en medio ácido el quitosán protonado es inefectivo en remover Cu (II) por mecanismos de adsorción¹²². De lo anterior se demuestra, al igual que en las curvas de viscosidad, que no hay cambios considerables que sugieran modificación de la CasIII-ia con lo cual se concluye que se mantiene estable durante la fase ácida de la preparación de las nanopartículas.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otra parte, para estudiar cuantitativamente la interacción entre el polímero y el fármaco se usa el método de espectroscopía directa¹²³. Se mantuvo constante la CasIII-ia a 1 mM y se varió la concentración de quitosán desde 0.5 a 40 mM, en base a su monómero. Graficando ΔA a 610 nm y linealizando logarítmicamente se obtiene, mediante ajuste lineal a la ecuación de Benesi–Hildebrand y suponiendo una aproximación de interacción 1:1 entre el polímero y la Casiopeína, la constante de unión de 193.65 M⁻¹ (25°C) a 355.81 M⁻¹ (37 °C). De la ecuación de Van't Hoff se obtuvieron algunos parámetros termodinámicos, los cuáles son presentados en la tabla 4.2 y comparados en la tabla 4.3 con algunos datos reportados en la bibliografía¹²⁴⁻¹²⁶. De los datos termodinámicos se observa que el valor de ΔH sugiere interacciones de tipo no covalente entre las dos especies, indicando que la unión es gobernada por fuerzas de Van der Waals, donde el efecto hidrofóbico no es muy significativo como fuerza directriz de la interacción. Por otra parte el valor de ΔS se opone a la formación del producto ya que provoca una contribución positiva al valor de ΔG ya que cuando se favorece la interacción entre el Cu (II) y el quitosán este parámetro tiende a valores positivos^{125,126}. El cambio de entropía negativa puede surgir a causa de dos moléculas individuales que están siendo reacomodadas en una sola molécula, con la resultante disminución en el número de configuraciones y microestados del sistema. No obstante ya que ΔS es cercano de cero, es asumido que la sustitución es muy pequeña de acuerdo a los valores de las constantes reportadas.

Tabla 4.2. Valores de K calculado y otros parámetros termodinámicos obtenidos a partir de la ecuación de Van't Hoff.

Temperatura (°C)	20	25	30	37
Temperatura (°K)	293.15	298.15	303.15	310.15
$K_{1:1}$ (M ⁻¹)	193.65	246.39	290.04	355.81
ΔG (KJ)	-12.83	-13.65	-14.29	-15.14
ΔH (KJ mol ⁻¹)	-26.64	-26.64	-26.64	-26.64
ΔS (KJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-0.135	-0.135	-0.135	--0.135

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.3. Comparación de valores de K y otros parámetros termodinámicos a 25°C obtenidos de la bibliografía.

	Cas III ^a -QS	Cu-QS Ref ¹²⁵	Cu-QS Ref ¹²⁴	Cu-QS Ref ¹²⁶
<i>Ln K</i>	5.5	14.8	8.98	15.3
ΔG (KJ)	-13.65	-36.8	-22.3	-38.1
ΔH (KJmol ⁻¹)	-26.64	-41.27	-39.05	-48.64
ΔS (KJmol ⁻¹ K ⁻¹)	-0.135	-0.015	0.056	-0.035

Además se ha reportado que en medio ácido el quitosán protonado es inefectivo en interaccionar con Cu (II) ya que la adsorción es seguida por la transferencia de carga del nitrógeno al cobre y el nitrógeno protonado limita la eficacia de la interacción ¹²².

4.1.2.3. Estabilidad de la Cas III-ia en medio básico

Dado que los cambios de pH que se dan durante el proceso de formación de las nanopartículas y para asegurar estabilidad del fármaco a todas las condiciones de trabajo, se llevó a cabo el seguimiento del comportamiento UV-Vis de la CasIII-ia en pH=7.80-8.12 (Figura 4.8) ajustando el pH con citrato de sodio.

Como puede observarse en la figura 4.8, en medio básico en el intervalo de pH de 7.5 a 8.5 no afecta la estabilidad del compuesto de coordinación. La constante de estabilidad de la formación del complejo Cu-Citrato es de 7.2¹²⁷, lo cual refleja una escasa interacción. Los datos de absorbencia reflejan menores cambios o nulos con respecto al compuesto solo, además los cambios presentados son menores que en medio ácido por lo que se infiere que el fármaco es menos susceptible de ser modificado en medio básico en presencia de citratos en el intervalo de pH mencionado. Por lo anterior, la técnica para la formación de nanopartículas puede ser utilizada asegurando la integridad del fármaco.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

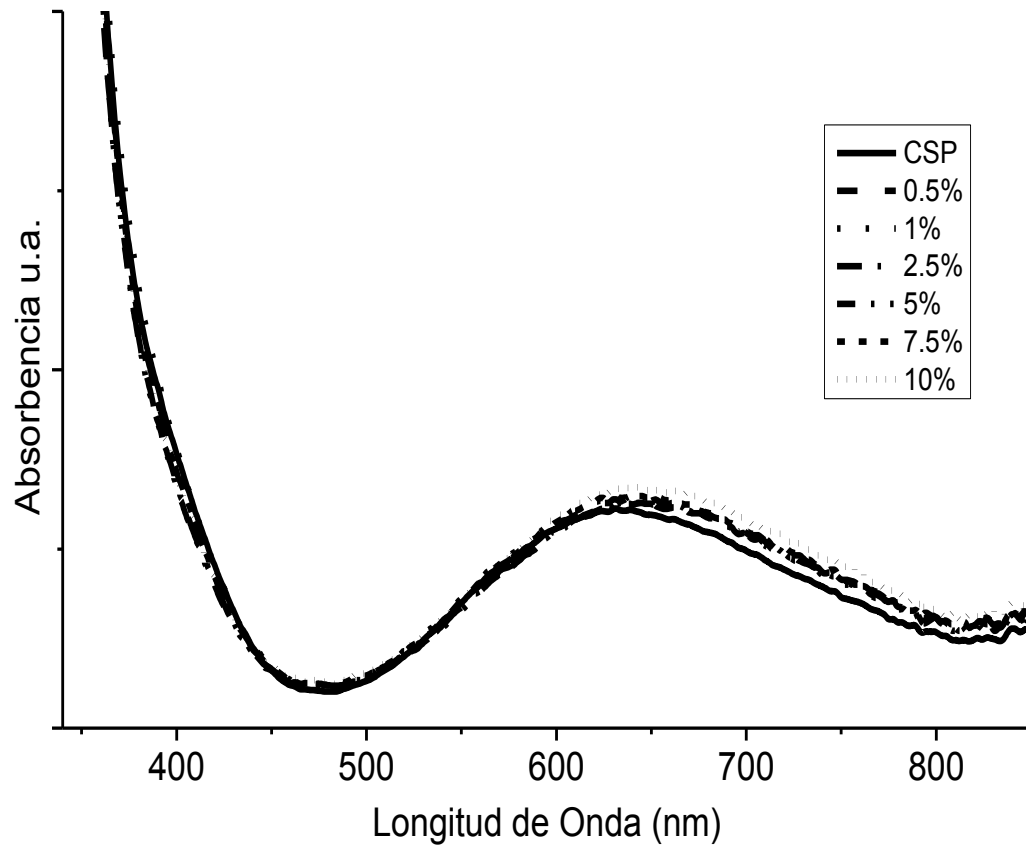


Figura 4.8. Espectros de UV-Vis de la CasIII-ia sola y en presencia de diferentes concentraciones de Citrato de sodio (p/v).

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.3. Resonancia Paramagnética Electrónica

La resonancia paramagnética nuclear tiene sustento parecido a la resonancia magnética nuclear; la diferencia radica es que en este caso se sigue una especie paramagnética como lo es el Cu^{2+} . La técnica nos da información acerca del ambiente que rodea al ion metálico, por lo que estos estudios pueden dar información sobre la estabilidad del fármaco en mención. Se estudió la CasIII-ia sola, en presencia de ácido acético y en presencia de quitosán-ácido acético.

La figura 4.9a muestra los espectros de la CasIII-ia con respecto a la concentración, en ellos se observa que los máximos y mínimos cambian de intensidad de manera proporcional a la concentración no habiendo alguna modificación en la forma del espectro. En la figura 4.9b se presenta el comportamiento de la CasIII-ia en presencia de ácido acético y ácido acético-quitosán. De acuerdo a los espectros obtenidos se deduce que la estructura de la CasIII-ia en presencia de quitosán en medio ácido mantiene sus características, por lo tanto se asegura que durante un proceso de coacervación por cambios de pH de ácido a básico, la CasIII-ia no se degrada al estar presente el quitosán en condiciones ácidas diluidas, por lo que la estabilidad del fármaco queda garantizada a través del proceso de formación de nanopartículas por coacervación.

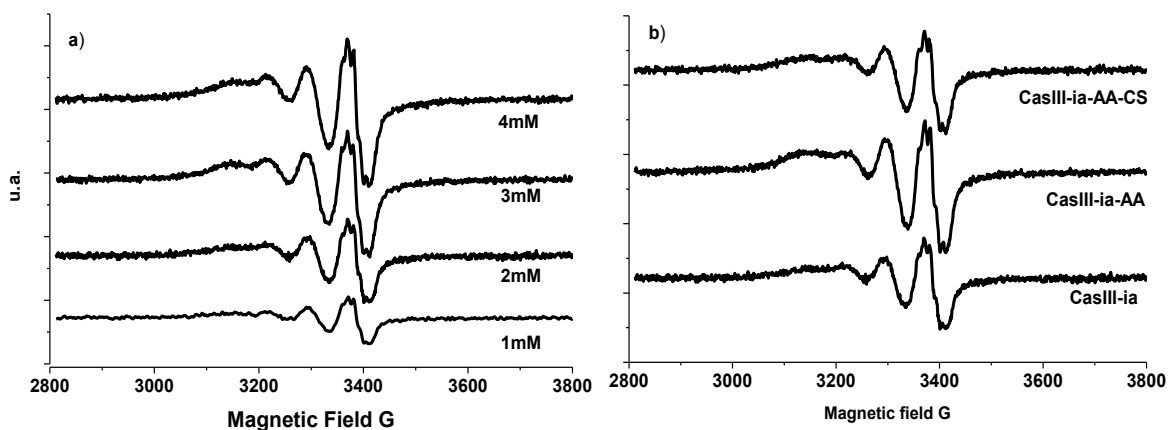


Figura 4.9. (a) Espectros de REP de la CasIII-ia en concentraciones de 1mM a 4mM y (b) mezclas de Casiopeína III-ia con ácido acético (CasIII-ia-AA) y ácido acético-quitosán (CasIII-ia-AA-QS) en relaciones molares 1:1:1.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.4. Actividad *in vitro*

La dosis de Inhibición de Crecimiento 50 (IC₅₀) de la CasIII-ia en la línea celular HeLa es de 18 mM¹²⁸. Para confirmar su actividad *in vitro* se realizó la prueba de inhibición sobre la línea celular HeLa. La Figura 4.10 muestra el efecto del vehículo y del fármaco (sólo y en presencia de diferentes cantidades de quitosán y ácido acético de 0.1 a 0.5 % p/v) sobre la inhibición de crecimiento. Los resultados indican que el efecto del fármaco sobre el crecimiento celular es prácticamente el mismo cuando se introduce sólo en solución acuosa en comparación cuando se administra en solución acida con quitosán, es decir, la dosis IC₅₀ no se modifica. El porcentaje de viabilidad celular promedio es de 53.70 ± 5.74. Se probó además el posible efecto inhibitorio de los componentes de la formulación, en cuyo caso se observa que en las condiciones experimentales (quitosán y ácido acético de 0.1 % a 0.5 % p/v) el porcentaje de inhibición fue menor al 10 %. Este dato concuerda con otros estudios donde el quitosán en concentraciones de 0.1 y 1 mM muestra porcentajes de inhibición de 5 y 22 % respectivamente sobre la línea celular HeLa¹²⁹.

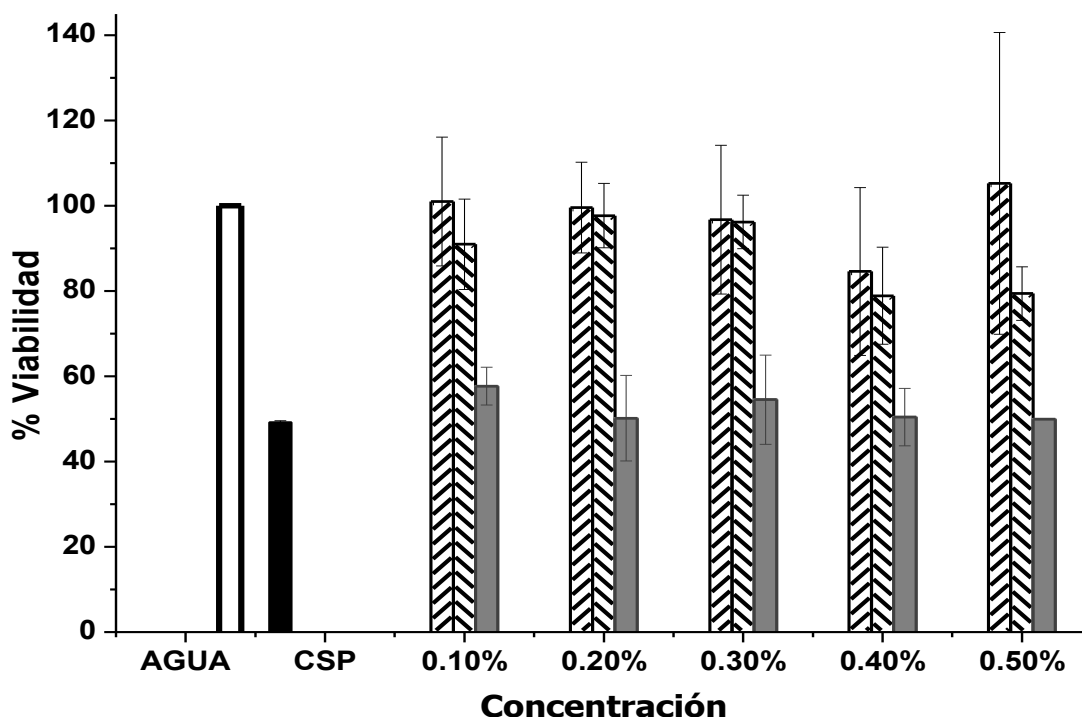







Figura 4.10. Efecto antiproliferativo del ácido acético (0.1% a 0.5% p/v) , solución ácida de quitosán (0.1% a 0.5% p/v) , Cas III-ia 18mM en presencia de quitosán en medio ácido (0.1% a 0.5%)  y control negativo (Agua)  y control positivo CasIII-ia (Cas III-ia 18mM sola) . Los resultados muestran el promedio ± DE (n=3).

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.5. Discusión

La preparación de nanopartículas por medio del proceso de coacervación-precipitación involucra un cambio de pH, lo cual implica que la CasIII-ia será sometida a este cambio, en consecuencia es necesario conocer la estabilidad del compuesto durante la metodología. Asimismo se ha reportado que el quitosán se coordina con el Cu^{2+} preferencialmente con respecto a otros metales de transición¹³⁰, estos complejos de Cu^{2+} con quitosán se forman dependiendo del pH del medio; sin embargo, también es sabido que los complejos de Cu^{2+} y bipyridina son más estables cuando el ligante es de tipo O-O, como el acetilacetato¹³¹. De lo anterior se esperaría que la Casiopeína III-ia no se disocie o que algún ligante sea remplazado por el quitosán. Para sustentar lo anterior se hicieron estudios de interacción fármaco-excipientes. Las curvas de viscosidad de los sistemas quitosán y quitosán-CasIII-ia muestran que las diferencias observadas son relacionadas a la alteración de la conformación estructural del quitosán en solución a consecuencia de la presencia de fármaco en el mismo medio. La disminución en la viscosidad de los sistemas quitosán-fármaco puede ser interpretado como la segregación de las cadenas del polímero debido al colapso de la estructura ordenada y a la disminución de los enlaces de hidrógeno¹³² por la interposición de la CasIII-ia. Este hecho sugiere que la presencia de enlaces de hidrógeno intermoleculares y entre el quitosán y el agua, los cuales mantienen la estructura rígida, son reemplazados por la interacción quitosán CasIII-ia, así mismo las repulsiones electrostáticas del polímero protonado son disminuidas por el contra-ión nitrato de la CasIII-ia. La disminución de estas interacciones conduce al desenredamiento de la cadena de quitosán lo cual se atribuye al encogimiento del polielectrolito debido al apantallamiento causado por la Casiopeína. De lo anterior es claro que si se suscita interacción entre la CasIII-ia y el quitosán, sin embargo, únicamente se sugiere que en medio ácido sólo se presentan interacciones débiles que no conducen al rompimiento de la esfera de coordinación de la CasIII-ia por lo que dicha molécula conserva su actividad biológica bajo las condiciones estudiadas.

Los espectros de UV-Vis, en las condiciones de trabajo, igualmente soportan la idea de algunas interacciones débiles entre el polímero y el fármaco, ya que las gráficas obtenidas muestran muy ligeros desplazamientos que indican algún tipo de interacción, no

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

obstante no parecen apuntar hacia el rompimiento de la CasIII-ia puesto que la banda perteneciente a las transiciones d-d y el hombro de la transferencia de carga en la esfera de coordinación muestran muy ligera modificación, mientras que si ocurriese lo contrario se llegaría a observar una nueva banda o bien, un desplazamiento en el máximo de absorción³⁸. Por el contrario, cuando se induce un rompimiento de la CasIII-ia por efecto de una elevada concentración de ácido, sí se observa como el espectro modifica visiblemente sus bandas características de absorción, lo cual indica la ruptura del complejo. Los resultados sugieren que partir de una solución de ácido acético cuyo pH sea 4.3-4.8, no ocurrirá una ruptura del compuesto de coordinación. La adición de quitosán también llega a tener un ligero efecto en el espectro de la CasIII-ia, es claro que a mayor concentración habrá una mayor cantidad de grupos amino protonados ($^+\text{NH}_3$), lo cual posiblemente disminuye la probabilidad de que ocurra una interacción con el Cu^{2+} , sin embargo en una relación molar de CasIII-ia-monómero de quitosán de hasta 1:5 se observa que no hay modificación de complejo ya que las condiciones ácidas son las principales responsables de la estabilidad o ruptura de la molécula de CasIII-ia; además el quitosán llega a actuar como un agente estabilizante puesto que el ácido primeramente protona el grupo amino por ser una base de mayor fuerza y la CasIII-ia se ve protegida por este efecto de ionización del polímero. El cambio de pH, que involucra el método sugerido para la formación de las nanopartículas, tampoco provoca un rompimiento de la CasIII-ia, en este sentido se infiere que el acetilacetato no es desplazado por el citrato de sodio, ya que de entre ellos solo el primero es un donador de tipo (O-O). Por otra parte el citrato, ya en el método de formación, interactúa principalmente con el quitosán al llevarse a cabo la complementariedad electrostática para dar lugar a la formación de complejos de polielectrolito.

En los estudios de inhibición celular se observó que el porcentaje de viabilidad celular promedio es de $53.70\% \pm 5.74$. Este hecho sugiere que la estructura del complejo de cobre no se ve modificada por la presencia del quitosán en medio ácido, esto implica que no hay competencia con el ligante acetyl-acetonato, por lo tanto se infiere que la actividad de la CasIII-ia *in vivo* no se modifica, ya que ésta no pierde su actividad *in vitro* bajo condiciones ácidas en presencia de quitosán. Además, se ha observado que los complejos monoquelatos de cobre muestran una actividad muy baja en comparación con las Casiopeínas[®], por lo que

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la actividad de las Casiopeínas[®] se debe a la molécula entera¹²⁸, lo cual se observó en éste experimento confirmando que la CasIII-ia no se ve afectada por las condiciones de preparación de nanopartículas por la técnica de coacervación.

En síntesis, se observó que entre el quitosán y la CasIII-ia no se presenta alguna interacción fuerte que provoque la degradación o inestabilidad de la molécula activa por lo que bajo las condiciones de trabajo para la preparación de nanopartículas de quitosán, el fármaco cargado no se degradará durante el proceso.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2. Formulación de Nanopartículas

La preparación de nanopartículas de quitosán se llevó a cabo por proceso de coacervación-precipitación, involucrando interacciones electrostáticas y un cambio de pH de una solución ácida a un pH alcalino. La coacervación es un método que involucra la separación de la fase liq/liq que ocurre por las atracciones electrostáticas cuando dos coloides con cargas contrarias son mezclados, el resultado es una fase rica en coloides y otra fase diluida¹¹⁶. Adicionalmente el quitosán posee un pKa de 6.5 por lo que es soluble en soluciones ácidas^{93,98,100}, sin embargo un cambio de pH por encima de su pKa provoca la precipitación del polímero. Sí este proceso ocurre bajo condiciones suaves puede ser un método de elección para la encapsulación de moléculas lábiles o fácilmente degradables bajo otro tipo de metodologías que involucran calor y solventes orgánicos¹¹⁷.

4.2.1. Efecto de la base

El primer factor a considerar en la formación de las NP fue el tipo de agente neutralizante a utilizar. Se comparó una base fuerte (Hidróxido de sodio) y una base débil (Citrato de sodio dihidratado con pKa de 6.4). Las soluciones de quitosán se neutralizaron con estas bases en diferentes concentraciones, la Tabla 4.4 presenta los resultados de las mediciones de tamaño de partícula por DLS.

Tabla 4.4. Tamaño de partícula en función del agente neutralizante producidas por el método de coacervación precipitación.

Base	NaOH			
Concentración	0.5 M	1.0 M	2.0 M	3.0 M
Tamaño ± Desv. Est. (nm)	7263 ± 1367	7735± 2074	> 10,000	> 10,000
PDI	0.601	0.634	0.869	0.387
pH	10.59	11.07	10.72	10.73
Base	Citrato Na			
Concentración	0.05 M (1.5 % p/v)	0.07 M (2 % p/v)	0.17 M (5 % p/v)	
Tamaño ± Desv. Est. (nm)	263.4 ± 5.4	189.1± 4.7	340 ± 19	
PDI	0.275	0.316	0.647	
pH	8.1	8.0	7.9	

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El NaOH se usó en concentraciones 0.5, 1, 2 y 3 M. Los resultados que se muestran en la tabla 4.2 indican que, independientemente de la concentración de ésta base, el pH de la reacción es ≥ 10 y no se lograba la coacervación-precipitación en tamaños submicrónicos. En este pH no hay un balance de cargas y las interacciones electrostáticas son nulas y provoca la precipitación del polímero produciendo un crecimiento incontrolado en el tamaño de las partículas formadas¹¹⁷. En el caso contrario el citrato de sodio logró controlar el tamaño del polímero precipitado. Esto puede ser explicado comparando el modelo de formación de NP de quitosán hechas por el método de gelación iónica con tripolifosfato (TPP), las cuales son formadas a través de entrecruzamiento intermoleculares entre los grupos amino del polímero con los grupos fosfato cargados negativamente de la molécula de TPP¹¹⁶, es este caso dichas interacciones son llevadas a cabo entre el grupo amino protonado y los aniones de citrato. Sin embargo las partículas eran inestables físicamente, es decir, se observaba aglomeración de las partículas formadas e incrementaba con ello el tamaño de las mismas en función del tiempo. A partir de estos resultados se eligió el citrato de sodio como agente neutralizante para la formación de las NP y se decidió emplear en concentración de 2.0 % p/v ya que fue el que presentó el menor tamaño de partícula. Además el quitosán al ser un polielectrolito se ve afectado por la fuerza iónica del medio, en este sentido se ha demostrado que en la preparación de nanopartículas, al incrementar la fuerza iónica el tamaño aumenta por la agregación de las partículas y la distribución de población se hace más amplia¹³³.

Las diferencias observadas entre el hidróxido y el citrato radican en que en un caso se trata de una base fuerte y en otro de una base débil, esta última es capaz de establecer un interacciones intermoleculares en el quitosán lo cual explica la formación de partículas de menor tamaño ya que se puede entender como un complejo de polielectrolito, en su fase inicial de la coacervación, el cual se da en las cercanías de la neutralidad de pH⁹⁶, con la posterior precipitación del polímero para formar las NP¹¹⁶.

4.2.2. Efecto de la concentración del polímero

El siguiente factor a considerar fue la cantidad de polímero necesaria para la formación de las NP. Las concentraciones del quitosán a examinar fueron de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 % p/v, la tabla 4.5 muestra los datos obtenidos a partir de estos experimentos. A partir de esta tabla se logra observar que el incremento en el tamaño es proporcional a la cantidad de

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

polímero presente en la solución inicial, este comportamiento ha sido reportado en otros estudios donde se evalúa la concentración de polímero para la formación de nanopartículas^{97,116,134}. Cabe mencionar que el incremento de la concentración provoca un incremento de la viscosidad y esto puede provocar que al llevarse a cabo la desprotonación del quitosán la nucleación se vea favorecida hacia tamaños mayores provocando la formación precipitación del polímero en forma de hebras y cúmulos, y no como una suspensión de partículas⁹⁷. Además previamente se ha mencionado que una fase viscosa disminuye la capacidad de encapsulamiento en la formación de nanopartículas de quitosán, por lo que se supone que una concentración moderada promoverá la encapsulación del activo al no tener una gran viscosidad¹³³. Otro factor a considerar en la elección del tamaño de la partícula, y en consecuencia de la cantidad de polímero requerida, es la respuesta biológica *in vivo*. En la terapia para combatir el cáncer se presenta el efecto de aumento de la permeabilidad y retención EPR (Enhanced Permeability and Retention)^{135,136}, el cual permite la acumulación de sistemas coloidales cuyo tamaño sea mayor a 200 nm y menor a 800 nm. Esta deficiencia anatómica, junto con alteraciones funcionales, resulta en la amplia filtración de componentes del plasma sanguíneo, tales como macromoléculas, partículas lipídicas y sistemas coloidales, hacia el tejido tumoral. Por otra parte, en el tejido tumoral el retorno venoso es lento y el aclaramiento linfático pobre provoca que las macromoléculas o sistemas coloidales se mantengan en el tumor, mientras que la extravasación en el intersticio del tumor continúa¹⁸.

En los resultados mostrados en la tabla 4.5 se reporta que concentraciones menores al 0.3 % de quitosán serían condiciones adecuadas para lograr un targeting pasivo por efecto EPR. Por lo anterior la concentración del quitosán para la elaboración de las nanopartículas puede ser hasta de 0.3 % p/v.

Tabla 4.5. Tamaño de partícula de las partículas producidas por el método de coacervación precipitación.

	NP Quitosán vacías				
Concentración % QS (p/v)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
d(nm) ±	263.4 ±	355.6	578.8	977.1	1022
Desv Est	5.4	± 13.3	± 190	± 428	± 228
PDI	0.275	0.679	0.878	0.969	0.882

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.3. Efecto del agente estabilizante

Para estabilizar las partículas formadas se analizó el efecto del alcohol polivinílico (PVA) en diferentes concentraciones: 0.1, 0.25 y 0.5 % p/v. El poloxámero 407 (P407) se evaluó en concentración 0.1% con fines de comparación con respecto al PVA. El PVA se ha utilizado ampliamente en la elaboración de nanopartículas como agente estabilizante, además propiamente tiene la capacidad de estabilizar sistemas coloidales como suspensiones o emulsiones. La tabla 4.6 resume los resultados de estos experimentos. Los resultados muestran que la adición de 0.1 % de P407 produce tamaños alrededor de 263 nm, los cuales son mayores a los obtenidos con el PVA (198.11 nm). La Figura 4.11 se muestra el efecto del poloxámero y se observa que el tamaño va cambiando con el tiempo, es decir el fenómeno de aglomeración no es inhibido por dicho agente detectándose partículas superiores a los 1000 nm a consecuencia de la coalescencia de las partículas¹¹⁷. Por el contrario en la Figura 4.12 muestra el efecto del PVA sobre la estabilidad de las partículas formadas y se observa que éstas se mantienen con respecto al tiempo.

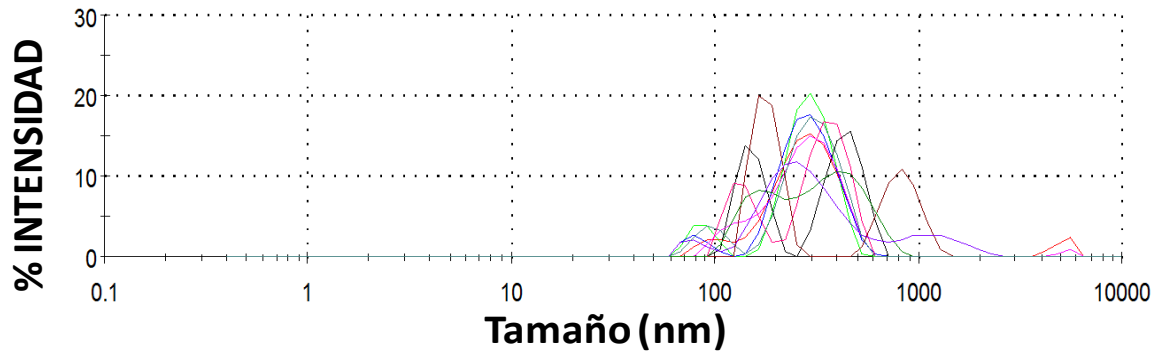


Figura 4.11. Distribución poblacional de partículas de quitosán estabilizadas con 0.1 % (p/v) de P407.

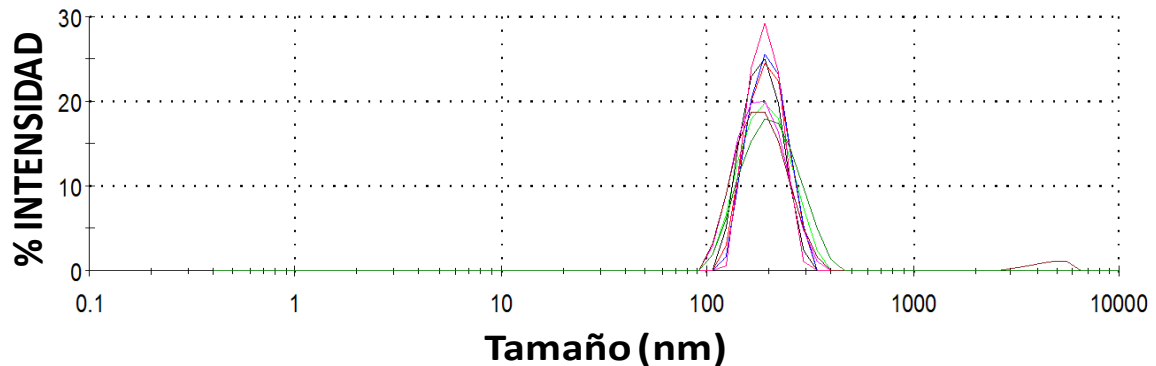


Figura 4.12. Distribución poblacional de partículas de quitosán estabilizadas con 0.1 % (p/v) de PVA.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.6. Efecto del estabilizante y su concentración en el tamaño de las partículas producidas por el método de coacervación precipitación.

Estabilizante	Alcohol Polivinílico			Poloxámero 407
Concentración % p/v	0.1	0.25	0.5	0.1
Tamaño ± Desv. Est. (nm)	198.11 ± 9.36 nm	642 ± 208 nm	926 ± 108 nm	263.4 ± 5.4 nm
PDI	0.186	0.239	0.585	0.275

La figura 4.13 y la tabla 4.7 muestran los tamaños de las nanopartículas formadas hasta 5 horas después de su formación. Aquellas formadas utilizando poloxámero 407 presentan tamaños constantes hasta una hora y media, posteriormente se comienza a observar aglomeración de las partículas y la aparición de más de una distribución poblacional (figura 4.11). Por el contrario, las partículas estabilizadas con alcohol polivinílico se mantienen constantes durante el periodo de observación (figura 4.12).

En este caso el PVA es mejor estabilizante ya que las interacciones con el quitosán son a través de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del PVA y los grupo amino desprotonados del quitosán⁹⁶, esto permite mantener controlado el tamaño ya que impide la aglomeración de las partículas producidas por la coacervación del polímero.

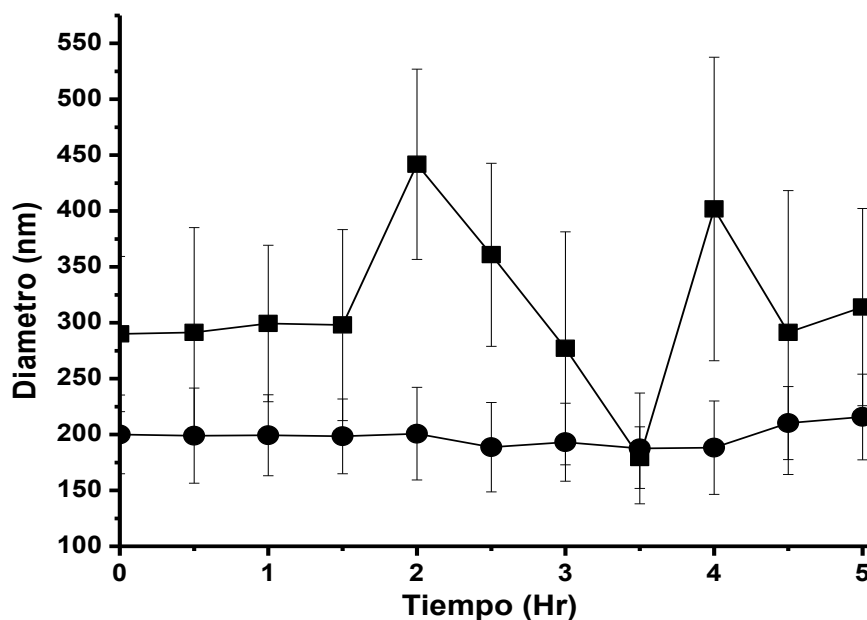


Figura 4.13. Influencia del agente estabilizante con respecto al tiempo en el diámetro de las nanopartículas formadas por coacervación. Los datos muestran el promedio y la amplitud de la distribución normal. -●- PVA, -■- P407.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.7. Influencia del agente estabilizante con respecto al tiempo en el diámetro de las nanopartículas formadas por coacervación. Los datos muestran el promedio y la amplitud de la distribución normal.

ESTABILIZANTE	Poloxámero 127 (0.1 % p/v)		Alcohol Polivinílico (0.1 % p/v)	
	Tiempo (Hr)	Diámetro (nm)	PDI	Diámetro (nm)
0.5	291.3	0.267	199	0.185
1	299.3	0.269	199.4	0.193
1.5	298	0.243	198.4	0.17
2	441.9	0.254	200.8	0.188
2.5	360.9	0.282	188.7	0.169
3	277.1	0.222	193.2	0.158
3.5	179.4	0.246	187.5	0.210
4	401.8	0.254	188.2	0.187
4.5	291.3	0.233	210.2	0.197
5	314.1	0.244	215.7	0.201

Comparando el PVA en diferentes porcentajes se observó que la adición del 0.1 % arroja resultados de distribución de tamaño de partícula mejores que en los otros casos. Este efecto puede ser atribuido a que el PVA se adsorbe o se acomoda en la superficie de la partícula⁹⁶, de tal manera que al incrementarse la cantidad de PVA presente en el proceso de formación éste tenderá a incrementar el diámetro de la partícula⁹⁷. Los resultados observados por espectroscopía de correlación fotónica fueron confirmados mediante microscopía electrónica de barrido (resultados mostrados más adelante).

4.2.4. Efecto de la Cas III-ia en la formación de Nanopartículas

Después de que se determinaron las condiciones propicias para la elaboración de las nanopartículas se analizó el efecto de la presencia de la CasIII-ia.

Tabla 4.8. Efecto de la presencia de la Casiopeína III-ia en las propiedades de las partículas producidas por el método de coacervación precipitación, bajo condiciones definidas.

Estabilizante	Ninguno		PVA 0.1 %		F127 0.1 %	
	s/CasIII-ia	c/CasIII-ia	s/CasIII-ia	c/CasIII-ia	s/CasIII-ia	c/CasIII-ia
Tamaño ± Desv Est (nm)	263.4* ± 5.4 nm	189.1* ± 4.7 nm	280.2 ± 8.4 nm	182.0 ± 2.1 nm	263.4* ± 5.4 nm	164.3* ± 2.6
PDI	0.275	0.316	0.239	0.181	0.275	0.251
% Encapsulación	NA	7.6	NA	12.8	NA	16.1

*Los resultados gráficos muestran más de una población de partículas, además se observa aglomeración con respecto al tiempo.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 4.8 muestra el efecto de la presencia y ausencia del fármaco en el proceso de elaboración bajo circunstancias distintas. Inicialmente se observa que en todos los casos la CasIII-ia provoca una disminución en el tamaño de las partículas. Este comportamiento puede ser atribuido al efecto que tiene la CasIII-ia sobre la viscosidad de soluciones de quitosán, es decir, el polímero pierde rigidez y se produce una contracción de las cadenas provocando que la interacción entre el polímero y el citrato forme coacervados de menor tamaño¹¹⁶. Como se ha mencionado en secciones anteriores, la CasIII-ia disminuye la viscosidad y en consecuencia esto favorece la formación de tamaños más pequeños, tal cual fue observado cuando se evaluó la concentración del polímero presente el medio.

4.2.5. Porcentaje de encapsulación

La encapsulación del fármaco se determinó como la fracción atrapada en las nanopartículas y el porcentaje de encapsulación se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{C_i - C_l}{C_i} \times 100\%$$

Donde C_i es la concentración total de fármaco presente y C_l es la concentración de fármaco libre disuelto en la fase acuosa.

El porcentaje de encapsulación bajo las condiciones definidas de trabajo resultó ser de 12.8 %. Cabe mencionar que el porcentaje de fármaco encapsulado reportado para distintos compuestos disueltos en la fase acuosa durante la preparación llega a ser bajo, por ejemplo la encapsulación de doxorubicina en nanopartículas de alginato de sodio es de 3.8 %¹³⁷. Estos resultados son de esperarse para metodologías en las que no se emplea una fase donde el fármaco sea insoluble, ya que en todo momento éste permanecerá en el seno de la solución de tal manera que cuando se lleva a cabo el proceso de coacervación-precipitación en solución acuosa una gran parte permanece sin encapsular en el sobrenadante.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.6. *Discusión*

Durante el desarrollo para la obtención de nanopartículas de quitosán se propusieron diferentes técnicas reportadas en la literatura^{58,59}, las más comunes involucran el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos lo cual representa una desventaja para un proceso productivo a nivel industrial. La necesidad de superar este tipo de obstáculo ha hecho que se propongan técnicas alternativas que no utilicen disolventes orgánicos durante el proceso, una de ellas la coacervación-precipitación. Esta metodología aprovecha algunas características fisicoquímicas del polímero utilizado para la formación de las partículas, esto es, la capacidad de formar complejos de polielectrolito en la fase inicial de la coacervación¹¹⁶ y el cambio de fase dependiente de su pKa. En comparación con un gel de quitosán entrecruzado covalentemente, los complejos entrecruzados no covalentemente mantienen las propiedades de quitosán como la biodegradabilidad y baja toxicidad, además si un complejo iónico es sujeto de entrecruzamiento covalente entonces sería necesaria una posterior purificación. En los resultados se muestra que el quitosán es capaz de formar partículas con tamaños que van desde los 100 nm hasta más de 10 μm dependiendo de los factores involucrados en el proceso. Las partículas de mayor tamaño se forman a consecuencia de que no hay una formación de coacervados por complejación ya que el pH que genera una base fuerte, como el hidróxido de sodio, no es propicio para la complementariedad electrostática que se necesita para la formación del complejo. Caso contrario ocurre con una base débil como el citrato de sodio. El citrato es un agente amortiguador de pH con la capacidad de mantener un balance de cargas lo cual facilita la complementariedad electrostática con el quitosán protonado. Se ha mencionado que las interacciones para la formación de los complejos iónicos son electrostáticas, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. La formación del complejo depende directamente del grado de ionización, densidad de carga y temperatura de la reacción¹³⁸.

Cuando el pH del medio alcanza un comportamiento básico el quitosán dejará de estar protonado y una precipitación no controlada da lugar a la formación de polímero sólido que tiende a aglomerarse con tamaños de partícula mayores a los 1000 nm siendo más marcado este comportamiento cuando la concentración del polímero en solución es elevada; es decir, mientras mayor sea la cantidad de polímero a partir del cual se da la nucleación, mayor será el tamaño de la partícula precipitada. Por lo anterior, para obtener

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tamaños menores a 1000 nm es necesario mantener el polímero diluido, es decir que haya menores interacciones entre el mismo para que cuando tenga lugar la precipitación la nucleación produzca tamaños nanométricos. Las técnicas que utilizan solventes orgánicos generalmente involucran la formación de un sistema disperso líquido-líquido en el cual la fase interna es quien dicta el tamaño de las partículas producidas, mientras menor sea la fase interna menor será también la partícula producida⁵⁵. A partir de un sistema disperso al estado molecular, una concentración diluida produce partículas de menor tamaño en comparación con una solución concentrada⁹⁷.

Por otra parte, también un agente estabilizante con carácter anfifílico en el medio de reacción, por ejemplo PVA o poloxámero, es capaz de producir tamaños nanométricos al momento de llevarse a cabo la precipitación puesto que es capaz de mantener dispersas las partículas formadas mediante efecto estérico ya que evita que ocurra la coalescencia¹³⁹. Comparando el PVA y el P407 se observa que el primero estabiliza la formación de las nanopartículas de quitosán, este comportamiento se da como consecuencia de procesos de coacervación-precipitación^{96,116}.

Como se mencionó anteriormente, la formación de las nanopartículas es el resultado de dos procesos consecutivos, la formación de complejos iónicos entre el quitosán y citrato de sodio y la posterior sustitución de estas interacciones electrostáticas por enlaces débiles de tipo dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno que se dan entre el quitosán y el PVA⁹⁶. Estos polímeros son eléctricamente neutros en la cercanía de un pH de 7, sin embargo ambos polímeros tienen dipolos que facilitan una complementariedad que induce la estabilización al momento de llevar a cabo la formación de nanopartículas. Matteucci et al¹³⁹, mencionan que en un método de precipitación por antisolvente, una vez que comienza la nucleación, las partículas crecen por condensación ya que las moléculas difunden hacia la superficie de la partícula y se incorporan en la fase sólida, así mismo por coagulación de las partículas que han comenzado a formarse. No obstante, la condensación disminuye la supersaturación puesto que reduce la masa del soluto en la mezcla y por tanto compite con la nucleación. También la coagulación puede reducir la condensación a medida que se reduce el número total de partículas. En consecuencia una alta velocidad de nucleación ofrece el potencial de obtener partículas en escala nanométrica si el crecimiento es controlado en las etapas de condensación y coagulación mediante el uso de agentes estabilizadores que disminuyen la

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

velocidad de condensación y coagulación de la fase sólida¹³⁹. En este caso el PVA se interacciona con el quitosán mediante enlaces de hidrógeno y provee estabilización estérica, de tal forma que el crecimiento o dicho de otra forma la nucleación es controlada mediante el PVA produciéndose tamaños submicrónicos. Adicionalmente, la relación entre ambos polímeros modifica el tamaño producido pues la interacción es dependiente de este factor debido al efecto que tiene el quitosán en la alteración de la cadena de PVA.

Finalmente la incorporación del fármaco reduce el tamaño de las partículas debido a la interposición entre las cadenas de quitosán lo cual concuerda con la tesis expuesta anteriormente, el tamaño se verá favorecido hacia poblaciones más pequeñas.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3. Caracterización instrumental

Además de los resultados comentados anteriormente se realizó análisis mediante MEB, DPR-X, CDB-TG e IR para confirmar el encapsulamiento de la CasIII-ia. Los resultados se comentan a continuación.

4.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido

La figura 4.14 muestra las micrografías de la CasIII-ia y el Quitosán. Se observa que la CasIII-ia presenta un aspecto cristalino y cuyo tamaño de partícula varía de 5 μm a 100 μm . La forma de las partículas no es esférica, sino de forma rectangular. La micrografía del Quitosán muestra un aspecto no cristalino, caracterizado por la forma irregular de las partículas, mostrando además una apariencia en forma de hojuelas.

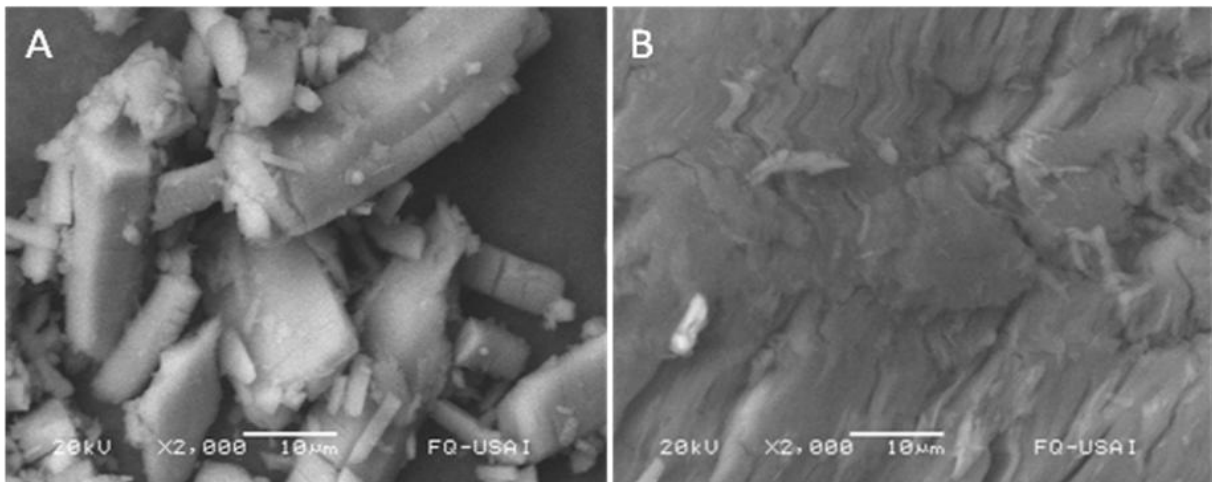


Figura 4.14. Micrografías de la Casiopeína III-ia (A) y del Quitosán (B)

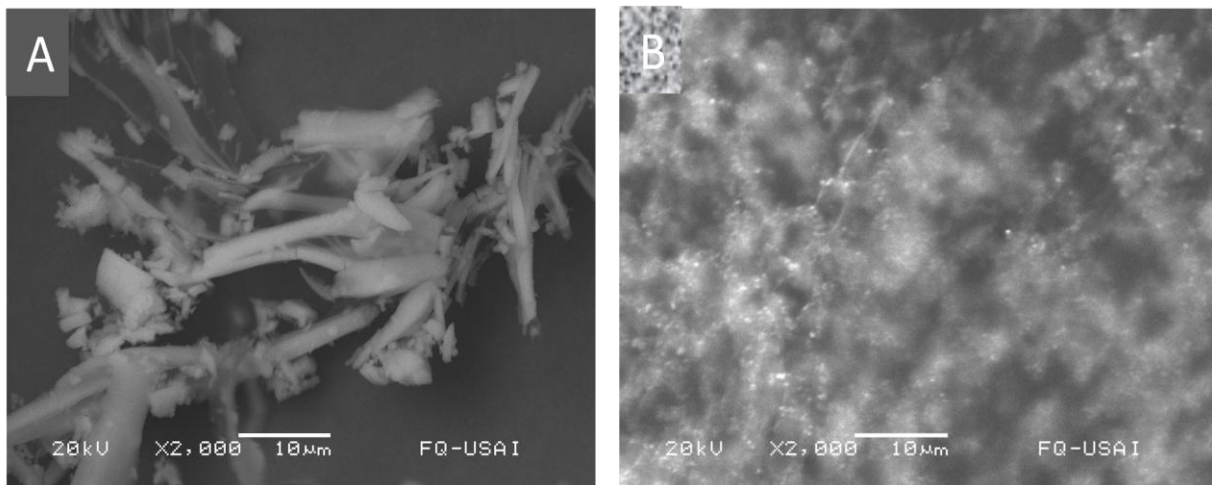


Figura 4.15. Micrografías de la mezcla física entre la Casiopeína III-ia y el quitosán(A) y de las NP de Quitosán cargadas con Casiopeína III-ia (B)

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 4.15 muestra la mezcla física (A) entre la CasIII-ia y el Quitosán y la correspondiente formación de nanopartículas de quitosán cargadas con CasIII-ia (B) en relación 1:1. En la micrografía de la MF (Figura 4.15A) se observan partículas con apariencia cristalina que muy probablemente corresponden al fármaco, mientras que también se logran observar rasgos de materia fibrosa que pueden ser debido a la presencia del polímero. En esta micrografía se observa que la CasIII-ia pierde cristalinidad ya que la forma de las partículas está menos definida y se logra observar rugosidad en parte de la superficie de las partículas. Sin embargo, éste cambio no es suficiente para mencionar que haya algún tipo de interacción que modifique la estructura cristalina por efecto de la presencia del polímero, puesto que el aspecto es prácticamente el mismo con respecto a su estado nativo. En la figura 4.15B se observa la formación de partículas muy finas de tamaño sub-micrónico. En esta micrografía se logra observar que el aspecto de las partículas con respecto a su estado original ha cambiado a consecuencia del proceso de coacervación precipitación que da como resultado la encapsulación del fármaco.

La figura 4.16 presenta micrografías de las nanopartículas cargadas con el fármaco (A) y vacías (B). Aparentemente la presencia del fármaco aumenta el tamaño de las partículas, sin embargo este hecho puede ser atribuido a la naturaleza de la muestra, es decir, al momento de llevar a cabo la medición el producto estaba concentrado de tal manera que la solidificación dio como resultado la apariencia de partículas más grandes. No obstante es posible observar partículas de tamaños muy pequeños las cuales concuerdan con los datos obtenidos mediante dispersión dinámica de luz.

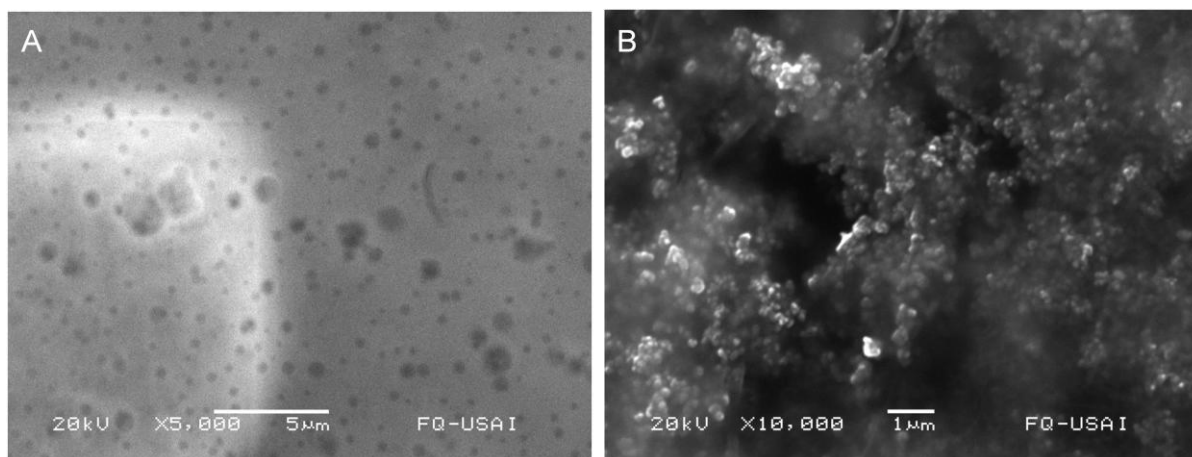


Figura 4.16. Micrografías de las NPs de Quitosán cargadas con Casiopeína III-ia (A) y vacías (B).

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.2. Difracción de Rayos X de Polvos

DRXP es una técnica de gran utilidad en la identificación de fases cristalinas. Ha sido usada ampliamente en el análisis de mezclas de diferentes formas de cristales, o bien para determinar el grado de cristalinidad. Un método utilizado para caracterizar el comportamiento cristalino involucra la intensidad de los picos individuales. En la Figura 4.17 se muestran los difractogramas del Quitosán, CasIII-ia, CasIII-ia-liofilizada, Mezcla Física-Liofilizada (MFL) y Nanopartículas, para comparar el comportamiento cristalino.

El quitosán ha sido caracterizado mediante la DRXP por Webster et al¹⁴⁰, en su trabajo demostró que el quitosán presenta una red cristalina y una parte amorfa. La región cristalina fue caracterizada por la presencia de una banda bien definida en la región $2\theta = 29.16^\circ$ y una serie de picos en $2\theta = 33-85^\circ$, mientras que la región amorfa fue representada por dos picos amplios en $2\theta = 9-13^\circ$ y $17-23^\circ$. El polímero analizado en este trabajo corresponde sólo a una muestra amorfa, ya que a diferencia de lo reportado por Webster et al¹⁴⁰, la figura 4.17 sólo muestra los picos amplios característicos de la región amorfa del quitosán y los picos correspondientes a la región cristalina están ausentes, dejando notar la naturaleza amorfa del polímero.

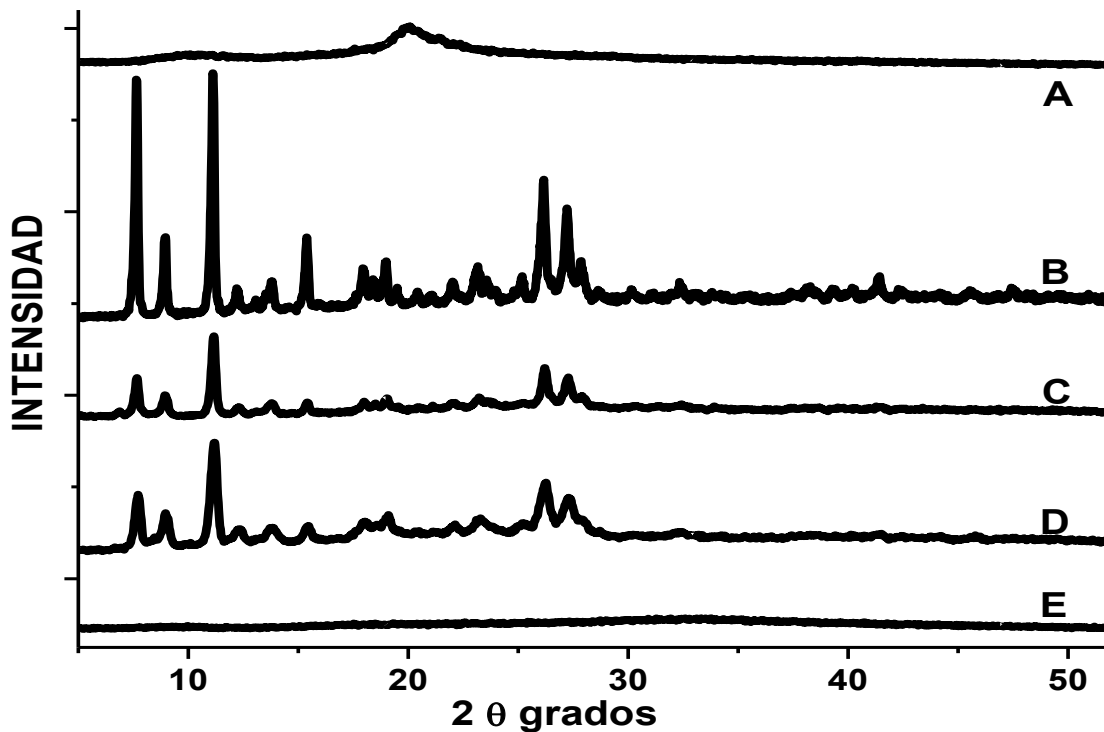


Figura 4.17. Difractogramas de A (Quitosán), B (Casiopéina III-ia), C Casiopéina III-ia Liofilizada), D (Mezcla física liofilizada) y E (NP)

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Casiopeína III-ia presenta un estado cristalino y los picos de mayor intensidad se presentan a $2\theta = 8.96^\circ, 11.12^\circ, 26.16^\circ, 27.22^\circ$ y 8.96° . Para descartar los cambios en la CasIII-ia, debido al proceso de liofilización, se procesó la CasIII-ia sola y se observa que hay una disminución considerable en el porcentaje de cristalinidad relativo. Este valor se calculó considerando la intensidad de los picos de la CasIII-ia sin liofilizar como el 100 % y el dato que se obtuvo fue de 30.76%. La tabla 4.9 muestra también el grado de cristalinidad relativo de la mezcla física liofilizada y de las NP sólidas.

Cuando se analiza la MFL en la figura 4.17 se observa que las bandas principales de la CasIII-ia se mantienen difractadas en $2\theta = 7.64^\circ, 11.12^\circ, 26.16^\circ, 27.22^\circ$ y 8.96° . No obstante, el porcentaje de cristalinidad relativo cambia a 44.12 %. Las diferencias en el porcentaje de cristalinidad de la mezcla liofilizada y del fármaco liofilizado nos refuerza la hipótesis que se presenta una interacción débil entre el QS y la CasIII-ia, sin embargo estas interacciones no son indicativo de algún tipo de degradación del activo o de formación de una dispersión sólida ya que no se pierde totalmente la cristalinidad de la CasIII-ia, inclusive es mayor con respecto a la ausencia del quitosán. Por otra parte en el difractograma de las NP solo se presenta un estado completamente amorfo representado por la ausencia total de picos en el gráfico. Este comportamiento implica que se ha llevado a cabo la encapsulación¹⁴¹ como resultado del proceso de coacervación-precipitación, indicando con ello que con esta metodología es posible la encapsulación de la Casiopeína III-ia.

Tabla 4.9. Porcentaje de cristalinidad de la Casiopeína III-ia tratada con respecto a su estado nativo. CasIII-ia no tratada (CasIII-ia), CasIII-ia liofilizada (CasIII-ia-L), mezcla física CasIII-ia-QS (MF) y nanopartículas de QS-CasIII-ia (NP).

	% Cristalinidad			
2θ	CasIII-ia	CasIII-ia-L	MF	NP
8.96	100	26.36	46.01	1.04
11.12	100	30.79	40.04	0.19
26.16	100	32.28	45.10	3.83
27.22	100	33.62	45.33	5.86
Promedio	100	30.76	44.12	2.73
Desv Est	0	3.15	2.75	2.60

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.3. Análisis Térmico

El análisis térmico, mediante DSC y TG, es una herramienta útil para caracterizar la formación de sistemas entre dos especies diferentes, por ejemplo complejos de inclusión, y poderlos diferenciar de una simple mezcla física mediante su cambio de comportamiento en función de la temperatura. En este caso, la caracterización de la encapsulación del fármaco en la formación de las nanopartículas está descrita por la desaparición de los picos del termograma¹⁴¹. Las Figuras 4.18 y 4.19 muestran los perfiles térmicos de la CasIII-ia, CasIII-ia-Liofilizada, Quitosán, Mezcla Física-Liofilizada y las Nanopartículas. En la figura 4.18 se observa que la curva de DSC de la CasIII-ia muestra un pico endotérmico de 78 a 110 °C que denota la pérdida de moléculas de agua, lo cual es confirmado por la curva de TG (figura 4.19 B) que resulta de la disminución de peso. Adicionalmente en la curva de DSC para la CasIII-ia se presenta un pico exotérmico alrededor de 225 °C debido a la disociación del complejo y la subsecuente degradación de uno de los componentes como lo demuestra la curva de TG (figura 4.19 B), posiblemente debido a la oxidación del acetilacetato. De acuerdo al análisis térmico, la CasIII-ia (figura 4.18 B) es una molécula hidratada, cristalina, sin presencia de transiciones cristalinas o vítreas, con un pico exotérmico alrededor de 225 °C.

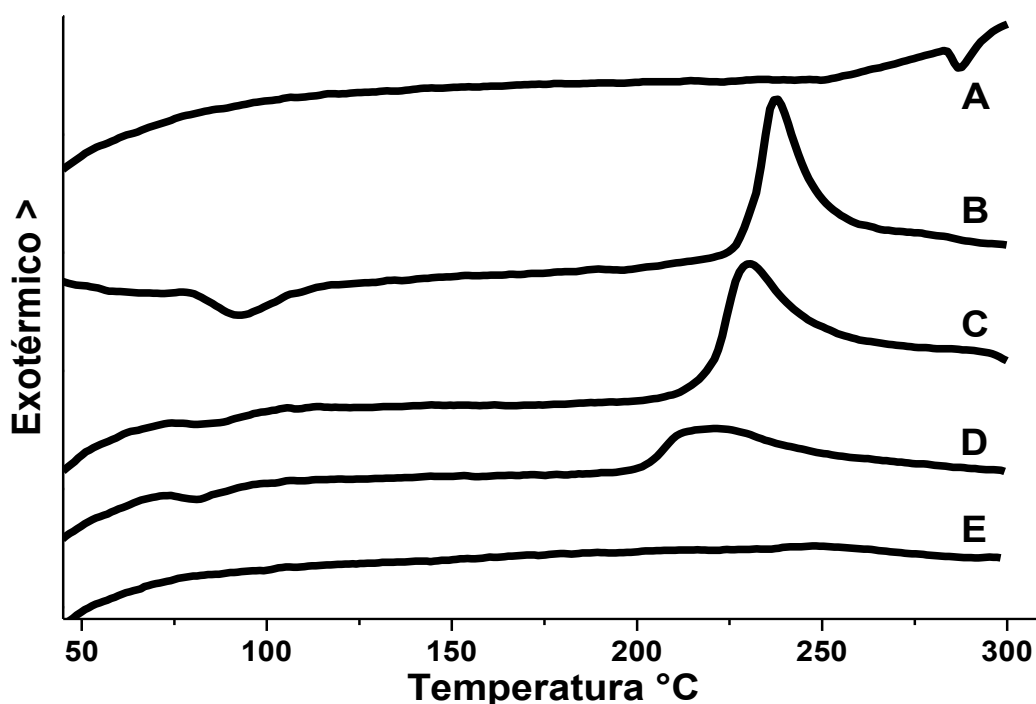


Figura 4.18. Curvas de Calorimetría Diferencial de Barrido de A (Quitosán), B (CasIII-ia), C (CasIII-ia-Liofilizada), D (Mezcla Física-Liofilizada) y E (NP).

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

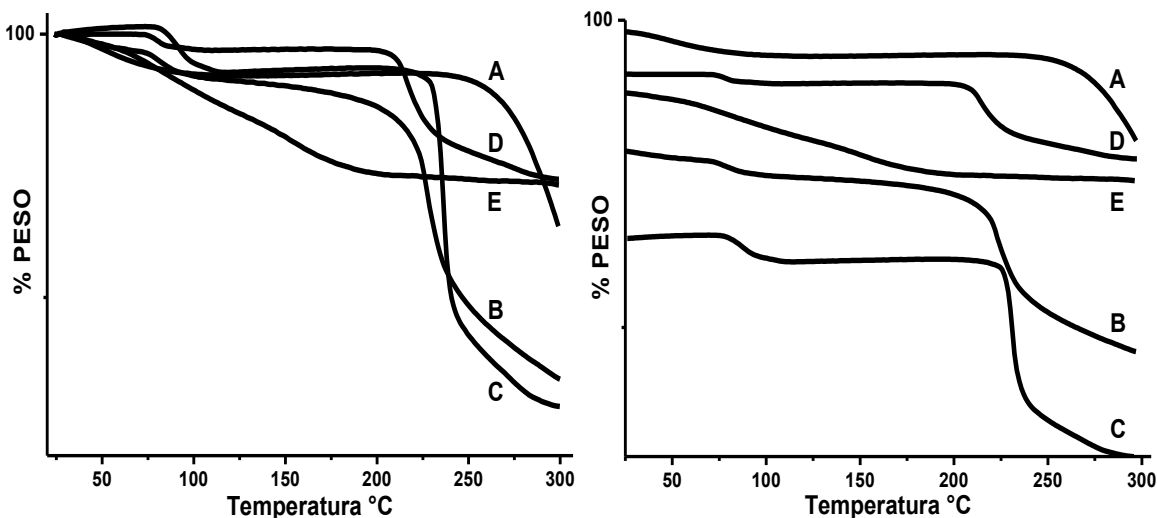


Figura 4.19. Curvas de Termogravimetría de **A** (Quitosán), **B** (CasIII-ia), **C** (CasIII-ia-Liofilizada), **D** (Mezcla Física-Liofilizada) y **E** (NP). La figura de la izquierda representa los datos normalizados con respecto al peso de cada muestra. La figura de la derecha muestra las gráficas separadas para mejor apreciación.

Por otra parte, la curva de DSC del quitosán (Figura 4.18 A) no muestra las típicas bandas anchas endotérmicas debidas a la evaporación de moléculas de agua por debajo de 100 °C, pero sí un pico exotérmico que indica el inicio de la descomposición que se presenta en la mayoría de los carbohidratos, la cual está presente en la curva de TG (figura 4.18 A) a partir de 250 °C. La curva de DSC de la Mezcla Física-Liofilizada (Figura 4.18 D) permite la observación de un solo pico exotérmico debido a la disociación de la CasIII-ia, lo cual nos indica que al parecer no hay interacción entre estas dos especies que implique la sustitución de alguno de los ligantes o el posible rompimiento del compuesto de coordinación, ya que en temperaturas menores o mayores a 225 °C no se observa la presencia de algún evento, de hecho la curva de TG (Figura 4.19 D) muestra los eventos correspondientes a la pérdida de agua de la CasIII-ia y a la disociación de la misma con la continua descomposición del quitosán. Sin embargo, cuando se lleva a cabo la formación de la NP, en la curva de DSC (Figura 4.18 E) los picos endo y exotérmicos característicos del fármaco desaparecen, en consecuencia se puede mencionar que el activo ha quedado incluido en el interior de la NP¹⁴¹. Adicionalmente en la curva de TG (Figura 4.19 E) se observa que las nanopartículas retienen agua en el interior, ya que se muestra una pendiente desde 60°C al iniciar el análisis y se mantiene hasta llegar a los 203°C, dicho comportamiento es característico cuando hay pérdida del solvente, en este caso agua.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.4. Espectroscopía de Infrarrojo

En la figura 4.20 se muestran los espectros de IR de los sistemas estudiados. La figura 4.20A señala el espectro del quitosán, en la cual se logra observar las bandas características de las vibraciones de los enlaces O-H en 3430 cm^{-1} , C-O-C en 1076 cm^{-1} y H-N-H en 1626 cm^{-1} , las cuales han sido descritas anteriormente¹³³. En la figura 4.20 B presenta el espectro de la Casiopeína III-ia y se observan las bandas características de las vibraciones de los enlaces N-H en 3474 cm^{-1} , NO_3 en 1384 cm^{-1} , aromáticos en 1587 cm^{-1} , bipyridina en 1490 cm^{-1} y -C=N en 1528 cm^{-1} .

Por otra parte se observa en la figura 4.17C el espectro resultante de la mezcla física entre el quitosán y la CasIII-ia. En esta ilustración se logra observar que las bandas características de la CasIII-ia permanecen visibles y no hay desplazamientos de los picos, por lo que se puede sostener que no hay una interacción que implique el rompimiento del compuesto de coordinación. A diferencia del comportamiento de la figura anterior, en la figura 4.20D se muestra el espectro de las NP y se observa que si hay un encapsulamiento de la CasIII-ia ya que las bandas presentes en la región de 1750 a 1250 cm^{-1} se ven traslapadas o bien como una sola banda de absorción¹³³.

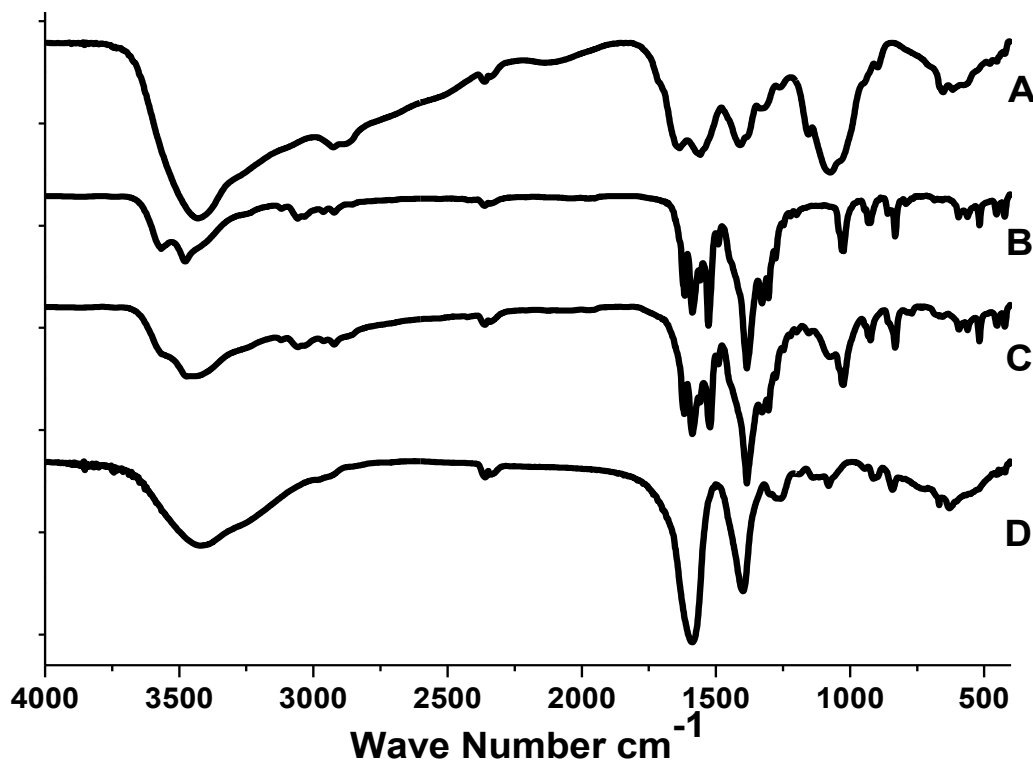


Figura 4.20. Espectros de infrarrojo de **A** (Quitosán), **B** (Casiopeína III-ia-Liofilizada), **C** (Mezcla Física-Liofilizada) y **D** (NP)

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los picos de la CasIII-ia, de 1384 cm^{-1} correspondiente a los movimientos vibracionales del los enlaces NO_3 y el pico de 1587 cm^{-1} de los grupos aromáticos, se traslapan pero no desaparecen, mientras que la banda de 1490 cm^{-1} de la biperidina desaparece. Así mismo el pico de 3430 cm^{-1} se hace más amplio indicando que hay un aumento de los enlaces de hidrógeno. Este comportamiento indica que el fármaco si se logra encapsular al darse la formación de las nanopartículas.

Las técnicas anteriores demostraron que el proceso de coacervación-precipitación es capaz de formar nanopartículas de quitosán en cuyo interior queda encapsulada parcialmente la CasIII-ia, dichos resultados son soportados ya que en cada caso las bandas características de la molécula activa o el polímero se ven modificadas a consecuencia del método de formación. Por ejemplo, la mezcla liofilizada permite la observación de los picos característicos de la CasIII-ia, lo cual nos indica que al parecer no hay completa disolución de la CasIII-ia en el quitosán. Sin embargo cuando se lleva a cabo la formación de la NP el pico característico del fármaco desaparece, en consecuencia se puede mencionar que el activo ha quedado incluido en el interior de la NP.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.Evaluación *in vivo* de las nanopartículas

La evaluación *in vivo* de las nanopartículas se realizó en ratones trasplantados con células de melanoma B16, en los cuales se evaluaron diferentes formulaciones. La tabla 4.9 detalla los resultados que arrojó el estudio.

En la tabla 4.10 se puede observar que en este estudio la formación de las nanopartículas mejora favorablemente el índice de supervivencia de los animales tratados, a diferencia de la administración del fármaco solo. Estos resultados demuestran la utilidad de formular moléculas de fármacos anticancerígenos en nanopartículas, las cuales pueden presentar el efecto EPR^{18,136} y permitir mejorar el efecto de las moléculas activas mediante mayores tiempos de residencia²³. Adicionalmente el quitosán es un polímero al cual se le atribuyen propiedades como promotor de la absorción y mucoadhesividad, promoviendo con ello el aumento de permeabilidad¹¹¹, además de que su pKa favorece la liberación en sitios con ambiente ácido como el caso de las células tumorales, las cuales presentan pH ácido por efecto de la acidosis provocada por la hipoxia celular⁷². Adicionalmente la Figura 4.21 muestra el peso de los ratones después de los tratamientos con el fármaco sólo, en nanopartículas y nanopartículas con ácido fólico. Los resultados indican que la adición de ácido fólico aumenta aún más esta respuesta ya que la ganancia en peso es menor que para los casos en que está el fármaco solo o en nanopartículas.

Tabla 4.10. Incremento de supervivencia de los ratones tratados con diferentes formulaciones de la Casiopeína III-ia.

Grupos	Formulaciones	INCREMENTO DE SUPERVIVENCIA (%)
1	Casiopeína III-ia en agua desionizada: 6 mg/kg qd 4x3 días: 1, 5 y 9	6.6
2	NP cargadas con Casiopeína III-ia: 6 mg/kg qd 4x3 días 1, 5 y 9	46.7
3	NP cargadas con Casiopeína III-ia + ácido fólico. 6 mg/kg qd 4x3 días 1, 5 y 9	54.5
4	Ciclofosfamida 50 mg/kg una aplicación.	28.74
5	Control (Agua desionizada)	0

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este efecto puede explicarse debido a que en las células tumorales el receptor para ácido fólico está sobre-expresado^{13,70,88,89}, en consecuencia hay mayor preferencia por esta molécula, contribuyendo con ello a que las partículas cargadas con la CasIII-ia alcancen de manera selectiva aquellas células las cuales quieren ser atacadas.

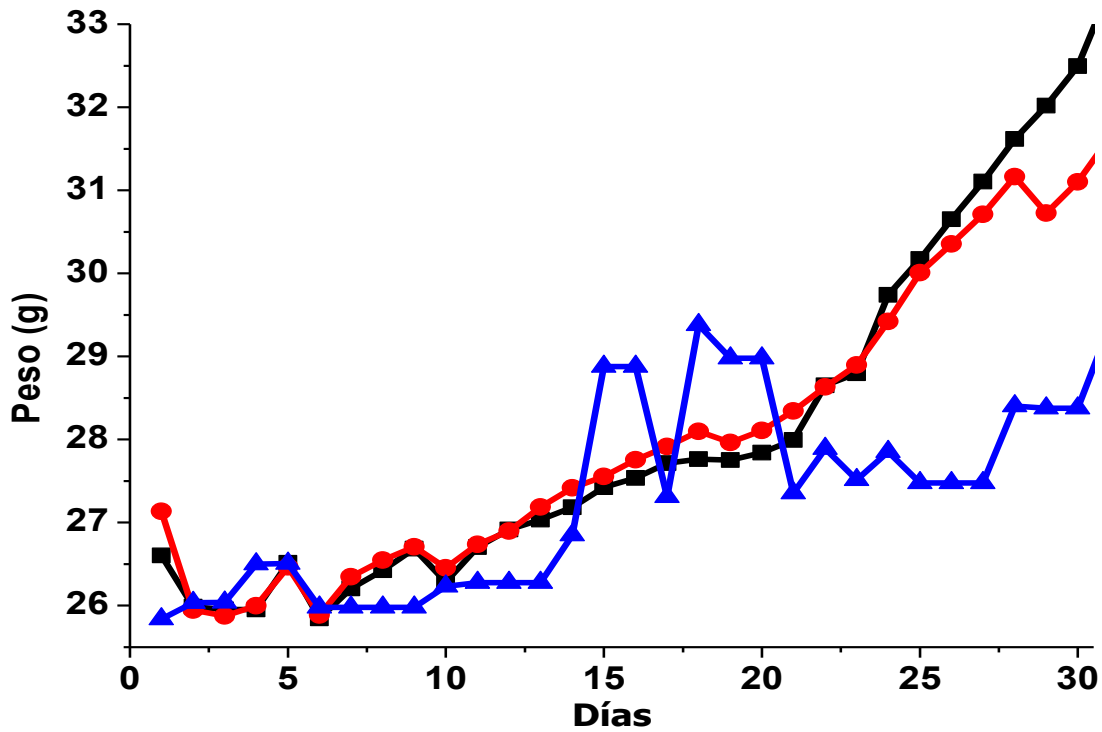


Figura 4.21. Peso promedio de los ratones con diferentes tratamientos después de ser implantados con el melanoma B16. (■) Cas III-ia sola, (●) NP (QS-CasIII-ia) y (▲) NP-AF (QS-CasIII-ia).

5

CONCLUSIONES
Y
PERSPECTIVAS

5
CONCLUSIONES
Y
PERSPECTIVAS

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que:

La respuesta biológica *in vivo* de la CasIII-ia formulada en nanopartículas es mayor en comparación a la molécula sola.

Las curvas de viscosidad de los sistemas CasIII-ia QS indican que existe interacción entre ambas moléculas las cuales son de tipo no covalente.

Los espectros de las CasIII-ia en la región del visible no aportan evidencia que indique su degradación por la presencia de quitosan en medio ácido.

Los espectros de la CasIII-ia obtenidos mediante EPR muestran que la esfera de coordinación no se ve afectada por la presencia de quitosan en medio ácido.

Los datos termodinámicos sugieren que la interacción que ocurre entre la CasIII-ia y el QS es mínima con respecto a otros sistemas Cu (II)-Qs.

La actividad *in vitro* de la CasIII-ia en la línea celular HeLa no se modifica por la presencia de quitosan o por las condiciones de preparación de NP

La técnica de coacervación es una alternativa para formar nanopartículas de quitosan encapsulando CasIII-ia.

La formación de nanopartículas de quitosán de tamaños de 100 a 300 nm, empleando el método de coacervación, se obtiene controlando la concentración del polímero (0.1 % p/v), concentración de estabilizante (0.1 % p/v), pH del medio (7.8-8.2) y velocidad de agitación (> 14 000 rpm).

Las técnicas de caracterización utilizadas confirman que la CasIII-ia se logra incluir en las NP cuando se preparan por el método de coacervación.

La administración de CasIII-ia en NP de quitosan aumenta el tiempo de sobrevida y disminuye la ganancia en peso con respecto a la administración de la CasIII-ia sola.

La preparación de NP cargadas con CasIII-ia, a partir del quitosan modificado con ácido fólico, aumenta el tiempo de sobrevida de ratones trasplantados con melanoma B16 y disminuye la ganancia en peso con respecto a las NP de quitosan.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.2. Perspectivas

La investigación científica es una actividad dinámica que está cambiando constantemente, por lo tanto, el trabajo presentado debe tener continuidad para complementar los aspectos que por alguna razón no se llevaron a cabo. Algunas de las actividades sugeridas son las siguientes:

- Realizar la cuantificación del fármaco en el tumor y órganos para definir su biodistribución.
- Realizar estudios de marcaje para comprobar la acumulación de fármaco en el tumor.
- Optimizar la reacción de conjugación entre el Quitosan y ácido fólico.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. W.H.O. 2009. Cancer. Health Topics, ed., USA: World Health Organization.
2. INEGI. 2011. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. ed., Mexico.
3. Thurston DE. 2007. Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs. ed.: Taylor and Francis.
4. W.H.O. 2012. Cancer. Health Topics, ed., USA: World Health Organization.
5. INEGI. 2012. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. ed., Mexico.
6. Tan ML, Choong PFM, Dass CR 2009. Cancer, chitosan nanoparticles and catalytic nucleic acids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61(1):3-12.
7. Priestman T. 2008. Cancer chemotherapy in clinical practice. ed., London: Springer-Verlag.
8. Wang V, Wu W 2009. MicroRNA-based therapeutics for cancer. *BioDrugs* 23(1):15-23.
9. Narang AS, Desai DS. 2009. Anticancer Drug Development. In Lu Y, Mahato RI, editors. *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, ed., New York: Springer Science.
10. Ortho Biotech P. 2010. Product information, Doxil®. ed.: Janssen Products, LP.
11. Rakesh K J 2001. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46(1-3):149-168.
12. Huang PS, Oliff A 2001. Drug-targeting strategies in cancer therapy. *Current Opinion in Genetics and Development* 11(1):104-110.
13. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L 2008. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(15):1615-1626.
14. Devalapally H, Chakilam A, Amiji MM 2007. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96(10):2547-2565.
15. Jonkman-de Vries JD, Flora KP, Bult A, Beijnen JH 1996. Pharmaceutical development of (investigational) anticancer agents for parenteral use - A review. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 22(6):475-494.
16. Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I 2005. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13(17):5043-5054.
17. Jones T, Saba N 2011. Nanotechnology and drug delivery: An update in oncology. *Pharmaceutics* 3(2):171-185.
18. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H 2006. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* 11(17-18):812-818.
19. Danhier F, Feron O, Préat V 2010. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release* 148(2):135-146.
20. Eugene R C 2010. Nanoparticles: A personal experience for formulating poorly water soluble drugs. *Journal of Controlled Release* 141(3):300-302.
21. Couvreur P, Vauthier C 2006. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research* 23(7):1417-1450.

22. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54(5):631-651.
23. Lukyanov AN, Elbayoumi TA, Chakilam AR, Torchilin VP 2004. Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody. *Journal of Controlled Release* 100(1):135-144.
24. Narang AS, Mahato RI. 2010. Targeted Delivery of Small and Macromolecular Drugs. ed., Boca Raton: CRC Press.
25. Couvreur P, Kante B, Grislain L 1982. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71(7):790-792.
26. Couvreur P, Kante B, Roland M, Speiser P 1979. Adsorption of antineoplastic drugs to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and their release in calf serum. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 68(12):1521-1524.
27. Kante B, Couvreur P, Dubois-Krack G 1982. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. I: Free nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71(7):786-790.
28. Couvreur P, Vauthier C 1991. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: Present state and perspectives. *Journal of Controlled Release* 17(2):187-198.
29. Gao K, Jiang X 2006. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 310(1-2):213-219.
30. Pacira P. 2010. Prescription Products, Depocyt®. ed., San Diego, CA: Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
31. Abraxis B. 2010. ABRAXANE® for Injectable Suspension. ed.: Celgene Corporation
32. Ruiz-Azuara L, Bravo-Gómez ME 2010. Copper compounds in cancer chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry* 17(31):3606-3615.
33. Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C 2009. Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 9(2):185-211.
34. Bravo-Gómez ME, García-Ramos JC, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L 2009. Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®). *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(2):299-309.
35. Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Marín-Hernández A, Ruiz-Azuara L, Moreno-Sánchez R 2006. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 215(2):208-217.
36. Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R 2003. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology* 65(12):1979-1989.
37. De Vizcaya-Ruiz A, Rivero-Müller A, Ruiz-Ramírez L, Howarth JA, Dobrota M 2003. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeína II. *Toxicology* 194(1-2):103-113.
38. Tovar-Tovar A, Ruiz-Ramírez L, Campero A, Romerosa A, Moreno-Esparza R, Rosales-Hoz MJ 2004. Structural and reactivity studies on 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (Casiopeína III-ia®) with methionine, by UV-visible and EPR techniques. *Journal of Inorganic Biochemistry* 98(6):1045-1053.

39. Serment-Guerrero J, Cano-Sanchez P, Reyes-Perez E, Velazquez-Garcia F, Bravo-Gomez ME, Ruiz-Azuara L 2011. Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes Casiopeinas®. *Toxicology in Vitro* 25(7):1376-1384.
40. Rivero-Müller A, De Vizcaya-Ruiz A, Plant N, Ruiz L, Dobrota M 2007. Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* 165(3):189-199.
41. Kachadourian R, Brechbuhl HM, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I, Day BJ 2010. Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology* 268(3):176-183.
42. Galindo-Murillo R, Hernandez-Lima J, González-Rendón M, Cortés-Guzmán F, Ruíz-Azuara L, Moreno-Esparza R 2011. π -Stacking between Casiopeinas® and DNA bases. *Physical Chemistry Chemical Physics* 13(32):14510-14515.
43. García-Ramos JC, Tovar-Tovar A, Hernández-Lima J, Cortés-Guzmán F, Moreno-Esparza R, Ruiz-Azuara L 2011. A new kind of intermolecular stacking interaction between copper (II) mixed chelate complex (Casiopeína III-ia) and adenine. *Polyhedron* 30(16):2697-2703.
44. Carvallo-Chaigneau F. 2007. Tesis Doctoral: Efectos antiproliferativos y apoptoticos de las Casiopeinas II-gli y III-ia en las lineas tumorales humanas. Veterinaria, ed., México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
45. Carvallo-Chaigneau F, Trejo-Solís C, Gómez-Ruiz C, Rodríguez-Aguilera E, Macías-Rosales L, Cortés-Barberena E, Cedillo-Peláez C, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Madrid-Marina V, Constantino-Casas F 2008. Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *BioMetals* 21(1):17-28.
46. Leal-García M, García-Ortuño L, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I, Luna-Delvillar J, Sumano H 2007. Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopeinas in anaesthetized dogs. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 101(3):151-158.
47. Feynman RP 1992. There's plenty of room at the bottom. *Journal of Microelectromechanical Systems* 1(1):60-66.
48. Drexler KE 1981. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(9 D):5275-5278.
49. Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit DB, Oberdorster E 2006. The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* 3.
50. Jain K. 2007. Role of Nanobiotechnology in the Development of Nanomedicine. In Thassu D, Deleers M, Pathak Y, editors. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*, ed., New York: Informa Healthcare. p 173-183.
51. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC 2005. Nanomedicine: Current status and future prospects. *FASEB Journal* 19(3):311-330.
52. Ruenaroengsak P, Cook JM, Florence AT 2010. Nanosystem drug targeting: Facing up to complex realities. *Journal of Controlled Release* 141(3):265-276.
53. Pathak Y, Thassu D, Deleers M. 2007. Pharmaceutical Applications of Nanoparticulate Drug-Delivery Systems. In Thassu D, Deleers M, Pathak Y, editors. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*, ed., New York: Informa Healthcare. p 185-212.

54. Vauthier C, Bouchemal K 2009. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 26(5):1025-1058.
55. Mishra B, Patel BB, Tiwari S 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6(1):9-24.
56. Ravi Kumar MNV, Kumar N, Domb AJ, Arora M. 2002. Pharmaceutical polymeric controlled drug delivery systems. *Advances in Polymer Science*, ed. p 45-117.
57. Panyam J, Labhasetwar V 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55(3):329-347.
58. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN 2010. Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58(11):1423-1430.
59. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100(1):5-28.
60. Prabakaran M, Mano JF 2005. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents* 12(1):41-57.
61. Jyothi NVN, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation* 27(3):187-197.
62. Nam HY, Kwon SM, Chung H, Lee SY, Kwon SH, Jeon H, Kim Y, Park JH, Kim J, Her S, Oh YK, Kwon IC, Kim K, Jeong SY 2009. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 135(3):259-267.
63. Desgouilles S, Vauthier C, Bazile D, Vacus J, Grossiord JL, Veillard M, Couvreur P 2003. The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study. *Langmuir* 19(22):9504-9510.
64. Jaiswal J, Gupta SK, Kreuter J 2004. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. *Journal of Controlled Release* 96(1):169-178.
65. Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Doelker E, Fessi H 1998. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research* 15(7):1056-1062.
66. Song CX, Labhasetwar V, Murphy H, Qu X, Humphrey WR, Shebuski RJ, Levy RJ 1997. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release* 43(2-3):197-212.
67. Vandervoort J, Ludwig A 2002. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: A factorial design study. *International Journal of Pharmaceutics* 238(1-2):77-92.
68. Shekunov BY, Chattopadhyay P, Seitzinger J, Huff R 2006. Nanoparticles of poorly water-soluble drugs prepared by supercritical fluid extraction of emulsions. *Pharmaceutical Research* 23(1):196-204.
69. Owens III DE, Peppas NA 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 307(1):93-102.
70. Brannon-Peppas L, Blanchette JO 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(11):1649-1659.

71. Duceppe N, Tabrizian M 2010. Advances in using chitosan-based nanoparticles for in vitro and in vivo drug and gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 7(10):1191-1207.
72. Pouysségur J, Dayan F, Mazure NM 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441(7092):437-443.
73. Pradhan P, Giri J, Rieken F, Koch C, Mykhaylyk O, Döblinger M, Banerjee R, Bahadur D, Plank C 2010. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *Journal of Controlled Release* 142(1):108-121.
74. Anya M. Hillery, Andrew W. Lloyd, Swarbrick J. 2001. *Drug Delivery and Targeting*. ed., London and New York: Taylor & Francis Inc.,.
75. Molema Grietje, F. MDK. 2001. *Drug Targeting Organ-Specific Strategies*. ed., Federal Republic of Germany: WILEY-VCH.
76. Kim IS, Lee SK, Park YM, Lee YB, Shin SC, Lee KC, Oh IJ 2005. Physicochemical characterization of poly(l-lactic acid) and poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier. *International Journal of Pharmaceutics* 298(1):255-262.
77. Bae Y, Jang WD, Nishiyama N, Fukushima S, Kataoka K 2005. Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Molecular BioSystems* 1(3):242-250.
78. Kumar S, Li C 2001. Targeting of vasculature in cancer and other angiogenic diseases. *Trends in Immunology* 22(3):129.
79. Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, Eliceir BP, Reisfeld RA 2002. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nature Medicine* 8(12):1369-1375.
80. Backer MV, Gaynutdinov TI, Patel V, Bandyopadhyaya AK, Thirumamagal BTS, Tjarks W, Barth RF, Claffey K, Backer JM 2005. Vascular endothelial growth factor selectively targets boronated dendrimers to tumor vasculature. *Molecular Cancer Therapeutics* 4(9):1423-1429.
81. Roy R, Yang J, Moses MA 2009. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27(31):5287-5297.
82. Vihinen P, Kähäri VM 2002. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *International Journal of Cancer* 99(2):157-166.
83. Gosk S, Moos T, Gottstein C, Bendas G 2008. VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1778(4):854-863.
84. Scallon BJ, Snyder LA, Mark Anderson G, Chen Q, Yan L, Weiner LM, Nakada MT 2006. A review of antibody therapeutics and antibody-related technologies for oncology. *Journal of Immunotherapy* 29(4):351-364.
85. Grünwald V, Hidalgo M 2003. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute* 95(12):851-867.
86. Mendelsohn J, Baselga J 2003. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology* 21(14):2787-2799.

87. Wu J, Lu Y, Lee A, Pan X, Yang X, Zhao X, Lee RJ 2007. Reversal of multidrug resistance by transferrin-conjugated liposomes co-encapsulating doxorubicin and verapamil. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 10(3):350-357.
88. Wu J, Liu Q, Lee RJ 2006. A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* 316(1-2):148-153.
89. Pan J, Feng S-S 2008. Targeted delivery of paclitaxel using folate-decorated poly(lactide) vitamin E TPGS nanoparticles. *Biomaterials* 29(17):2663-2672.
90. Muzzarelli RAA 1983. Chitin and its derivatives: New trends of applied research. *Carbohydrate Polymers* 3(1):53-75.
91. Singla AK, Chawla M 2001. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects - An update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53(8):1047-1067.
92. Khor E, Lim LY 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24(13):2339-2349.
93. Illum L 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research* 15(9):1326-1331.
94. Kean T, Thanou M 2010. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(1):3-11.
95. Bilensoy E 2010. Cationic nanoparticles for cancer therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery* 7(7):795-809.
96. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R 2004. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57(1):35-52.
97. Davidenko N, Blanco MD, Peniche C, Becheran L, Guerrero S, Teijan JM 2009. Effects of different parameters on the characteristics of Chitosan-Poly(acrylic acid) nanoparticles obtained by the method of coacervation. *Journal of Applied Polymer Science* 111(5):2362-2371.
98. Rinaudo M 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 31(7):603-632.
99. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC 2010. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(1):28-41.
100. Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews* 104(12):6017-6084.
101. Kjoniksen AL, Nyström B, Nakken T, Palmgren O, Tande T 1997. Effect of surfactant concentration, pH, and shear rate on the rheological properties of aqueous systems of a hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue. *Polymer Bulletin* 38(1):71-79.
102. Barnes HA. 2000. *A Handbook of Elementary Rheology*. First Edition ed., Penglais, Aberystwyth, Dyfed, Wales, SY23 3BZ: University of Wales, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics
103. Mucha M 1997. Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics* 198(2):471-484.
104. Mucha M 1998. Rheological properties of chitosan blends with poly(ethylene oxide) and poly(vinyl alcohol) in solution. *Reactive and Functional Polymers* 38(1):19-25.

105. Nyström B, Kjoniksen A-L, Iversen C 1999. Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. *Advances in Colloid and Interface Science* 79(2-3):81-103.
106. Sakurai K, Maegawa T, Takahashi T 2000. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer* 41(19):7051-7056.
107. Kristmundsdottir T, Ingvarsdottir K, Saemundsdottir G 1995. Chitosan matrix tablets: The influence of excipients on drug release. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 21(13):1591-1598.
108. Gupta KC, Ravi Kumar MNV 2000. An overview on chitin and chitosan applications with an emphasis on controlled drug release formulations. *Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews* 40(4):273-308.
109. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S 2004. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 274(1-2):1-33.
110. Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE 2001. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 52(2):117-126.
111. Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate JA, DeBoer AG, Vårum KM, Artursson P 1997. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharmaceutical Research* 14(7):923-929.
112. Bozkir A, Saka OM 2004. Chitosan-DNA nanoparticles: Effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency. *Journal of Drug Targeting* 12(5):281-288.
113. Mitra S, Gaur U, Ghosh PC, Maitra AN 2001. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *Journal of Controlled Release* 74(1-3):317-323.
114. Ta HT, Dass CR, Larson I, Choong PFM, Dunstan DE 2009. A chitosan-dipotassium orthophosphate hydrogel for the delivery of Doxorubicin in the treatment of osteosarcoma. *Biomaterials* 30(21):3605-3613.
115. Mansouri S, Cuie Y, Winnik F, Shi Q, Lavigne P, Benderdour M, Beaumont E, Fernandes JC 2006. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials* 27(9):2060-2065.
116. Kaloti M, Bohidar HB 2010. Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81(1):165-173.
117. Remuñán-López C, Bodmeier R 1996. Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. *International Journal of Pharmaceutics* 135(1-2):63-72.
118. Zheng Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S, Dong L, Wu L, Shen X 2007. Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67(3):621-631.
119. Kjoniksen AL, Nyström B, Iversen C, Nakken T, Palmgren O, Tande T 1997. Viscosity of dilute aqueous solutions of hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue at different conditions of salt and surfactant concentrations. *Langmuir* 13(19):4948-4952.

120. Morris ER, Cutler AN, Ross-Murphy SB, Rees DA, Price J 1981. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers* 1(1):5-21.
121. Díaz-Rivero. 2012. In Press: Tesis de Licenciatura. Química Inorgánica y Nuclear, ed., México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
122. Dambies L, Guimon C, Yiacoumi S, Guibal E 2001. Characterization of metal ion interactions with chitosan by X-ray photoelectron spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 177(2-3):203-214.
123. Connors KA. 2002. Thermodynamics of pharmaceutical systems. ed., New Jersey: Wiley Interscience.
124. Lima IS, Airoidi C 2004. A thermodynamic investigation on chitosan-divalent cation interactions. *Thermochimica Acta* 421(1-2):133-139.
125. Monteiro Jr OAC, Airoidi C 1999. Some Thermodynamic Data on Copper-Chitin and Copper-Chitosan Biopolymer Interactions. *Journal of Colloid and Interface Science* 212(2):212-219.
126. Monteiro Jr OAC, Airoidi C 2005. The influence of chitosans with defined degrees of acetylation on the thermodynamic data for copper coordination. *Journal of Colloid and Interface Science* 282(1):32-37.
127. Kabra K, Chaudhary R, Sawhney RL 2008. Solar photocatalytic removal of Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Pb(II): Speciation modeling of metal citric acid complexes. *Journal of Hazardous Materials* 155(3):424-432.
128. Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Gómez-Ruiz C, Tinoco-Méndez M, Márquez-Quiñones A, Lira LRD, Marín-Hernández A, Macías-Rosales L, Bravo-Gómez ME 2001. Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeinas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Metal-Based Drugs* 8(1):19-28.
129. Zheng Y, Yi Y, Qi Y, Wang Y, Zhang W, Du M 2006. Preparation of chitosan-copper complexes and their antitumor activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16(15):4127-4129.
130. Vold IMN, Varum KM, Guibal E, Smidsrod O 2003. Binding of ions to chitosan - Selectivity studies. *Carbohydrate Polymers* 54(4):471-477.
131. Hurley RB, Testa AC 1970. Triplet yield determinations at high concentrations of cis-piperylene. *Journal of the American Chemical Society* 92(1):211-212.
132. Janciauskaite U, Makuska R 2009. Cationic polyelectrolytes from natural building blocks of chitosan and inulin. *Reactive and Functional Polymers* 69(5):300-305.
133. Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S 2005. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics* 295(1-2):235-245.
134. Katas H, Alpar HO 2006. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release* 115(2):216-225.
135. Maeda H 2001. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation* 41(1):189-207.
136. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* 65(1-2):271-284.

137. Chavanpatil M, Khdair A, Panyam J 2007. Surfactant-polymer Nanoparticles: A Novel Platform for Sustained and Enhanced Cellular Delivery of Water-soluble Molecules. *Pharmaceutical Research* 24(4):803-810.
138. Il'ina AV, Varlamov VP 2005. Chitosan-based polyelectrolyte complexes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41(1):5-11.
139. Matteucci ME, Hotze MA, Johnston KP, Williams RO 2006. Drug Nanoparticles by Antisolvent Precipitation: Mixing Energy versus Surfactant Stabilization. *Langmuir* 22(21):8951-8959.
140. Webster A, Halling MD, Grant DM 2007. Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative. *Carbohydrate Research* 342(9):1189-1201.
141. Sairam M, Babu VR, Naidu BVK, Aminabhavi TM 2006. Encapsulation efficiency and controlled release characteristics of crosslinked polyacrylamide particles. *International Journal of Pharmaceutics* 320(1-2):131-136.

7. ANEXOS

7.1. Artículo publicado

Carbohydrate Research 346 (2011) 121–126



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carres

Characterization of physical interaction between Casiopeina III-ia and chitosan. Toward a Cas III-ia drug delivery system

J. E. Miranda-Calderón^a, L. Medina-Torres^b, M. Tinoco-Mendez^c, R. Moreno-Esparza^d, L. Ruiz-Ramírez^d, J. Gracia-Mora^d, I. Gracia-Mora^c, M. J. Bernad-Bernad^{c,*}

^a Depto. Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México DF 04510, México

^b Depto. Polímeros, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Edificio F Oficina 001, Planta baja, Ciudad Universitaria, México DF 04510, México

^c Unidad de Experimentación Animal, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México DF 04510, México

^d Depto. Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México DF 04510, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2010

Received in revised form 28 June 2010

Accepted 6 July 2010

Available online 17 November 2010

Keywords:

Cancer

Chitosan

Casiopeínas[®]

Copper interaction

Preformulation

ABSTRACT

Casiopeínas[®] are a new generation of anticancer drugs that have shown great *in vitro* and *in vivo* antineoplastic activities. Information about interaction drug-excipient, for developing a based-nanoparticle drug delivery system, has not been investigated yet. In order to elucidate if chitosan (CS) modifies the copper complex due to its interaction with Cu²⁺ ion, different studies in aqueous media between CS and Casiopeina III-ia (Cas III-ia) were carried out. CS–Cas III-ia mixtures were characterized by viscosity curves, UV–vis, EPR, and *in vivo* activity against HeLa cell line. Rheological behavior showed a decrease of viscosity when the drug was present due to diminished electrostatic interactions of charged amine group. UV–vis results illustrate that Cas III-ia is not stable at low pH as a result of interaction with acetic acid. However, when chitosan is present at the acidic solution Cas III-ia is stable. These results are supported by EPR studies. Finally, activity of the drug against HeLa cell line was not modified. Therefore, the present work presents evidence that there is no breaking of copper complex due to interaction between CS and Cas III-ia in acidic media. In addition, Cas III-ia maintains both its stability and effectiveness against cancer cell line.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In cancer therapy, most of the conventional chemotherapy is not always successful; it releases the anticancer drug into both tumor and normal cells. Nanoparticles are carriers for conventional drugs¹ as well as for peptides and proteins, enzymes, vaccines, or antigens and they can enhance bioavailability by longer circulation times compared with the free drug alone, which means that they can improve tumor uptake; moreover, they have been shown to accumulate more readily in tumors.^{2,3} For example, doxorubicin, a potent anticancer drug associated with cardiotoxicity and low oral bioavailability, was loaded into nanoparticles demonstrating superior performance *in vivo*, versus the drug alone, characterized by a sustained release (80%) for 24 days, with evidently enhanced bioavailability and lower toxicity.⁴

Pt-compounds have been used for cancer treatment with good results.^{5,6} A major feature of these compounds is the transition metal, which has been a key to synthesize more anticancer drugs.^{5,7} Casiopeínas[®] are a new generation of anticancer agents which are coordination complexes with copper as metallic center.^{7,8} The

design of the molecules was made considering several factors such as: the compounds should contain an essential metal in order to diminish toxicity; they should include chelates that favor the cis-configuration around the metal ion and also render more stable complexes; and finally the mixed chelate must possess different levels of hydrophobicity.⁷ Many of these molecules have shown greater antineoplastic potency than cisplatin *in vitro* and *in blank vivo* studies of a variety of tumor cell lines.^{7,9} Casiopeina III-ia [Cu(4,4'-dimethyl 2,2'-bipyridine) (acetylacetonate)]NO₃ (Cas III-ia) is one of the most studied and it has a promising future as anticancer drug.¹⁰

In spite that the mechanism of action is poorly understood, it has been reported that this copper complex is toxic probably due to their high potential to participate in redox reactions which could cause apoptosis in cells.¹⁰ Additionally, the effects of Cas-III-ia in an *in vitro* study were evaluated and it was found that the drug reduced the viability and induced necrosis and apoptosis, while in an *in vivo* study it was shown that it diminishes the proliferation of tumor cells, so it is capable to increase the number of days in doubling size and to reduce the mitotic index at the higher dose administered.¹¹

Nevertheless, as it is the case in other metallic drugs Casiopeínas[®] have to maintain their structure to show activity, that is, they

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223849; fax: 52 55 56162010.

E-mail address: bernad@comunidad.unam.mx (M.J. Bernad-Bernad).

have to penetrate into the cells without being dissociated.^{6,12} A study demonstrates that the isolated 5-FU-cisplatin adducts are not as effective antitumor agents as when they are used in combination.¹³ A coordination complex-like Casiopeina could be broken by substitution of some of its ligands before it gets its target; in other words, it can show instability in living systems. To avoid this, it is necessary to employ a drug delivery system (DDS), since a DDS frequently contains a polymer that modulates the release of the drug. Such is the case of chitosan (CS), a biodegradable¹⁴ natural polysaccharide, N-deacetylated derivative of chitin, which can be obtained from crustaceans, insects, fungi, etc. Chitosan (CS) is an important polymer with –OH and –NH₂ groups which can interact with several metals^{15–18} and is of interest for drug delivery.¹⁹ This polymer has been widely used as a micro and nanoparticle vehicle.^{20–22} Compared to many other natural polymers chitosan when dissolved presents a positive charge due to protonation of the amine group. The primary amine groups render special properties that make CS very useful (it can be dissolved easily) in pharmaceutical applications.²² Due to the fact that CS is very efficient in binding some transition metals, the study of Cu²⁺ complexation processes with chitosan is important because of its potential applications in metal recovery and purification,¹⁸ pharmacy,¹⁶ catalysis,¹⁷ etc.

Copper sorption on chitosan flakes has been the subject of some studies. Several ways of complexation have been proposed to explain its accumulation on nitrogen sites. However, this process is very pH dependent. The lower the pH the lesser is the copper retained. This can be explained in terms of the generally accepted fact that copper binds to nitrogen with the formation of a single bond, without inter- or intra-molecular coordination, and thus the copper ions form a pendant complex with amine sites, without reduction of the metal,^{17,23} if these sites are protonated, the copper cannot bind. Using it in solution increases the accessibility to reactive sites and their availability making binding easier than in solid state.^{16,17}

Then, a casiopeina-loaded chitosan DDS will be developed in order to obtain a good delivering system for these drugs. Therefore, it is important to investigate if CS modifies Casiopeina due to interaction of amine or hydroxy groups with Cu²⁺. To study the stability of the drug, the interaction of Cas III-ia with chitosan was studied at pH 3.8–4.3 media, and we have examined the behavior of the metal complex with CS using rheology, UV–vis spectroscopy, electronic paramagnetic resonance, and in vitro activity.

2. Experimental

2.1. Materials

All reagents were used without further purification or treatment. Copper complex, ([Cu(4,4'-dimethyl 2,2'-bipyridine)(acetylacetonate)]NO₃ (Cas III-ia NO₃)), was provided by Dr. M. E. Bravo-Gómez (UNAM). Acetic acid and chitosan were purchased from Sigma–Aldrich (México). Deionized water was obtained from NANOpure Diamond System™ (Barnstead).

2.2. Methods

2.2.1. Rheological measurements

Different concentrations (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, and 0.7%, w/v) of CS solutions were prepared by dissolving chitosan in deionized water with glacial acetic acid.

CS systems were prepared as mentioned above; after chitosan solutions were prepared, to each solution the same amount of Cas III-ia (10 mg/mL) was added and dissolved. The measured pH of the homogenized solution was 4.1–4.3. All the rheological measurements were performed in a stress-controlled rheometer model TA-

Instruments AR-2000 using a double-concentric-cylinder geometry and a temperature control bath (Haake, Germany, FT). The solutions were characterized regarding their steady shear viscosity function, $\eta(\dot{\gamma})$, using a unidirectional steady shear flow, with shear rates ranging from 0.1 to 1000 s⁻¹. All samples were tested out at 25 and 37 °C at least twice.

2.2.2. UV–vis

Cas III-ia concentration was kept constant in all experiments. In the first set of experiments, the pure drug was dissolved in deionized water and aqueous acetic acid 1% v/v to get a final concentration of 5 mM of the drug. On the other hand Cas III-ia–CS systems were prepared as follows: chitosan solutions with different concentrations of monomer (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, and 40 mM) were prepared dissolving the proper amount of chitosan in deionized water with acetic acid from 1.4 to 111.6 mM and to these solutions Cas III-ia was added and dissolved. Experiments were performed at 20, 25, 30, 37 and 40 °C, using an Ocean Optics Spectrophotometer S2000 and all the measurements were performed at 610 nm.

2.2.3. EPR studies

All the solutions employed were prepared as mentioned above and all spectra were measured in an ELEXSYS E500 magnet spectrometer working at X-band frequency (9.5 GHz). All the measurements were performed in solution at room temperature at the same conditions.

2.2.4. In vitro activity

In vitro activity evaluation was carried out as previously described by Gracia-Mora et al.⁷ Briefly, HeLa cells were cultured in RPMI Medium supplemented with 10% FBS, 1% antibiotics, and 1% amino acids, at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere, until subconfluent phase was reached and further harvested with a 0.01% trypsin–EDTA solution. HeLa cells were seeded in 96-well plates and then treated separately with our samples for 24 h and measured as described by Skehan et al.²⁴ Cultures were fixed with 10% trichloroacetic acid and stained for 30 min with 0.4% (wt/vol) sulforhodamine B (SRB) (Sigma Chemical Co.) dissolved in 1% acetic acid. Unbound dye was removed by washes with 1% acetic acid, and protein-bound dye was extracted with 10 mM unbuffered Tris base [tris (hydroxymethyl) amino methane] to determine optical density in a 96-well μ L plate reader at 564 nm.

3. Results

3.1. Steady shear flow measurements

Typical viscosity curves for CS and CS–Cas III-ia solutions in acid media, as a function of the concentration at 25 °C, are shown in Figure 1.

Due to the fact that plots of viscosity vs shear rate present a newtonian behavior at low shear rates followed by a shear thinning region (which often takes the form of a power law straight line on logarithmic axes), the experimental data were analyzed using the Ostwald-de Waele ($R^2 < 0.9$) model and Cross model ($R^2 > 0.95$).

Cross model was found to be the most appropriate to fit the flow curves of CS and CS–Cas III solutions at all concentrations.

The Ostwald-de Waele model is expressed by:

$$\eta = k\dot{\gamma}^{n-1} \quad (1)$$

where η is the shear viscosity (Pa s), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s⁻¹), k is the consistency index (Pa s^{*n*}), and n is the fluid behavior index (dimensionless).

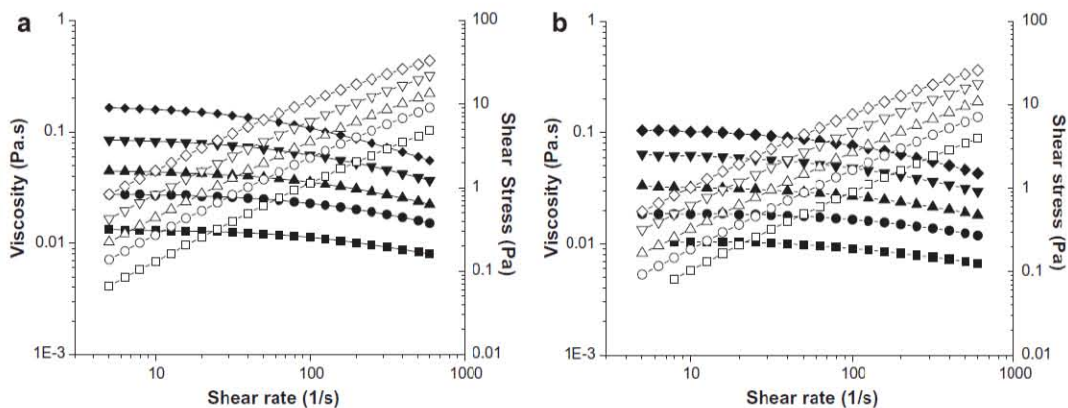


Figure 1. Flow curves of chitosan aqueous solutions with acetic acid at 25 °C (a) and 37 °C (b). Viscosity values in black symbols and shear stress in open symbols. ■ □ 0.1% w/v, ● ○ 0.2% w/v, ▲ △ 0.3% w/v, ▼ ▽ 0.5% w/v, and ◆ ◇ 0.7% w/v. Solid lines represent viscosity predictions from the Cross model.

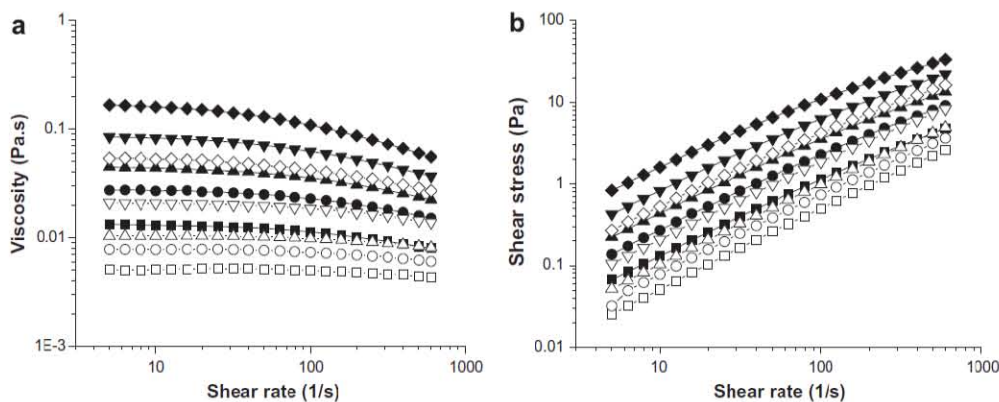


Figure 2. Flow curves (a and b) of different Chitosan concentrations in water and Cas III-ia-CS systems with drug constant at 25 °C. Pure chitosan ■ 0.1% w/v, ● 0.2% w/v, ▲ 0.3% w/v, ▼ 0.5% w/v and ◆ 0.7% w/v. Chitosan. Cas III-ia □ 0.1% w/v, ○ 0.2% w/v, △ 0.3% w/v, ▽ 0.5% w/v, and ◇ 0.7% w/v.

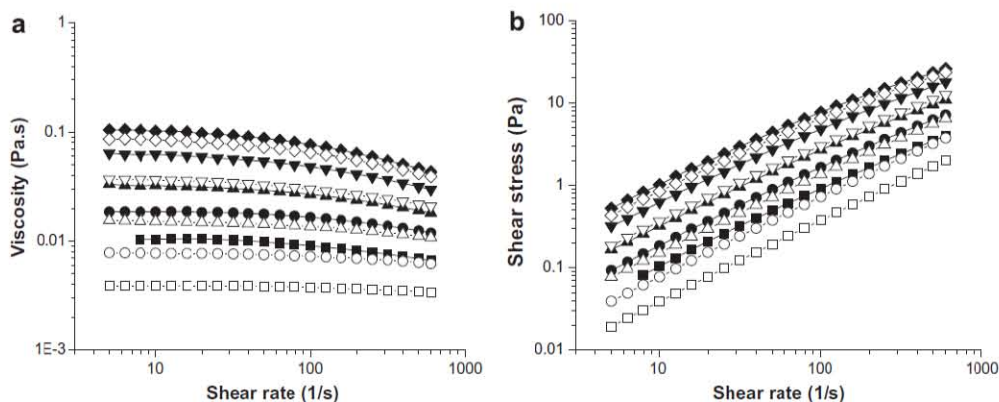


Figure 3. Flow curves (a and b) of different Chitosan concentrations in water and Cas III-ia-CS systems with drug constant at 37 °C. Pure chitosan ■ 0.1% w/v, ● 0.2% w/v, ▲ 0.3% w/v, ▼ 0.5% w/v and ◆ 0.7% w/v. Chitosan. Cas III-ia □ 0.1% w/v, ○ 0.2% w/v, △ 0.3% w/v, ▽ 0.5% w/v, and ◇ 0.7% w/v.

And, Cross model is expressed by:

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{1 + (\lambda \dot{\gamma})^m} \quad (2)$$

where η is the shear viscosity (Pa s), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s^{-1}), λ is the characteristic time (s), m is the flow index [$m = 1 - n$] (dimensionless), and η_0 and η_{∞} are the asymptotic viscosities at low shear rate and high shear rate, respectively.

Eq. 2 has been found to represent correctly the macromolecular solutions of polysaccharides. Although higher concentrations obey the Ostwald-de Waele (power-law relationship)^{25,26} this was not the case.

CS dissolutions show a concentration-dependent viscosity. At concentrations lower than 0.1% (w/v) they behave as a simple Newtonian fluid (data not shown); on the other hand, concentrations from 0.1% to 0.7% w/w perform as shear-thinning fluid; this means that their viscosity decreases as the rate of deformation increases.

When Cross model is used to describe non-Newtonian liquids, the degree of shear thinning is dictated by the value of m . When m tends to zero the equation describes more Newtonian liquids, while the most shear-thinning liquids have a value of m tending to unity. In this case, the parameter m changes from 0.755 to 0.834 as concentration increases from 0.1% to 0.7% describing important changes in pseudoplasticity levels.²⁷

Figures 2 and 3 compare CS and CS-Cas III-ia solutions (Figs. 2 and 3) with the same concentration of CS at 25 °C and 37 °C, respectively. In both temperatures the observed viscosity was smaller for systems including the drug. This behavior is in agreement with the general knowledge of the viscosity and their ascent is much larger in the absence than in the presence of a salt. In these cases, the statistical analysis of the viscosity shows that there are significant differences ($P < 0.01$).

Analysis of these curves indicates that viscosities of both CS and CS-Cas III-ia are constant at low-enough shear rates and tend to decrease to a constant value at high-enough shear rates, showing two regions. These two Newtonian regions are usually indicated as lower and upper Newtonian plateaus, respectively, according to Cross model of viscosity.²⁸ On the other hand, data at 25 °C and 37 °C seem to indicate that the higher the temperature the lower is the viscosity. This behavior was observed in all samples including CS or CS-Cas III-ia solutions.

3.2. UV-vis

Spectroscopic experiments in the UV-vis region were performed in order to investigate the interaction between chitosan and Cas III-ia (Figs. 4–6). Figure 4 displays a Cas III-ia characteristic spectrum of a Cu^{2+} coordination compound, showing a broad band at 620 nm typical of the d-d transitions and a shoulder of a charge transfer band around 400 nm.

3.2.1. Acetic acid effect

Spectra of Cas III-ia aqueous solution and Cas III-ia acetic acid aqueous solution are compared at 25 °C (Fig. 5). It can be seen that acetic acid modifies the coordination compound; both charge transfer and the d-d transitions band are displaced, clearly reflecting the modification of the coordination sphere of the cation. On the other hand, this effect is influenced by temperature; the higher the temperature the more pronounced is the change.

3.2.2. Chitosan influence

The spectra obtained for these mixtures are shown in Figure 6. One broad band around 610 nm and a shoulder around 400 nm are also observed; however, aqueous spectra of Cas III-ia with neutral

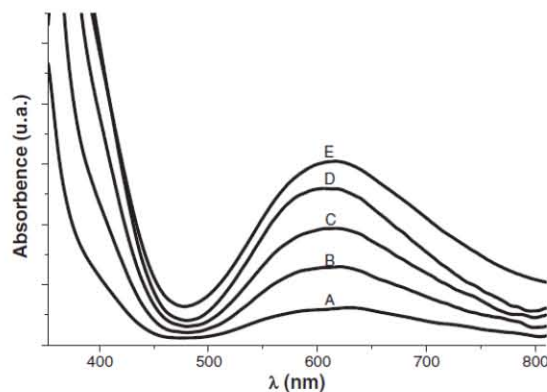


Figure 4. UV-vis spectra of Cas III-ia in aqueous solution at different molar concentrations. A (1 mM) B (2 mM), C (3 mM), D (4 mM), and E (5 mM).

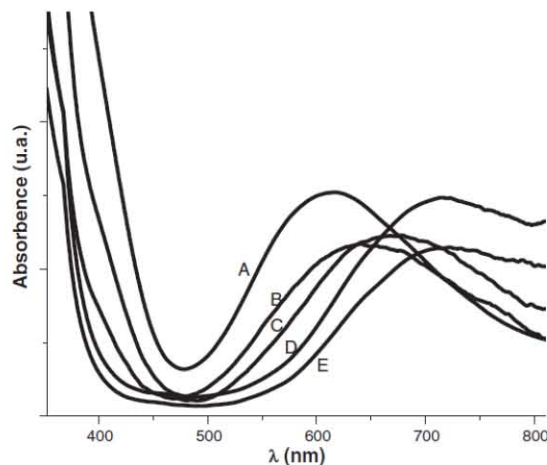


Figure 5. UV-vis spectra of Cas III-ia in the presence of acetic acid (AA) at different concentrations and chloride acid (HCl) 1 M. A (alone) B (AA 0.1 M), C (AA 1 M), D (HCl 1 M + AA 1 M), and E (HCl 1 M).

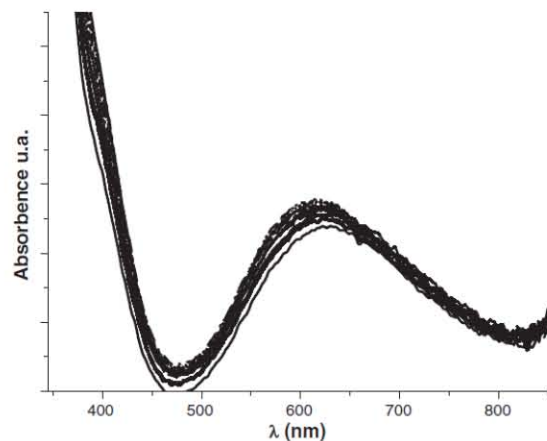


Figure 6. UV-vis spectra of Cas III-ia in aqueous solution (5 mM) and Cas III-ia-CS (from 0.5 to 40 mM monomer) in aqueous solution with acetic acid.

Table 1
K values calculated and some thermodynamic parameters obtained from Vant Hoff equation

Temperature (K)	293.15	298.15	303.15	310.15
$K_{1:1}$ (M^{-1})	193.65	246.39	290.04	355.81
ΔG (kJ/mol)	-12.83	-13.65	-14.29	15.14
ΔH (kJ/mol)	26.64	26.64	26.64	26.64
ΔS (J/mol K)	134.95	134.95	134.95	134.95

pH and Cas III-ia-CS in acid media are similar. These facts suggest that acetic acid reacts only with chitosan while the drug seems to remain unchanged. Once chitosan is in excess, the absorbance of the Cas III-ia spectrum is slightly modified, indicating that there are some possible weak interactions between the copper complex and the CS, but they are clearly different from those presented for the complex without chitosan in acid media.

3.2.3. Thermodynamic parameters

In order to characterize CS-Cas III-ia interaction, spectra of both CS and CS-Cas III-ia in solution were measured at several temperatures. We have assumed a 1:1 stoichiometric mode for the adduct, using the Benesi-Hildebrand plot to get $K_{1:1}$. The binding constant was obtained using the measured absorbance at 610 nm. In the studied region, the observed association constant was somewhat small. The thermodynamic parameters (ΔH and ΔS) were obtained using the Vant Hoff equation. These parameters and $K_{1:1}$ are recorded in Table 1.

3.3. EPR studies

Spectra of free Cas III-ia, and in the presence of CS, are shown in Figure 7. Their EPR spectra at room temperature exhibited at low field a set of four hyperfine (HF) lines, corresponding to the interaction of the electron with the Cu ion (nuclear spin 1-3/2).

The presence of CS does not modify the drug EPR spectrum. These results support that the drug remains stable in spite of the presence of the CS.

3.4. In vitro activity

To evaluate the cell growth inhibition profile of our samples, a human cancer cell line was used (HeLa). In Figure 8 the antiproliferative effect of the Casiopeina in the presence of chitosan in acid media and the effect of the vehicles are shown. This figure depicts the vehicle-independent effect of the drug on cell viability; in all

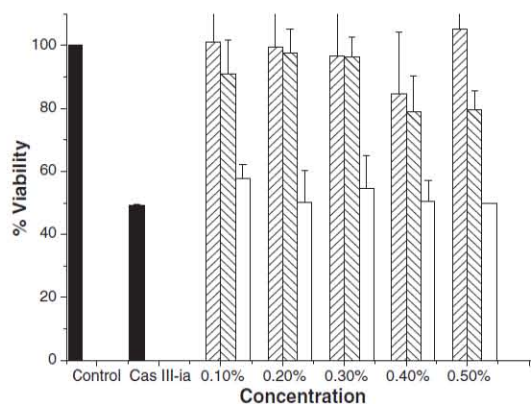


Figure 8. Anti-proliferative effect of acetic acid (AA) and chitosan (CS) in acetic acid and Cas III-ia (Cas III-ia) in the presence of acetic acid and chitosan at different concentrations v/v. ■ Control and CSP, ▨ AA, ▩ CS-AA, and □ CSP-AA-CS.

experiments most cells died after treatment, when Cas III-ia was present for 24 h. According to the obtained data, acetic acid seems to have no effect on cell viability; finally, chitosan solutions at low concentration show no effect, however, when concentration is increased it seems to have slight growth inhibition. From this, we can conclude that the cell growth inhibition effect is mainly due to Cas III-ia.

4. Discussion

Casiopeínas[®] are coordination complexes with copper as a metallic center. These molecules have shown greater antineoplastic strength than cisplatin in vitro and in vivo studies of a variety of tumor cell lines. However, high concentrations of Casiopeínas[®], as many others drugs, have deleterious effects associated to their in vivo administration; therefore chitosan-nanoparticles will be developed for a sustained release of Cas III-ia. An important stage in developing a pharmaceutical product is drug-excipient interaction. The present work illustrates the CS-Cas III-ia interaction in acid media toward the production of Cas III-ia-loaded submicron particles. This is important because one of the methods to produce micro or nanoparticle is by coacervation, which involves pH changes. Since chitosan has a pKa ca. of 6.5, if a change of pH from acidic to basic occurs, precipitation will take place.

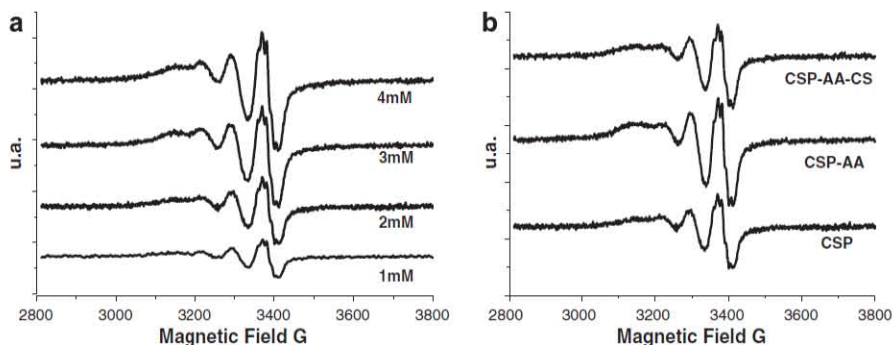


Figure 7. EPR spectra of Cas III alone (a) at different concentrations from 1 mM (bottom) to 4 mM (upper) and mixtures (b) of Cas III-ia-acetic acid (1:1 molar relation) and Cas III-ia-acetic acid (1:1:1 molar relation), Cas III-ia (CSP), Cas III-ia-acetic acid (CSP-AA), and Cas III-ia-acetic acid-chitosan (CSP-AA-CS).

From the rheological characterization it is clear that changes in viscosity are related to the alteration of the structural conformation of polyelectrolytes in solution²⁹ and such alterations in the structure are observed in the case of the system CS–Cas III-ia compared to CS, where this can be interpreted as the segregation of chitosan backbones; this produced due to the collapse of the ordered structure and the decrease of hydrogen bonds due to the presence of Cas III-ia. This fact suggests that the presence of hydrogen bonds between chitosan and water, which maintain an entangled structure, are replaced by CS–Cas III-ia interaction. Studies on free copper–chitosan interaction pointed out that copper binds to nitrogen with the formation of a single-bonded complex, without inter- or intra-molecular coordination, however, it is difficult to know if that occurs here. However, the decrease of viscosity, when Cas III-ia is present, can be attributed to shrinkage of the polyelectrolyte chain, due to the screening of the charged groups of the chain by Cas III-ia. This is caused by a decrease of interactions of chitosan macromolecules leading to their disentanglement, the CS with Cas III-ia solutions behave similarly to solutions of neutral water-soluble polymers, in consequence values of m from Cross model are lower for CS–Cas III-ia than CS alone.

UV-vis supports the idea of some weak interaction (hydrogen bond and van der Waals): spectra recorded show that there is some interaction between CS and Cas III-ia, and at the same time there is no indication about changes in the structure of Cas III-ia as can be corroborated because the bands belonging either to d-d transitions or to charge transfer remain the same as before the interaction. All this suggests that the Cas III-ia complex is stable in the presence of CS. From the thermodynamical data acquired, the small positive value of ΔH and favorable ΔS suggests that non-covalent binding is occurring between CS and Cas III-ia. Once the stability of Cas III-ia was guaranteed, an assay was performed to evaluate its in vitro activity against HeLa cell line. Although it has been demonstrated that there is an interaction between CS and Cas III-ia, this is quite small, and in consequence in vitro activity of Cas III-ia in solution with CS, at least in HeLa cell line, is the same as that observed for the drug alone. These results support that Cas III-ia maintains both its structure and effectiveness against cancer cell line such as the HeLa cell line and is in concordance with the behavior observed through this work.

In summary, this work has shown the interaction between CS and Cas III-ia. Studies carried out in solution support that there is no evidence of breaking of the complex. But only weak interactions were detected. This can be explained taking into account that the polymer surrounds the complex, although there is no coordination between the metal and the CS due to the fact that the primary amines are protonated. This can be assured because the electronic and EPR spectra remain unchanged. Cas III-ia is stable and maintains its effectiveness under acid conditions in the presence of CS. Since coacervation is a manner to prepare micro or nanoparticles, it can be used through a pH change to get Cas III-ia-loaded

chitosan submicron particles guaranteeing drug stability during each step of the method. Therefore, future work will be focused to prepare a Cas III-ia drug delivery system by means of pH change.

Acknowledgments

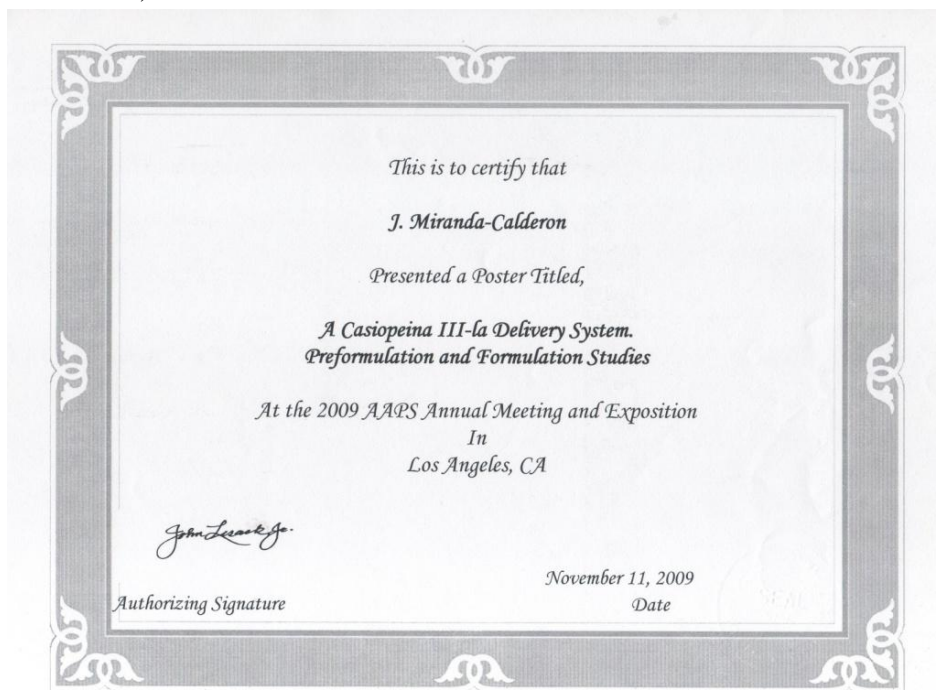
This work was supported by CONACYT Scholarship. The authors want to thank Dr. Alejandro Solano Peralta for his help in recording the EPR spectra.

References

- Qi, L.; Xu, Z.; Jiang, X.; Hu, C.; Zou, X. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2693–2700.
- Li, S. D.; Huang, L. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 496–504.
- Davis, M. F.; Chen, Z.; Shin, D. M. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2008**, *7*, 771–782.
- Kalaria, D. R.; Sharma, G.; Beniwal, V.; Ravi Kumar, M. N. V. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 492–501.
- Chen, D.; Milacic, V.; Frezza, M.; Dou, P. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 777–791.
- Ahmad, S.; Isab, A. A.; Ali, S. *Transition Met. Chem.* **2006**, *31*, 1003–1016.
- Gracia-Mora, I.; Ruiz-Ramírez, L.; Gómez-Ruiz, C.; Tinoco-Méndez, M.; Márquez-Quirónes, A.; Lira, L. R. D.; Marín-Hernández, A.; Macías-Rosales, L.; Bravo-Gómez, M. F. *Metal-Based Drugs* **2001**, *8*, 19–28.
- Ruiz-Ramírez, L.; de la Rosa, M. E.; Gracia-Mora, I.; Mendoza, A.; Pérez, G.; Ferrer-Sueta, G.; Tovar, A.; Brena, M.; Gutierrez, P.; Cruces Martínez, M. P. *J. Inorg. Biochem.* **1995**, *59*, 207.
- De Vizcaya-Ruiz, A.; Rivero-Muller, A.; Ruiz-Ramírez, L.; Kass, G. E. N.; Kelland, L. R.; Orr, R. M.; Dobrota, M. *Toxicol. In Vitro* **2000**, *14*, 1–5.
- Mejia, C.; Ruiz-Azuara, L. *Pathol. Oncol. Res.* **2008**, *14*, 467–472.
- Carvalho-Chaigneau, F.; Trejo-Solis, C.; Gómez-Ruiz, C.; Rodríguez-Aguilera, E.; Macías-Rosales, L.; Cortés-Barberena, E.; Cedillo-Peláez, C.; Gracia-Mora, I.; Ruiz-Azuara, L.; Madrid-Marina, V.; Constantino-Casas, F. *BioMetals* **2008**, *21*, 17–28.
- Alemón-Medina, R.; Brena-Valle, M.; Muñoz-Sánchez, J. L.; Gracia-Mora, M. I.; Ruiz-Azuara, L. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 219–228.
- Wang, X.; Lin, J.; Zhang, X.; Liu, Q.; Xu, Q.; Tan, R. X.; Guo, Z. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *94*, 186–192.
- Kean, T.; Thanou, M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 3–11.
- Webster, A.; Halling, M. D.; Grant, D. M. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1189–1201.
- Bodek, K. H.; Kufelnicki, A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *98*, 2572–2577.
- Dambies, L.; Guimon, C.; Yacoumi, S.; Guibal, E. *Colloids Surf., A* **2001**, *177*, 203–214.
- Rangel-Mendez, J. R.; Monroy-Zepeda, R.; Leyva-Ramos, E.; Diaz-Flores, P. E.; Shirai, K. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *162*, 503–511.
- Hu, H.; Yu, L.; Tan, S.; Tu, K.; Wang, L. Q. *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 462–468.
- Al-Kahtani Ahmed, A.; Bhojya Naik, H. S.; Shergara, B. S. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 699–706.
- Shu, S.; Zhang, X.; Teng, D.; Wang, Z.; Li, C. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1197–1204.
- Agnihotri, S. A.; Mallikarjuna, N. N.; Aminabhavi, T. M. *J. Controlled Release* **2004**, *100*, 5–28.
- Domard, A. *Int. J. Biol. Macromol.* **1987**, *9*, 98–104.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Nat. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.
- Mucha, M. *Macromol. Chem. Phys.* **1997**, *198*, 471–484.
- Mucha, M. *React. Funct. Polym.* **1998**, *38*, 19–25.
- Morris, E. R.; Cutler, A. N.; Ross-Murphy, S. B.; Rees, D. A.; Price, J. *Carbohydr. Polym.* **1981**, *1*, 5–21.
- Barnes, H. A. *A Handbook of Elementary Rheology*, 1st ed.; University of Wales, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics Penglais: Aberystwyth, Dyfed, Wales, SY23 3BZ, 2000.
- Janciuskaite, U.; Makuska, R. *React. Funct. Polym.* **2009**, *60*, 300–305.

7.2. Presentación en congresos

7.2.1. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS 2009;California, USA)



7.2.2. Coordinación de Estudios de Posgrado U.N.A.M. ("QUIMIUNAM 2009", Ciudad Universitaria, U.N.A.M. 2009)



7.2.3. Cátedra Internacional de Desarrollo de Medicamentos (CISDEM 2011, México, DF).

