



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“NANOENCAPSULACIÓN DE CASIOPEÍNA® III-IA EN UN SISTEMA
NIOSOMAL Y ESTUDIO DE SU LIBERACIÓN *IN VITRO*”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.I. ZENAYDA AGUILAR JIMÉNEZ

DRA. LENA RUÍZ AZUARA

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“NANOENCAPSULACIÓN DE CASIOPEÍNA® III-IA EN UN SISTEMA
NIOSOMAL Y ESTUDIO DE SU LIBERACIÓN *IN VITRO*”**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.I. ZENAYDA AGUILAR JIMÉNEZ



Ciudad de México 2016

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Jesús Gracia Fadrique

Vocal: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Vocal: Dra. María Josefa Bernad Bernad

Vocal: Dr. Ernesto Rivera García

Secretario: Dr. Ernesto Carrillo Nava

Lugar donde se desarrolló el trabajo

Laboratorio 210 y 05 Química Inorgánica Medicinal. Departamento de Química Inorgánica y Nuclear. Facultad de Química, UNAM.

Congresos y foros donde se ha presentado el trabajo

-Simposio de Avances y Perspectivas en Química Inorgánica y Medicinal. Taxco, Guerrero, noviembre de 2015.

-Simposio Anual del Instituto de Química. Ciudad Universitaria, Ciudad de México, abril de 2016.

-51 ° Congreso Mexicano de Química. Pachuca de Soto Hidalgo, octubre de 2016.

Asesor

Dra. Lena Ruiz Azuara

Sustentante

Q.I. Zenayda Aguilar Jiménez

Agradecimientos

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, por la dirección de esta tesis, sus consejos, paciencia, cariño y por permitirme ser parte de su gran grupo de trabajo.

A los proyectos PAPIIT IN 218013, CONACYT 179119 y PAIP 5000-9047 por el apoyo económico.

A CONACYT por la beca otorgada en el periodo 2015-I - 2016-2 con número de becario 335983. Y por la beca por ayudantía SNI Nivel III.

A la M. en C. Ana Luisa Alonso Sáenz por otorgarme la Casiopeína III-ia utilizada en este trabajo.

Al M. en C. Adrián Espinoza Guillén por el apoyo técnico en el laboratorio.

Al Dr. Jesús Gracia Fadrique por permitir realizar las pruebas de dispersión dinámica de luz en el laboratorio 310 del edificio F de la Facultad de Química, UNAM.

A la Dra. María Josefa Bernad Bernad por permitir realizar los estudios del perfil de liberación en el laboratorio 002 y 003 del edificio F de la Facultad de Química, UNAM.

A la M. en C. Silvia Dávila Manzanilla por los estudios inhibición de la proliferación celular realizados en el laboratorio 05 del edificio B de la Facultad de Química, UNAM.

Al I.Q. Iván Puente Lee de la USAI por los estudios de microscopía de barrido y transmisión.

A los integrantes del laboratorio 210, por sus consejos, asesorías, ayuda, buen compañerismo y ambiente de trabajo. A todos, gracias.

DEDICATORIAS

A Dios, por tantas bendiciones en mi vida.

Citando las palabras de mi hermano: "Uno no escoge a su familia, pero la vida y Dios hicieron un excelente trabajo al escogerla por mi".

Agradezco eternamente a mis padres, Zenayda y José Arturo, por el apoyo y amor incondicional, por su eterno esfuerzo, son el motor de mi vida.

A mis hermanos y mejores amigos Beatriz y José Arturo, por ayudarme, amarme y apoyarme siempre en todo.

A Moisés, gracias por tu eterna paciencia, por tu apoyo, siempre me contagias con tu optimismo, gracias por ser mi compañero de vida y mejor amigo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
1.1 CÁNCER	3
1.2 QUIMIOTERAPIA	4
1.3 CASIOPEÍNAS®	5
1.4 CASIOPEÍNA III-IA	7
1.4.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA	9
1.4.2 MECANISMO DE ACCIÓN	9
1.4.3 FARMACOCINÉTICA PRECLÍNICA	10
1.5 LIBERACIÓN MODIFICADA DE FÁRMACOS	11
1.6 NANOACARREADORES	12
1.7 NANOACARREADORES PARA EL TRATAMIENTO EN CÁNCER	12
1.7.1 NANOENCAPSULACIÓN DE CASIOPEÍNA III-IA	14
1.8 NIOSOMAS	16
1.8.1 FACTORES QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS NIOSOMAS	18
1.8.1.1 Balance hidrofílico-lipofílico (HLB, por sus siglas en inglés)	18
1.8.1.2 Temperatura de transición de fases (T _c)	19
1.8.1.3 Parámetro de empaquetamiento (CPP)	19
1.8.2 TERMODINÁMICA DE LOS NIOSOMAS	20
1.8.3 FORMACIÓN DE LOS NIOSOMAS	21
1.8.3.1 Tensoactivos	21
1.8.3.1.1 Tensoactivos no iónicos	21
1.8.3.2 Agentes aditivos	22
1.8.3.2.1 Colesterol	22
1.8.3.2.2 Molécula cargada	23
1.8.3.3 Efecto de la concentración tensoactivo/aditivos	24
1.8.4 TIPOS DE NIOSOMAS	24
1.8.5 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LOS NIOSOMAS	25
1.8.5.1 Método de hidratación de película delgada (MHPD)	25
1.8.5.2 Método de inyección de éter (MIE)	26
1.9 NIOSOMAS USADOS PARA FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER	26
HIPÓTESIS	28

OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
II. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1 MATERIALES	29
2.2 FORMACIÓN DE LOS NIOSOMAS	29
2.2.1 MÉTODO DE LA PELÍCULA DELGADA	29
2.2.2 MÉTODO DE INYECCIÓN DEL ÉTER	30
2.3 EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO	32
2.3.1 VARIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN SPAN60/COLESTEROL	32
2.3.1.1 Cuantificación del fármaco	32
2.3.2 VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL SOLUTO	32
2.4 MORFOLOGÍA	33
2.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)	33
2.4.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	33
2.5 TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA	33
2.6 ESPECTROFOTOMETRÍA DE UV-VISIBLE	33
2.6.1 MODIFICACIÓN DE LAS TRANSICIONES D-D DURANTE EL SONICADO PARA EL MÉTODO DE LA PELÍCULA DELGADA	33
2.6.2 INTERACCIÓN DE LA CASIOPEÍNA III-IA CON LA MEMBRANA NIOSOMAL	34
2.7 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	34
2.8 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i>	34
2.8.1 CINÉTICA DE LIBERACIÓN	35
2.8.1.1 Cinética de orden cero	35
2.8.1.2 Cinética de primer orden	36
2.8.1.3 Modelo de Higuchi	36
2.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> EN UNA LÍNEA TUMORAL	36
2.10 ANÁLISIS DE DATOS	38
III RESULTADOS	39
3.1 MÉTODO DE HIDRATACIÓN DE LA PELÍCULA DELGADA	39
3.1.1 ANÁLISIS PREVIO: EFECTO DEL SONICADO SOBRE LAS TRANSICIONES D-D DEL METAL	39
3.1.2 TAMAÑO DE PARTÍCULA	42
3.1.3 PROPUESTA DE FORMACIÓN DE LOS NIOSOMAS	43
3.2 MÉTODO DE INYECCIÓN DEL ÉTER	45
3.2.1 ANÁLISIS PREVIO: VOLUMEN A UTILIZAR DEL ÉTER PARA LA FORMACIÓN DE NIOSOMAS	45
3.2.2 TAMAÑO DE PARTÍCULA	47
3.2.3 PROPUESTA DE FORMACIÓN DE LOS NIOSOMAS INYECCIÓN DEL ÉTER	48
3.3 HIDRATACIÓN DE LA PELÍCULA DELGADA (HPD) VS INYECCIÓN DEL ÉTER (IE).	50

3.4 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (EE)	51
3.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)	56
3.6 TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL ZETA	57
3.7 ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE	61
3.7.1 INTERACCIÓN CASIOPEÍNA III-IA-SPAN60-COLESTEROL	61
3.7.1.1 Región visible	61
3.7.1.2 Región ultravioleta	63
3.7.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE POSIBLES INTERACCIONES DÉBILES ENTRE LA MEMBRANA NIOSOMAL Y LA CASIOPEÍNA ATRAPADA O EN DISOLUCIÓN	64
3.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	71
3.8.1 CASIOPEÍNA III-IA	71
3.8.2 SPAN 60	72
3.8.3 COLESTEROL	73
3.8.4 NIOSOMAS	73
3.8.5 NIOSOMAS CON CASIOPEÍNAS	75
3.9 ESTUDIO DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i>	76
3.9.1 CINÉTICA DE LIBERACIÓN	77
3.10 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	79
IV DISCUSIÓN	82
V CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	89

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) el cáncer causó cerca de ocho millones de defunciones a nivel mundial en el 2012, lo que lo convierte en la principal causa de muerte. Los tratamientos comúnmente utilizados para esta enfermedad son la cirugía, radioterapia o quimioterapia, los dos primeros usados cuando el tratamiento es local, mientras que cuando el cáncer se ha expandido invadiendo tejidos adyacentes la cirugía y radioterapia son usadas en combinación con la quimioterapia. Esta última hace referencia al uso de compuestos citotóxicos que dada su naturaleza pueden producir diversos efectos adversos así como resistencia celular a múltiples fármacos; por lo que resulta de importancia encontrar nuevos compuestos para el uso contra el cáncer. Entre los fármacos más utilizados en la clínica se encuentra el cis-platino dada su alta efectividad; sin embargo, produce severos efectos como ototoxicidad, nefrotoxicidad, y anormalidad visual. Es por lo anterior que han surgido nuevas alternativas utilizando compuestos de coordinación con metales esenciales como son las Casiopeínas®, las cuales han mostrado actividad biológica en líneas tumorales siendo citotásticas, citotóxicas y genotóxicas. La Casiopeína III-ia es uno de los compuestos que destacan entre este grupo, la cual fue aprobada por COFEPRIS para entrar en fase clínica I. Este compuesto ha mostrado actividad en líneas tumorales de mama, cervicouterino y colon; no obstante, en pruebas farmacocinéticas preclínicas ha mostrado baja biodisponibilidad. Entre las alternativas propuestas para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos se encuentran los sistemas de liberación modificada, donde dependiendo de la aplicación y la vía de administración, se busca mantener el principio activo por más tiempo en circulación sanguínea, de esta forma también se puede reducir la frecuencia de dosificación y con ello los efectos adversos. Los nanoacarreadores son sistemas de liberación modificada que son ampliamente estudiados para transportar fármacos que son usados para el tratamiento del cáncer, algunos de éstos sistemas pueden ser encontrados en la clínica, entre los que destacan los liposomas, ya que presentan ventajas como encapsulación de fármacos hidro- y

liposolubles y se ha visto, mejoran la biodisponibilidad. Sin embargo, presentan desventajas como cortos tiempos de almacenamiento y altos costo; dada esta situación, surgen alternativas análogas a los liposomas como son los niosomas, los cuales son vesículas formadas por tensoactivos no iónicos y presentan ventajas, como la reducción en costo, son químicamente estables y los tensoactivos no requieren condiciones especiales. Expuesto lo anterior, en este trabajo se presenta la nanoencapsulación de la Casiopeína III-ia en un sistema nanoacarreador. Considerando las características farmacológicas, farmacocinéticas y la solubilidad en agua del compuesto, se utilizó un sistema niosomal para su nanoencapsulación, utilizando Span60 como tensoactivo y un aditivo (Colesterol). La formación de los niosomas fue realizada por el método de formación de la película delgada y el método de inyección del éter, en ambos casos se varió la concentración de Span60/Colesterol usado (relación molar 1:1). Los sistemas obtenidos fueron caracterizados por diversas técnicas y se evaluó el perfil de liberación del compuesto, así como su actividad biológica *in vitro*.

I. ANTECEDENTES

De acuerdo con el INEGI, las enfermedades cardiovasculares y respiratorias crónicas junto con la diabetes y el cáncer son causales del 63 % de las muertes a nivel mundial; lo que representa aproximadamente 38 millones de defunciones al año. De la cifra anterior, el cáncer es responsable de cerca de ocho millones, lo que lo convierte en la principal causa de muerte [1].

1.1 Cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células y puede aparecer prácticamente en cualquier parte del cuerpo. El cáncer es un término usado para un extenso grupo de enfermedades que afectan a diferentes partes del organismo, y se produce a partir de la mutación genética que controla el ciclo celular; lo anterior, originado principalmente por el daño o mutación de proto-oncogenes que codifican para proteínas implicadas en la inducción de la proliferación y diferenciación celular; esta mutación contribuye a la malignización de la estirpe celular convirtiéndolos en oncogenes. El crecimiento ilimitado y autosuficiente de éstas células es responsable de la mayor característica del cáncer, cuando una masa de células cancerosas es producida se llama tumor y un crecimiento incontrolado de un tumor resulta en la invasión de tejidos adyacentes y metástasis [2–4].

El perfil oncológico de la Organización Mundial de la Salud publicado en 2014, mostró que para México, se tuvo un total de 71,900 muertos por cáncer, siendo el 47 % de los casos en hombres y el 53 % en mujeres. La incidencia de esta enfermedad por género es presentado en la figura 1, donde se observa que el tipo de cáncer con mayor ocurrencia en hombres es el de próstata, mientras que en mujeres es el cáncer de mama.

Incidencia de cáncer

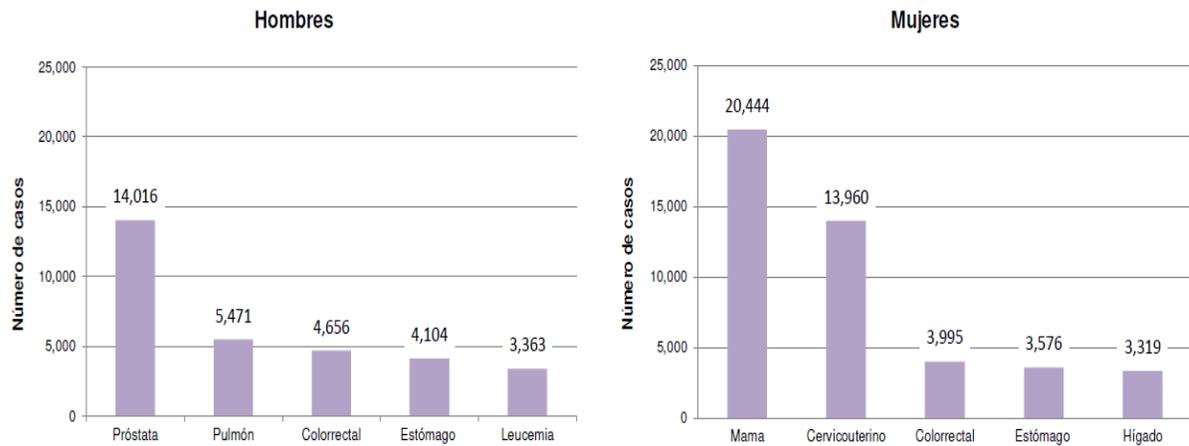


Figura 1. Incidencia de cáncer en México por género.

Para el tratamiento de esta patología se usan diversos tratamientos como son la cirugía, radioterapia y la quimioterapia, siendo las dos primeras las más usadas cuando se requiere un tratamiento local, sin embargo, pueden causar daño a tejidos circundantes y son ineficientes cuando el cáncer se ha esparcido por el organismo. Por su parte, la quimioterapia, se refiere al uso fármacos citotóxicos principalmente por vía sistémica. Estas tres formas de tratamiento pueden ser usados solas o en combinación, dependiendo del tumor a atacar [3–5].

1.2 Quimioterapia

La quimioterapia envuelve un amplio tipo de compuestos citotóxicos, citostáticos y antineoplásicos. El propósito de este tratamiento es prevenir que las células cancerígenas se multipliquen, invadan, produzcan metástasis y la muerte del paciente. En una idealidad se busca que estos fármacos curen o desaparezcan el cáncer; no obstante, dependiendo del estado de la enfermedad, si no es posible curar, el objetivo se vuelve controlar el padecimiento, disminuir los tumores cancerosos y parar el crecimiento celular y la metástasis [6,7].

Los compuestos quimioterapéuticos pueden ser divididos dentro de varios grupos basados en factores como su mecanismo de acción, su relación con otros fármacos y su estructura

química. Algunos de los compuestos más utilizados son doxorubicin, 5-fluoracil, paclitaxel y cis-platino. Éstos fármacos y otros agentes quimioterapéuticos también presentan efectos tóxicos en las células normales lo que puede provocar diversos cambios en el organismo, como hipersensibilidad y resistencia celular a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés) [7,8].

Como se mencionó con anterioridad, el cis-platino es de los fármacos más usados dada su alta efectividad; pese a esto, presenta severos efectos adversos donde la dosis más alta causa toxicidad sistemática incluyendo problemas gastrointestinales, ototoxicidad, nefrotoxicidad y anormalidad visual [3]. Es por lo anterior la importancia de buscar nuevas moléculas para su uso en el tratamiento contra el cáncer; donde se busca seleccionar un compuesto efectivo que además pueda tener selectividad en las células cancerígenas y así minimizar los efectos tóxicos en el paciente. Tomando como base la estructura química del cis-platino, se han sintetizado diversos compuestos de coordinación usando metales esenciales para uso como agentes quimioterapéuticos. En México, las Casiopeínas® han surgido como una alternativa usando cobre, dada su presencia en el organismo.

1.3 Casiopeínas®

Las Casiopeínas® son compuestos de coordinación, quelatos mixtos, con cobre como centro metálico y diiminas aromáticas (bipiridina o fenantrolinas) como ligante primario, y donadores de oxígeno (acetilacetionato, salilcinaldehído) o aminoácidos como ligantes secundarios (figura 2).

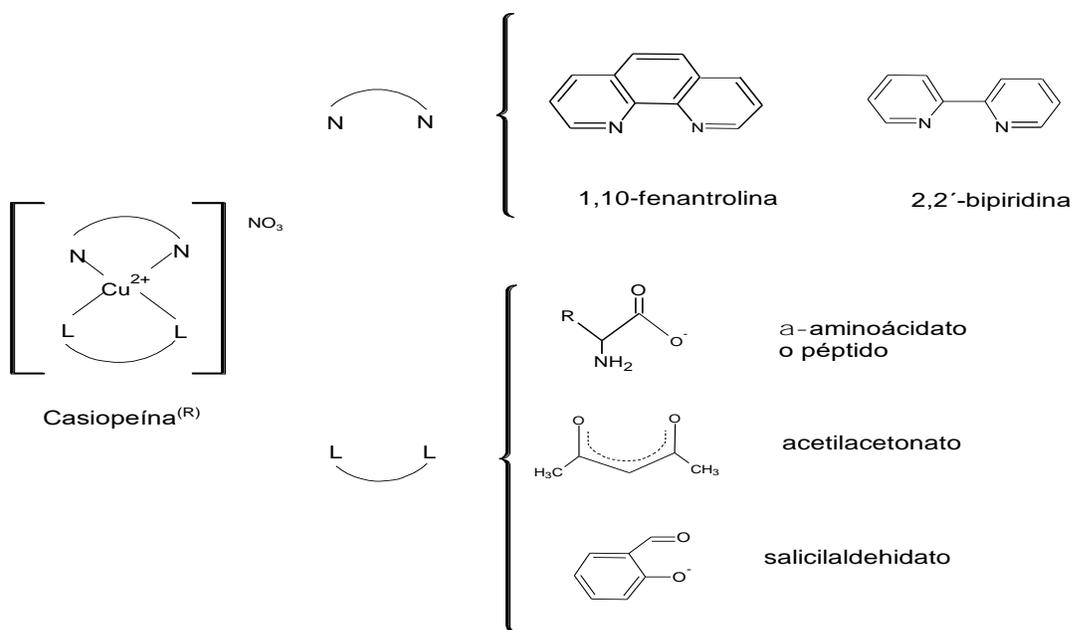


Figura 2. Estructura general de las Casiopeínas®

Estos compuestos fueron sintetizados por el grupo de investigación de la Dra. Lena Ruiz Azuara, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se trata de más de cien compuestos, los cuales son clasificados de acuerdo al cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de las Casiopeínas® por grupos.

Grupo	Fórmula general
Casiopeína I	[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(N-O)] NO ₃
Casiopeína II	[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)] NO ₃
Casiopeína IIIa	[Cu(N-N)(acetilacetonato)] NO ₃
Casiopeína IIIs	[Cu(N-N)(salicilaldehidato)] NO ₃
Casiopeína IV	[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(N-O)] NO ₃
Casiopeína V	[Cu(5-R-1,10-fenantrolina)(N-O)] NO ₃
Casiopeína VI	[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(N-O)] NO ₃
Casiopeína VII	[Cu(1,10-fenantrolina)(N-O)] NO ₃
Casiopeína VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(N-O)] NO ₃
Casiopeína IX	[Cu(2,2'-bipiridina)(N-O)] NO ₃
Casiopeína X	[Cu(N-N)(péptidos)] NO ₃

Todas las Casiopeínas sintetizadas presentan diversas variaciones, lo que les confiere diferentes propiedades electroquímicas, lipofílicas y estructurales, que mediante estudios de estructura-reactividad se ha comprobado, algunas presentan una mayor actividad biológica en líneas celulares de cáncer siendo citotásticas, citotóxicas y genotóxicas [9]. Entre este grupo destacan la Casiopeína II-gly y la Casiopeína III-ia, siendo ésta última ya aprobada en México para entrar en fase clínica I.

1.4 Casiopeína III-ia

La Casiopeína III-ia (figura 3) con fórmula $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-1,10-bipiridina})(\text{acetilacetionato})]\text{NO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, es un polvo fino de color azul claro. En condiciones ambientales es soluble en agua, metanol y suero dextrosado a pH 7.4. En un estudio realizado en buffer de fosfatos (pH 7.4 y 64 mM a 37 °C) durante 12 horas, no se observó inestabilidad del compuesto. Por medio de análisis termogravimétrico se observó una pérdida de masa del 1.18 % con respecto al 100 %, a una temperatura de 60 °C, que corresponde a las dos moléculas de agua, así como dos pérdidas más de masa, una a 220 °C y otra a 440 °C. Se trata de un compuesto paramagnético con un electrón desapareado, lo que indica que el centro metálico de cobre se encuentra en estado de oxidación II. Es electrólito 1:1, tratándose de complejos catiónicos con una molécula de nitrato como contra ión [10,11].

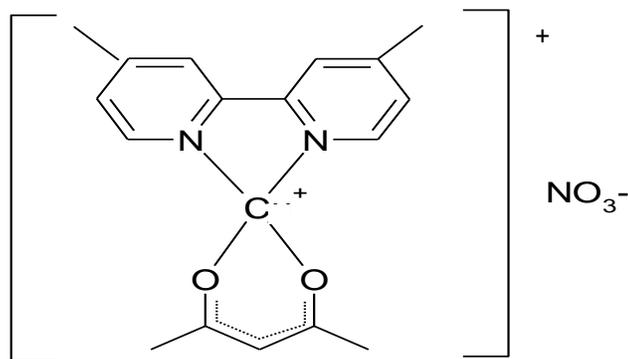


Figura 3. Estructura química de la Casiopeína III-ia.

De acuerdo con la difracción de rayos X (figura 4) obtenido por Alonso en 2013, la Casiopeína III-ia cristaliza en un sistema triclinico en donde el ión Cu (II) se encuentra en una geometría

de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada. La base de la pirámide está constituida por los átomos donadores N₁ y N₂ de la 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina y los átomos O₁ y O₂ del acetilacetonato, mientras que la posición apical está ocupada por un átomo de oxígeno de una molécula del contra ión NO₃ [12].

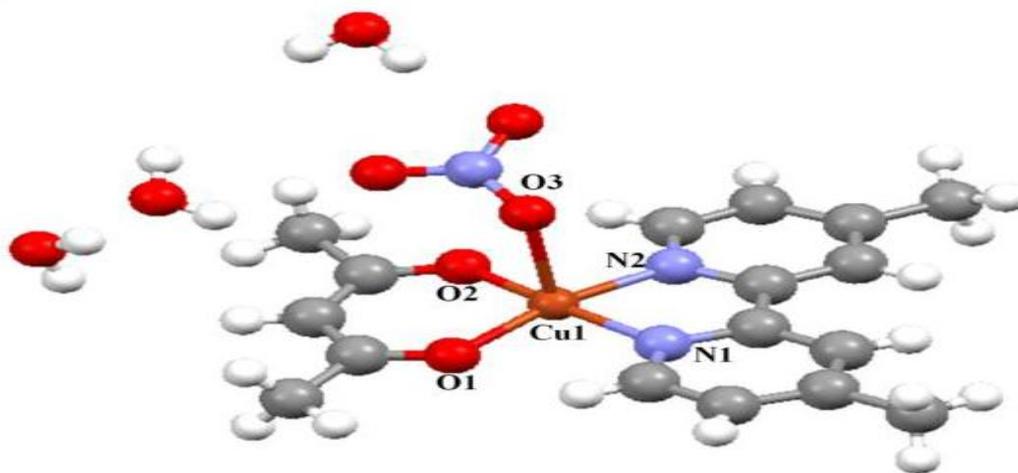


Figura 4. Estructura molecular del compuesto de la Casiopeína III-ia [12].

Las propiedades fisicoquímicas de la molécula son presentadas en el cuadro 2.

Cuadro 2. Propiedades fisicoquímicas de la Casiopeína III-ia.

Característica	Valor
Peso molecular	444.93 g/mol (con dos moléculas de agua) [11]
Coefficiente de partición	0.358 [13]
Solubilidad en agua	Alta [11]
pKa	8.25 [11]
E_{1/2}:	-338 mV [13]
Log D:	-0.95 [13]

Estudios de estabilidad realizados por Uribe en 2011, demostraron que la Casiopeína III-ia en sólido no presenta productos de degradación luego de seis meses a 40 ± 2 °C y humedad relativa de 75 ± 5 %. Se observó que en disolución era estable a la fotólisis (luz UV, una hora), hidrólisis básica (NaOH 1 M) y oxidación (peróxido de hidrógeno al 30 %), durante 24

horas. Por su parte, cuando fue sometida a condiciones ácidas (HCl 1 M), se observó un pico de degradación (mediante cromatografía) luego de un día de análisis [14].

1.4.1 Actividad biológica

La Casiopeína III-ia muestra citotoxicidad, proapoptótico y propiedades antitumorales, con actividad en líneas tumorales de HeLa, SiHa (cervicouterino), MCF-7 (mama), HTC-15 (colon) y CHP-212 (neuroblastoma) . La concentración inhibitoria media (IC₅₀) en μM se presenta a continuación:

*HeLa: 18.2 ± 2.7 *SiHa: 14.5 ± 1.5 *MCF-7: 15.9 ± 1.8 *HCT-15: 40.5 ± 4.6 *
CHP-212: 47.5 ± 1.7 [10,15].

Se observó que la Casiopeína III-ia disminuyó la viabilidad celular e indujo apoptosis sobre HCT-15 (carcinoma de colon) *in vitro* de manera dosis dependiente y ciclo celular independiente, a través de la activación de Bax y caspasas, presumiblemente por vía intrínseca. Demostró actividad sobre HCT-15 transplantado en el ratón desnudo [16].

Se calculó la dosis letal 99 (DL99) en perros, donde se encontró que para la Casiopeína III-ia se tenía una DL99 de 200 mg/m^2 , induciendo muerte de forma aguda, la cual fue causada por un edema pulmonar debido a un fallo cardiaco después de un periodo de 30-50 minutos [17].

1.4.2 Mecanismo de acción

La Casiopeína III-ia puede producir daño en el DNA, el cual es observado en presencia de un reductor, lo que sugiere que su modo de acción es mediante generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) luego de la reducción del cobre; lo que hace que la citotoxicidad de las Casiopeínas no sea específica, pero si diferencial. Esto como resultado del rápido incremento de los niveles de estrés oxidativo en las células de cáncer. Los complejos de cobre pueden contribuir a intensificar el desbalance redox por la activación de peróxido conduciendo a un daño celular y como consecuencia la muerte celular por apoptosis u otro mecanismo [9].

1.4.3 Farmacocinética preclínica

Se realizó una farmacocinética preclínica en ratas Wistar, donde se encontró que para una administración intravenosa de 10 mg/kg se tiene una vida media de eliminación de 12.46 h, con una constante de eliminación de $9.28 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. Mientras que para un estudio farmacocinético realizado en conejos en el 2002, se encontró que el tiempo de vida media de la Casiopeína III-ia era de 53.92 min^{-1} (0.88 h) y la constante de eliminación fue de 0.0150 min^{-1} [18]. Por su parte, el área bajo la curva (ABC) fue baja tanto para las ratas como para los conejos lo que significa baja biodisponibilidad; y se obtuvieron altos volúmenes de distribución lo que podría explicar la baja biodisponibilidad.

Por su parte, Romero en 2007, realizó un estudio en ratas tipo Wistar con el objeto de conocer los parámetros farmacocinéticos a partir de datos urinarios. Se observó una farmacocinética de tipo lineal donde los parámetros farmacocinéticos no dependen de la dosis administrada [19]. En el cuadro tres se presentan lo descrito con anterioridad.

Cuadro 3. Parámetros farmacocinéticos preclínicos obtenidos a partir de datos sanguíneos y urinarios para la Casiopeína III-ia.

Parámetro farmacocinético [Referencia]	Dosis (mg/kg)	ABC (mg/mL min)	Tiempo de vida media ($t_{1/2}$)	Constante de eliminación (k_e)	Depuración (Cl)	Cantidad excretada (Aex)
Conejo [18]	10	20.01	0.88 h	0.0150 min^{-1}	2.08 mL/min	---
Ratas Wistar [20]	10	22.27	12.46 h	$9.28 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	0.45 mL/min	---
Ratas Wistar macho (datos urinarios) [19]	7	---	13.4 h	$9.83 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	---	0.88 mg

Fuentes en 2005, reportó la unión a proteínas de la Casiopeína III-ia en plasma humano. Se observó que a menor concentración del compuesto ($12 \mu\text{g/mL}$) se tenía una mayor unión a proteínas $89.1 \pm 1.9 \%$, mientras que un aumento de concentración (25 y $50 \mu\text{g/mL}$) conducía a una disminución en la unión a proteínas (76%), lo que sugiere que existe un número

ilimitado de sitios de unión que se encuentra disponible para fijar el compuesto. Se plantea que cuando se tienen concentraciones bajas la mayoría de la Casiopeína podría fijarse a la proteína, mientras que a altas concentraciones, los sitios de unión pueden haberse saturado, con lo que se produciría un rápido incremento en la concentración libre del compuesto [20]. Lo anterior podría tener implicaciones clínicas debido a que una alta unión a proteínas puede significar una alta variabilidad entre pacientes.

Expuesto lo anterior, resulta de importancia encontrar un sistema efectivo de liberación de la Casiopeína III-ia, de tal forma que se reduzca el compuesto libre en el torrente sanguíneo, aumentando su biodisponibilidad y reduciendo posibles efectos adversos.

Una de las alternativas que ha surgido en las últimas décadas y que ha sido ampliamente estudiado son los sistemas de liberación modificada de fármacos [3,5].

1.5 Liberación modificada de fármacos

Los sistemas de liberación modificada, idealmente, están diseñados para sostener la liberación del ingrediente farmacéutico activo a velocidad constante en un periodo definido de tiempo, de tal forma que se mantenga la concentración apropiada en el plasma dentro del intervalo terapéutico. Así, el perfil de liberación de un sistema de administración de fármacos, puede permitir una reducción en la frecuencia de dosificación por lo que trata de eliminar o reducir los efectos adversos produciendo una concentración terapéutica del compuesto que sea estable en el organismo y, por lo tanto, mejorar el cumplimiento y la eficacia global del tratamiento incrementando la aceptación de los pacientes [21–24].

Los sistemas de liberación modificada son diseñados en función de las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del compuesto, por lo que pueden tener diversas clasificaciones dependiendo de su mecanismo de liberación y su preparación; de este modo, los compuestos pueden ser liberados por diversos estímulos físicos, químicos o biológicos. También pueden ser clasificados de acuerdo a su tamaño, principalmente en micro y nanoacarreadores, siendo estos últimos los más estudiados cuando la administración es por vía intravenosa y para el tratamiento contra el cáncer.

1.6 Nanoacarreadores

Los nanoacarreadores son sistemas coloidales que van en un rango de 10 a 900 nm, capaces de transportar tanto fármacos con bajo peso molecular como macromoléculas (genes o proteínas). Estos sistemas pueden proteger el fármaco de la degradación, así como reducir el aclaramiento renal, incrementar el tiempo de vida media en el flujo sanguíneo y proveer solubilidad a fármacos insolubles. Asimismo, pueden mejorar el control farmacocinético y farmacodinámico de los compuestos encapsulados en comparación con el fármaco libre [4,8,25]. Dependiendo del diseño y tipo de nanoacarreador, pueden permitir el control de la cinética de liberación, ser específicos a alguna diana terapéutica (vectorización) y se busca sean biocompatibles y biodegradables, de tal forma que puedan ser usados con seguridad en humanos [26]. Dadas las ventajas anteriormente presentadas, los nanoacarreadores han surgido como una alternativa para el tratamiento del cáncer, donde al encapsular fármacos quimioterapéuticos se busca principalmente reducir los efectos adversos causados por los fármacos usados contra esta patología, aumentar la biodisponibilidad y proveer seguridad y especificidad.

1.7 Nanoacarreadores para el tratamiento en cáncer

Los nanoacarreadores pueden ser diseñados de tal forma que sean sistemas "inteligentes", aprovechando que los tejidos cancerosos presentan diversas señales incluyendo hipoxia, bajo pH, hipoglucemia, estrés mecánico, respuesta inmune o inflamatoria y mutación genética, con lo que se busca que el fármaco sea liberado del nanoacarreador a partir de uno o varios estímulos provocado por las condiciones del tumor [5]. Los nanoacarreadores también pueden ser funcionalizados en su superficie con moléculas bioactivas como transferrina, anticuerpos, enzimas, ácido fólico, entre otros; que reconocen e interaccionan con objetivos específicos sobreexpresados en la superficie de las células cancerígenas, obteniendo de este modo un nanoacarreador "active targeting" [27,28].

Una característica importante de un tumor es que cuando comienza a formarse, las células tumorales proliferan y crecen de forma irregular y rápida, lo que ocasiona que requieran más nutrientes que las células con proliferación normal. Con el objetivo de satisfacer la falta

de nutrientes, las células cancerígenas recurren a la formación de una red nuevos vasos sanguíneos, y la angiogénesis tumoral comienza a tomar lugar [5,23]. Los nuevos vasos sanguíneos son altamente porosos, irregulares y dilatados, lo que ocasiona que exista una desorganización entre las células endoteliales que lo recubren provocando un gran espacio entre ellas (> 400 nm) causando fenestración [5,29]. Asimismo, el flujo sanguíneo dentro del tumor es deficiente o nulo. Bajo estas condiciones, la permeabilidad de los tejidos tumorales incrementa de tal forma que los acarreadores o macromoléculas en circulación, quienes pueden ser excluidos del tejido normal, puedan extravasarse en el tejido tumoral dándose una mejorada permeación. Cuando los nanoacarreadores logran permear, se observa una alta retención, esto gracias a que los tumores presentan un drenaje linfático pobre y un lento retorno venoso. El conjunto de estos fenómenos es denominado efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR, por sus siglas en inglés). Este fenómeno es esquematizado en la figura cinco [26].

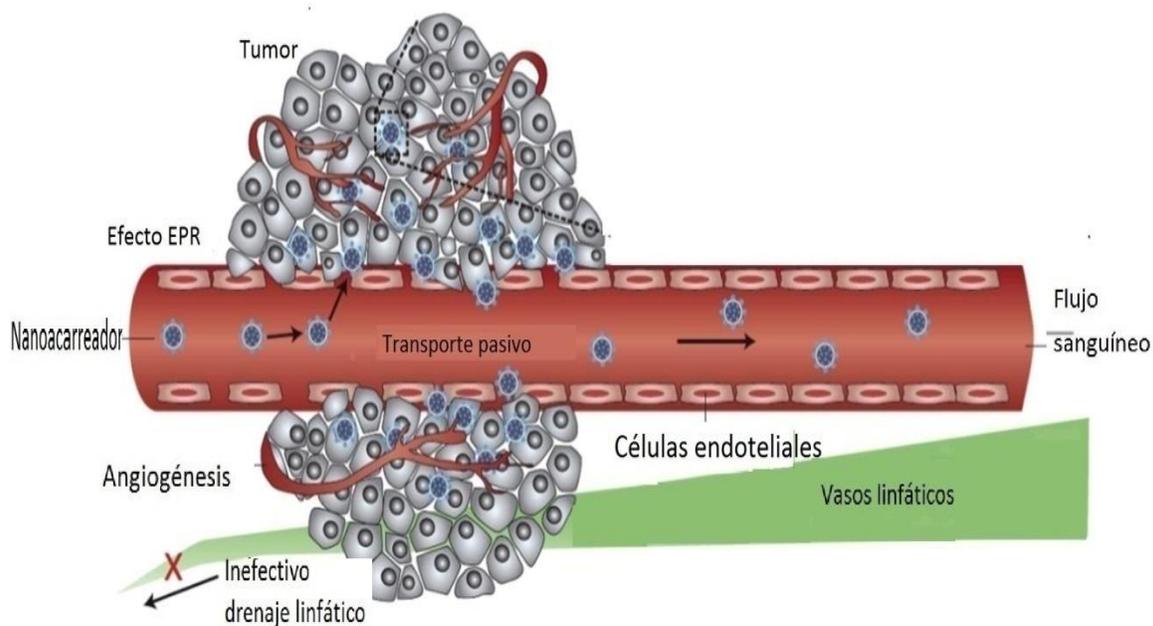


Figura 5. Esquema general del efecto EPR. Modificado de [30].

El efecto EPR puede ser aprovechado para que los nanoacarreadores sean localizados en los tumores sólidos mediante un transporte pasivo; el cual se basa en el paso mediante difusión pasiva a través de los capilares tumorales defenestrados. Descrito lo anterior, se debe tomar

en cuenta el tamaño de los sistemas a utilizar. Se ha visto que para que se pueda obtener un efecto EPR, el diámetro del acarreador debe tener un tamaño de 10 a 200 nm. Por otra parte, si los sistemas acarreadores son inyectados en el flujo sanguíneo un tamaño no adecuado, podría resultar en una obstrucción física de los vasos sanguíneos. Además, nanoacarreadores más grandes que 400 nm en diámetro, son conocidos por ser fácil y rápidamente capturado por el sistema reticuloendotelial, por lo que las nanopartículas no pueden circular en el flujo sanguíneo por un tiempo suficiente para liberar una cantidad adecuada y conseguir el objetivo terapéutico. Partículas en un rango de 10 a 200 nm son tamaños óptimos a partir de la inyección intravenosa y demostraron tiempos de circulación más prolongado en la sangre [4,26,31,32].

1.7.1 Nanoencapsulación de Casiopeína III-ia

Son diversos los sistemas nanoacarreadores usados con el objetivo de encapsular compuestos antitumorales, tales como las micelas, liposomas, dendrimeros, nanopartículas inorgánicas y nanopartículas sólidas lipídicas; que pueden autoensamblarse o ser directamente sintetizados dentro de multicomponentes y sistemas multifuncionales [27]. En este sentido, se ha realizado la nanoencapsulación de la Casiopeína III-ia en nanopartículas sólidas lipídicas y en nanopartículas poliméricas, esto, tomando en cuenta las características de los tejidos tumorales y las propiedades farmacológicas y la farmacocinética preclínica del compuesto. A continuación se describe brevemente los resultados obtenidos en cada uno de los trabajos reportados.

Morán en 2006, reportó la nanoencapsulación de Casiopeína III-ia mediante nanopartículas sólidas lipídicas (nsl). Encontraron tamaños de partículas alrededor de 100 nm, y evaluaron la estabilidad del sistema coloidal luego de tres meses de formadas las nsl, se encontró que todas las formulaciones presentaban aumento en el tamaño de partícula. De las cuatro formulaciones, una presentó estabilidad a través del tiempo y un potencial zeta de -30.2 mV. La inestabilidad observada para las otras tres fue confirmada mediante microscopía electrónica de barrido, donde se observaron partículas de hasta 130 μm . Al evaluar el perfil

de liberación del compuesto, se observó una liberación prolongada en comparación con la Casiopeína III-ia libre. No se presentaron datos de eficiencia de encapsulación [33].

Por su parte, Miranda en 2012 reportó la preparación de nanopartículas poliméricas de quitosán cargadas con Casiopeína III-ia por el método de coacervación. Dadas las condiciones de preparación de las nanopartículas, se evaluó una posible interacción de la Casiopeína III-ia con el quitosán, encontrando interacciones débiles entre el polímero y el compuesto. Observaron que la concentración del polímero, concentración del estabilizante, pH del medio y velocidad de agitación son factores claves para obtener un tamaño de partícula adecuado para su administración intravenosa. Encontraron eficiencias de encapsulación de 12.8 %, probablemente debido al carácter hidrofílico del compuesto, por lo que se espera que la mayor parte se encuentre en el seno de la disolución. La actividad *in vitro* en una línea tumoral HeLa no se modificó por la presencia de quitosán. Sin embargo, la administración de Casiopeína III-ia en las nanopartículas de quitosán aumentó el tiempo de supervivencia en ratones y disminuyó la ganancia en peso con respecto a la administración del compuesto libre [34].

Descrito lo anterior, se observa una ventana de oportunidades para la administración de Casiopeína III-ia mediante nanoencapsulación. Si bien son diversos los materiales usados para la formación de nanoacarreadores, los liposomas y los conjugados polímero-fármaco actualmente son los más usados en la clínica. En este sentido, Estanqueiro y colaboradores en 2015, reportaron los sistemas de liberación de fármacos para tratamiento de cáncer usados en la clínica y aquellos que se encuentran en alguna fase clínica. En la figura 6, se presenta un gráfico de pasteles realizado a partir de la tabla presentada por Estanqueiro [3].

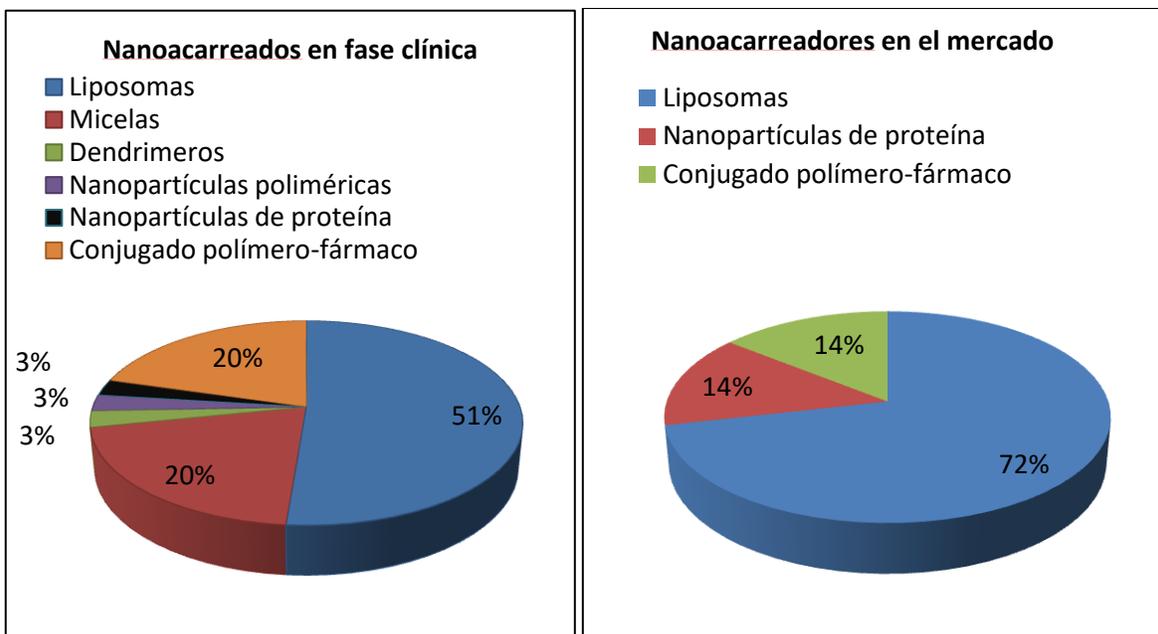


Figura 6. Nanoacarreos en alguna fase clínica o usado en el mercado para el tratamiento del cáncer.

Tal como se observa en los gráficos anteriores, los liposomas presentan más del 50 % del tipo de nanoacarreos utilizado en ambos casos, esto se debe a que presentan diversas ventajas, como son: encapsulación de compuestos hidrofílicos y lipofílicos y su buena biodegradabilidad. Bajo esta tesitura y tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas (hidrosoluble), farmacológicas (antineoplásico, citotóxico) y farmacocinéticas (baja biodisponibilidad en modelos animales) del compuesto, resulta de interés nanoencapsular la Casiopeína III-ia en un sistema vesicular como son los liposomas. Sin embargo, estos sistemas presentan desventajas como altos costos, y que los fosfolípidos utilizados pueden ser inestables y requieren condiciones especiales. Dada esta situación, han surgido alternativas análogos a los liposomas, entre los que destacan los niosomas [3].

1.8 Niosomas

Los niosomas son vesículas formadas principalmente por un tensoactivo no-iónico, y en muchos casos es añadido colesterol o sus derivados para aumentar su estabilidad, estas vesículas son análogas a las vesículas de los fosfolípidos que forman los liposomas (figura 7).

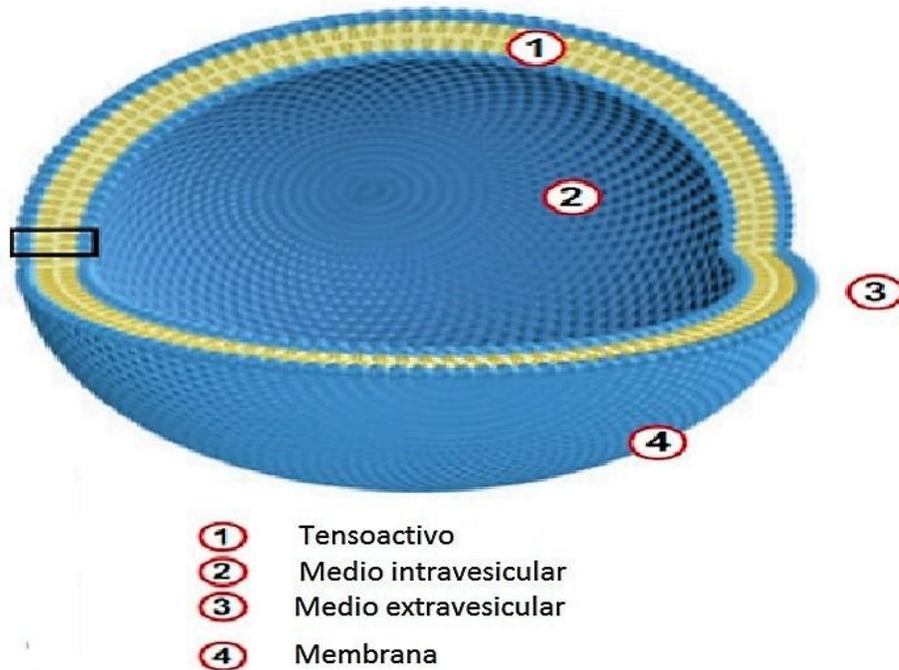


Figura 7. Estructura general de los sistemas niosomales [35].

Estos sistemas fueron introducidos por primera vez al mercado por L'Oréal en 1986 en la crema Niosôme de Lancôme, el cual se usó para el transporte de ingredientes activos como el retinol y la vitamina E. Se ha visto que el autoensamblaje de estos sistemas raramente es espontáneo, por lo que normalmente se requiere aplicar alguna energía como agitación física o calor [36,37].

Los tensoactivos no iónicos al ser moléculas anfifílicas, y al estar en un medio acuoso se pueden autoensamblar resultando en una estructura bicapa, por lo que una de las ventajas de los niosomas es que pueden atrapar fármacos lipofílicos dentro de la membrana de la bicapa vesicular y fármacos hidrofílicos en su compartimento acuoso. Estos sistemas niosomales han atraído especial atención debido a que ofrecen diversas ventajas sobre los liposomas en algunos aspectos, tales como:

- a) Son osmóticamente activos, químicamente estables y pueden ofrecer un alto tiempo de almacenamiento comparado con los liposomas, por lo que se propone pueden incrementar la estabilidad del fármaco encapsulado [38,39].

- b) Se presume que tienen alta biocompatibilidad con los sistemas biológicos y baja toxicidad por su naturaleza no iónica [39].
- c) Pueden exhibir una mejor aceptación por parte del paciente, ya que su formulación se basa en una suspensión acuosa coloidal a diferencia de las dosificaciones oleosas, que pueden resultar dolorosas [38,39].
- d) A diferencia de los fosfolípidos, los tensoactivos no requieren precauciones y condiciones específicas.
- e) Características de los niosomas como tamaño de partícula, eficiencia de atrapamiento y estabilidad puede ser controlado por el método de preparación, tipo de tensoactivo, el contenido de aditivos, entre otros [38,40,41].

1.8.1 Factores que afectan las propiedades fisicoquímicas de los niosomas

Existen diversos factores que pueden afectar la formación de los niosomas, los cuales juegan un rol importante en las propiedades termodinámicas, cinéticas y fisicoquímicas en el autensamblaje de éstos compuestos anfifílicos. Los más conocidos son, el balance hidrofílico-lipofílico y la geometría de la molécula anfifílica [42]. Asimismo, la temperatura es un factor importante ya que puede inducir un cambio en la vesiculación, así como en el tamaño y la forma de los niosomas [39].

1.8.1.1 Balance hidrofílico-lipofílico (HLB, por sus siglas en inglés)

El balance hidrofílico-lipofílico es utilizado como un indicador de la habilidad de algún tensoactivo de formar vesículas. El rango de valores para tensoactivos no iónicos de HLB van de 0 a 20. Valores por debajo de 9 son tensoactivos liposolubles, mientras que valores de HLB mayores de 11 son tensoactivos solubles en agua. Diversos experimentos han mostrado que valores entre 3 y 8 son candidatos a la formación de superficies en bicapa y pueden actuar como emulsificadores de sistemas agua (w)/aceite (o). A medida que el valor de HLB aumenta, el tamaño de las vesículas también incrementa dado que la energía de superficie decrece con el incremento en la hidrofiliidad del tensoactivo. Entre los tensoactivos más utilizados para la formación de los niosomas se encuentran los poliglicerol-alkil-éteres,

glucosil-dialquil-éteres, polioxi-etilen-éter y éster como una serie de Brijis, Spans y Tweens, los cuales tienen un valor de HLB entre 4 y 8, que muestran una compatibilidad con la formación de las vesículas [37,40,43].

1.8.1.2 Temperatura de transición de fases (T_c)

Los tensoactivos y lípidos son caracterizados por la temperatura de transición de fase gel-líquido (T_c), dicho parámetro afecta el ensamblaje del tensoactivo en vesículas y la forma de éstas, por lo que los sistemas son comúnmente formados a una temperatura por arriba de la T_c . Por otra parte, se ha observado que a una mayor T_c se obtiene una mayor eficiencia de encapsulación. En este sentido, Abdelkader y colaboradores, realizaron estudios comparando diferentes Span (20, 40 y 60), donde se encontró que debido a que el Span 60 tiene una cadena hidrocarbonada larga y una alta T_c (60 °C), presenta las mayores eficiencias de encapsulación, estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores donde se observó que cuando el Span 60 es usado se obtiene una mayor encapsulación [37,39,42–45].

1.8.1.3 Parámetro de empaquetamiento (CPP)

La geometría de la molécula anfifílica, se ha usado como parámetro para predecir las asociaciones que pueden sufrir los monómeros de tensoactivo en un disolvente. Dicho parámetro fue denominado "parámetro crítico de empaquetamiento" que fue discutido por Inraelachvili y col. en 1976, los cuales propusieron la siguiente ecuación:

$$CPP = \frac{v_o}{l_c A} \quad (1.1)$$

Donde:

v_o = volumen del grupo hidrofóbico

l_c = longitud crítica del grupo hidrofóbico

A = el área de la cabeza hidrofílica.

Cuando la cabeza polar del tensoactivo es más grande en comparación con su parte hidrofóbica ($CPP < 1$), las moléculas tienden a formar micelas, mientras que se esperan micelas inversas cuando el $CPP > 1$. Un CPP entre 0.5-1 indica que la formación de bicapas se ve energéticamente favorecida, ya que la fuerza que conduce a la vesiculación es el cambio conformacional del incremento anfifílico en el valor del parámetro de empaquetamiento, que favorece la más baja curvatura [37,42,46].

1.8.2 Termodinámica de los liposomas

En general, los liposomas o vesículas de tensoactivos no iónicos, no son estructuras termodinámicamente estables dada su energía elástica de flexión (E_b), originado a partir de la curvatura, C , de la bicapa simétrica. Lasic en 2001, mencionó que las membranas simétricas prefieren ser planas (curvatura espontánea = $C_0 = 0$) y se requiere energía para alcanzar una curvatura. De igual forma, se ha planteado que el autoensamblaje debe lidiar con una entropía negativa y la reducción de la energía libre ($-\Delta G$) y sólo con una favorable contribución en la entalpía al arreglo a partir de atracciones por van der Waals, fuerzas hidrofóbicas, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas [40,42,47,48].

En varios artículos se ha planteado que se ha logrado una vesiculación espontánea. En este sentido, Lasic en 2001, definió la vesiculación espontánea como un proceso en el cual las vesículas son formadas simplemente por la adición de agua, mezcla de compuestos apropiados y un cambio de temperatura. En el caso de los liposomas, se ha reportado la formación espontánea de la bicapa, sin embargo, hasta lo investigado en la literatura, éstos autores utilizan algún tipo de energía para provocar la formación de la bicapa, típicamente formados en un proceso dinámico cinético, como sonicación, homogeneización o extrusión a altas presiones. Por otra parte, Lasic menciona que para los liposomas, la formación espontánea puede darse sólo en el caso de bicapas extremadamente flexibles, dicha flexibilidad está dada por una asimetría en la bicapa lipídica, esto se logra induciendo a una $C \neq 0$, que puede estar dada a partir de interacciones hidrofóbicas, estéricas o electrostáticas [46,49]. Se dice que es la inestabilidad termodinámica, con estabilidad cinética, quien hace

que los liposomas puedan ser candidato a muchos usos en procesos biológicos y aplicaciones.

1.8.3 Formación de los niosomas

La eficacia de los sistemas de liberación de fármacos es dependiente de sus componentes, éstos deben ser elegidos en términos de las propiedades farmacológicas y fisicoquímicas necesarias para la vía de administración y patología a tratar; deben tener características específicas, junto con biocompatibilidad y relevancia en la clínica. Para los niosomas, los componentes principales son tensoactivos no iónicos y algún aditivo como colesterol y en algunos casos, alguna molécula cargada como dicetilfosfato [42].

1.8.3.1 Tensoactivos

Los tensoactivos son moléculas anfifílicas que tienen dos distintas regiones en su estructura química, uno de los cuales es hidrofílico y el otro es hidrofóbico. Las dos porciones pueden estar unidas por enlaces éter, éster o amida, y son clasificados de acuerdo al grupo polar de la cabeza, pudiendo ser iónicos y no iónicos [40,42,50].

Los tensoactivos no iónicos son el tipo más común de agentes activadores de la superficie usados en la preparación de la vesícula, dado los beneficios que ofrecen respecto a la estabilidad, compatibilidad y toxicidad comparada con sus contrapartes aniónicas, anfotéricas o catiónicos. Los no iónicos son generalmente menos tóxicos, menos hemolíticos y menos irritantes a la superficie celular [43].

1.8.3.1.1 Tensoactivos no iónicos

Un tensoactivo no iónico, tiene una cabeza polar no cargada. Ejemplos de estos compuestos son: sales de ácidos grasos, sulfatos, sulfatos éter y fosfatos éster. Los Spans (ésteres de sorbitan), Tweens (polisorbatos) y Brij (polioxietilen aquil éter) son los tensoactivos más usados debido a que estos compuestos presentan en general un parámetro de empaquetamiento entre 0.5-1 y un HLB entre 4 y 8, lo que los hace candidatos a la formación de vesículas [39,40,43,50].

Diversos autores han observado que al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada de los tensoactivos, la eficiencia de encapsulación (EE) aumenta. Por lo que se han comparado diferentes Spans (20, 40, 60 y 80) los cuales tienen un número de carbonos de 12, 14, 16 y 16, respectivamente. Considerando que todos los Span tienen la misma cabeza hidrofílica, con diferentes longitudes en la cola hidrocarbonada, se encontró que el Span60 presenta las mayores eficiencias de encapsulación tanto para fármacos hidrofílicos (metformina) como para fármacos hidrofóbicos (tamoxifen). Tanto el Span60 como el Span80, tienen la misma longitud de cadena hidrocarbonada, sin embargo, el Span80 muestra más bajas eficiencias de encapsulación, dada una insaturación en la cadena alquílica, lo que hace la cadena más flexible [41,51–54]. En este sentido, De Gier y col. demostraron que la introducción de un doble enlace en la cadena de parafina causa un marcado mejoramiento en la permeabilidad de los liposomas, lo que podría explicar la más bajas eficiencias de atrapamiento [55].

1.8.3.2 Agentes aditivos

Los agentes aditivos pueden ser un parámetro efectivo para ayudar y estabilizar el autoensamblaje del tensoactivo en liposomas. Al agregar un agente aditivo, se puede estabilizar físicamente el sistema de tal forma que se prevenga la formación de agregados [37,40].

1.8.3.2.1 Colesterol

El colesterol es un metabolito esteroide de cera encontrado en las membranas celulares. Es el aditivo más común usado en una formulación liposomal dada su conocida capacidad de proveer una mayor estabilidad a la bicapa vesicular promovido por la temperatura de transición gel-líquido del tensoactivo. La presencia de un sistema esteroideal decrece la fluidez e imparte rigidez al liposoma y en general, afecta propiedades físicas y estructurales como la permeabilidad en la membrana, mejoramiento de su estiramiento mecánica, eficiencia de encapsulación, tiempo de almacenamiento y estabilidad [37,39,40,42,56]. Varios tensoactivos forman vesículas solo después de la adición del colesterol (entre 30-50 % mol) por lo que la cantidad de colesterol a agregar depende del valor HLB [42]. Para tensoactivos con HLB > 6, el colesterol puede ser agregado en orden para formar una

vesícula en bicapa y para bajos valores de HLB, el colesterol mejora la estabilidad de las vesículas [40]. Se ha observado que cuando se utiliza una relación molar 1:1 (tensoactivo:colesterol) se obtienen vesículas niosomales estables. Yoshioka en 1994, reportó que los niosomas preparados con Span 60 y sin colesterol forman un gel y solo con la adición de colesterol se obtuvo una dispersión homogénea de niosomas [37].

Se ha planteado que la posición del colesterol en la bicapa de la vesícula forma enlaces de hidrogeno con la cabeza hidrofílica del tensoactivo (figura 8), y se ha sugerido que puede incrementar la interacción entre las proporciones no polares de la bicapa, mejorando así la cohesión de la membrana niosomal [42].

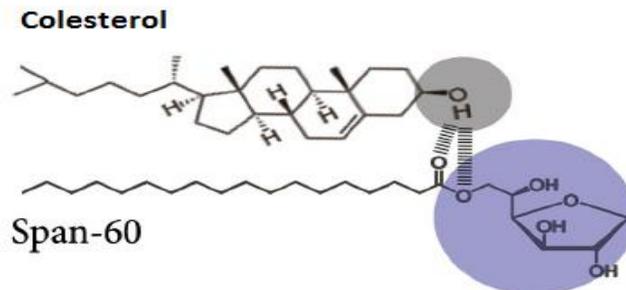


Figura 8. Formación por puentes de hidrógeno del colesterol con las cabezas hidrofílicas del Span60. Modificado de [40].

Si bien el colesterol es usado como principal aditivo, se han utilizado otras moléculas que se plantea pueden otorgarle una mayor estabilidad al sistema, otorgándole carga a los niosomas [45].

1.8.3.2.2 Molécula cargada

Moléculas con carga son usadas como una alternativa para incrementar la estabilidad de los niosomas, ya que le otorgan carga al nanoacarreador previniendo la coalescencia por repulsiones electrostáticas. Algunos ejemplos, son Dicetil fosfato (DCP) y ácido fosfatídico (cargadas negativamente), y con carga positiva se encuentran stearyl amina (SA) y cloruro de cetilpiridina; siendo dicetil fosfato la más usada. Si bien pueden otorgar estabilidad al sistema, sólo son tolerables 2.5- 5 % en mol de concentración ya que altas concentraciones

pueden conducir a la inhibición de la formación de los niosomas, y un incremento en la concentración de DCP, puede conducir a un decremento en la eficiencia de encapsulación [39,42,56,57].

1.8.3.3 Efecto de la concentración tensoactivo/aditivos

La concentración máxima de tensoactivo/colesterol usado para preparar los niosomas es generalmente 30 mM [43]. La mayoría de los autores reportan concentraciones alrededor de 20 mM; no obstante, se ha observado la formación de vesículas multilamelares o vesículas unilamelares grandes por arriba de 1000 nm con formación de precipitados. Con la finalidad de obtener vesículas unilamelares pequeñas se ha recurrido a métodos como sonicación (disminuir) o filtración (aislar). Es por lo anterior, que se ha pensado en usar diversas concentraciones y relaciones molares tensoactivo/colesterol para la formación de los niosomas con la finalidad de evaluar, principalmente la influencia de éstos en la eficiencia de encapsulación. En este sentido, en 2010, Hao y Li encontraron que cuando se usó una concentración de 2×10^{-4} M y relación molar 1:1, se obtenía una mayor eficiencia de encapsulación y tamaño de partículas alrededor de 150 nm; reportaron que cuando se usó DCP, la eficiencia de encapsulación disminuyó y no encontraron efecto alguno en la estabilidad del sistema [41]. Shaker, en 2015, comparó la encapsulación de un compuesto hidrofílico con diferentes tensoactivos y se obtuvo una mejor eficiencia de encapsulación cuando la relación molar tensoactivo/colesterol fue 1:1 [54]. Además, cuando el tensoactivo fue Span, un incremento en la cantidad incorporada de colesterol sobre la relación equimolar significó un incremento en la rigidez de la membrana. Membranas rígidas ensamblan en vesículas grandes por lo que se vio que un incremento en el tamaño de los niosomas, lo que significó un decremento en la eficiencia de encapsulación [54].

1.8.4 Tipos de niosomas

De acuerdo al tamaño de los niosomas, éstos pueden ser clasificados en cuatro categorías (figura 9). Vesículas unilamelares pequeñas (SUV) (10-100 nm), vesículas grandes unilamelares (LUV) (100-3000 nm), unilamelares gigantes (UG) (>3000 nm) y vesículas multilamelares (MLV) donde se presenta más de una bicapa [40].

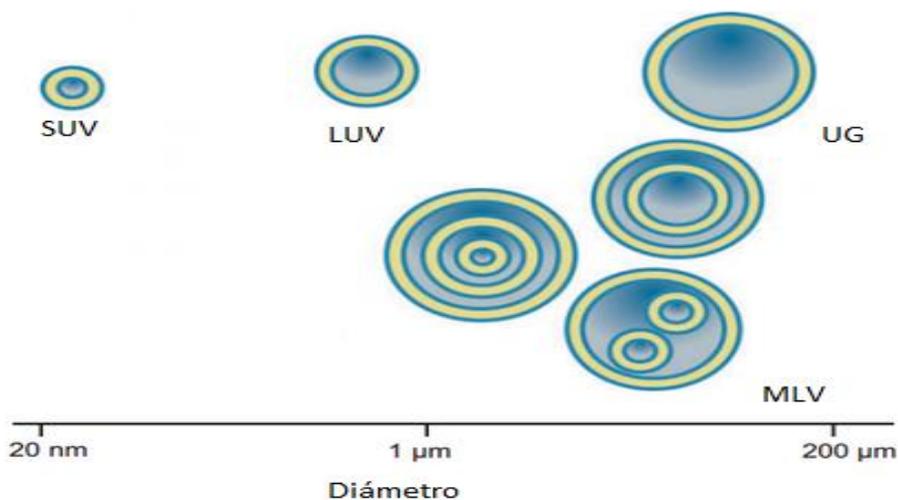


Figura 9. Clasificación de las vesículas de acuerdo a su tamaño.

1.8.5 Métodos de preparación de los niosomas

Existen diversos métodos para la preparación de un sistema niosomal en los cuales se requiere aplicar alguna forma de energía y la mayoría de ellos consisten en la hidratación de una mezcla de tensoactivo/colesterol a la temperatura de transición de fases del tensoactivo; seguido por una opcional reducción de tamaño para obtener una dispersión coloidal. El más utilizado es el método de hidratación de la película delgada, no obstante, existen otras alternativas como el método de inyección del éter. A continuación se realiza una breve descripción de ambos métodos.

1.8.5.1 Método de hidratación de película delgada (MHPD)

En el método de la película delgada, el tensoactivo y los aditivos a utilizar son disueltos en un disolvente orgánico, generalmente una mezcla de metanol/cloroformo en un matraz de fondo redondo. El disolvente entonces es evaporado en un rotavapor con el objetivo de formar una película delgada. Agua o una disolución acuosa como buffer de fosfatos (conteniendo el compuesto) a un temperatura por encima de la T_c del tensoactivo es agregada al matraz, de tal forma que se hidrate la película delgada. MLVs son formadas durante la hidratación y se puede realizar una posterior reducción del tamaño mediante sonificado [39,40,48]. Éste método ha sido reportado por diversos autores, en donde la

preparación de niosomas se ha realizado utilizando diferentes tipos de tensoactivos (Span, Tween y Brij), colesterol (relación molar, 1:1) y en algunos caso dicetilfosfato [41,47,56]. Se ha reportado, el uso de 10 mL de una mezcla de cloroformo y metanol para la formación de la película delgada [41,56]. Luego de la hidratación de la película se observó la formación de los niosomas (SUV y MLV), la dispersión resultante fue filtrada [56], y en algunos casos se sonicó durante 60 minutos [41,56].

1.8.5.2 Método de inyección de éter (MIE)

En este método, el tensoactivo y los aditivos son disueltos en un disolvente orgánico como dietil éter e inyectado lentamente a través de una aguja en una solución acuosa (que contiene el fármaco) manteniendo una temperatura constante. El disolvente orgánico es evaporado usando un rotavapor. Durante la evaporación del éter, el tensoactivo es conducido a la formación de vesículas de capa simple. A partir de esta técnica se producen SUVs y LUVs y se ha visto que se tienen altos volúmenes de agua atrapada. Dependiendo de las condiciones, el diámetro de la vesícula final puede estar en un rango entre 50-1000 nm [39,40].

1.9 Niosomas usados para fármacos para el tratamiento contra el cáncer

Mohamed y col en 2012, nanoencapsularon silimarín mediante niosomas. Encontraron que los niosomas formados con Span60 y colesterol (1:1), mostraron una eficiencia de encapsulación de 70.61 ± 1.83 %. Encontraron que si se agregaba una molécula cargada al sistema la eficiencia de encapsulación disminuía. El análisis estadístico reveló que el incremento en la cantidad del colesterol en relación molar Span60/Colesterol (2:1) a una relación molar Span60/Colesterol (1:1) significó un incremento en la eficiencia de atrapamiento [58].

Yang y col. en 2013, prepararon y caracterizaron sistemas niosomales para la encapsulación del cis-platino. Usaron diversos tensoactivos, para evaluar la eficiencia de encapsulación y estabilidad con Span (40, y 60) y Tween (20, 40 y 80), y variando la relación molar del colesterol. Observaron que cuando utilizaban Span40, una relación Span40/Colesterol 1.5:1

y temperatura de formación entre 60-80 °C, se obtenía una mayor estabilidad y una eficiencia de encapsulación del 76.93 %. El tamaño promedio de partícula fue 7.33 μm con un potencial zeta de 0.8 ± 0.5 mV. Encontraron una liberación del 11.73 % en la primera hora, mientras que para el fármaco libre la difusión a través de bolsas de diálisis fue de 83.07 % en 0.5 horas. Reportan que la liberación *in vitro* puede ser expresada por una distribución de Weibull. Realizaron pruebas *in vivo* en ratones, donde observaron que cuando se inyectaba localmente los niosomas-cisplatino se tenía una mayor inhibición del crecimiento tumoral y una mortalidad más baja comparado con el cisplatino libre [59].

Sharma y col. en 2015, prepararon y caracterizaron niosomas encapsulando dos compuestos antitumorales (doxorrubicina y curcumina). Usaron Tween 80 y colesterol en una relación molar 1:1. Lograron formar niosomas estables con un potencial zeta de -24 ± 2 mV; de acuerdo a sus micrografías de SEM, no se observó agregación de los sistemas. Encontraron que la población niosomal era polidispersa con dos tamaños de partícula, una mayor a 3 μm y otra de 250 ± 20 nm. Encontraron eficiencias de encapsulación de 90 y 25 % para la curcumina y para la doxorrubicina respectivamente. Se obtuvo una liberación del 79 % para la doxorrubicina en dos días y del 70 % para la curcumina luego de una semana. Estudios de citotoxicidad en línea tumorales de Hela, muestra que el fármaco cargado en los niosomas presenta una mayor citotoxicidad en comparación con los fármacos libres, mientras que el blanco de niosoma no muestra citotoxicidad [47].

Shaker y col. En 2015, nanoencapsularon tamoxifen en niosomas, preparados a partir de diferentes tensoactivos y diferentes relaciones molares tensoactivo:colesterol. Observaron que cuando se usó Span60 con relación molar tensoactivo:colesterol (1:1), se obtenía un alta encapsulación (92 %), una liberación rápida en las primeras 4 horas (35 % liberado) y una posterior liberación lenta hasta por 7 días con una cinética gobernada por difusión (Higuchi), y tamaños de partícula alrededor de 212 nm. Se observó un mejoramiento en la captación celular y una mejor actividad citotóxica con líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 cuando se usaron los sistemas niosomales en comparación con el fármaco libre. Experimentos *in vivo* mostraron un mejoramiento en la reducción del tamaño del tumor [54].

Hipótesis

Debido a que la Casiopeína III-ia presenta una baja biodisponibilidad en modelos animales y se trata de un compuesto hidrosoluble, al nanoencapsular la Casiopeína III-ia en un sistema niosomal, se obtendrá una alta eficiencia de encapsulación y al evaluar su liberación *in vitro* se observará una liberación modificada.

Objetivo General

Nanoencapsular Casiopeína® III-ia mediante un sistema niosomal y evaluar su liberación *in vitro*.

Objetivos específicos

- Obtener niosomas mediante el método de hidratación de la película delgada y el método de inyección del éter.
- Evaluar el tamaño de partícula mediante dispersión dinámica de luz, con la finalidad de elegir el método a utilizar para la nanoencapsulación.
- Obtener el sistema niosomal cargado con Casiopeína III-ia y evaluar la eficiencia de encapsulación.
- Caracterizar los niosomas cargados mediante dispersión dinámica de luz, microscopía, espectrofotometría UV-visible y espectroscopía de infrarrojo.
- Evaluar interacción fármaco-niosoma mediante UV-visible.
- Evaluar el perfil de liberación de la Casiopeína III-ia.
- Evaluar la actividad biológica de la Casiopeína III-ia nanoencapsulada en cultivos de la línea tumoral HeLa.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

Para la formación de los niosomas se utilizó monoestereato de sorbitan (Span® 60) y colesterol con un peso molecular de 430.63 g/mol y 386.65 g/mol respectivamente, ambos marca Sigma-Aldrich. La Casiopeina® III-ia fue sintetizada en el laboratorio 210, del departamento de química inorgánica y nuclear, de la facultad de química de la UNAM, que fue proporcionado por la M. en C. Ana Luisa Alonso. Como disolventes se utilizó metanol, diclorometano y éter etílico grado reactivo.

2.2 Formación de los niosomas

La preparación de los niosomas, se realizó por medio del método de formación de la película delgada y por el método de inyección del éter.

2.2.1 Método de la película delgada

Una mezcla de tensoactivo y colesterol con una relación molar 1:1 y una concentración total de 0.2 y 20 mM, se disolvió en 10 mL de una mezcla de metanol/diclorometano (1:4, v/v) y fue colocado en un matraz balón de 100 mL; posteriormente el disolvente orgánico fue removido bajo vacío en un rotavapor a 60 °C con el objetivo de formar una película delgada en el fondo del matraz y el diclorometano residual fue evaporado durante 8 horas a temperatura ambiente. La película seca fue hidratada con 10 mL de agua destilada y se sonicó durante una hora a 60 °C. Luego de la preparación, la dispersión fue filtrada en un papel filtro Wathman #2 con un tamaño de poro de 8 µm y fue reservada para medir tamaño de partícula por medio de dispersión dinámica de luz (LSD, por sus siglas en inglés). El diagrama general de la metodología anteriormente descrita se presenta en la figura 10.

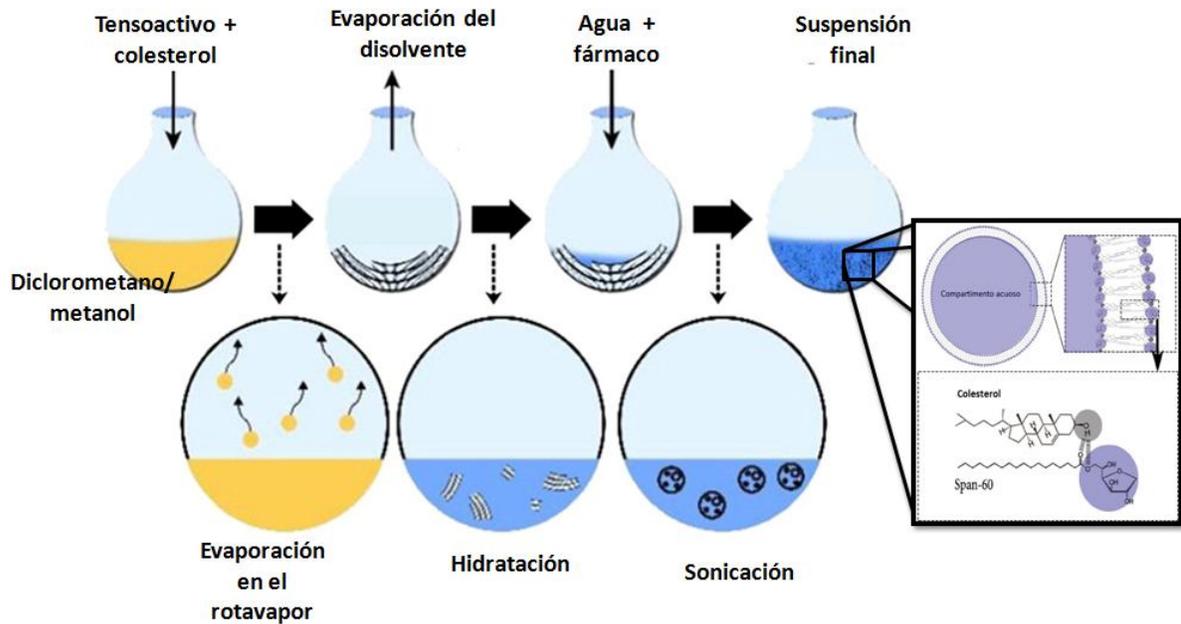


Figura 10. Formación de niosomas mediante el método de hidratación de la película delgada. Modificado de [40].

2.2.2 Método de inyección del éter

El método de inyección del éter fue llevado a cabo con modificaciones de acuerdo a como se describe a continuación. La cantidad correspondiente de Span 60 y colesterol con una relación molar 1:1 y una concentración total de 0.2 y 2 mM, fueron disueltos en 2.5 mL de éter etílico. Esta disolución fue agregada por goteo a 10 mL de agua destilada precalentada a 60 °C. Este nuevo sistema se dejó en agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente hasta la evaporación del éter. De la dispersión obtenida, 5 mL fueron reservados sin sonicación para su caracterización por tamaño de partícula y 5 mL fueron sonicados durante 30 minutos; todas las formulaciones fueron reservadas para medir tamaño de partícula por medio de dispersión dinámica de luz (figura 11).

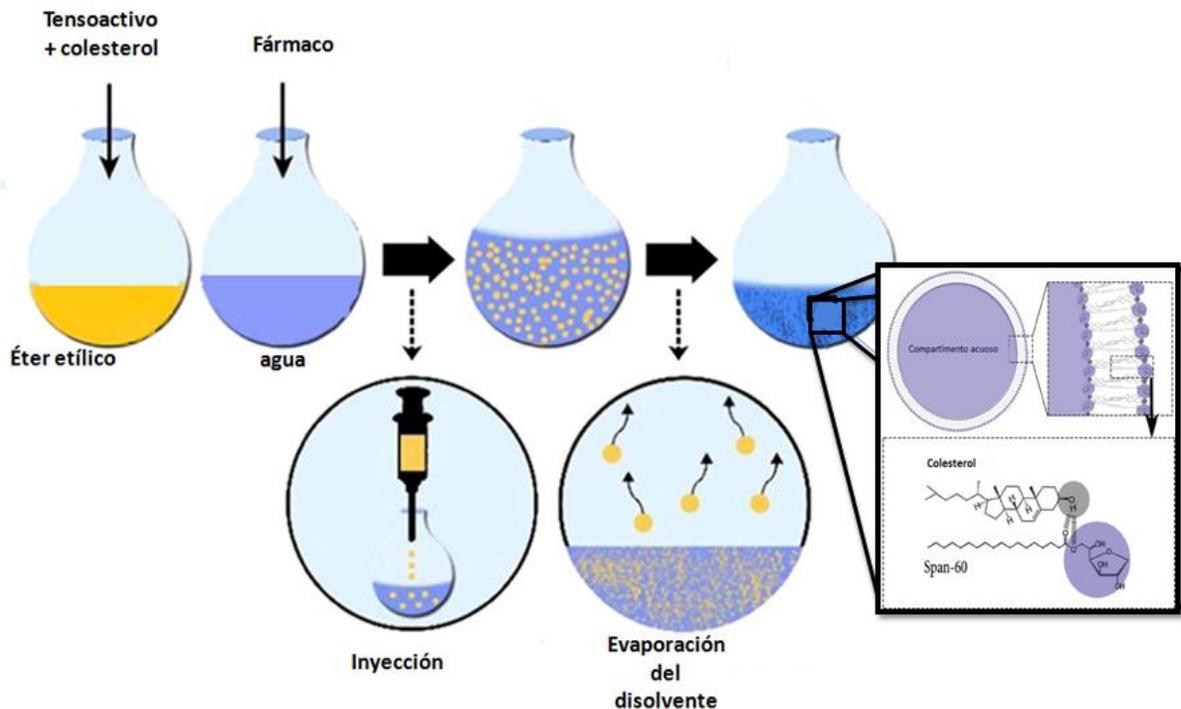


Figura 11. Formación de niosomas mediante el método modificado de inyección del éter. Modificado de [40].

En el cuadro 4 se presenta un resumen de la concentración de tensoactivo/colesterol y el tiempo de sonicado para ambos métodos.

Cuadro 4. Condiciones experimentales para la formación de los niosomas mediante dos métodos.

Método de la película delgada		Método de inyección de éter	
Concentración Span60/Colesterol (mM)	Tiempo de sonicado (minutos)	Concentración Span60/Colesterol (mM)	Tiempo de sonicado (minutos)
0.2	60	0.2	0
		0.2	30
20	60	2	0
		2	30

2.3 Eficiencia de atrapamiento

2.3.1 Variación en la concentración Span60/Colesterol

Con la finalidad de observar la influencia de la concentración del Span60/Colesterol (S/C) en la eficiencia de encapsulación, se realizó un estudio tal como lo sugirieron Hao y Li en 2011. Se varió la concentración de S/C de 1 a 5×10^{-4} M, mientras que la concentración del soluto (Casiopéina III-ia) se mantuvo en 9×10^{-5} M ($n = 3$ repeticiones). Los niosomas fueron preparados de acuerdo al método de inyección del éter. Los sistemas obtenidos fueron centrifugados a 8500 rpm durante 25 minutos a 10 °C. El sobrenadante fue medido por espectroscopía UV-visible a 294 nm para calcular la eficiencia de encapsulación.

2.3.1.1 Cuantificación del fármaco

Para la cuantificación del fármaco se construyó una curva de calibración; para esto, se preparó una solución stock de 200 ppm y se prepararon estándares de 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm. La eficiencia de encapsulación se define como la cantidad en porcentaje de fármaco que es encapsulado en los niosomas. La cuantificación del fármaco se llevó a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$EE = \left(\frac{\text{cantidad de fármaco encapsulado}}{\text{total de fármaco añadido}} \right) 100 \quad (2.1)$$

Para considerar si existía diferencia significativa entre los datos obtenidos, se realizó el análisis de ANOVA de un factor.

2.3.2 Variación de la concentración del soluto

Con el objetivo de evaluar la concentración del soluto en la eficiencia de encapsulación se varió la concentración de la Casiopéina III-ia fijando la cantidad del S/C en 4×10^{-4} M. La concentración del soluto se varió de 0.9 a 8×10^{-4} M. La cuantificación del fármaco se llevó a cabo de acuerdo al método descrito con anterioridad. Se realizó el ANOVA de un factor.

2.4 Morfología

2.4.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se determinó la morfología de los niosomas obtenidos mediante microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa. Para esto, se tomó una gota de la suspensión de los niosomas con y sin compuesto que fue directamente colocada sobre una rejilla de níquel FC con película continua de carbono. La rejilla se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se colocó una gota de acetato de uranilo al 1 % (p/v) [60]. El estudio se realizó en un microscopio electrónico marca JEOL modelo JEM-2010.

2.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se realizó un análisis de los niosomas, luego de 10 días de realizada la formulación mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900LV. Las muestras fueron recubiertas con una película de oro y corridas a 200 kV.

2.5 Tamaño de partícula y potencial zeta

El tamaño de la partícula y potencial zeta se obtuvo mediante un equipo de Dispersión Dinámica de Luz marca NICOMP 380 ZLS. Se tomaron 2 mL de la muestra y se colocaron en una celda de vidrio, se midió el tamaño de la partícula y para el potencial zeta se adaptaron unos electrodos. En ambos casos se calculó el promedio de las mediciones realizadas con $n = 3$.

2.6 Espectrofotometría de UV-visible

2.6.1 Modificación de las transiciones d-d durante el sonicado para el método de la película delgada

Se llevó a cabo la espectroscopia de UV-visible de la Casiopeína III-ia para conocer si se modificaban las transiciones d-d en el espectro de la Casiopeína III-ia durante el sonicado. Para esto, se preparó una solución de Casiopeína 1 mM, se realizó un barrido en un equipo de ultravioleta-visible marca Genesys 10S ThermoScientific de 100 a 1100 nm. El barrido se llevó a cabo antes de sonicado, luego de 15, 30, 45 y 60 minutos de sonicado.

2.6.2 Interacción de la Casiopeína III-ia con la membrana niosomal

Con el objetivo de estudiar una posible interacción de la Casiopeína III-ia con la membrana niosomal, se realizó un barrido en la región ultravioleta con una concentración de tensoactivo/colesterol de 4×10^{-4} M y una concentración de Casiopeína de 0.9×10^{-4} M. Asimismo, con el objeto de observar si existía un cambio en la región visible en las transiciones d-d del cobre, se saturó el sistema con una concentración de 2 mM de Casiopeína III-ia y una concentración de 6 mM del tensoactivo/colesterol; debido a que el Span60 y el colesterol no son solubles en agua, el estudio se realizó en una mezcla diclorometano:metanol con una relación 1:1 v/v, con el objetivo de obtener un sistema totalmente soluble.

2.7 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La composición de las materias primas (Span® 60, Colesterol y Casiopeína III-ia) y de los niosomas con y sin fármaco, se realizó mediante FTIR en un equipo Nicolet Avatar 320 en modo transmitancia, en un intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . Para esto, se preparó una pastilla de bromuro de potasio con las materias primas, niosomas con y sin fármaco a analizar.

2.8 Estudios de liberación *in vitro*

Se evaluó el perfil de liberación de la Casiopeína III-ia mediante estudios de liberación *in vitro* utilizando celdas de difusión en forma horizontal (figura 12). Para esto, 4 mL de una dispersión de niosomas con soluto, una dispersión de niosomas sin soluto y una disolución de Casiopeína (todas con $n = 3$ repeticiones) fueron colocados en el compartimento donador. Se utilizó una membrana de celulosa regenerada de 12-14 kDa, marca Spectrum Labs, la cual fue lavada e hidratada durante 30 minutos con agua destilada. La membrana fue colocada entre los dos compartimentos (receptor y donador). Como medio de difusión se utilizó agua destilada y se mantuvo a $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ con una agitación constante de 150 rpm. Se tomaron muestras a determinados intervalos de tiempo durante 69 horas, las muestras tomadas del compartimento receptor fueron reemplazadas con un volumen igual al

removido. La liberación fue determinada mediante espectrofotometría a 294 nm. Para la cuantificación del fármaco liberado, se realizó una curva de calibración de 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm.

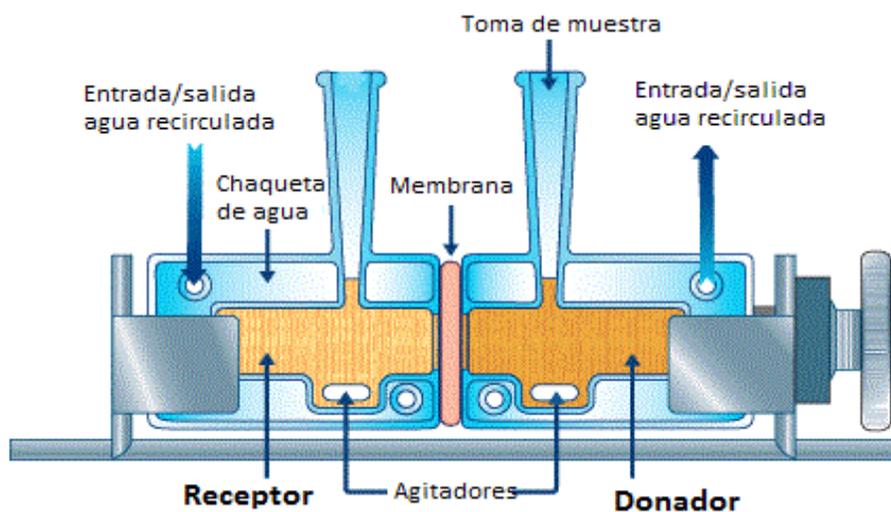


Figura 12. Celdas de difusión en forma horizontal

2.8.1 Cinética de liberación

El método de aproximación utilizado en este trabajo para investigar la cinética de liberación del fármaco a partir de los niosomas, fue mediante modelos independientes, por lo que los datos obtenidos a partir del análisis *in vitro* fueron ajustados a las siguientes ecuaciones cinéticas: orden cero, primer orden y modelo de Higuchi; a continuación se realiza una descripción de cada una.

2.8.1.1 Cinética de orden cero

En este modelo se plantea que se libera la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo, donde la liberación no depende de la concentración. En un sentido ideal, los sistemas de liberación prolongada deben seguir este mecanismo. Se representa por una ecuación lineal de la forma:

$$L_t = L_0 + k_0 t \quad (2.2)$$

Donde:

L_t : Liberación del fármaco en el tiempo t .

L_o : Cantidad inicial del fármaco presente en los niosomas.

t : tiempo.

K_o : constante cinética.

2.8.1.2 Cinética de primer orden

Las formas farmacéuticas que siguen este perfil de disolución suelen ser matrices porosas que contienen principios activos hidrosolubles, y puede ser utilizado cuando se presenta un mecanismo mixto o transporte anómalo. Se representa por la siguiente ecuación:

$$\ln(L_t) = -k_1 \times t + \ln(L_o) \quad (2.3)$$

$$L_o - L_t = e^{-k_1 \times t}$$

$$\ln(L_o - L_t) = -k_1 \times t$$

Donde k_1 : constante cinética de primer orden.

2.8.1.3 Modelo de Higuchi

Este modelo describe la liberación del fármaco como un proceso de difusión a través del nanoacarreador. Esta difusión está basada en la ley de Fick, que depende de la raíz cuadrada del tiempo. La ecuación del modelo de Higuchi es la siguiente:

$$L_t = k_H \times t^{1/2} \quad (2.4)$$

Donde k_H : constante de disolución de Higuchi.

2.9 Evaluación de la actividad *in vitro* en una línea tumoral

Se realizó una prueba de inhibición celular en líneas tumorales HeLa (cáncer cervico-uterino) de la Casiopeína III-ia libre, los niosomas sin Casiopeína y niosomas con Casiopeína. Los

estudios fueron realizados con la ayuda de la M. en C. Silvia Dávila Manzanilla. La evaluación de la inhibición se realizó de acuerdo a lo descrito por Dávila en 2010.

Se sembraron 2×10^4 células HeLa (ATCC) por pozo en una microplaca de 96 pozos (Costar®) en presencia de medio D-MEM (Gibco) adicionado con 10 % de SFB (Gibco), 1 % antibiótico antimicótico (Gibco) y 1 % aminoácidos no esenciales (Gibco). La microplaca se incubó por 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, el medio de cultivo se aspiró y se agregó 100 µL por pozo de la concentración a evaluar (Cuadro 5) utilizando medio de cultivo como vehículo.

Cuadro 5. Concentraciones usadas para calcular la actividad *in vitro*.

	Concentración solución Stock	Concentraciones a evaluar (µM)			
		36	54	72	90
Casiopeína III-ia	245 µM	36	54	72	90
Niosomas	200 µM	40	80	160	200
Niosomas con Casiopeína III-ia.*	400/180 µM	80/36	160/72	200/90	400/180

*Las concentraciones usadas a evaluar fueron establecidas en función de la Casiopeína III-ia en el nanoacarreador.

Se incubó una placa durante 24 horas y otra a 48 horas a las mismas condiciones de temperatura y atmósfera. Pasado el tiempo de incubación se aspiró nuevamente el medio de cultivo y se adicionaron 100 µL de ácido tricloroacético al 10 % (Baker) en cada pozo. Las placas se incubaron a 4 °C durante una hora para fijar las células. Los residuos de ácido tricloroacético fueron lavados tres veces con agua.

La proliferación celular se determinó realizando una tinción con 50 µL de sulforhodamina B (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos, después de los cuales se retiró el colorante y se lavó cuatro veces con 100 µL de ácido acético glacial, para eliminar el exceso del colorante. Posteriormente se agregó 200 µL de tris base (Sigma-Aldrich) 200 mM, pH= 10.5. La cantidad de colorante incorporado se determinó mediante la absorbancia de cada pozo a 564 nm

(Microplate reader BIORAD 550). El porcentaje de crecimiento celular para cada concentración se calculó con la siguiente ecuación

$$\% \text{ de proliferación} = 100 - \left[100 \left(\frac{T}{C} \right) \right] \quad (2.5)$$

Donde T es la absorbancia de los pozos tratados y C es la absorbancia de los pozos no tratados.

2.10 ANÁLISIS DE DATOS

Para graficar los datos arrojados por los equipos de FTIR y espectrofotometría UV-visible se utilizó el software OriginPro 8.5.1. Las muestras de microscopía fueron tratadas con el software Digital Micrograph 3 y los datos de eficiencia de encapsulación fueron graficados en GraphPad Prism 5. Los datos de correlación y constantes cinéticas para los modelos de orden cero, primer orden e Higuchi, así como el cálculo de porcentaje de proliferación celular se obtuvieron a partir de Excel.

Para el análisis de los datos obtenido mediante la variación de la concentración de Span60/Colesterol y de la Casiopeína III-ia, se usó un análisis de varianza ANOVA de un factor, de una vía con 95 % de confianza, con el software StatsGraphics Centurion.

.

III RESULTADOS

Para la formación de los niosomas, se compararon dos métodos, el método de formación de la película delgada y el método de inyección del éter, en ambos casos se varió la concentración de Span60/Colesterol (S/C), con el fin conocer la influencia de éste en el tamaño de partícula mismo que fue tomada como parámetro principal para seleccionar el método y la concentración a usar para la formulación de niosomas con Casiopeína III-ia.

3.1 Método de hidratación de la película delgada

3.1.1 Análisis previo: Efecto del sonicado sobre las transiciones d-d del metal

Tal como se describió en la metodología; para la formación de los niosomas mediante el método de la película delgada, se llevó a cabo el sonicado de la muestra para reducir el tamaño de partícula obtenido. Previo a la formación de los niosomas, se estudió la estabilidad del compuesto de coordinación cuando es sometido al sonicado, para esto se realizó un estudio por espectrofotometría UV-visible, siguiendo las transiciones d-d del metal en la región visible a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los espectros obtenidos son presentados en la figura 13, donde se observa que con el paso de los minutos la absorción del compuesto es mayor, probablemente dado que podría haber ocurrido una pequeña evaporación del disolvente (agua) durante el sonicado.

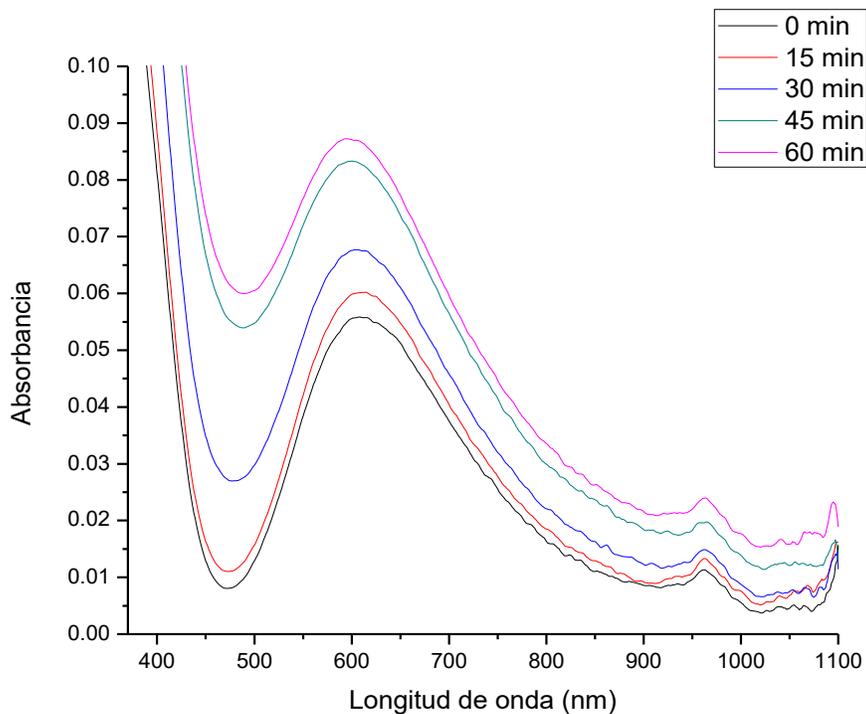


Figura 13. Espectros de absorción en la región visible para transiciones d-d para el cobre.

En la figura 14, se presenta la gráfica del tiempo de sonicado contra absorbancia a 600 nm, donde la absorbancia aumenta conforme aumenta el tiempo de sonicado. Se plantea que dicho aumento, tal como se mencionó con anterioridad, está dado por un incremento en la concentración de la muestra conforme pasa el tiempo y por una interrupción de las posibles interacciones que se podrían dar para formar agregados de la Casiopeína III-ia, esto atribuyendo al hecho de que por medio de conductimetría se encontró que puede existir una posible concentración crítica de agregación a partir de 2.6 mM [61].

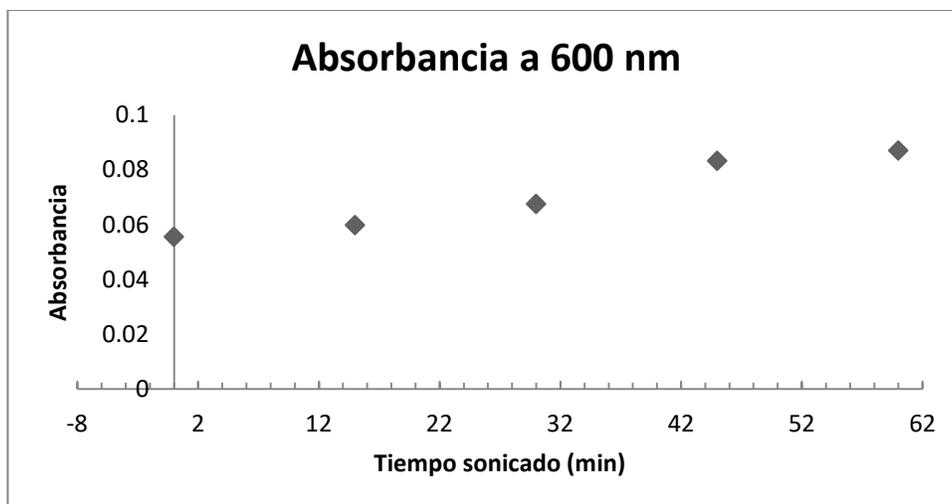


Figura 14. Tiempo de sonicated contra absorbancia a 600 nm.

Por otra parte, también se observa un pequeño desplazamiento hipsocrómico conforme el tiempo de sonicated aumenta, este desplazamiento es presentado en la gráfica de la figura 15, tomando las longitudes de onda en la máxima absorbancia.

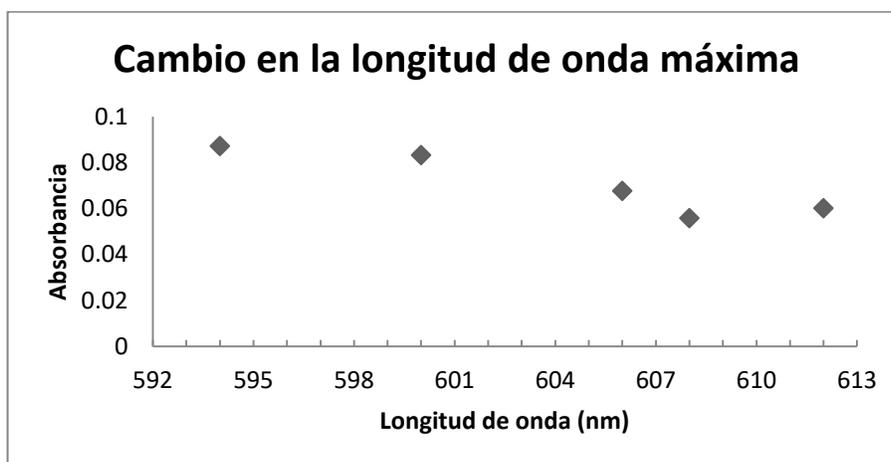


Figura 15. Efecto hipsocrómico de la longitud de onda de máxima absorción para CasIII-ia.

De acuerdo con lo expuesto con anterioridad, se plantea que no existe un cambio estructural en la Casiopeína III-ia por efecto del sonicated, los desplazamientos en la absorbancia e hipsocrómicos se podrían deber a la ruptura de interacciones intermoleculares débiles entre la Casiopeína III-ia. Por lo que la formación de niosomas por el método de la película delgada se llevó a cabo.

3.1.2 Tamaño de partícula

En la figura 16, se presenta el tamaño de partícula (en diámetro) obtenido para el método de la película delgada variando la concentración de Span60/Colesterol con el objeto de conocer si existía un cambio en el tamaño de partícula cuando la concentración de S/C aumentaba. Hasta lo revisado en la literatura, las concentraciones usadas para la formación de niosomas va de 10-30 mM; sin embargo, en el presente trabajo se observó que cuando se utilizó una concentración de 20 mM se obtuvieron tres poblaciones una de ~3000 nm, la segunda de ~600 nm y una tercera de ~100 nm. En este sentido, diversos autores reportan que para la obtención de una sola población, posterior a la formación de las vesículas y su posterior sonicación, la dispersión vesicular se filtra en diversos tamaños de filtro con el objeto de obtener vesículas unilamelares pequeñas. Por otra parte, cuando se utilizó 0.2 mM, se observó la formación de dos poblaciones una de ~600 nm y otra de ~200 nm. Hao y Li en 2010, reportaron que a esta concentración se obtiene una mejor eficiencia de encapsulación.

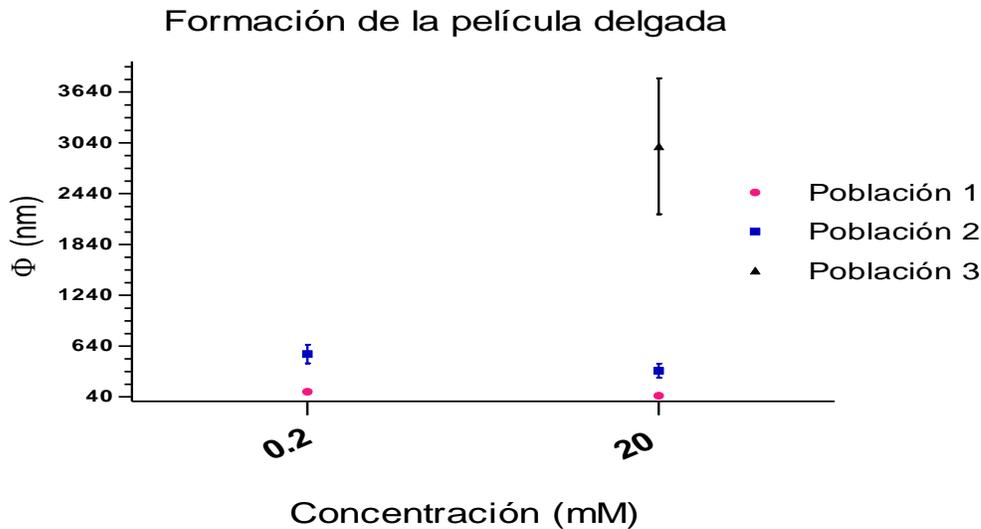


Figura 16. Tamaño de partícula obtenido mediante dispersión dinámica de luz para concentración de C/S de 0.2 mM y 20 mM.

La diferencia en el número de poblaciones obtenidas entre las dos concentraciones podría deberse por una parte, al espesor de la película formada en el fondo del matraz. En el caso de los liposomas se ha visto que al aumentar la concentración de la disolución de recubrimiento, la estructura es formada por la extensión con bicapas invertidas adicionales. Como consecuencia se podría tener una película multilamelar gruesa, la cual al ser hidratada podría estarse formando vesículas multilamelares lo que explicaría la tercera población obtenida por arriba de los 3000 nm, mientras que cuando la concentración es menor esta tercera población no es observada. Ahora bien, se debe considerar que las mediciones de tamaño de partícula fueron realizadas luego de 60 minutos de sonicado, el cual es utilizado para la reducción del tamaño de vesículas, por lo que la formación de dos y tres poblaciones para una menor y una mayor concentración respectivamente, puede ser atribuida tanto al espesor de la película formada como al sonicado aplicado. Asimismo, cuando se utilizó 20 mM, luego de la hidratación, se observó un precipitado blanco lo que sugiere que al haber más monómero tanto del tensoactivo como del Colesterol en el medio, es de esperarse formación tanto de vesículas como de precipitado dado la insolubilidad en agua del tensoactivo y las atracciones hidrofóbicas entre los monómeros. Para el caso de 0.2 mM durante la hidratación probablemente se formaron vesículas grandes unilamelares que se reporta van del orden de 100-1000 nm, y durante la sonicación se espera la reducción en el tamaño de la vesícula; sin embargo, se ha reportado que el sonicado puede producir alta polidispersidad, lo que se traduce a las dos poblaciones encontradas para esta concentración.

3.1.3 Propuesta de formación de los liposomas

En la figura 17 se presenta una propuesta de formación de los sistemas vesiculares por medio del método de la película delgada. Un primer paso en el método es la disolución del tensoactivo y el Colesterol en la mezcla metanol/diclorometano (figura 17a), donde los monómeros de Span60 y Colesterol se encuentran solvatados por el diclorometano para las colas hidrofóbicas y el metanol para las cabezas hidrófilas, esto dada la miscibilidad de los disolventes, por lo que no se esperaría formación de micelas. Como segundo paso (figura 17b), se da la evaporación de la mezcla de disolventes, durante el cual las cabezas hidrófilas

podrían orientarse hacia la superficie del matraz, dada la hidrofiliidad del vidrio de borosilicato; mientras que las colas hidrocarbonadas se orientan hacia el espacio aire/vacío con posibles interacciones hidrofóbicas entre ellas. Dadas las condiciones de parámetro de empaquetamiento y si el tensoactivo puede adoptar una configuración de capa invertida, se espera que pueda ocurrir la formación de una bicapa en donde monómeros del tensoactivo se orientan de tal forma que las colas hidrofóbicas coincidan. Se plantea que la estructura total de la película es estable ya que en el caso de los liposomas, Cohen y Bagatolli mencionan que los lípidos en la superficie podrían tener sus cadenas hidrofóbicas apuntando hacia el exterior mientras que las cabezas polares se encuentran interactuando ya sea con el sustrato polar o con grupos de cabeza opuesta de los lípidos [62]. De esta forma se plantea que para éste método las cadenas de tensoactivo ya se encuentren preorganizadas en las bicapas de la membrana seca. De igual forma, los monómeros del colesterol, podrían encontrarse formando puentes de hidrógeno con las cabezas polares del tensoactivo, acomodándose entre los monómeros del Span60.

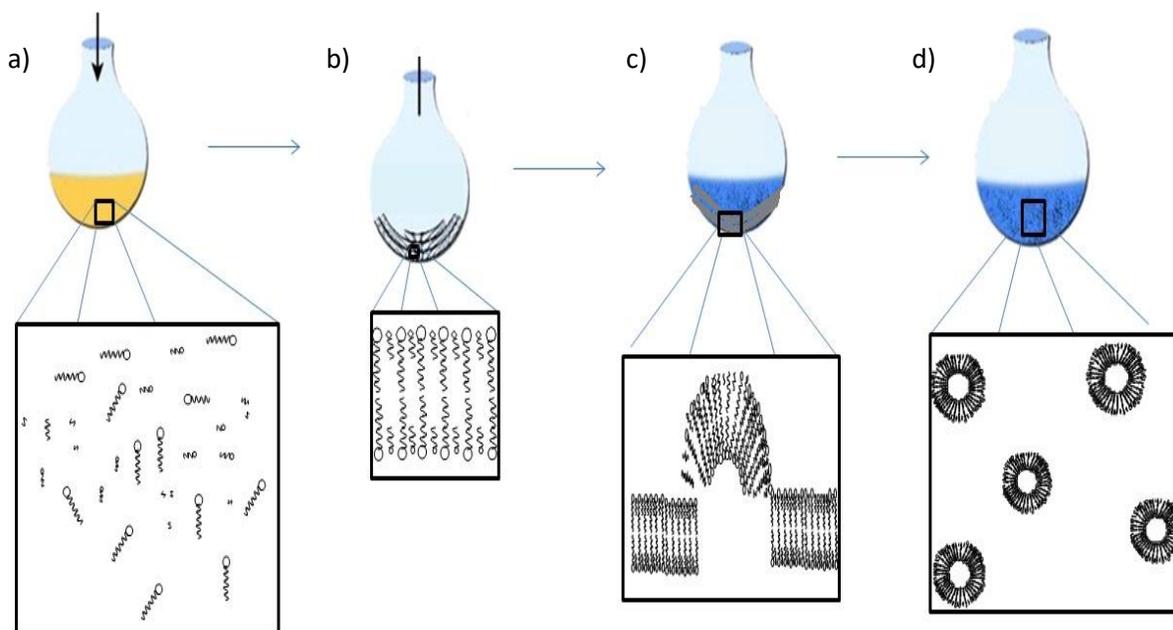


Figura 17. Probable formación de los liposomas por el método de hidratación de la película delgada, donde a) monómeros de Span60 y Colesterol en metanol/diclorometano b) Arreglo

de los monómeros en la película delgada, c) hidratación de la película, d) Vesículas formadas luego de la hidratación.

La hidratación de la película delgada (figura 17c) se da como un tercer paso, ya que para que ocurra la formación de los niosomas es necesario la presencia de un medio acuoso, sin embargo, se sabe que el autoensamblaje en bicapas tanto para fosfolípidos como para tensoactivos no iónicos raramente es espontáneo y usualmente se requiere algún tipo de energía como agitación física o calor [39,40], por lo que la hidratación debe ser a la temperatura de transición de fases del tensoactivo para favorecer la formación de una bicapa invertida. El Span60 tiene una Tc de 60 °C, misma que se ve afectada por la inclusión del Colesterol en la bicapa produciendo una reducción en la temperatura de Tc, no obstante, es común encontrar en la literatura que la hidratación de la película formada por la bicapa del Span60/Colesterol se lleve a cabo a 60 °C, dado que hasta lo revisado, no se encontró un estudio experimental sobre la reducción de la temperatura inducido por el Colesterol. Cuando el agua precalentada es agregada a la película de tensoactivo/colesterol se esperaría una hidratación de las cabezas hidrófilas y posteriormente una hinchamiento de la bicapa. Por su parte, las moléculas de agua que puedan penetrar el espacio interlaminar provocarían una alta tensión superficial. Lo anterior, aunado a posibles efectos estéricos entre las cabezas polares hidratadas podrían favorecer una curvatura (C) diferente a cero, lo que cinéticamente ayudaría a la formación de las vesículas, probablemente vesículas unilamelares grandes (100-3000 nm) (figura 17c) [37,63]. Con el objeto de formar vesículas unilamelares pequeñas (<100 nm), se realizó un sonicado, en el cual se provoca que LUVs, puedan romperse y se autoensamblen para formar vesículas más pequeñas, evitando la interacción del agua con el núcleo hidrocarbonado de la bicapa en los bordes [37,39,40].

3.2 Método de inyección del éter

3.2.1 Análisis previo: Volumen a utilizar del éter para la formación de niosomas

Para la formación de los niosomas por el método de inyección del éter, se evaluó de manera visual la cantidad de disolvente a utilizar observando si durante la formación de las vesículas, se obtenía formación de agregados, alta, mediana o baja turbidez; esto indicaría si existía

una precipitación del tensoactivo, o probable formación de vesículas multilamelares o unilamelares grandes. En la figura 18 se presenta la posible formación de las vesículas variando la cantidad de éter desde 1 hasta 4 mL. De acuerdo con los resultados, cuando se utilizó una menor cantidad de éter (1 mL) se observaba precipitación del tensoactivo y colesterol, esto probablemente se debía a que dada la rápida evaporación del disolvente favorecía el agregado de los monómeros del tensoactivo, mientras que conforme se aumentó la cantidad de éter no se observó la formación de agregados pero si una mediana turbidez, lo que podría indicar que se tenía un sistema con posible formación de agregados en el orden de micrómetros. Cuando la cantidad usada fue de 2.5 y 3 mL se observó una baja turbidez, mientras que cuando se utilizó 4 mL se volvió a observar una mayor turbidez en el sistema.

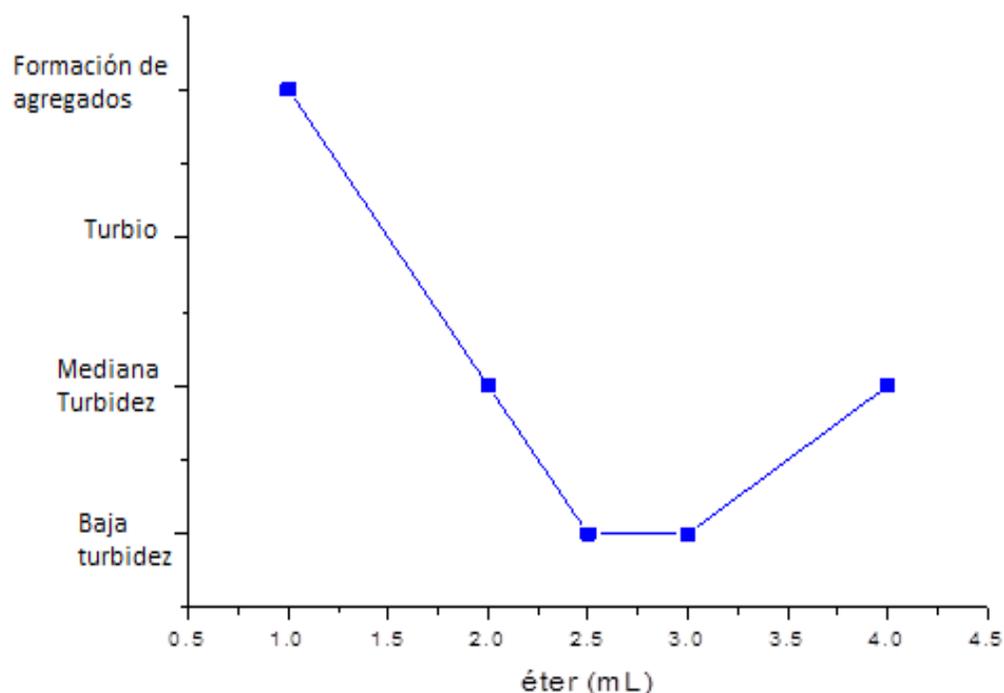


Figura 18. Evaluación de forma visual si existía una turbidez en el sistema dependiente del volumen del disolvente.

De acuerdo con los resultados anteriores, se tomó 2.5 mL de disolvente para realizar la formación de los niosomas con el método de inyección del éter, ya que como se mencionó anteriormente, fue donde se observó una menor turbidez.

3.2.2 Tamaño de partícula

Al igual que para el método de la película delgada, para la formación de las vesículas por medio del método de inyección del éter, se varió la concentración de Span60/Colesterol, usando 0.2 y 2 mM y ambas formulaciones se les evaluó con sonicated y sin sonicated. El tamaño de partícula obtenido (en diámetro) es presentado en la figura 19.

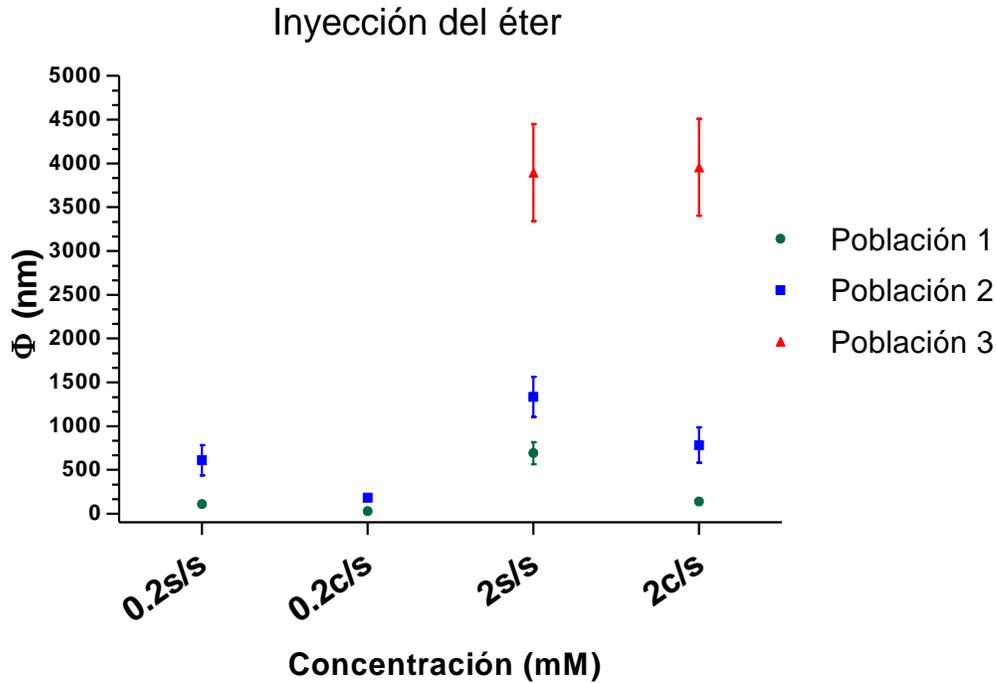


Figura 19. Tamaño de partícula obtenido mediante el método de inyección del éter para 0.2 y 2 mM, donde s/s: sin sonicated y c/s: con sonicated.

Se observó que cuando la concentración fue de 2 mM se obtenía para ambos casos (c/s y s/s) tres poblaciones de partícula; mientras que cuando se utilizó 0.2 mM se obtenía dos poblaciones, siendo de un menor tamaño (~25 nm y ~300 nm) cuando se aplicó sonicated. Por otra parte, al igual que en el método de formación de la película delgada, al aumentar la concentración, el número de poblaciones aumentó, y cuando se le aplicó sonicated la dispersión aumentó, probablemente porque el ultrasonido aplicado no es uniforme lo que se traduce en diferentes poblaciones en la dispersión.

3.2.3 Propuesta de formación de los niosomas Inyección del éter

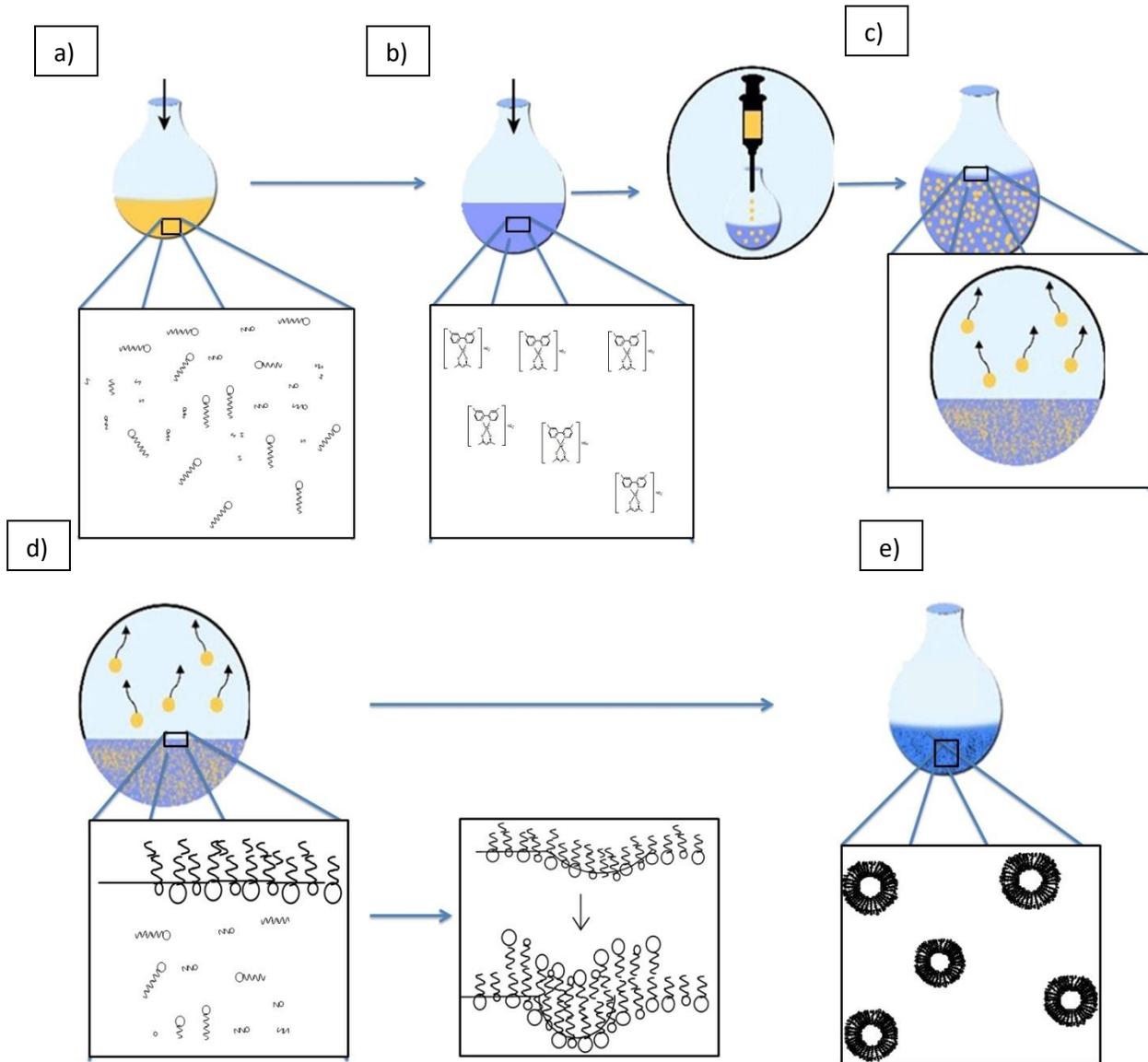


Figura 20. Propuesta de formación del sistema niosomal mediante el método de inyección del éter. Donde a) monómeros de Span60/Colesterol en éter, b) disolución acuosa de Casiopeína III-ia, c) inyección por goteo de la disolución de Span60/Colesterol y evaporación del disolvente, d) formación de una posible monocapa sobre la superficie acuosa, e) formación de SUVs y LUVs.

En la figura 20 se presenta la posible formación de los niosomas mediante el método de inyección del éter, en el cual se realiza una disolución del tensoactivo y el colesterol en éter

etílico (figura 20a) y una disolución de la Casiopeína III-ia en un agua (figura 20b). Como siguiente paso (figura 20c), se realizó una inyección por goteo de la disolución de éter en el agua precalentada; se espera una rápida evaporación del disolvente orgánico dado su punto de ebullición (35 °C) y que la temperatura del agua se encontraba a 60 °C dada la temperatura de transición de fases del tensoactivo.

Se ha visto que los monoestereatos de sorbitan pueden formar monocapas en donde las cadenas hidrocarbonadas son dirigidas hacia la fase oleosa mientras que las cabezas polares se dirigen a la fase acuosa [64]. Por lo que, durante la evaporación del disolvente (figura 20c) monómeros del Span60 y el Colesterol podrían migrar hacia la superficie del agua dada la hidrofobicidad que presentan, donde las cadenas hidrocarbonadas son orientadas hacia el espacio aire/vacio y las cabezas hidrófilas hacia la fase acuosa. Las propiedades de los derivados de ácidos grasos adsorbidos en la interfase agua/aire depende de la interacción lateral entre las cadenas alifáticas adyacentes, misma que se vería favorecida gracias a que el agua es un disolvente pobre para las cadenas hidrocarbonadas [65]. Se ha reportado que para el Span60 se pueden formar monocapas condensadas a temperatura ambiente, lo que resulta en una mayor estabilidad gracias a su larga cadena hidrocarbonada y que no presenta insaturaciones, por lo que las interacciones entre las cadenas vecinas son más grandes. Asimismo se reportó que cuando la temperatura incrementa, las monocapas de Span60 llegan a ser más expandidas, sin embargo, hasta los 42 °C aún permanece parcialmente como un tipo líquido-condensado [65] por lo que se esperaría que durante la evaporación del disolvente y la posible formación de una monocapa el Span60 se comience a formar una monocapa tipo expandida, y conforme la temperatura disminuye hasta la ambiental, se puede llegar a tener una monocapa de tipo condensada, por lo que la estabilidad aumentaría (figura 20d). Sin embargo, cuando la concentración del tensoactivo aumenta, la presión superficial del tensoactivo es suficiente para llegar a una alta tensión interfacial entre el agua y la porción hidrocarbonada, se puede dar la asociación de los monómeros anfifilos dentro de las vesículas a causa de su asociación. Se ha reportado que para el Span60 en una interfase agua/aceite la concentración micelar crítica es de aproximadamente 0.0070 mg/mL [65] (figura 20d). Simultáneamente las repulsiones

hidrofílicas y estéricas entre los grupos de la cabeza asegura que estos grupos se encuentren en contacto con el agua. Estas dos fuerzas opuestas, el valor HLB y el parámetro de empaquetamiento del Span60 dan lugar al ensamble supramolecular [38].

3.3 Hidratación de la película delgada (HPD) vs inyección del éter (IE).

Previo a la nanoencapsulación de la Casiopeína III-ia se comparó el tamaño de partícula obtenido por los dos métodos evaluados (cuadro 6) cuando la concentración tensoactivo/Colesterol fue de 2×10^{-4} M.

Cuadro 6. Comparación del tamaño de partícula en número obtenido por dos métodos.

Método	$\Phi \pm$ DE (nm) en diámetro	Porcentaje en número
Hidratación de la película delgada (HPD)	101 \pm 22	99.5
	545 \pm 110	0.5
Inyección del éter (IE)	108 \pm 30	99
	610 \pm 170	1

De acuerdo con el cuadro seis, para ambos métodos con la misma concentración se obtuvieron dos poblaciones, una alrededor de 100 nm y la otra alrededor de 600 nm; sin embargo, cuando se observa el porcentaje en número del total de las partículas analizadas de la muestra, se tiene que la población de \sim 100 nm representa la mayor población (99.5 % para HPD y 99 % para IE). Si bien, se podría usar alguno de los dos métodos para la formación de los niosomas, el método de inyección del éter presenta varias ventajas respecto al método de hidratación de la película delgada, los cuales se enlistan a continuación:

1.- La administración de fármacos para el tratamiento contra el cáncer, se da generalmente por vía intravenosa, por lo que los nanoacarreadores usados contra esta patología requieren un tamaño de partícula por debajo de 200 nm, dado que es más difícil que sean detectados por los fagocitos y dado el efecto EPR. En el caso del método de HPD se obtienen

principalmente vesículas unilamelares grandes que van del orden de 100-1000 nm, por lo que resulta necesario la reducción del tamaño de partícula, generalmente por medio de sonificado, no obstante éste representa un gasto energético alto. Aunado a esto, se ha reportado que cuando se aplica sonificado no se obtiene un tamaño uniforme de partícula, y su escalamiento industrial podría resultar complicado. Mientras que en el método de inyección del éter no es necesario aplicar sonificado para obtener la misma población. Es de importancia mencionar que previo al sonificado se observa una disolución turbia lo que indica un mayor tamaño de partícula.

2.- Por otra parte, para la formación de la película delgada se requiere un matraz de fondo redondo, en el cual se asume que la superficie de éste se encuentra lisa por lo que la película formada será totalmente uniforme, pero probablemente el material utilizado podría haber presentado rugosidad lo que provocó que algunos sitios el espesor de la película fuera mayor, favoreciendo de esta forma la formación de vesículas multilamelares y posible polidispersidad.

3.- En el método de formación de la película delgada, se utilizan grandes cantidades de disolvente (10 mL), principalmente diclorometano y metanol, quienes tienen un ICH de clase 2, el cual, según la FDA, indica que se trata de disolventes que se debe limitar su uso en productos farmacéuticos por su inherente toxicidad. Mientras que el éter (usado para el método de inyección del éter), tiene un ICH de clase 3, que indica que se trata de un disolvente menos tóxico para la salud humana, pero se recomienda un uso máximo de 5,000 ppm [66].

De acuerdo con lo expuesto con anterioridad, se decidió trabajar con el método de inyección del éter para la nanoencapsulación de la Casiopeína III-ia en los niosomas.

3.4 Eficiencia de encapsulación (EE)

Hao y Li en 2010, reportaron que la concentración del Span60/Colesterol (S/C) tiene una fuerte influencia en la eficiencia de encapsulación. Es por lo anterior, que se varió la concentración de S/C de 0.1 a 0.5 mM.

En el cuadro siete, se presenta la eficiencia de encapsulación obtenida para las concentraciones evaluadas. Se encontró que para todos los casos se obtuvieron EE por arriba del 70 %, exceptuando para 0.2 mM. Obteniendo un mayor valor cuando la concentración de S/C fue 0.1 mM.

Cuadro 7. Eficiencia de encapsulación con variación en la concentración de S/C de 0.1 a 0.5 mM.

Concentración S/C (mM)	Eficiencia de encapsulación (%)	Error estándar (%)
0.1	76.91	4.65
0.2	58.09	9.52
0.3	73.77	8.02
0.4	75.75	3.42
0.5	72.74	5.47

Aunque para 0.1 mM se obtuvo la mayor eficiencia de encapsulación, al graficar los datos obtenidos (figura 21), se observó que los errores estándar eran muy parecidos, por lo que se procedió a realizar un ANOVA de un factor, el cual indicó que no existía diferencia significativa entre los valores, por lo que la concentración de S/C no tiene influencia en la eficiencia de encapsulación. Pese a esto, tal como se puede observar en la figura 21 y en el cuadro siete, a una concentración de 0.4 mM se observó el menor error estándar, por lo que fue la concentración de S/C usada para la nanoencapsulación de la Casiopeína III-ia.

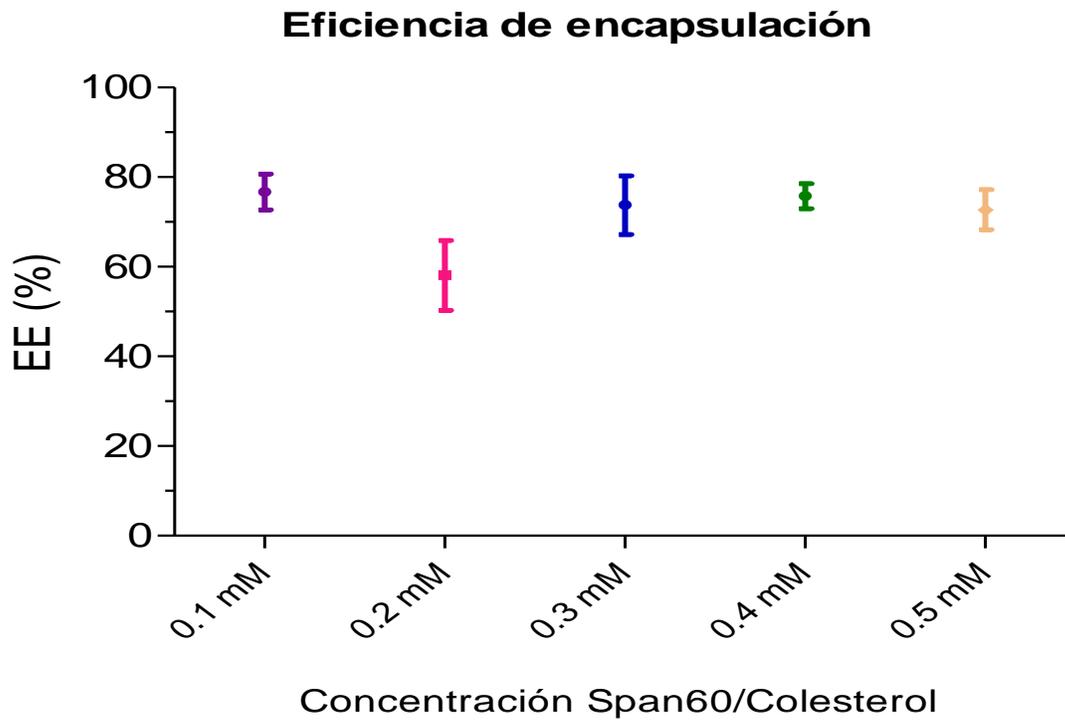


Figura 21. Eficiencia de encapsulación con variación en la concentración de S/C de 0.1 a 0.5 mM.

Por otro lado, Hao y Li también mencionan que la concentración del fármaco (soluto) tiene influencia sobre la eficiencia de encapsulación, ellos observaron que a mayor concentración del compuesto la EE disminuye. En este trabajo, se varió la concentración de la Casiopeína III-ia desde 9×10^{-5} M hasta 7×10^{-4} M, con una concentración fija de S/C de 0.4 mM con el objeto de observar lo anteriormente descrito.

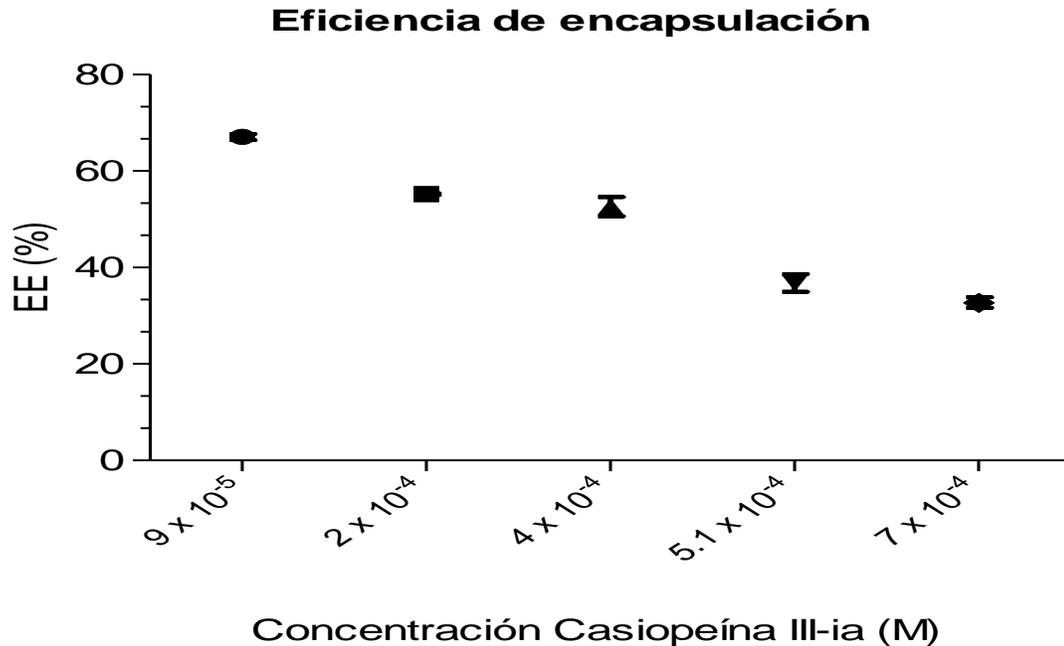


Figura 22. Eficiencia de encapsulación al variar la concentración de la Casiopeína III-ia.

Como se observa en la figura 22, a medida que se incrementa la concentración del soluto, la eficiencia de encapsulación decrece, cuando la concentración es menor se tiene una encapsulación de hasta 70 %; mientras que cuando se tiene la mayor concentración se obtuvo una EE de hasta 39 %. Es por lo anterior, que se realizó un análisis ANOVA de un factor, donde se encontró que si existía diferencia significativa entre los datos, por lo que la concentración del compuesto si influye en la EE.

Con la finalidad de investigar la influencia de la cantidad del compuesto, la capacidad de encapsulación del sistema niosomal ha sido examinada por la variación de la concentración de la Casiopeína III-ia mientras que la cantidad total de S/C se mantuvo en 4×10^{-4} M. Para esto, se realizó un análisis relacionando la concentración del soluto cargado con la concentración del Span60/Colesterol de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{[soluto]}{[S/C]} \quad (3.1)$$

La relación anteriormente descrita (R), fue graficada contra la concentración de la Casiopeína III-ia.

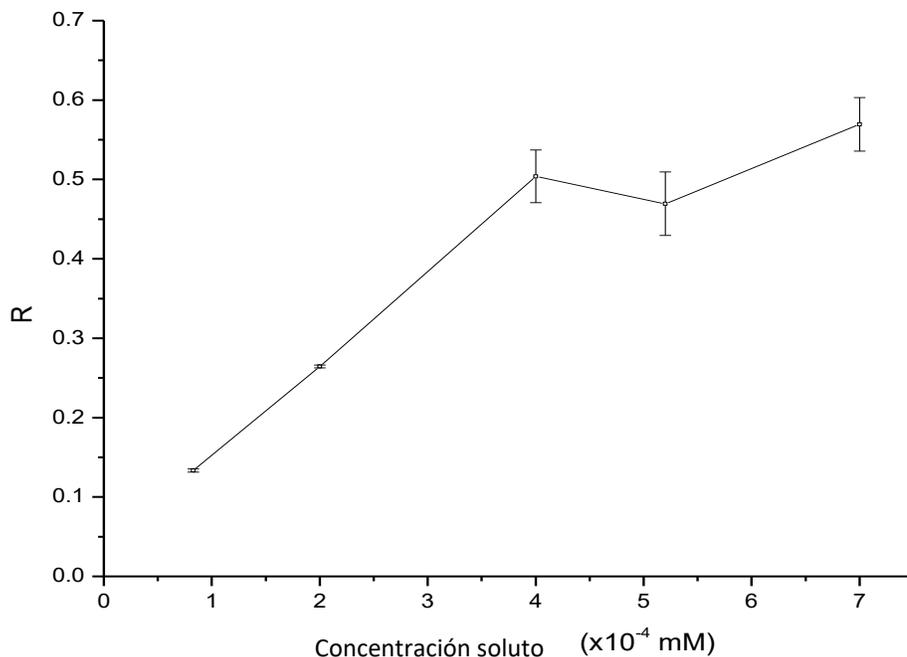


Figura 23. Relación de la concentración del soluto cargado con la concentración del S/C contra la concentración del soluto.

En la figura 23, se observa que a medida que la concentración del soluto incrementa la R incrementa, lo que podría indicar un aumento en el fármaco atrapado en los niosomas, no obstante, cuando se llega a una concentración de 4×10^{-4} M ya no se observa un incremento lineal, las desviaciones estándar entre 4, 5.1 y 7 mM, se observan sobrelapadas lo que indica que aunque se agregue más soluto, el fármaco cargado en los niosomas ya no incrementaría, por lo que la concentración donde se observa una carga máxima de compuesto es a 4×10^{-4} M.

Ahora bien, estos resultados toman en cuenta la cantidad del compuesto que fue cargado en una cantidad específica de Span60/Colesterol. Mientras que para los resultados de eficiencia de encapsulación, únicamente se considera la cantidad "cargada" del compuesto sobre la cantidad total añadida del compuesto. Si bien la gráfica de la figura 23 indica que la cantidad

máxima de Casiopeína III-ia encapsulable en los niosomas (dada la concentración de éstos) es de 4×10^{-4} M, añadir una cantidad equimolar del compuesto, no resultaría en la más alta eficiencia de encapsulación, es decir, del total de compuesto añadido sólo el 60 % se encontraría encapsulado según resultados de eficiencia de encapsulación. Tomando en cuenta lo anterior, una concentración de 9×10^{-5} M resulta en una alta eficiencia de encapsulación, por lo que fue la concentración elegida para la formulación de los niosomas.

Una vez establecido la concentración del S/C en 4×10^{-4} M y de la Casiopeína III-ia en 9×10^{-5} M, se procedió a medir el tamaño de partícula, potencial zeta y observar la morfología de los sistemas niosomales.

3.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La formación y morfología de los niosomas fue observada mediante microscopía, las micrografías obtenidas son presentadas en las figuras 24 y 25 sin y con Casiopeína III-ia respectivamente.

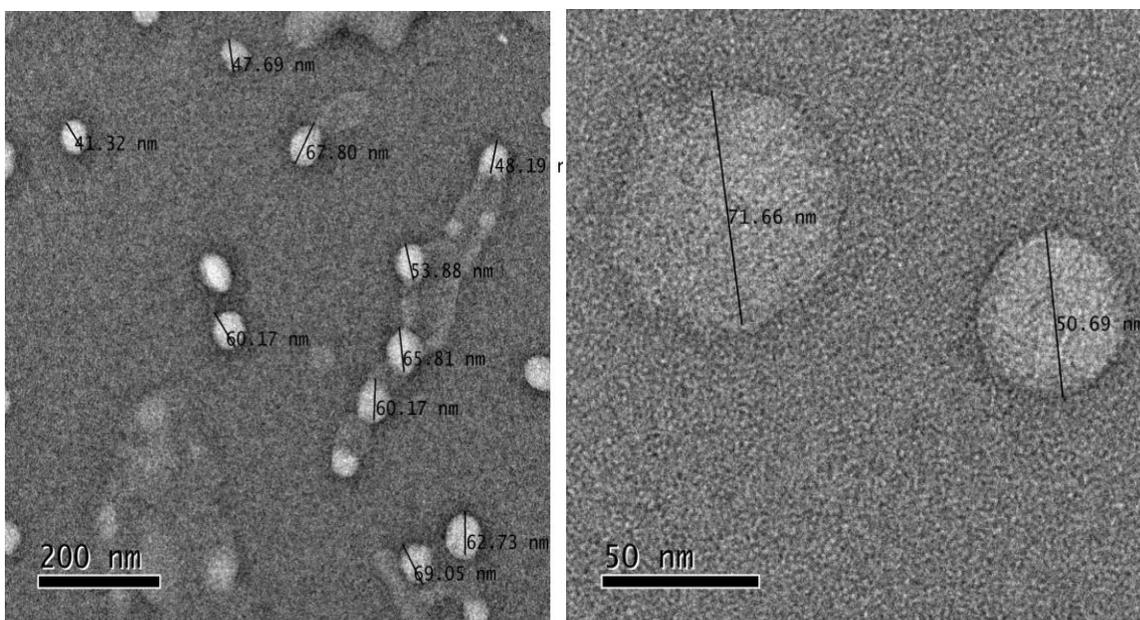


Figura 24. Micrografías de los sistemas niosomales sin Casiopeína III-ia

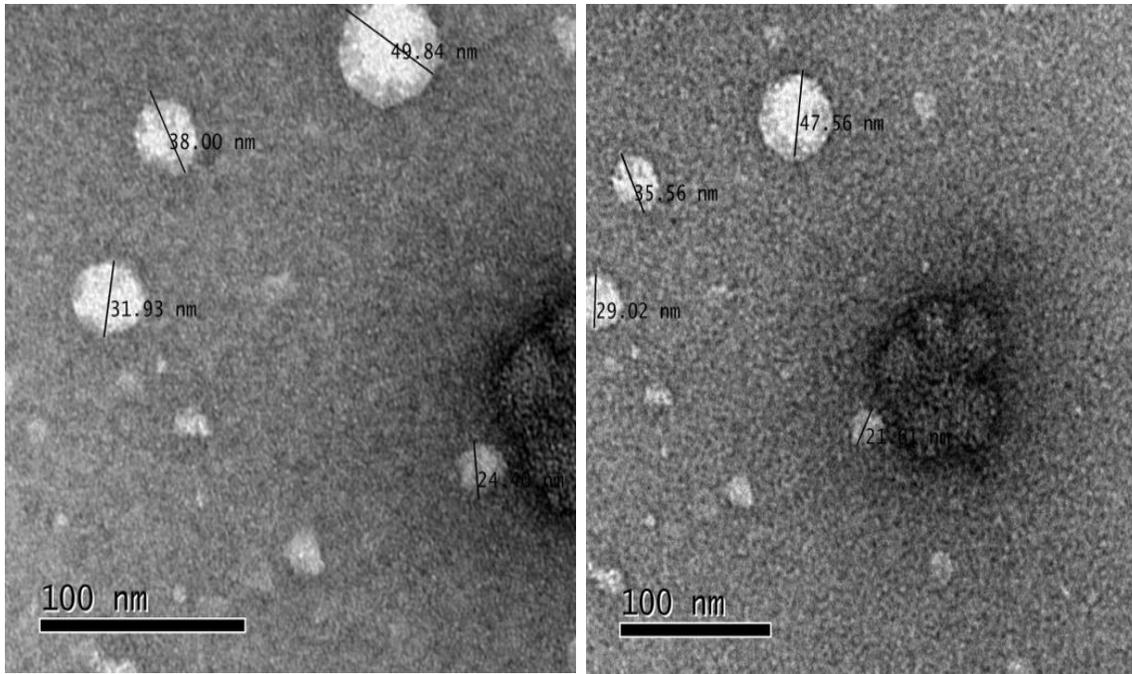


Figura 25. Micrografías de los sistemas niosomales con Casiopeína III-ia.

Ambos sistemas mostraron estructuras vesiculares esféricas unilamelares con un tamaño aproximado de 60 nm, cuando el sistema no tenía fármaco, mientras que cuando encapsuló la Casiopeína se obtuvieron tamaños de 40 nm aproximadamente. En todas las micrografías, se observa las orillas de los sistemas vesiculares más oscurecidos, probablemente por la presencia del acetato de uranilo embebido en la bicapa vesicular. Por otro lado, no se observó cristales o agregados de Casiopeína III-ia sobre la superficie de los niosomas, por lo que se piensa el compuesto se encuentra nanoencapsulado.

3.6 Tamaño de partícula y potencial zeta

El tamaño de partícula y potencial zeta fue estimado mediante un equipo de dispersión dinámica de luz, los resultados obtenidos son presentados en el cuadro ocho.

Cuadro 8. Tamaño de partícula y potencial zeta para los sistemas niosomales con y sin Casiopeína III-ia. Tamaños de partícula reportados en número.

Tamaño de partícula en diámetro $\Phi \pm SD$ (nm)		Potencial zeta (mV)	
Con CasIII-ia	Sin CasIII-ia	Con CasIII-ia	Sin CasIII-ia
208 \pm 2	27 \pm 15	0 \pm 0	0 \pm 0

Se evaluó el tamaño de partícula cuando la concentración del Span60/Colesterol fue 4×10^{-4} M y la concentración de la Casiopeína III-ia fue 9×10^{-5} M. Se observó que cuando se realizó la formación de los niosomas sin Casiopeínas se obtuvo un tamaño promedio de 27 nm con una alta dispersión ($n = 3$), mientras que cuando se encapsuló la Casiopeína se obtuvo un tamaño promedio de 208 nm.

Se midió potencial zeta (cuadro 8), donde se obtuvo un valor promedio de 0 mV para ambos casos. Se esperaba que la Casiopeína en disolución, al ser un compuesto iónico, proporcionara alguna carga al sistema; pese a esto, no se pudo observar dicho comportamiento dado que el potencial zeta indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides. Se trata del punto en el cual la capa de contraión que rodea a una partícula cargada negativa o positivamente. Dicho lo anterior, si la Casiopeína III-ia se encontrara en la superficie del niosoma le otorgaría cierta carga al sistema, y los iones nitrato actuarían como contraión. Sin embargo, se propone una encapsulación de la Casiopeína dado el potencia zeta obtenido por el niosoma y lo observado en microscopía, por lo que no existiría una capa stern ni una capa difusa, mientras que la Casiopeína libre con su contraión nitrato se encuentra en equilibrio con la disolución del sistema. El potencial zeta obtenido indica que estos sistemas son sistemas inestables, propiciando una rápida coalescencia dado que no existen repulsiones electrostáticas y por lo tanto un corto tiempo de almacenamiento. Esta inestabilidad fue confirmada mediante microscopía electrónica de barrido, donde luego de 10 días se observaron los sistemas niosomales obtenidos (figura 26).

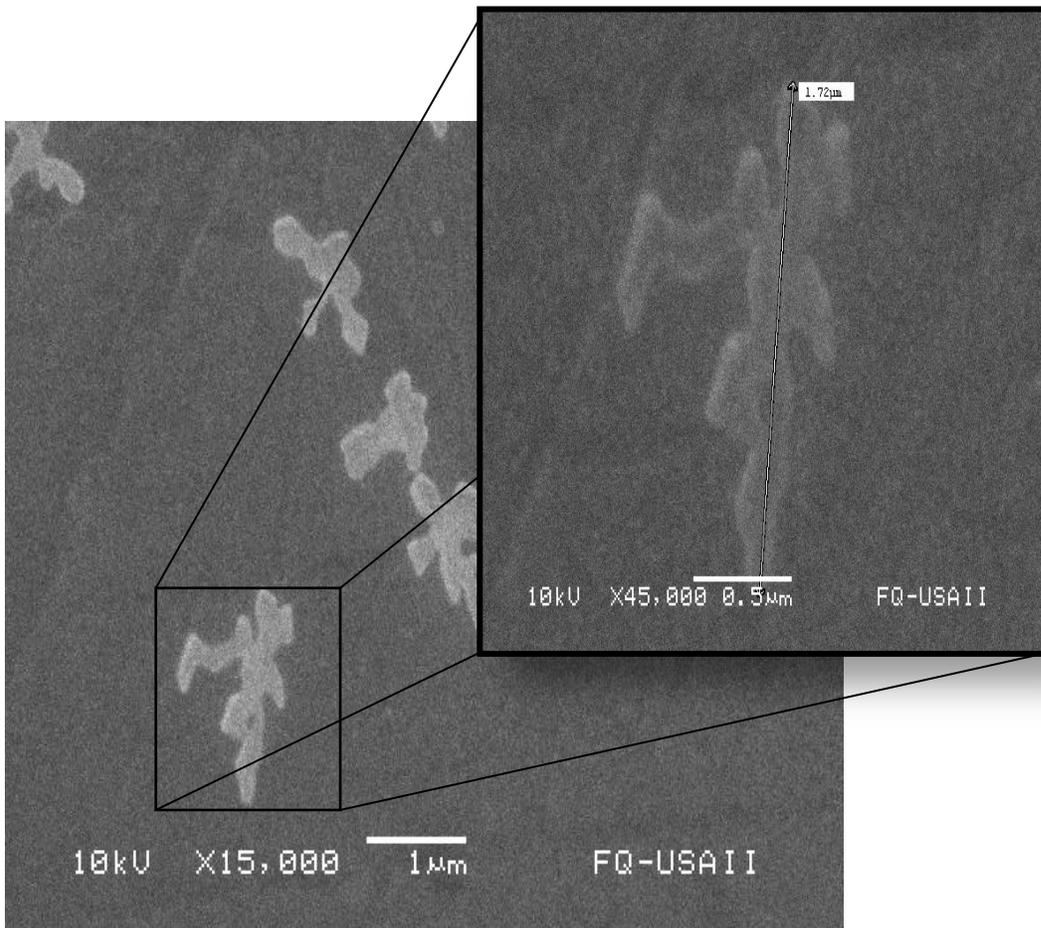


Figura 26. Micrografía del sistema niosomal luego de 10 días de realizada la formulación.

En las micrografías anteriores, se observa estructuras amorfas en el orden de $1.72 \mu\text{m}$, dada la coalescencia sufrida luego de 10 días de realizada la formulación, estos resultados coinciden con lo obtenido con el potencial zeta. Dada esta situación, resulta de importancia estabilizar los coloides; una alternativa, es agregar aditivos que puedan otorgarle carga a la membrana niosomal y de esta forma incrementar la estabilidad del sistema. En este sentido, se ha utilizado principalmente dicetilfosfato que le otorga una carga negativa a las vesículas generando repulsiones electrostáticas y otorgando estabilidad. Sin embargo, es de importancia considerar que la Casiopeína III-ia se trata de un compuesto de coordinación, con una posición axial vacante en el centro metálico. Es por lo anterior, que se realizó un estudio por medio de espectrofotometría UV-visible en el cual, la Casiopeína III-ia fue disuelta en una disolución de buffer de fosfatos y fue comparada con la banda de absorción obtenida en la región visible de las transiciones d-d de la Casiopeína III-ia en disolución

acuosa. En ambos casos, el compuesto tuvo una concentración de 2 mM; el espectro obtenido es presentado en la figura 27.

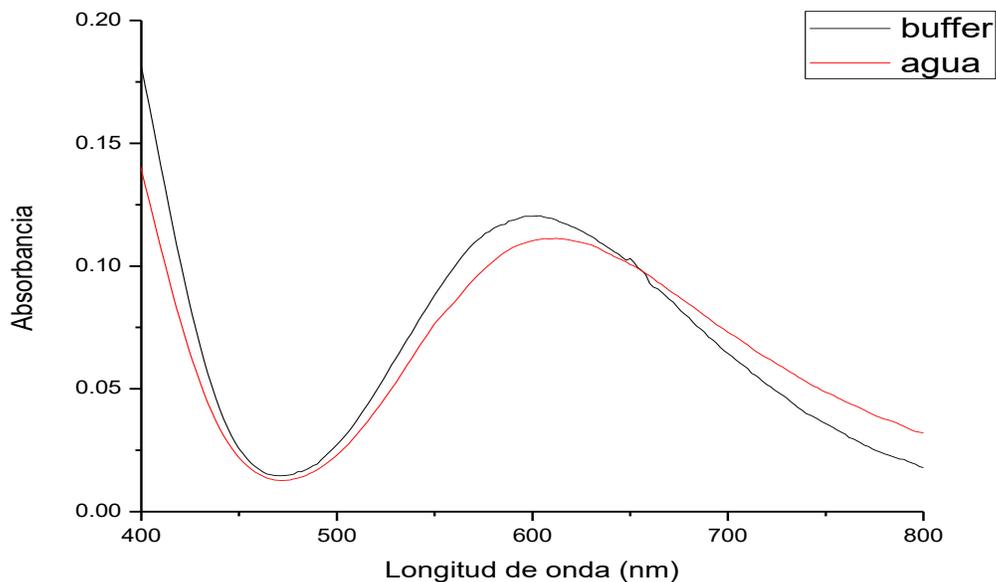


Figura 27. Espectros de absorción de la región visible de la Casiopeína III-ia en agua (2 mM) y en buffer de fosfatos (2 mM).

De acuerdo con el espectro anterior se observa un pequeño incremento en la absorbancia cuando la Casiopeína se encuentra en buffer de fosfatos y un pequeño desplazamiento hipsocrómico en el espectro; dicho desplazamiento podría estar dado por la interacción del grupo fosfato con la Casiopeína III-ia en posición axial. Pese a esto, no se observa la aparición de una nueva banda ni un desplazamiento significativo, por lo que se piensa no existe un descoordinación de alguno de los ligantes.

Dados los resultados anteriores, debe considerarse, que en el caso de los niosomas, el dicetil fosfato se encontrará probablemente formando interacciones por puentes de hidrogeno en la superficie de la membrana niosomal. Tomando en cuenta un estudio teórico realizado por Galindo y colaboradores, donde su objetivo era describir el sitio específico de reconocimiento entre el DNA y la Casiopeína III-ia, el estudio dio como resultado que la Casiopeína III-ia tienen una preferencia en posicionarse en el surco menor del DNA, con un

oxígeno del grupo fosfato coordinado axialmente al átomo de cobre de la Casiopeína y con una molécula de agua en la posición axial opuesta, obteniendo de este modo, un aducto final estable (figura 28) [67].

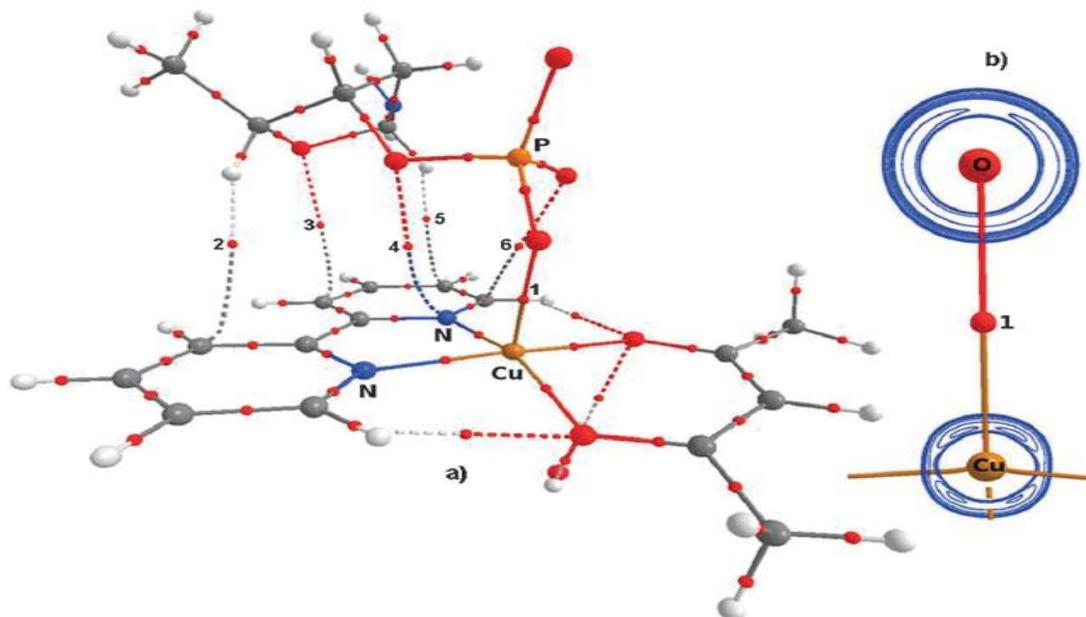


Figura 28. Interacción de la Casiopeína III-ia con el grupo fosfato en el surco menor del ADN [67].

Descrito lo anterior, se plantea que una inserción del dicetil fosfato en la membrana niosomal, favorecería la coordinación de la Casiopeína III-ia con el grupo fosfato en posición apical, siendo estabilizado por una molécula de agua cuando el sistema se encuentre en disolución, por lo que la liberación de la Casiopeína III-ia se vería afectada dada la estabilidad de la nueva molécula formada, disminuyendo de este modo la eficacia terapéutica del compuesto.

3.7 Espectroscopía UV-visible

3.7.1 Interacción Casiopeína III-ia-Span60-Colesterol

3.7.1.1 Región visible

Se evaluó la interacción de la Casiopeína III-ia con la mezcla de Span60 y Colesterol mediante espectroscopía UV-visible. Para evaluar algún cambio en las transiciones d-d del metal en la

región visible, una disolución de Casiopeína III-ia (2 mM), una mezcla de Span60/Colesterol (6mM) y una mezcla de Casiopeína III-ia (2mM)/Span60/Colesterol (6 mM) fueron usadas con el objeto de evaluar si el Span o el Colesterol no afectan las transiciones en esta región. Debido a que tanto el tensoactivo como el colesterol son insolubles en un medio acuoso, el estudio se realizó en una mezcla de metanol:diclorometano (1:1). Dichas concentraciones fueron escogidas dadas las transiciones d-d del metal que al ser señales débiles es necesario saturar el sistema, por lo que se utilizó 2 mM para la Casiopeína III-ia y tomando en cuenta las concentraciones usadas para la formación de los niosomas, se escaló la concentración del Span60/Colesterol a 6 mM. Los espectros obtenidos son presentados en la figura 29.

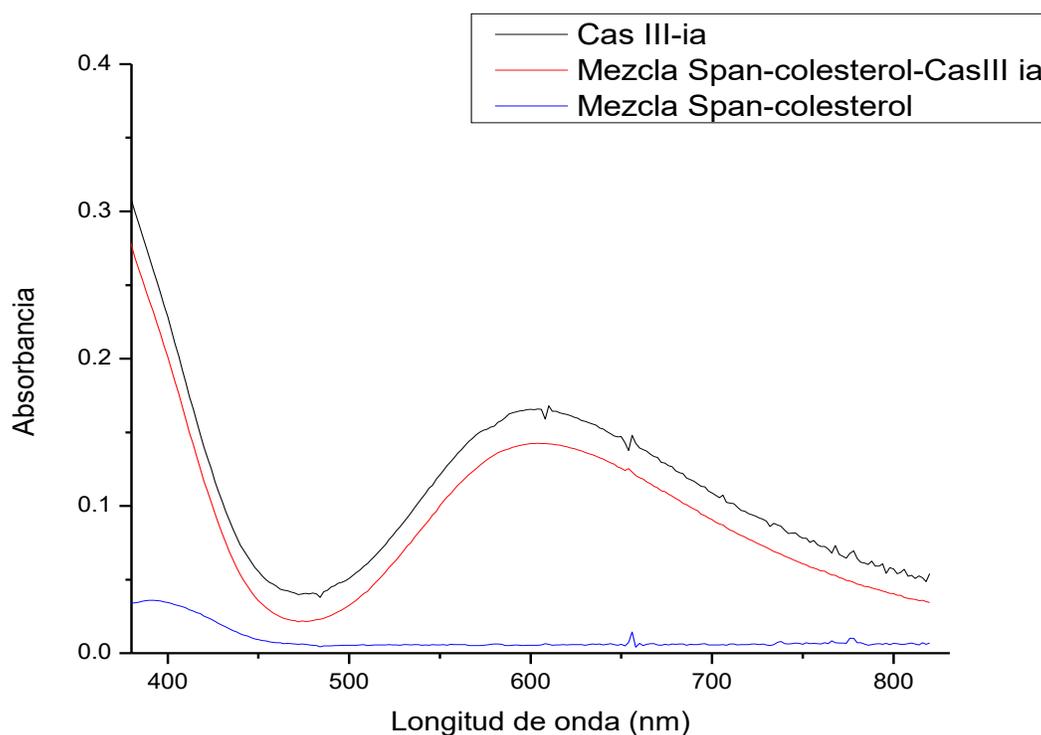


Figura 29. Espectro visible de la Casiopeína III-ia con concentración de 2 mM. Mezcla de Casiopeína III-ia, Span 60 y Colesterol (6 mM) y mezcla de Span 60 y Colesterol (6 mM), en una mezcla de diclorometano:metanol (1:1).

Como se observó en el espectro anterior, el uso del Span60 y el Colesterol no produce un cambio en la longitud máxima de absorción de las transiciones d-d de la Casiopeína III-ia. La

pequeña diferencia en las absorbancias es debido a la rápida evaporación del disolvente orgánico. Por otra parte, dada la naturaleza orgánica del tensoactivo y del colesterol, no presentan absorciones en el espectro visible (línea azul).

3.7.1.2 Región ultravioleta

Se evaluó la posible interacción de la membrana niosomal con la Casiopeína III-ia en la región ultravioleta. Las concentraciones usadas para este análisis fueron las establecidas para la formación de los niosomas (4×10^{-4} M de Span60/Colesterol y 9×10^{-5} M para la Casiopeína) y para la disolución de la Casiopeína se usó una concentración de 1×10^{-5} M. A diferencia del espectro presentado en la región visible, los sistemas evaluados fueron los niosomas ya formados, y los niosomas en dispersión con el compuesto encapsulado. Se observan dos picos máximos de absorción para la Casiopeína III-ia en 208 y en 294 nm correspondientes a la biperidina.

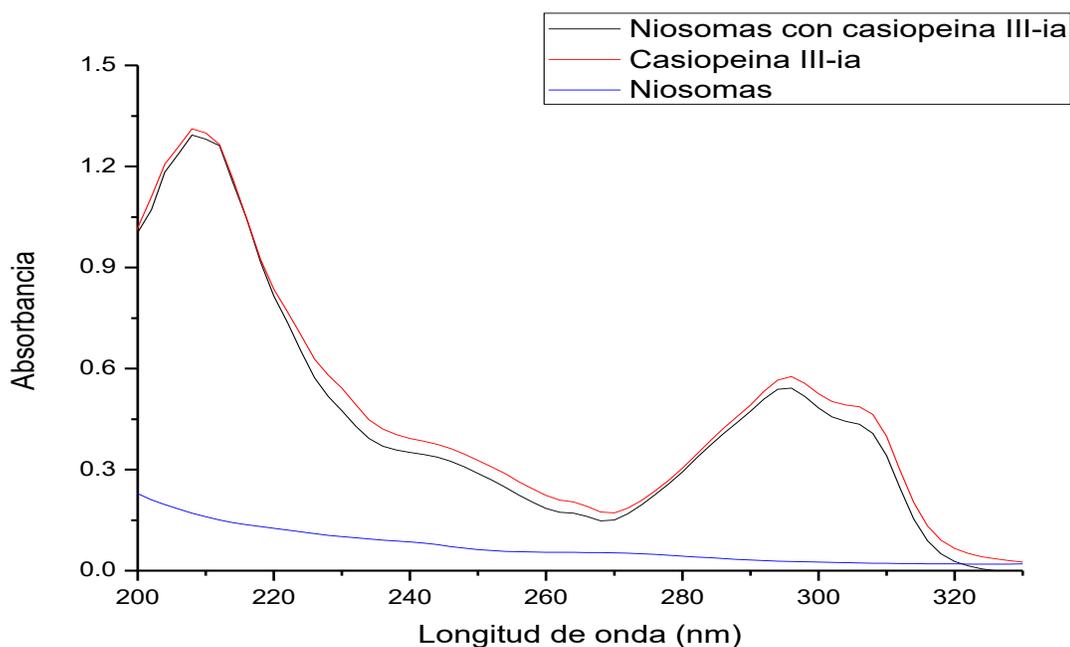


Figura 30. Espectro de absorción en la región ultravioleta para Casiopeína III-ia (1×10^{-5} M), niosoma (4×10^{-4} M) y niosoma (4×10^{-4} M) con Casiopeína III-ia (9×10^{-5} M).

Tal como se observa en la figura anterior, los niosomas no presentaron absorción en la región y a la concentración evaluada, esto nos sugiere que al realizar los estudios de

eficiencia de encapsulación no se obtuvo un falso positivo. Por otro lado, al comparar los espectros de la Casiopeína libre y Casiopeína con niosoma, no se observa cambio alguno en las bandas máximas de absorción, lo que sugiere que no existe algún tipo de interacción de la Casiopeína con la membrana niosomal. En este sentido, para corroborar lo sugerido por el espectro obtenido en la región ultravioleta, se realizó un análisis cuantitativo de una posible interacción de la Casiopeína con la membrana niosomal, dicho análisis es descrito a continuación.

3.7.2 Análisis cuantitativo de posibles interacciones débiles entre la membrana niosomal y la Casiopeína atrapada o en disolución

Para los niosomas formados con algún Span, es posible obtener una membrana en bicapa donde las cabezas hidrofílicas, están conformadas por un sorbitol deshidratado. Por lo que el compuesto encapsulado, dependiendo de su estructura química, podría tener algún tipo de interacción con la membrana niosomal, principalmente interacciones débiles como puentes de hidrógeno formados con los grupos OH del sorbitan. Hao y Li en 2011 propusieron un esquema general para la interacción y no interacción del fármaco con los niosomas cuando el compuesto llega a un equilibrio en disolución o en dispersión; donde el fármaco puede estar embebido de tres maneras:

- Fármaco atrapado sin interacción con la membrana niosomal.
- Fármaco no atrapado localizado en el medio acuoso.
- Fármaco con interacción con el niosoma fuera o dentro del niosoma

El esquema general de lo anteriormente descrito es presentado en la figura 31.

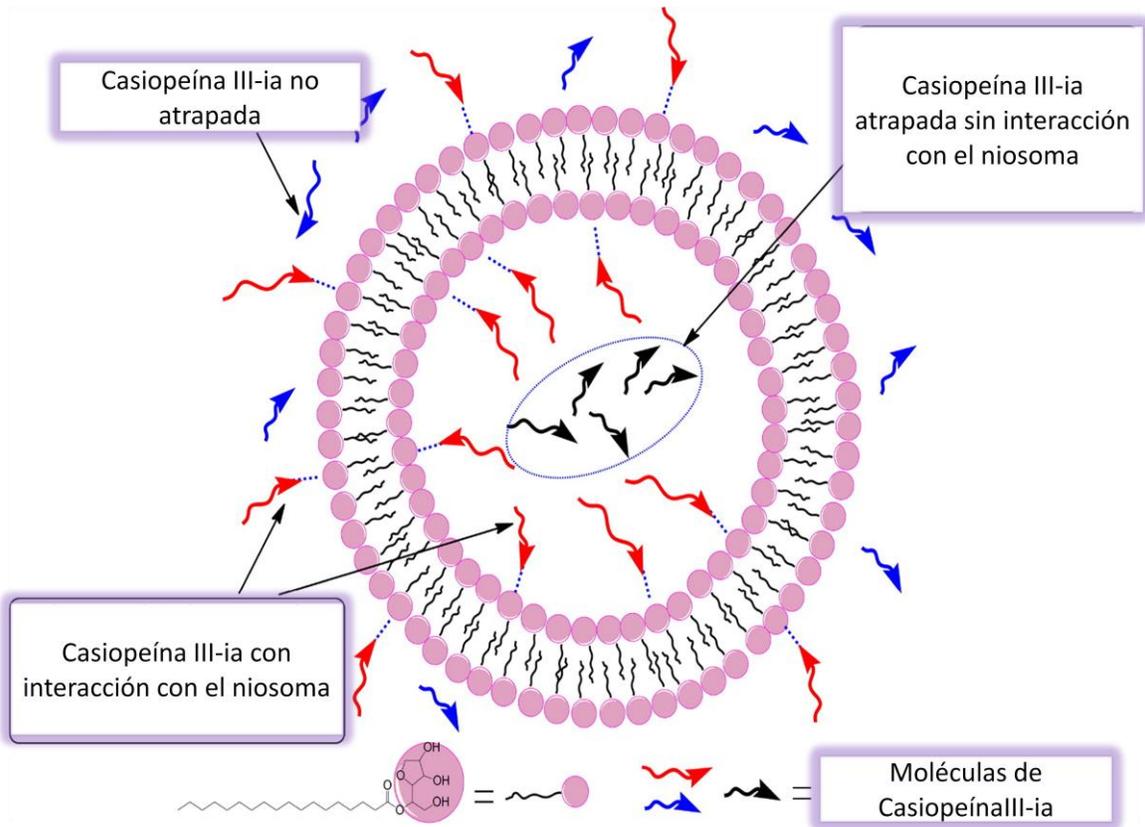


Figura 31. Posibles interacciones de la Casiopeína III-ia con los niosomas. Modificado de [41].

La ecuación de equilibrio para niosomas con Span60, Colesterol y Casiopeína, puede ser descrita por:



Donde:

- ❖ Casiopeína-Span60: Especie de moléculas de Casiopeína que interactúa con los niosomas.
- ❖ Casiopeína@Span60: Especie de Casiopeína atrapado sin interacción con la membrana de los niosomas.
- ❖ K= constante de equilibrio.

- ❖ Span60: Se representa como la concentración total, debido a que se propone que la interacción entre el Colesterol y el Span60 dentro de la bicapa se da entre la cabeza hidrofílica 3-beta-hidroxil del colesterol, la cual es capaz de posicionarse en las proximidades del grupo éster del monoestereato de sorbitan formando puentes de hidrógeno con el oxígeno del éster, mientras que el anillo hidrofóbico esteroide se orienta paralelamente a las cadenas alquílicas del tensoactivo [68,69]. Por lo que una interacción entre un fármaco hidrofílico y el colesterol se vería afectado por un impedimento estérico de las cabezas de sorbitan del tensoactivo.

Las concentraciones iniciales son:

Span60: $[\text{Span60}]_0$; Casiopeína: $[\text{Casiopeína}]_0$; $[\text{Casiopeína-Span60}]_0$: 0;
 $[\text{Casiopeína@Span60}]_0$: 0; [mol/L]

Las concentraciones en el equilibrio:

Span60: $[\text{Span60}]_e$; Casiopeína: $[\text{Casiopeína}]_e$; Casiopeína-Span60: $[\text{Casiopeína-Span60}]_e$;
 $[\text{Casiopeína@Span60}]_e$; [mol/L]

De acuerdo con la ecuación de equilibrio, la constante de equilibrio está dada por:

$$K = \frac{[\text{Casiopeína-Span60}]_e [\text{Casiopeína@Span60}]_e}{[\text{Span60}]_e [\text{Casiopeína}]_e} \quad (3.3)$$

Entonces para el $[\text{span60}]$ en el equilibrio:

$$[\text{Span60}]_e = [\text{Span60}]_0 - [\text{Casiopeína-Span60}]_e \quad (3.4)$$

En la ecuación 3.4, para la concentración del Span60 en el equilibrio, se debe tomar en cuenta la concentración inicial del tensoactivo menos lo que interactúa con la Casiopeína $[\text{Casiopeína-Span60}]_e$, pero no debe tomarse en cuenta el Span60 que no se encuentra interactuando con el compuesto (Span60@Casiopeína), ya que éste formaría parte del $[\text{Span60}]_0$.

Para la Casiopeína en el equilibrio:

$$[\text{Casiopeína}]_e = [\text{Casiopeína}]_0 - [\text{Casiopeína-Span60}]_e - [\text{Casiopeína@Span60}]_e \quad (3.5)$$

Para poder conocer la constante de equilibrio y el porcentaje de interacción del fármaco con los niosomas, Hao y Li, propusieron linealizar la ecuación de tal forma que las concentraciones conocidas por medio de espectrofometría de UV-visible (variando la concentración del Casiopeína III-ia) sean graficadas contra las concentraciones iniciales de la Casiopeína:

Conociendo: $[Casiopeína]_0$, $[Casiopeína]_e$ y $[Span60]_0$ y dado que es de especial interés conocer $[Casiopeína-Span60]$, la ecuación 3.5, puede ser reordenada de tal forma que:

$$[Casiopeína@Span60] = [Casiopeína]_0 - [Casiopeína-Span60]_e - [Casiopeína]_e \quad (3.6)$$

De este modo, la ecuación 3.4 y 3.6, pueden ser sustituidas en la 3.3, obteniendo la siguiente ecuación para la constante de equilibrio:

$$K = \frac{[Casiopeína-Span60]_e \left([Casiopeína]_0 - [Casiopeína-Span60]_e - [Casiopeína]_e \right)}{[Casiopeína]_e \left([Span60]_0 - [Casiopeína-Span60]_e \right)} \quad (3.7)$$

Para lograr la linealización anteriormente mencionada, es necesario reordenar algebraicamente términos, donde la ecuación utilizada para obtener la constante de equilibrio es la siguiente:

$$[Casiopeína]_0 = K \frac{[Span60]_0}{[Casiopeína-Span60]_e} [Casiopeína]_e + [Casiopeína-Span60]_e \quad (3.8)$$

Una vez obtenida la ecuación siete, se graficó $[Casiopeína]_e$ = concentración de Casiopeína no atrapada vs $[Casiopeína]_0$ = Casiopeína inicial.

La gráfica obtenida es presentada en la figura 32.

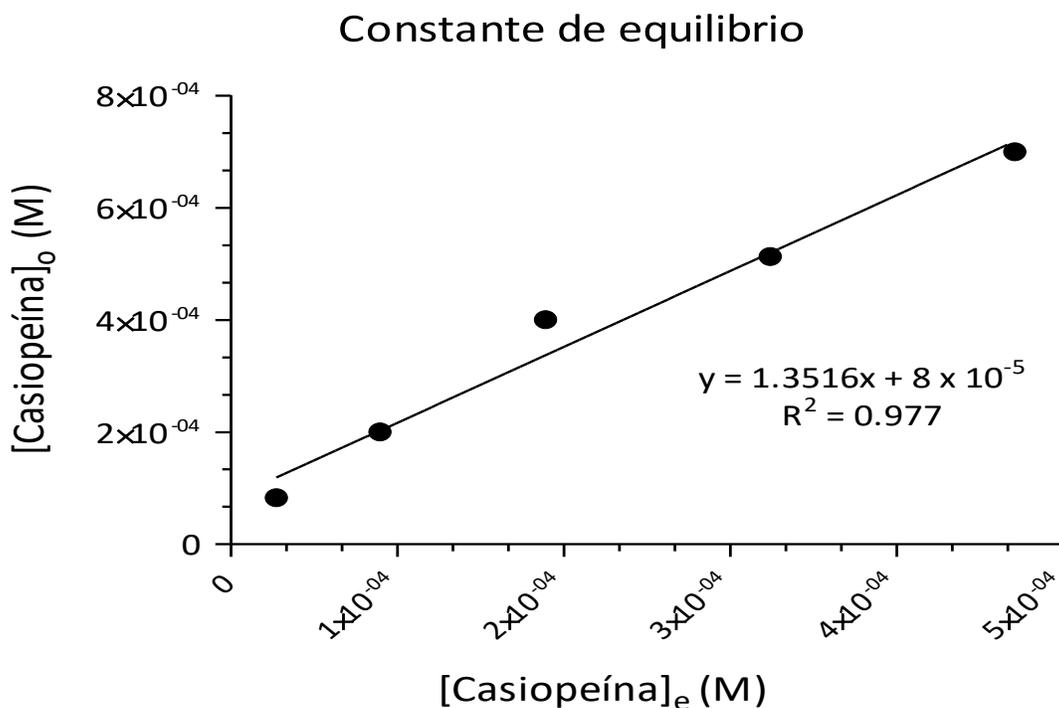


Figura 32. Obtención de la constante de equilibrio de soluto en equilibrio vs soluto inicial.

A partir de la gráfica anterior, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = 1.351 \times [\text{Casiopéina}]_e + 8 \times 10^{-5} \quad (3.9)$$

Donde:

$$[\text{Casiopéina-Span60}]_e = 8 \times 10^{-5} \text{ M } y$$

$$\frac{K [\text{Span60}]_o}{[\text{Casiopéina-Span60}]_e} = 1.351$$

Y conociendo que, $[\text{Span60}]_o = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$

Es posible calcular la constante de equilibrio sustituyendo términos:

$$K = \frac{1.351 \times (8 \times 10^{-5} \text{ M})}{4 \times 10^{-4} \text{ M}} = 0.27$$

La constante de equilibrio fue igual a 0.27, un valor por debajo de 1 indica que el equilibrio es favorecido hacia los "reactivos", es decir hacia la concentración inicial de Span60 y Casiopeína por lo que se favorece la Casiopeína libre, mientras que la cantidad de fármaco con interacción con la membrana, sería pequeño. Para calcular la cantidad de fármaco interaccionando con la membrana se hizo una relación entre la concentración de Span60-Casiopeína encontrada a partir del intercepto de la gráfica obtenida de la concentración de Casiopeína no atrapada y la concentración inicial del Span60. En la siguiente ecuación se observa lo descrito con anterioridad:

$$\frac{[\text{Casiopeína} - \text{Span60}]_e}{[\text{Span60}]_0} = \text{Interacción Casiopeína con niosoma}$$

$$(8 \times 10^{-5} \text{ M} / 4 \times 10^{-4} \text{ M}) = 0.20 \times 100 = 20 \%$$

Se encontró que el 20 % de la Casiopeína se encuentra formando algún tipo de interacción con la membrana niosomal. Se propone que la interacción esté dada principalmente entre los grupos OH de la cabeza de sorbitan del Span60 y los carbonos y nitrógeno de la piridina de la Casiopeína III-ia, por interacciones por puentes de hidrógeno (figura 33).

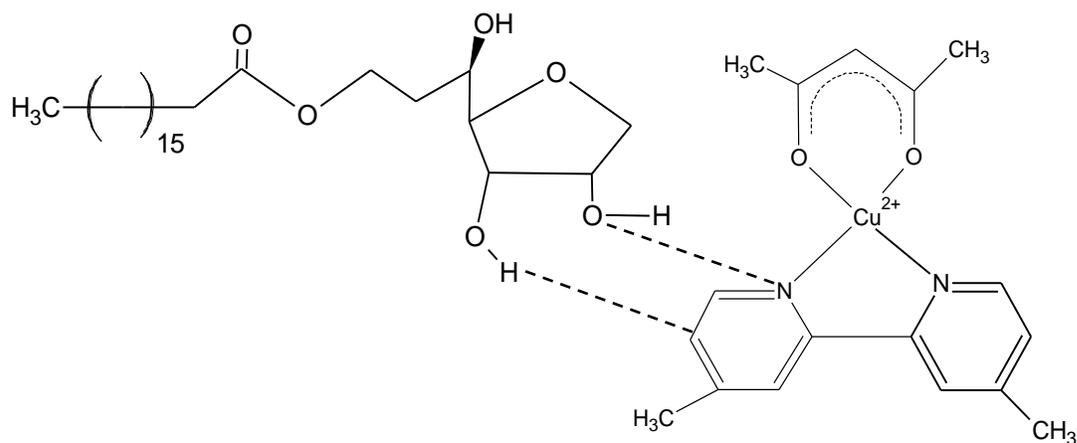


Figura 33. Interacción de la biperidina de la Casiopeína por puentes de hidrógeno con el grupo O-H de la cabeza hidrofílica del Span60.

Aludiendo a la figura anterior, la propuesta fue realizada de esa forma ya que en el estudio teórico realizado por Galindo, mediante el análisis de distribución de densidad electrónica de

la teoría cuántica de átomos en moléculas, se observó que la Casiopeína puede tener interacciones débiles entre el grupo azúcar y el ligante aromático de la Casiopeína. Estas interacciones están dadas, debido a que la coordinación de un grupo fosfato dentro de una posición axial de los átomos de cobre produce una transferencia de electrones del centro metálico que compensa la deficiencia de electrones de los ligantes, al mismo tiempo que la deoxirribosa dona densidad electrónica de forma axial con átomos de hidrógeno y oxígeno a la bipyridina. Se describen varias interacciones como son C-H \cdots pi, O \cdots pi (C) y O \cdots pi(N) [67], tal como se observa en la figura 34.

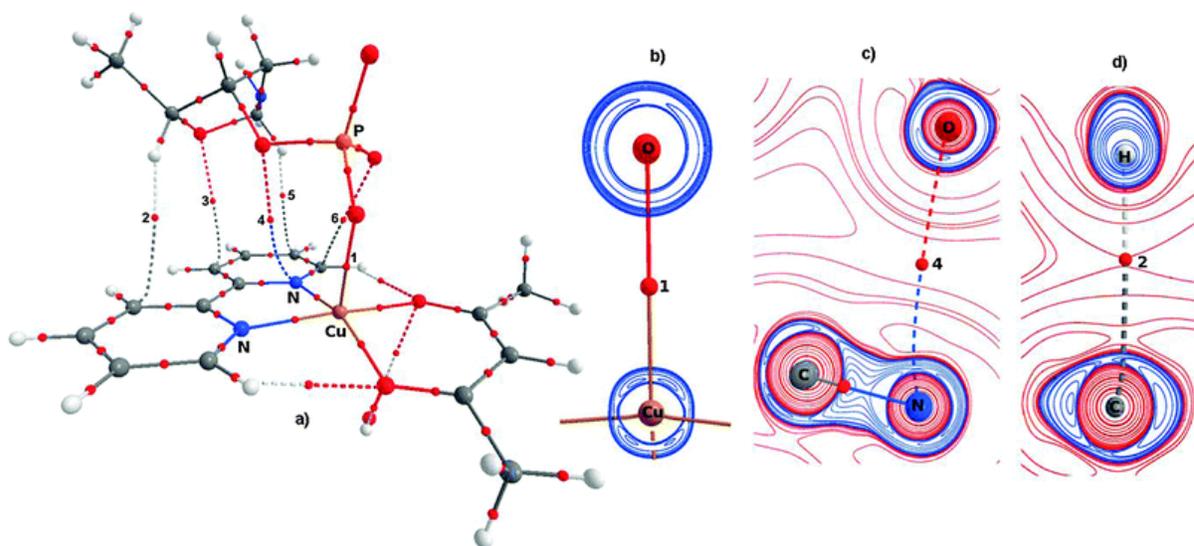


Figura 34. Interacciones de la Casiopeína III-ia: b) cobre con el grupo fosfato del nucleótido, c,d) Interacciones débiles de la bipyridina con el azúcar [67].

Si bien, el entorno electrónico para el sistema ADN-Casiopeína y el sistema niosoma-Casiopeína es diferente, dados los grupos fosfatos presentes en el primero, la cabeza de azúcar que contienen ambos puede otorgar una idea, de la posible interacción del compuesto con el niosoma. Una introducción de una molécula de agua en posición apical genera que el ión metálico pierda densidad electrónica que se puede redistribuir hacia los ligantes. El exceso de densidad electrónica podría generar las interacciones descritas en la figura 33 entre el sorbitol y la Casiopeína III-ia. Por otro lado, se podría plantear una interacción de los grupos OH del sorbitol con el cobre de forma axial, siendo estabilizados

por una molécula de agua en la posición apical opuesta, aunque, esta interacción podría encontrarse estéricamente impedida, dado el volumen de las cabezas hidrófilas cuando se encuentran formando la membrana niosomal.

3.8 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó la espectroscopía de infrarrojo, para la Casiopeína III-ia, Span60, Colesterol, niosomas y niosomas con Casiopeínas, con el objeto de observar la encapsulación del compuesto. A continuación se presentan los espectros obtenidos de las materias primas y los sistemas niosomales.

3.8.1 Casiopeína III-ia

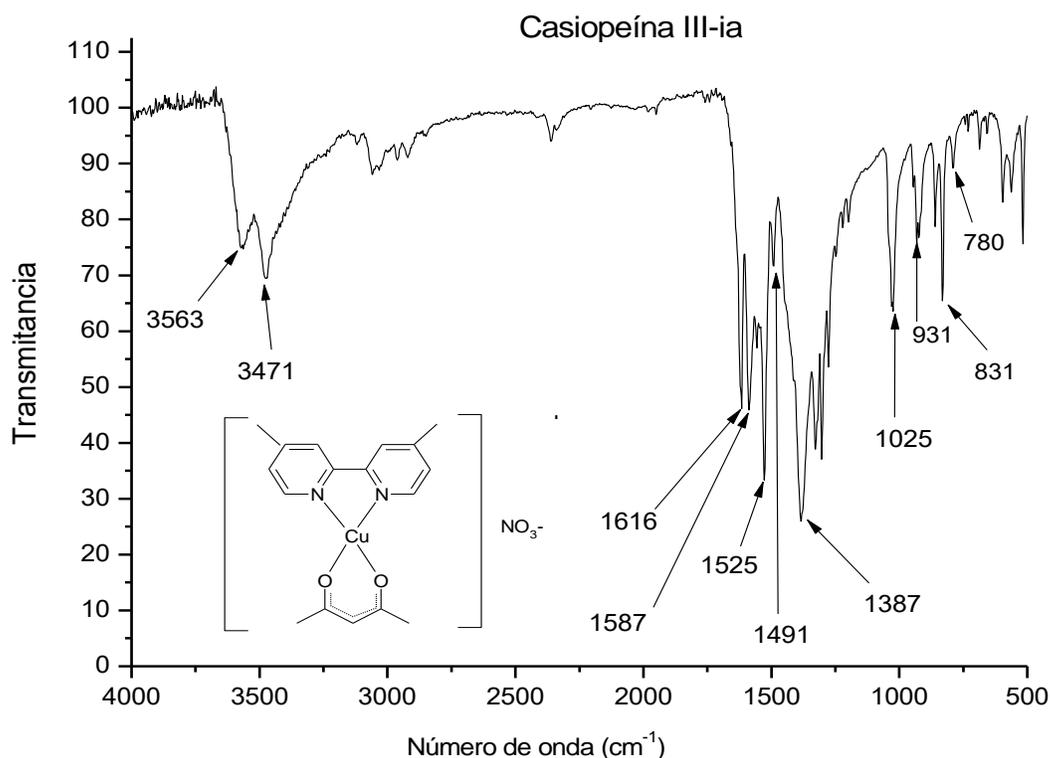


Figura 35. Espectro de infrarrojo de la Casiopeína III-ia.

En la figura 35 se presenta el espectro de infrarrojo para la Casiopeína III-ia, donde se observan las bandas características de la bipyridina y el acetilacetato. En 3479 cm⁻¹ vibraciones correspondientes a C-N, en 1616 cm⁻¹, las vibraciones correspondientes al enlace C=N, en 1525 cm⁻¹ vibraciones C=C, 1490 cm⁻¹ vibraciones del C=C, 831 cm⁻¹ vibraciones

aromáticas de las piridinas y 780 cm^{-1} aromáticos monosustituidos. Mientras que la banda del grupo carbonilo del acetilacetato se observa en 1587 cm^{-1} . Por su parte, la banda de absorción del contraíón nitrato está dada en 1387 cm^{-1} .

3.8.2 Span 60

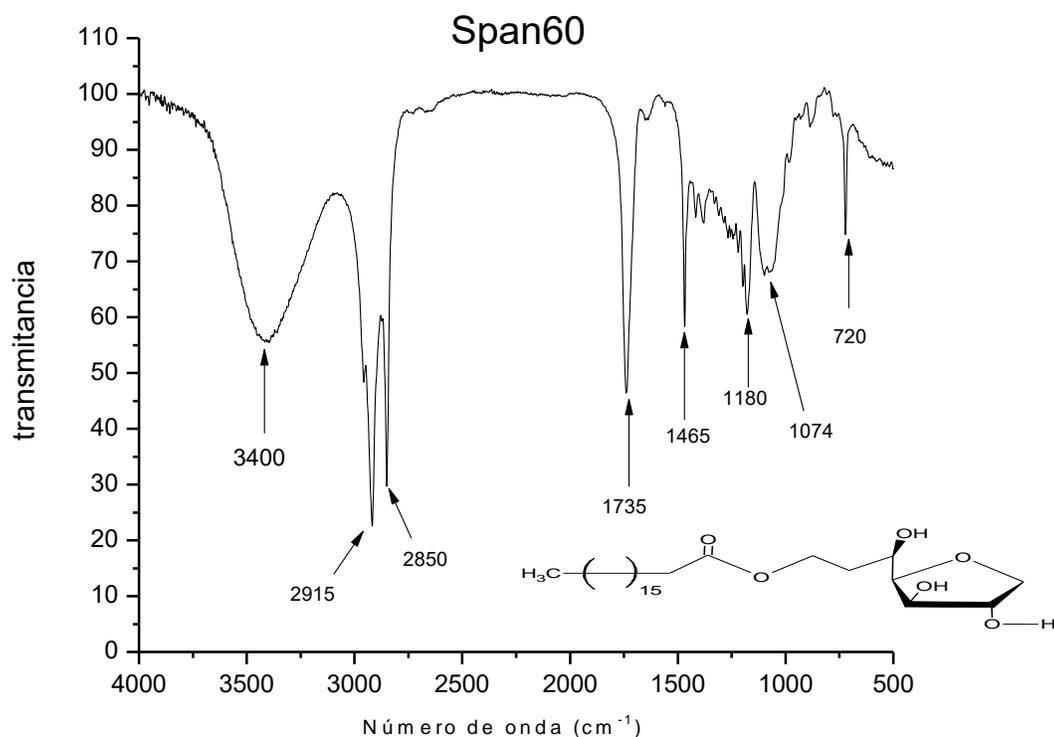


Figura 36. Espectro de infrarrojo del monoestereato de sorbitan (Span60).

En la figura 36 se observan las vibraciones de enlace de la molécula de monoestereato de sorbitan. En 3400 cm^{-1} se observa una banda características de alcoholes polivalentes, referente a los alcoholes del sorbitol deshidratado. 2915 cm^{-1} y en 2850 cm^{-1} vibraciones correspondientes a metilenos asimétricos y simétricos respectivamente. En 1735 cm^{-1} estiramientos del carbonilo del grupo funcional de los ésteres y en 1465 cm^{-1} estiramientos de tijera de grupos metilenos. Mientras que en 1180 cm^{-1} y 1074 cm^{-1} son bandas características de sólidos con cadenas largas y grupos polares terminales, de estiramientos simétricos y asimétricos. Por último en 720 cm^{-1} aparece una pequeña señal la cual es observada cuando se tienen más de cuatro metilenos en una cadena alifática.

3.8.3 Colesterol

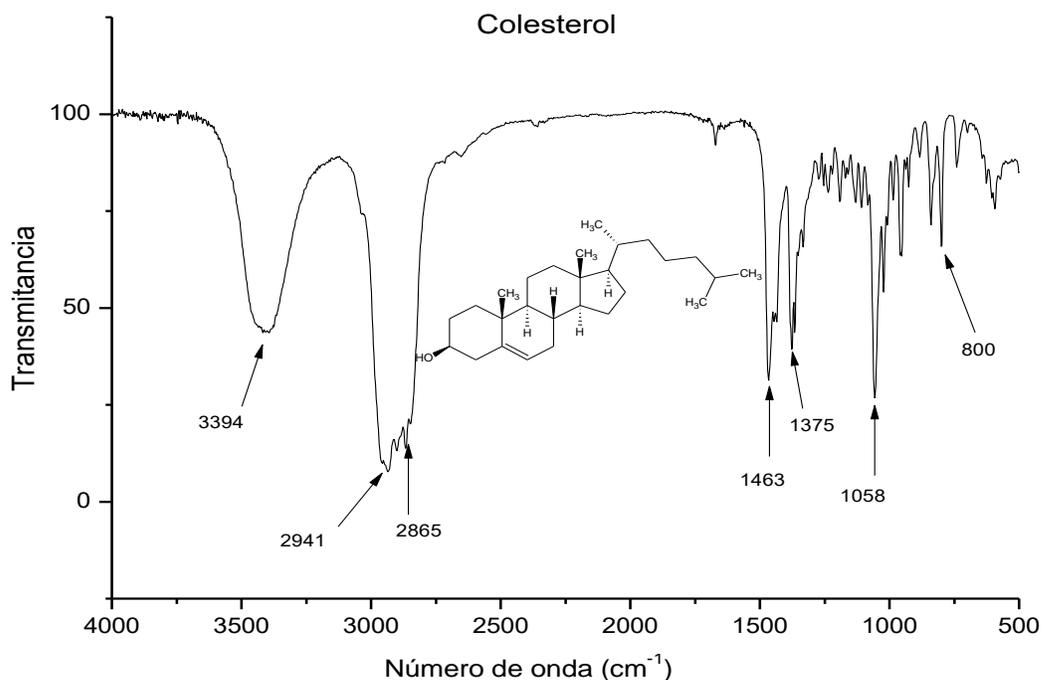


Figura 37. Espectro de infrarrojo del Colesterol.

El espectro de infrarrojo correspondiente al Colesterol es presentado en la figura 37. En 3394 cm^{-1} se observan vibraciones de alargamiento del enlace O-H. En 2940 cm^{-1} se observan vibraciones asimétricas del grupo metilo y en 2865 cm^{-1} vibraciones simétricas de metilenos. En 1463 cm^{-1} vibraciones de tijera de metilenos característicos en los ciclohexanos. En 1375 cm^{-1} se observa una banda que sugiere deformación simétrica de grupos gem dimetilos terminales. En 1058 cm^{-1} vibraciones característicos de estiramiento del enlace C-OH de alcohol primario y en 800 cm^{-1} torsión =C-H.

3.8.4 Niosomas

El espectro obtenido para los sistemas niosomales es presentado en la figura 38, donde se observaron principalmente bandas características del Span60. En 3446 cm^{-1} se obtuvieron vibraciones de estiramientos del enlace O-H, en 2917 cm^{-1} y en 2850 cm^{-1} se observan las vibraciones simétricas y asimétricas del estiramiento del grupo metileno. En 1735 cm^{-1} se observó los estiramientos del carbonilo del grupo funcional éster alifático correspondiente al

Span60. En 1462 cm^{-1} se observan vibraciones de tijera de metilenos de intensidad media, la banda en 1380 cm^{-1} de intensidad débil, perteneciente a vibraciones O-CO-CH₂ y en 1052 cm^{-1} vibraciones de estiramiento de enlace C-OH de alcohol primario que en el espectro del Span60 no es observado dada la banda ancha que aparece en 1074 cm^{-1} que es asignada a sólidos con cadenas largas y grupos polares terminales.

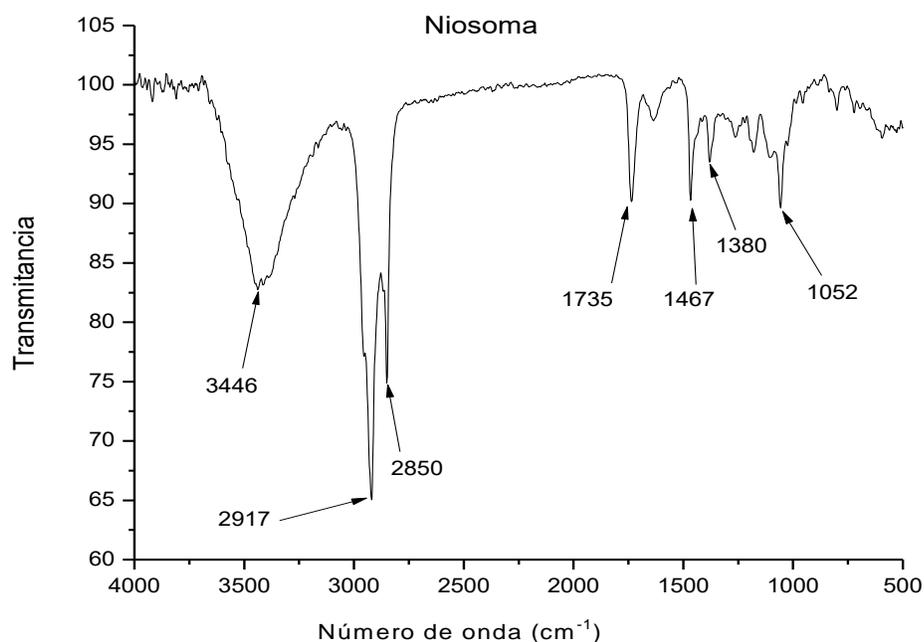


Figura 38. Espectros de infrarrojo de los niosomas.

La banda correspondiente al enlace O-H (3446 cm^{-1}) presentó un adelgazamiento y un desplazamiento hacia mayores números de onda comparado con las bandas O-H del Span60 (3400 cm^{-1}) y del colesterol (3394 cm^{-1}). Este fenómeno comúnmente se presenta cuando existe una disminución o una pérdida de formación de puentes de hidrógeno. Se piensa que la inserción de las cadenas de colesterol entre las cadenas del Span60 disminuye la interacción entre las cabezas hidrófilas del tensoactivo disminuyendo de este modo la formación de puentes de hidrógeno entre los monómeros del Span60. En un estudio teórico realizado por Aksornnarong y col. en 2016, se obtuvo que para bicapas puras de Span60 el número promedio de enlaces de hidrógeno entre Span60/Span60 fue de 2.6 ± 0.04 , mientras

que cuando el colesterol fue agregado a la bicapa, el número de enlaces de hidrógenos entre el Span60/Span60 decrece a 0.67 ± 0.05 [69], lo que explicaría lo observado en el espectro de IR. No obstante, se plantea que cuando las cadenas de colesterol son insertadas entre las cadenas de Span60 se espera la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos OH del tensoactivo y los oxígenos del grupo funcional éster del colesterol. Aksornnarong y col, mencionan que el decremento en la interacción Span60/Span60 es compensado por 0.84 ± 0.04 enlaces de hidrógeno entre el Span60/Colesterol [69]. Considerando que el colesterol otorga rigidez a la membrana y aunque entre el Span60 y el colesterol se encuentre formación por puentes de hidrógeno, dado el efecto estérico de las cabezas hidrófilas, en el espectro de infrarrojo sólo se observó la disminución de los puentes de hidrógeno entre las cabezas del tensoactivo, razón del efecto batocrómico y del adelgazamiento de la banda del O-H.

3.8.5 Niosomas con Casiopeínas

En la figura 39 se presenta el espectro de niosomas con Casiopeínas III-ia donde se observa una banda característica de enlaces O-H en 3405 cm^{-1} . En 2925 cm^{-1} una pequeña banda correspondiente a vibraciones asimétricas de metilenos. En 1731 cm^{-1} estiramiento de carbonilo del grupo funcional éster del Span60 o del acetilacetato de la Casiopeína III-ia. En este espectro se observa la aparición de dos nuevas bandas, una en 1641 cm^{-1} y otra en 1538 cm^{-1} las cuales pueden ser asignadas a sitios ácidos de Brönsted, generado a partir de la protonación de la biperidina. Las banda en 1538 cm^{-1} pueden indicar piridinas con formación de enlaces de hidrógeno. La banda en 1380 cm^{-1} de intensidad débil, también aparece en el espectro del niosoma y del Span60 perteneciente a vibraciones O-CO-CH₂-. En 1180 cm^{-1} una banda de mayor intensidad, que es característico con cadenas largas y grupos polares terminales. En 1058 cm^{-1} vibraciones característicos de estiramiento del enlace C-OH de alcohol primario.

La banda de vibraciones O-H (3405 cm^{-1}) se ensancha con respecto a la banda O-H del niosoma y se desplaza hacia menores números de onda, lo que puede indicar formación de puentes de hidrógeno del Span 60 con la biperidina, esta formación de puentes de hidrógeno

puede ser confirmada con las dos bandas que aparecen en 1641 cm^{-1} y en 1538 cm^{-1} . La presencia del colesterol, conduce a la reducción de interacciones Span60/Span60 y a un incremento en el espaciamiento molecular por lo que se favorece la solvatación de las cabezas hidrófilas y la formación de puentes de hidrógeno con la Casiopeína III-ia.

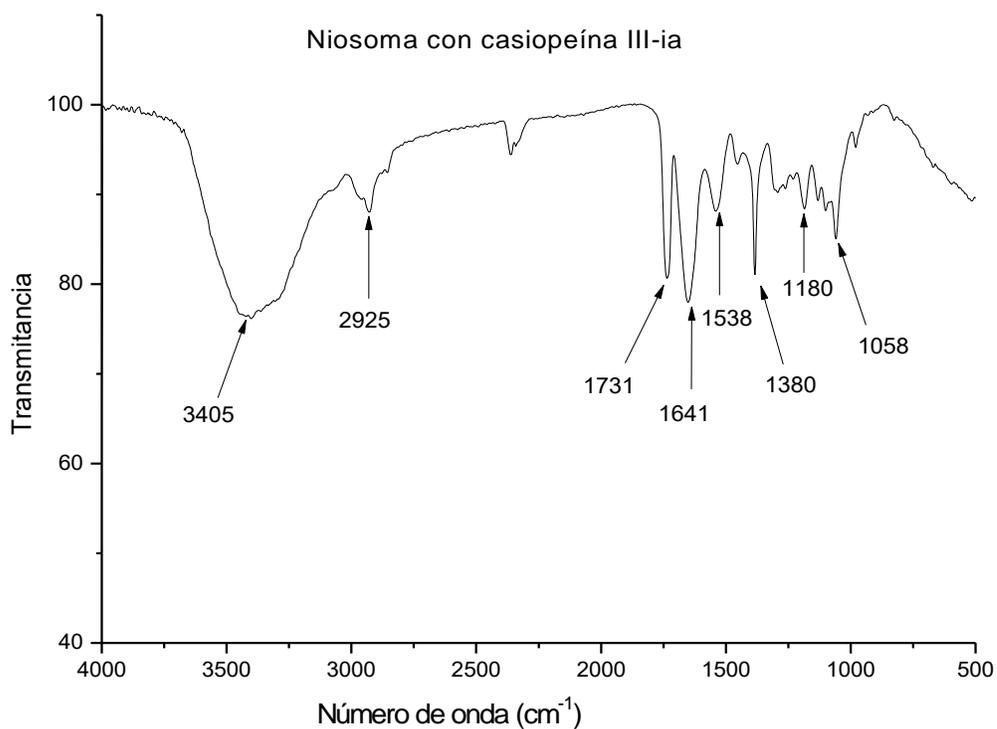


Figura 39. Espectro de infrarrojo de niosoma con Casiopeína III-ia.

3.9 Estudio de liberación *in vitro*

Se evaluó el perfil de liberación para la Casiopeína III-ia mediante celdas de difusión de forma horizontal. Se graficó el tiempo contra porcentaje de liberación, la gráfica obtenida es presentada en la figura 40.

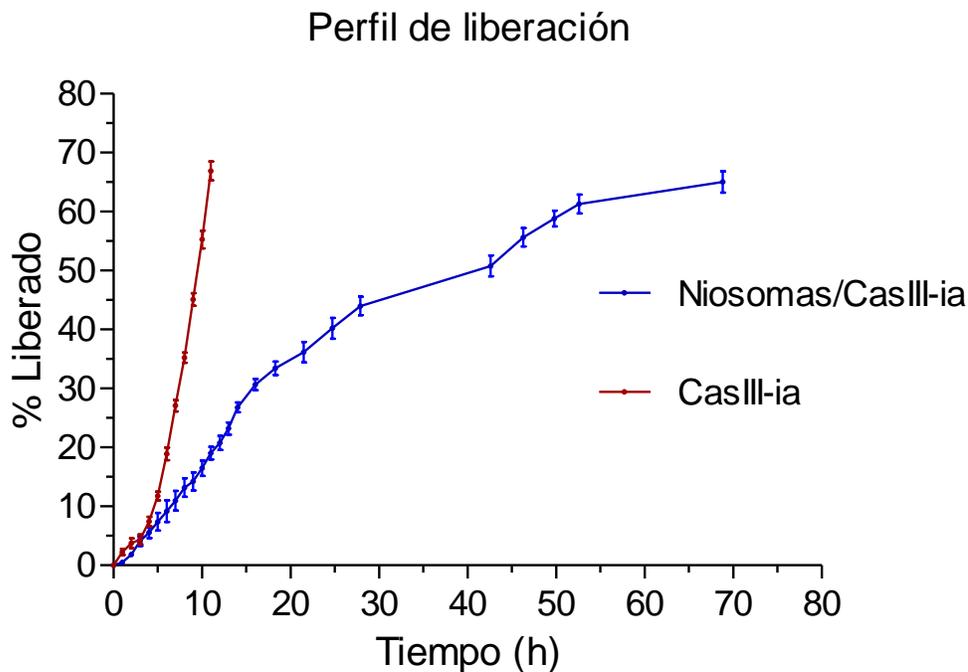


Figura 40. Perfil de liberación para la Casiopeína III-ia nanoencapsulada a 90 μ M.

En la gráfica anterior se muestra el paso de la Casiopeína III-ia (línea roja) a través de la membrana de celulosa regenerada, donde se observó una difusión con una cinética de orden cero, lo que indica que el compuesto no saturó la membrana; asimismo, se observó una difusión del 70 % del compuesto libre a las nueve horas del estudio. Comparando estos resultados con la línea azul (niosoma con Casiopeína III-ia), se observa para el segundo caso una modificación del paso del compuesto por la membrana con una liberación rápida durante las 15 primeras horas y posteriormente una disminución en la velocidad de liberación, con un 67 % liberado hasta las 69 horas, lo que habla de una modificación en la liberación a través del nanoacarreador.

3.9.1 Cinética de liberación

Para evaluar el tipo de liberación, los datos obtenidos fueron ajustados a diferentes ecuaciones cinéticas. Las gráficas obtenidas son presentadas a continuación.

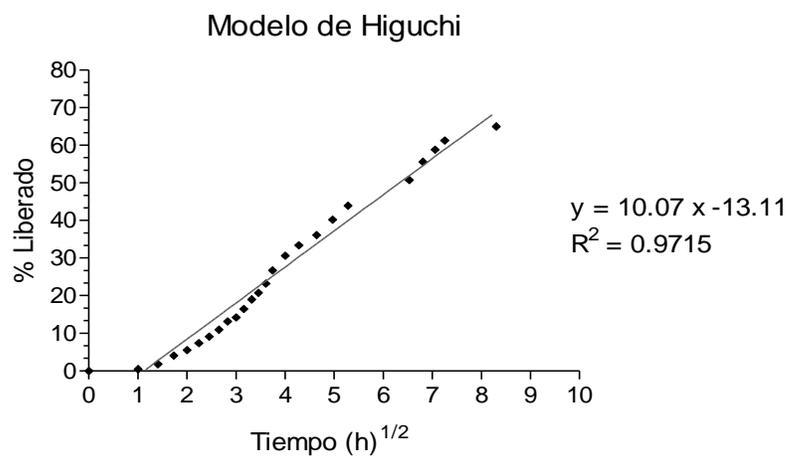
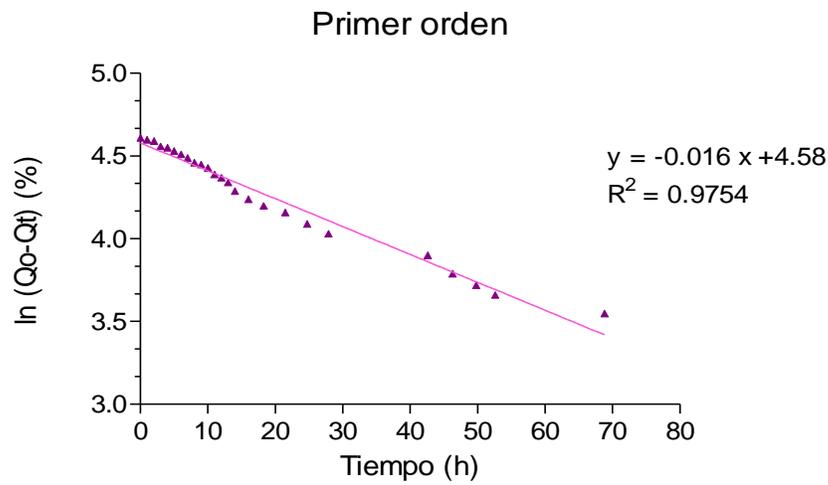
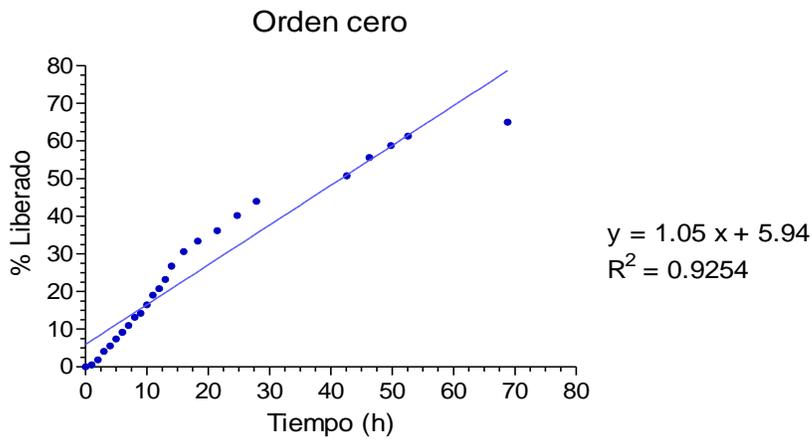


Figura 41. Ajuste de los datos del perfil de liberación a diferentes modelos cinéticos.

Los datos obtenidos fueron ajustados a una cinética de orden cero, primer orden y al modelo de Higuchi. En el cuadro 9 se presentan los coeficientes de correlación y las constantes de velocidad obtenidas con cada modelo.

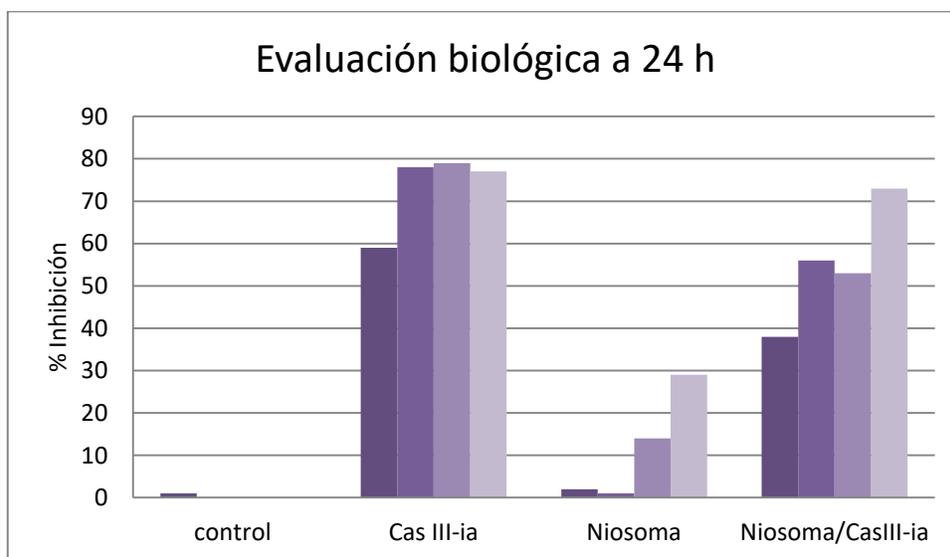
Cuadro 9. Coeficiente correlación y constantes cinéticas.

Modelo	R ²	k
Orden cero	0.9254	k ₀ : 1.05
Primer orden	0.9754	k ₁ :0.016
Higuchi	0.9715	k _H :10.07

Según los resultados obtenidos, el perfil de liberación puede ser ajustado a una cinética de primer orden o al modelo de Higuchi, ya que los coeficientes de correlación son similares. En este estudio se consideró que el perfil de liberación siguió una cinética de primer orden.

3.10 Evaluación de la actividad biológica

En la figura 42 se presenta el porcentaje de inhibición para la línea tumoral HeLa con Casiopeína III-ia libre, los niosomas y la Casiopeína III-ia nanoencapsulada en el sistema niosomal. La actividad biológica fue evaluada a 24 y 48 horas.



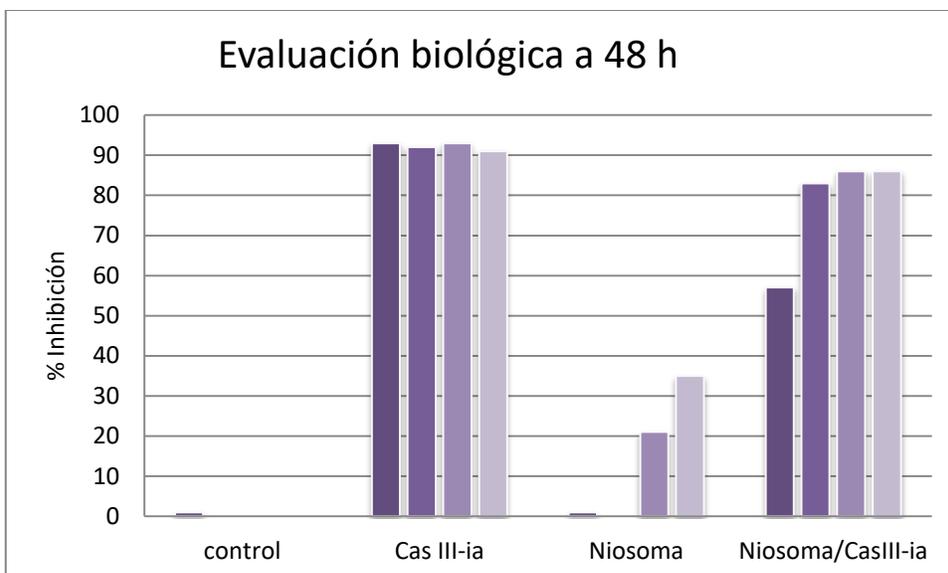


Figura 42. Porcentaje de inhibición de la proliferación celular. Donde, las concentraciones de Casiopeína III-ia y del niosoma no son iguales, ya que está referida a la concentración de Casiopeína III-ia en el niosoma (Cuadro 10).

Cuadro 10. Concentraciones evaluadas para la inhibición celular para la Casiopeína III-ia, niosomas y niosomas/casiopeína III-ia.

	Concentraciones evaluadas (μM)			
				
Casiopeína III-ia	36	54	72	90
Niosomas	40	80	160	200
Niosomas/Casiopeína III-ia.*	80/36	160/72	200/90	400/180

Para todas las concentraciones evaluadas, la Casiopeína III-ia libre presentó un porcentaje de inhibición celular mayor al 50 %, cuando fue evaluado a 24 horas, mientras que a las 48 horas, se presentó un porcentaje de inhibición por encima del 90 % para todos los casos. Cuando la Casiopeína III-ia fue nanoencapsulada, se observó una disminución en el porcentaje de inhibición superior al 50 %, en comparación con la Casiopeína libre, para todos los valores evaluados a los dos tiempos, exceptuando la menor concentración (36 μM) a 24 horas, que presentó una inhibición de 38 %. De acuerdo con los estudios de liberación del

fármaco a las 24 horas se tenía un 40 % liberado mientras que a las 48 h se tenía un 56 % de liberación. Tomando en consideración estos estudios, con el 56 % del compuesto liberado luego de 48 horas, más del 70 % de la proliferación celular es inhibida. Por otro lado, para los niosomas se observó un incremento de la inhibición conforme se incrementó la concentración, sin embargo, dicha inhibición no superó el 40% de la inhibición de la proliferación.

IV DISCUSIÓN

La formación de los niosomas se llevó a cabo por dos métodos, el método de la película delgada y el método de inyección del éter. Comúnmente la formación de los sistemas niosomales se realiza con una concentración de tensoactivo/aditivos de 10-30 mM. Sin embargo, se ha observado que en este rango, se obtienen principalmente vesículas grandes unilamelares (100-3000 nm) o multilamelares (> 3000 nm) [39]. Es por lo anterior que se ha propuesto que una reducción de la concentración del tensoactivo/aditivos resulta en una disminución en el tamaño de partícula. Sankhyan y col. encontraron que un decremento en la concentración del colesterol y del tensoactivo conduce a un decremento en el tamaño de partícula [51]. En este sentido, Hao y Li han propuesto que para el Span60 y Colesterol en una relación molar (1:1) la concentración del tensoactivo/aditivo podría usarse en 0.2 mM, donde encontraron un tamaño de partícula por debajo de 200 nm, sin formación de precipitado y una mayor eficiencia de encapsulación. En este trabajo, se varió la concentración en 20 y 0.2 mM para el método de hidratación de la película delgada y 0.2 y 2 mM para el método de inyección del éter, encontrando que para ambos métodos se obtuvieron tres poblaciones de tamaño de partícula y una mayor dispersión cuando la concentración fue mayor, mientras que cuando se utilizó 0.2 mM para ambos métodos se encontraron dos poblaciones. Una alrededor de 100 nm y la otra alrededor de 500 nm, los cuales presentados en número, la población de 100 nm, representa la mayor población con el 99 %, éste mismo comportamiento fue observado por Mohamed y col. en 2012, donde encontraron dos tamaños de partícula una de 319 ± 36.2 y otra de 2186 ± 319 nm [58]. Se han reportado tamaños de partículas por encima de los 500 nm, cuando Span60 y Colesterol son usados con una relación molar 1:1, con el método de la película delgada (sin sonicar la muestra) y en algunos casos una alta polidispersidad [51,70]. En el caso del método de inyección del éter, hasta lo investigado en la literatura, no se encontraron reportes para nanosistemas, sin embargo, lo obtenido en este trabajo muestra que éste segundo método puede llevar a un mejor escalamiento industrial por el proceso de obtención de los niosomas, con tamaños de partículas similares a los obtenidos por el método de hidratación de la película delgada. No obstante en ambos métodos se obtienen dos poblaciones, lo que

se traduce a una polidispersidad, muestras heterogéneas y un posible comportamiento anómalo en sistemas *in vivo*. Para fines de este trabajo, es de importancia considerar la segunda población, que si bien es minoría (en número), se debe tomar en cuenta, dado el objetivo de administración por vía intravenosa y de aprovechar el efecto de permeación y retención mejorada. Una alternativa propuesta para homogeneizar el tamaño de partícula, sería agregar una operación unitaria al método, que podría tratarse de extrusión. Si bien, en este trabajo no se presenta una reducción de la polidispersidad, se decidió trabajar con el método de inyección del éter para obtener la Casiopeína III-ia nanoencapsulada dadas las ventajas que presenta.

Una vez que se decidió el método a utilizar, se evaluó la eficiencia de encapsulación para los sistemas obtenidos con diferentes concentraciones de Span60/Colesterol y de Casiopeína III-ia, se encontró que la mayor encapsulación (EE) se observó cuando la concentración de Span60/Colesterol (S/C) fue de 4×10^{-4} M y de Casiopeína III-ia fue de 9×10^{-5} M, con una EE de 75.75 ± 3.42 %. Diversos autores han reportado eficiencias de encapsulación, para niosomas formados con Span60/Colesterol, entre 70 y el 90 %, siendo menor la EE cuando se trata de compuestos hidrofílicos, éstos resultados concuerdan con lo obtenido en este trabajo [47,56,59,70].

Bajo las condiciones anteriormente descritas (inyección del éter, S/C en 4×10^{-4} M, Casiopeína III-ia en 9×10^{-5} M), se evaluó la morfología de los niosomas con y sin fármaco mediante TEM, donde se observaron sistemas esféricos con un tamaño aproximado de 60 nm, para ambos sistemas, estos resultados no coinciden con lo obtenido mediante dispersión dinámica de luz (DLS), donde se observaron tamaños de partícula de 27 nm cuando no se tenía Casiopeína y de 208 nm, cuando la Casiopeína fue encapsulada. Para sistemas nanoacarreadores, se reporta que la incorporación del fármaco puede afectar el tamaño de la partícula incrementando su radio hidrodinámico, lo que explicaría el aumento en el tamaño obtenido del niosoma, sin embargo, también se sabe que el radio hidrodinámico de la Casiopeína III-ia es de aproximadamente 2 nm, por lo que no se esperaba un incremento en el tamaño de la partícula, aunque la diferencia del promedio de

tamaño obtenido entre DLS y microscopía, podría deberse a la deshidratación de los niosomas para realizar el análisis mediante TEM.

Por otro lado, se encontró que se tenía un potencial zeta de 0 mV, éstos resultados coinciden con lo obtenido por Yan y col. en 2013, donde obtuvieron potenciales zeta de 0.8 ± 0.5 mV [59]. Diversos autores, reportan la formación de niosomas sin agregarle alguna molécula cargada y obtienen potenciales zeta alrededor de -10 mV; sin embargo, si consideramos la estructura no iónica de los tensoactivos usados, estos valores de potenciales son difíciles de obtener, por lo que comúnmente se debe recurrir a añadir alguna molécula que pueda otorgar carga a la membrana niosomal. Se esperaba que la Casiopeína III-ia pudiera interactuar con la membrana del niosoma y de esta forma otorgar una pequeña carga al sistema. El potencial zeta obtenido, sugiere que la Casiopeína no se encuentra formando interacción con la membrana fuera del niosoma, que podría ser confirmada con las micrografías de TEM, donde no se observó cristales o agregados del compuesto en la superficie de la partícula. Ahora bien, con respecto al potencial zeta obtenido, el valor de 0 mV, indica que el sistema es inestable, lo que podría conducir a una rápida coalescencia de los niosomas. Esta inestabilidad fue confirmada por medio de MEB, donde se observaron los sistemas luego de 10 días de realizada la formulación, las micrografías mostraron estructuras amorfas en el orden $1.73 \mu\text{m}$, lo que conduce a confirmar la coalescencia de los niosomas con respecto al tiempo. Con la finalidad de observar si al agregar dicetil fosfato, dado que es la molécula cargada más usada para la formación de los niosomas, la Casiopeína III-ia no sufría alguna modificación en su estructura, se evaluó la región visible mediante espectrofotometría, donde una disolución de Casiopeína III-ia en presencia de fosfatos fue comparada con una disolución de Casiopeína III-ia en agua. Según los resultados obtenidos, en disolución no existe un cambio significativo en la λ máxima de absorción, sin embargo, en un estudio teórico realizado por Galindo y col., se encontró que los fosfatos pueden interaccionar con el cobre de la Casiopeína III-ia de forma apical, siendo este aducto estabilizado por una molécula de agua en la posición apical contraria [67] En este sentido, si en la formulación de los niosomas se agregan moléculas de dicetilfosfato, la Casiopeína podría formar compuestos estables con la

membrana niosomal y dado que la Casiopeína no sería liberada de forma efectiva y únicamente cuando el nanoacarreador sea degradado, podría significar un decremento en la actividad *in vivo*, de este modo, no se alcanzaría la concentración plasmática efectiva. Es por lo anterior, que no resultaría conveniente agregar alguna molécula con fosfatos a la membrana niosomal. Una forma de preservar los sistemas nanoacarreadores o los fármacos inestables en disolución, es mediante liofilización donde se realiza una sublimación a presiones bajas con el objeto de obtener un sólido. No obstante, existen reportes que mencionan que la liofilización puede resultar un proceso tardado y costoso, por lo que se ha propuesto la preservación de las muestras de nanoacarreadores mediante un secado por atomización, siendo éste un proceso más rápido y de fácil escalamiento [71,72], ahora bien, se debe considerar las condiciones a trabajar el secado, dado las características fisicoquímicas del compuesto, principalmente considerando su temperatura de descomposición.

Por otro lado, se evaluó la región ultravioleta para observar algún cambio en las bandas de absorción de la Casiopeína III-ia correspondiente a la biperidina, no se observó algún cambio en la banda máxima de absorción, por lo que no se esperaría algún tipo de interacción de la Casiopeína con el niosoma; no obstante, mediante un análisis cuantitativo se obtuvo que alrededor del 20 % del compuesto puede estar interaccionando con el niosoma, se plantea que esta interacción podría estar ocurriendo mediante puentes de hidrógeno entre los enlaces O-H de las cabezas hidrófilas del Span60 y los carbonos y nitrógenos de la biperidina, dicha propuesta fue realizada tomando en cuenta los estudios teóricos de Galindo y col., donde se observó una interacción de la biperidina con la azúcar de un nucleótido. El porcentaje de interacción obtenido mediante este estudio pueden ser reafirmadas mediante FITR, donde el espectro obtenido para la Casiopeína III-ia con el niosoma, se observan dos nuevas bandas atribuidas a sitios ácidos de Brønsted generado a partir de la protonación de la biperidina, dichas bandas no fueron observadas en el espectro del niosoma.

Al evaluar la liberación del compuesto mediante celdas de difusión, la Casiopeína III-ia nanoencapsulada tuvo un comportamiento bifásico, con una liberación rápida hasta las primeras 15 horas, seguido de una liberación más lenta hasta las 68 horas de evaluación, con

porcentaje liberado de aproximadamente el 65 %. Este comportamiento también fue observado por Mohamed y col., ellos mencionan que dicho comportamiento es característico de las vesículas [58]. Shaker y col., mencionan que una liberación bifásica puede ser debida a la combinación de un mecanismo de difusión de fármaco que se encuentra en el exterior de la capa de los niosomas, así como liberación de fármaco que se encuentra en la más externa superficie y la liberación lenta puede estar dada por posibles interacciones del fármaco con la membrana del niosoma [54]. En este sentido, los resultados obtenidos por medio de espectrofotometría y FTIR, muestran un porcentaje bajo de interacciones de la Casiopeína III-ia con la membrana del niosoma, lo que explica el comportamiento bifásico obtenido. Por otro lado, la liberación sólo fue evaluada hasta las 68 horas, con un 65 % de liberación, diversos autores reportan liberación de fármacos hidrofílicos a partir de niosomas hasta por 6 días.

El porcentaje de liberación obtenido a través del tiempo fue ajustado a diferentes modelos cinéticos, donde se obtuvo un mejor coeficiente de correlación para una cinética de primer orden y una cinética de Higuchi. La cinética de primer orden es aplicada a diferentes formas farmacéuticas donde la forma geométrica inicial y el volumen conserva la misma forma todo el tiempo, mientras que el modelo de Higuchi describe la liberación del compuesto en sistema de tipo matriz, y toma en cuenta diversas consideraciones, donde: la concentración inicial del fármaco en la matriz es mucho más alta que el fármaco en la disolución, la difusión del fármaco toma lugar en una sola dimensión, y es principalmente aplicable para describir disolución de fármacos a través de varios tipos de formas de dosificación farmacéuticas modificada, como en el caso de algunos sistemas transdermal y tabletas en matriz con fármaco solubles en agua [73,74]. Los sistemas niosomales, han sido ajustados a diversos modelos cinéticos, donde principalmente gobiernan cinéticas de primer orden [75] y el modelo de Higuchi [44,54]; también existen reportes para Korsmeyer [51] y el modelo de Weibull [56,59]; sin embargo, todo modelo tiene limitaciones y debe considerarse que para el caso de Korsmeyer, es un modelo principalmente aplicable a nanoacarreadores poliméricos, por su parte, el modelo de Weibull es aplicable para sistemas de tipo matriz.

Por otra parte, se debe tomar en cuenta que el mecanismo también es influenciado por las propiedades fisicoquímicas del compuesto.

Zeng y col., proponen un modelo cinético, donde se considera el tipo de transporte (principalmente difusión) del fármaco a través del nanoacarreador (liberación rápida) y de interacciones fármaco-acarreador (liberación más lenta), que puede ser de importancia para el perfil de liberación del compuesto. Ellos mencionan que dicha interacción puede retardar la liberación a partir del nanoacarreador. En sus estudios, ajustaron diversos perfiles de liberación a sus ecuaciones (principalmente liposomas y nanopartículas sólidas lipídicas) y encontraron que los datos de los liposomas, se ajustan a este modelo. En este sentido, se propone que los resultados obtenidos en este trabajo podrían seguir dicho modelo, debido a que se observa una liberación rápida que puede seguir una cinética de primer orden y posteriormente una liberación más lenta que puede estar dada por la interacción por puentes de hidrógeno de la Casiopeína con el niosoma [76,77].

La evaluación de la actividad biológica mostró que la Casiopeína nanoencapsulada fue activa en las concentraciones evaluadas, mostrando una mejor actividad a las 48 horas del estudio, donde según los estudios de liberación de fármaco, a este tiempo, los nanoacarreadores han liberado el 55 %. Estos resultados son análogos a lo obtenido por Shaker y col., donde evaluaron la viabilidad celular de Tamoxifen libre y encapsulado en los niosomas en una línea tumoral de cáncer de mama, mencionan que el tamoxifen libre y nanoencapsulado muestran igual actividad luego de 72 horas, probablemente no se observa una mejorada actividad, ya que sus estudios *in vitro* mostraron una liberación del 62 % a las 72 horas [54]. Por lo que, en este trabajo se piensa que una evaluación a mayor tiempo podría significar un mejoramiento de la actividad inhibitoria de la proliferación celular.

V CONCLUSIONES

Se realizó la formación de los niosomas por el método de hidratación de la película delgada y el método de inyección del éter, donde se escogió el segundo método dadas las ventajas que presenta como ausencia de sonicado, lo que representa un menor gasto energético, se requiere menos volumen de disolvente y se utiliza éter que se trata de un disolvente menos tóxico para la salud humana.

De acuerdo con los resultados de ANOVA, la variación de la concentración de Span60/Colesterol no tiene influencia en la eficiencia de encapsulación, a diferencia de la concentración de la Casiopeína III-ia que sí influye en dicha eficiencia, obteniéndose una mayor encapsulación (75 %) cuando la concentración fue de 400 μM para el Span60/Colesterol y 90 μM para la Casiopeína III-ia.

Se obtuvo un sistema niosomal cargado con Casiopeína III-ia, que fue observado mediante TEM con una población de partículas por debajo de 210 nm según estudios de DLS. Mediante potencial zeta y microscopía electrónica de barrido se observó que los niosomas fueron físicamente inestables.

Se observó una liberación modificada bifásica, con una liberación rápida gobernada principalmente por difusión y una liberación lenta dadas las interacciones débiles entre la Casiopeína III-ia y la membrana niosomal, dichas interacciones fueron confirmadas por espectrofotometría UV-visible y FTIR.

Estudios de actividad antiproliferativa en líneas tumorales de HeLa, mostraron más del 50 % de la inhibición de la proliferación celular cuando la Casiopeína III-ia fue nanoencapsulada a las 48 horas de evaluación, dicha actividad fue menor a la Casiopeína III-ia no encapsulada que puede ser asociada a la liberación modificada.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), Estadísticas a Propósito Del Día Internacional Contra El Cáncer De Mama, Aguascalientes, 2016.
- [2] Organización Mundial de la Salud, Cáncer, (2016).
- [3] M. Estanqueiro, M.H. Amaral, J. Conceic, J. Manuel, S. Lobo, Biointerfaces Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy : The state of the art, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 126 (2015) 631–648. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.12.041.
- [4] E. Pérez-Herrero, A. Fernández-Medarde, Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy, Eur. J. Pharm. Biopharm. 93 (2015) 52–79. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
- [5] S. Nazir, T. Hussain, A. Ayub, U. Rashid, A.J. MacRobert, Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments., Nanomedicine. 10 (2014) 19–34. doi:10.1016/j.nano.2013.07.001.
- [6] R.T. Skeel, S.N. Khleif, Handbook of Cancer Chemotherapy, Eighth, Philadelphia, 2011.
- [7] E. Chu, V.T. DeVita, Physicians Cancer Chemotherapy Drug Manual, Firts, United States, 2013.
- [8] I. Ali, Rahis-Uddin, K. Salim, M. a Rather, W. a Wani, A. Haque, Advances in nano drugs for cancer chemotherapy., Curr. Cancer Drug Targets. 11 (2011) 135–146. doi:10.2174/156800911794328493.
- [9] J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-Garcia, M.E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Azuara, Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas., Toxicol. In Vitro. 25 (2011) 1376–84. doi:10.1016/j.tiv.2011.05.008.
- [10] M.E. Bravo, Estudio QSAR de quelatos mixtos de cobre (II) [Cu(N-N)(acetilacetato)]NO₃ y [Cu(N-N)(glicinato)]NO₃, Universidad Nacional Autónoma de México, 2009. <http://www.citeulike.org/user/LNCScatalogo/article/10716051>.
- [11] L.R. Azuara, Ficha técnica de la Casiopeína III-ia sometida a COFEPRIS, 2014.
- [12] A. Alonso, Estudio de la reactividad de la Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia con

cisteína, glutatión y 2-mercaptoetanol., Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.

[13] M.E. Bravo-gómez, J.C. García-ramos, I. Gracia-mora, L. Ruiz-azuara, Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu (N – N)(acetylacetonato)] NO 3 and [Cu (N – N)(glycinato)] NO 3 complexes , J. Inorg. Biochem. 103 (2009) 299–309. doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.10.006.

[14] T. Uribe, Estabilidad de casiopeína III-ia y casiopeína II-gly a una temperatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.

[15] A.G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, J.C. García-Ramos, M. Flores-Alamo, E. Hernández-Lemus, L. Ruiz-Azuara, C. Mejía, Copper(ii) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line chp-212, J. Inorg. Biochem. 126 (2013) 17–25. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.05.001.

[16] F. Carvalho Chaigneau, Efectos antiproliferativos y apoptóticos de las casiopeínas II-gly y III-ia en líneas tumorales humanas, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.

[17] M. Leal-García, L. García-Ortuño, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, J. Luna-Delvillar, H. Sumano, Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of casiopeinas in anaesthetized dogs, Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 101 (2007) 151–158. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00038.x.

[18] J. Antonio, Farmacocinética de Casiopeina III-ia. Estudio preclinico en conejos., Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.

[19] A. Romero, Estudio preliminar de farmacocinética de casiopeína III-ia (un nuevo anticancerígeno) en ratas, a partir del análisis de datos urinarios., Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.

[20] I. Fuentes, Farmacocinética preclínica de casiopeína IIIia y su unión a proteínas plasmáticas, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.

[21] V. Sáez, E. Hernández, L. Sanz, I. Katime, Liberación controlada de fármacos. micropartículas, Rev. Iberoam. Polímeros. 5 (2004) 87–101.

[22] J. Khandare, R. Haag, Pharmaceutically Used Polymers: Principles, Structures, and

Applications of Pharmaceutical Delivery Systems, *Handb. Exp. Pharmacol.* 197 (2010) 221–250. doi:10.1007/978-3-642-00477-3.

[23] T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science* (80-.). 303 (2004) 1818–1822. doi:10.1126/science.1095833.

[24] R. a Siegel, M.J. Rathbone, Overview of Controlled Release Mechanisms, in: *Fundam. Appl. Control. Release Drug Deliv.*, New York, 2012: pp. 19–44. doi:10.1007/978-1-4614-0881-9.

[25] C. Pinto, R. Neufeld, A. Ribeiro, F. Veiga, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles., *Nanomedicine.* 2 (2006) 8–21. doi:10.1016/j.nano.2005.12.003.

[26] S. Parveen, S.K. Sahoo, Polymeric nanoparticles for cancer therapy., *J. Drug Target.* 16 (2008) 108–123. doi:10.1080/10611860701794353.

[27] L. Bregoli, D. Movia, J.D. Gavigan-Imedio, J. Lysaght, J. Reynolds, A. Prina-Mello, Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12 (2016) 81–103. doi:10.1016/j.nano.2015.08.006.

[28] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler, Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications, *J. Control. Release.* 200 (2015) 138–157. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.030.

[29] Y.W. Naguib, Z. Cui, Nanomedicine: The promise and Challenges in Cancer Chemotherapy, in: D.G. Capco, Y. Chen (Eds.), *Nanomaterial*, New York, 2014: pp. 208–224. doi:10.1007/978-94-017-8739-0.

[30] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy., *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 751–760. doi:10.1038/nnano.2007.387.

[31] M. Yokoyama, Drug targeting with nano-sized carrier systems, *J. Artif. Organs.* 8 (2005) 77–84. doi:10.1007/s10047-005-0285-0.

- [32] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 206–212. doi:10.1016/j.addr.2012.09.033.
- [33] E. Morán, *Formulación de Casiopeína III Ia(R) por medio de nanopartículas como un sistema de liberación modificada*, Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
- [34] J. Miranda, *Estudio y caracterización de un sistema de liberación controlada de casiopeína III-ia*, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- [35] A. Jesorka, O. Orwar, Liposomes: technologies and analytical applications, *Annu Rev Anal Chem.* 1 (2008) 801–832. doi:10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747.
- [36] D.. Lasic, On thermodynamic stability of liposomes, *J. Colloid Interface Sci.* 140 (1990) 302–304. doi:10.1016/0021-9797(90)90348-R.
- [37] I.F. Uchegbu, S.P. Vyas, Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery, *Int. J. Pharm.* 172 (1998) 33–70. doi:10.1016/S0378-5173(98)00169-0.
- [38] A. Nasir, S. Harikumar, K. Amanpreet, Niosomes: an Excellent Tool for Drug Delivery, *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 2 (2012) 479–487. <http://www.ijrpc.com/files/33-276.pdf>.
- [39] R. Rajera, K. Nagpal, S.K. Singh, D.N. Mishra, Niosomes: a controlled and novel drug delivery system., *Biol. {&}pharmaceutical Bull.* 34 (2011) 945–953. doi:10.1248/bpb.34.945.
- [40] S. Moghassemi, A. Hadjizadeh, Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review, *J. Control. Release.* 185 (2014) 22–36.
- [41] Y.M. Hao, K. Li, Entrapment and release difference resulting from hydrogen bonding interactions in niosome, *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 245–253. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.027.
- [42] C. Marianecchi, F. Rinaldi, M. Carafa, C. Marianecchi, L. Di, F. Rinaldi, C. Celia, D. Paolino, F. Alhaique, S. Esposito, M. Carafa, Niosomes from 80s to present : The state of the art, *Adv. Colloid Interface Sci.* 205 (2013) 187–206. doi:10.1016/j.cis.2013.11.018.
- [43] G.P. Kumar, P. Rajeshwarrao, Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview, *Acta Pharm. Sin. B.* 1 (2011) 208–219. doi:10.1016/j.apsb.2011.09.002.

- [44] H. Abdelkader, U. Farghaly, H. Moharram, Effects of surfactant type and cholesterol level on niosomes physical properties and in vivo ocular performance using timolol maleate as a model drug, *J. Pharm. Investig.* 44 (2014) 329–337. doi:10.1007/s40005-014-0121-8.
- [45] D. Akhilesh, K.B. Bini, J. V Kamath, Review on span-60 based non-ionic surfactant vesicles (niosomes) as novel drug delivery, *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 3 (2012) 6–12.
- [46] D.D. Lasic, R. Joannic, B.C. Keller, P.M. Frederik, L. Auvray, Spontaneous vesiculation, *Adv. Colloid Interface Sci.* 89-90 (2001) 337–349. doi:10.1016/S0001-8686(00)00067-1.
- [47] V. Sharma, S. Anandhakumar, M. Sasidharan, Self-degrading niosomes for encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs: An efficient carrier for cancer multi-drug delivery, *Mater. Sci. Eng. C.* 56 (2015) 393–400. doi:10.1016/j.msec.2015.06.049.
- [48] D.. Lasic, On thermodynamic stability of liposomes, *J. Colloid Interface Sci.* 140 (1990) 302–304. doi:10.1016/0021-9797(90)90348-R.
- [49] V. Guida, Thermodynamics and kinetics of vesicles formation processes, *Adv. Colloid Interface Sci.* 161 (2010) 77–88. doi:10.1016/j.cis.2009.11.004.
- [50] D. Attwood, A.T. Florence, *Physical Pharmacy*, in: *Phys. Pharm.*, first, UK, 2008: pp. 43–62.
- [51] A. Sankhyan, P.K. Pawar, Metformin loaded non-ionic surfactant vesicles: optimization of formulation, effect of process variables and characterization., *Daru J. Fac. Pharm.* 21 (2013) 7. doi:10.1186/2008-2231-21-7.
- [52] J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-Garcia, M.E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Azuara, Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas[®], *Toxicol. Vitr.* 25 (2011) 1376–1384. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.008.
- [53] M. Nasr, S. Mansour, N.D. Mortada, a a Elshamy, Vesicular aceclofenac systems: a comparative study between liposomes and niosomes., *J. Microencapsul.* 25 (2008) 499–512. doi:10.1080/02652040802055411.
- [54] D.S. Shaker, M. a. Shaker, M.S. Hanafy, Cellular uptake, cytotoxicity and in-vivo

evaluation of Tamoxifen citrate loaded niosomes, *Int. J. Pharm.* 493 (2015) 285–294. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.07.041.

[55] J. De Gier, J.G. Mandersloot, L.L.M. Van Deenen, Lipid composition and permeability of liposomes, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 150 (1968) 666–675. doi:10.1016/0005-2736(68)90056-4.

[56] A.Y. Waddad, S. Abbad, F. Yu, W.L.L. Munyendo, J. Wang, H. Lv, J. Zhou, Formulation, characterization and pharmacokinetics of Morin hydrate niosomes prepared from various non-ionic surfactants, *Int. J. Pharm.* 456 (2013) 446–458. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.040.

[57] M.R. Mozafari, Niosomes as Nanocarrier Systems, in: *Nanomater. Nanosyst. Biomed. Appl.*, Australia, 2007: pp. 67–81. doi:10.1007/978-1-4020-6289-6.

[58] M.S. El-Ridy, A. a. Badawi, M.M. Safar, A.M. Mohsen, Niosomes as a novel pharmaceutical formulation encapsulating the hepatoprotective drug silymarin, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4 (2012) 549–559.

[59] H. Yang, A. Deng, J. Zhang, J. Wang, B. Lu, Preparation, characterization and anticancer therapeutic efficacy of cisplatin-loaded niosomes., *J. Microencapsul.* 30 (2013) 237–44. doi:10.3109/02652048.2012.717116.

[60] A. Vangala, D. Kirby, I. Rosenkrands, E.M. Agger, P. Andersen, Y. Perrie, A comparative study of cationic liposome and niosome-based adjuvant systems for protein subunit vaccines: characterisation, environmental scanning electron microscopy and immunisation studies in mice., *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 787–799. doi:10.1211/jpp.58.6.0009.

[61] A.M. Medina, Estudio de la auto asociación de la Casiopeína III-ia en disolución acuosa, Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.

[62] A. Cohen, L. a. Bagatolli, Structure of spin-coated lipid films and domain formation in supported membranes formed by hydration, *Langmuir.* 20 (2004) 9720–9728. doi:10.1021/la048683.

[63] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, P. Stano, Giant Vesicles: Preparations and

Applications, *ChemBioChem*. 11 (2010) 848–865. doi:10.1002/cbic.201000010.

[64] L. Peltonen, J. Yliruusi, Surface Pressure, Hysteresis, Interfacial Tension, and CMC of Four Sorbitan Monoesters at Water-Air, Water-Hexane, and Hexane-Air Interfaces., *J. Colloid Interface Sci.* 227 (2000) 1–6. doi:10.1006/jcis.2000.6810.

[65] L. Peltonen, J. Hirvonen, J. Yliruusi, The Effect of Temperature on Sorbitan Surfactant Monolayers., *J. Colloid Interface Sci.* 239 (2001) 134–138. doi:10.1006/jcis.2001.7520.

[66] International Conference on Harmonisation, Guidance for Industry Q3C — Tables and List, 2012. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> \n <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.

[67] R. Galindo-Murillo, L.R. Azuara, R. Moreno-Esparaz, F. Cortés-Guzmán, Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex w, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1 (2012) 15539–15546. doi:10.1039/c2cp42185b.

[68] B. Nasser, Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes, *Int. J. Pharm.* 300 (2005) 95–101. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.05.009.

[69] A. Ritwiset, S. Kongsuk, J.R. Johns, Molecular structure and dynamical properties of niosome bilayers with and without cholesterol incorporation: A molecular dynamics simulation study, *Appl. Surf. Sci.* 380 (2016) 23–31. doi:10.1016/j.apsusc.2016.02.092.

[70] K. Ruckmani, B. Jayakar, S.K. Ghosal, Nonionic surfactant vesicles (niosomes) of cytarabine hydrochloride for effective treatment of leukemias: encapsulation, storage, and in vitro release., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 217–22. doi:10.1081/DDC-100100348.

[71] J. Cárdenas, Desarrollo de una metodología mediante secado por atomización (Spray Drying) para el secado de una formulación de niosomas, Universidad Austral de Chile, 2006.

[72] N. Schafroth, C. Arpagaus, U.Y. Jadhav, S. Makne, D. Douroumis, Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 90 (2012) 8–15. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.038.

- [73] K.H. Ramteke, P.A. Dighe, A.R. Kharat, S. V Patil, Review Article Mathematical Models of Drug Dissolution : A Review, *Sch. Acad. J. Pharm.* 3 (2014) 388–396.
- [74] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems., *Acta Pol. Pharm.* 67 (2010) 217–23. doi:10.1016/S0928-0987(01)00095-1.
- [75] M. Nasr, S. Mansour, N.D. Mortada, a a Elshamy, Vesicular aceclofenac systems: a comparative study between liposomes and niosomes., *J. Microencapsul.* 25 (2008) 499–512. doi:10.1080/02652040802055411.
- [76] L. Zeng, X. Wu, Modeling the sustained release of lipophilic drugs from liposomes, *Appl. Phys. Lett.* 97 (2010) 2010–2013. doi:10.1063/1.3479924.
- [77] L. Zeng, L. An, X. Wu, Modeling drug-carrier interaction in the drug release from nanocarriers., *J. Drug Deliv.* 2011 (2011) 370308. doi:10.1155/2011/370308.