



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA TERAGNÓSTICO
BASADO EN MICROBURBUJAS MAGNÉTICAS CON UN
FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

José Guillermo Macías Cárdenas



Ciudad Universitaria, CDMX,

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD
VOCAL: JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERON
SECRETARIO: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS
1er. SUPLENTE: CARLOS JUAREZ OSORNIO
2° SUPLENTE: VICTOR BARRERA GUZMÁN

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 100 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR EN EL EDIFICIO B, Y EL LABORATORIO 001 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA EN EL EDIFICIO F-1 DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. JESÚS GRACIA MORA

SUSTENTANTE:

JOSÉ GUILLERMO MACÍAS CÁRDENAS

ÍNDICE GENERAL

Resumen	6
Introducción	8
Capítulo 1.-Antecedentes	9
1.1 Biología del cáncer	
1.1.1 Expresión genética	9
1.1.2 Microambiente tumoral	10
1.1.3 Etiología	10
1.1.4 Desarrollo clínico	14
1.1.4.1 Iniciación	15
1.1.4.2 Promoción	15
1.1.4.3 Progresión	15
1.1.4.4 Metástasis	15
1.2 Aspectos generales del cáncer	
1.2.1 Epidemiología	16
1.2.1.1 Cáncer en México	16
1.2.2 Diagnóstico	19
1.2.3 Métodos de diagnóstico	19
1.2.3.1 Pruebas clínicas	19
1.2.3.2 Biopsia	19
1.2.3.3 Imagenología	20
1.2.3.4 Imagenología en cáncer	21
1.2.4 Tratamiento	22
1.2.4.1 Intervención quirúrgica	22
1.2.4.2 Radioterapia	22
1.2.4.3 Inmunoterapia	23
1.2.4.4 Terapia hormonal	23
1.2.4.4 Terapia vectorizada	24

1.2.4.5 Quimioterapia	24
1.3 Metotrexato	
1.3.1 Indicación terapéutica	25
1.3.2 Mecanismo de acción antineoplásica	26
1.3.3. Características biofarmacéuticas	26
1.3.4 Efectos adversos	27
1.3.5 Características fisicoquímicas	27
1.4 Sistemas de liberación farmacéuticos	
1.4.1 Sistemas convencionales de liberación de fármacos	28
1.4.2 Sistemas de liberación modificada de fármacos	29
1.4.3 Sistemas teragnóstico	30
1.4.4 Modelos cinéticos de liberación de fármacos	31
1.5 Agentes de contraste	
1.5.1 Resonancia magnética de imagen (MRI)	33
1.5.2 Nanopartículas magnéticas	34
1.5.2.1 Magnetismo	34
1.5.2.2 Teoría de dominios	36
1.5.2.3 Métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas	37
1.5.2.4 Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas	38
1.5.2.5 Magnetita	39
1.6 Agentes de contraste para ultrasonido	
1.6.1 Microburbujas	41
1.6.2. Microburbujas magnéticas	42
1.7 Agentes teragnósticos en cáncer	
1.7.1 Avances en los sistemas teragnósticos de cáncer	44
1.7.2 Retos y nuevas perspectivas de sistemas teragnósticos de cáncer	44
1.8 Caracterización de nano y micro partículas	
1.8.1 Espectroscopía de Infrarrojo	45
1.8.2 Difracción de rayos X de polvos	45

1.8.3	Dispersión dinámica de luz (DLS)	46
1.8.4	Potencial Z	46
1.8.5	Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)	47
1.8.6	Sedimentación	48
1.8.7	Centrifugación	49
1.8.8	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	49
Capítulo 2.- Planteamiento del problema		50
Capítulo 3.- Objetivo general		51
3.1	Objetivos particulares	51
Capítulo 4.- Hipótesis de trabajo		51
Capítulo 5.- Metodología experimental		52
5.1	Materiales	52
5.2	Síntesis de NPMs hidrofóbicas	52
5.3	Caracterización de NPMs hidrofóbicas	53
5.3.1	Tamaño de partícula por TEM	53
5.3.2	Evaluación de la dispersabilidad	53
5.3.3	Espectroscopía de infrarrojo de nanopartículas magnéticas	53
5.3.4	Potencial Z	53
5.3.5	Difracción de Rayos X de Polvo	53
5.4	Síntesis de los sistemas coloidales poliméricos e híbridos	53
5.4.1	Microesferas poliméricas (CB)	53
5.4.2	Microburbujas poliméricas (PB)	54
5.4.3	Microburbujas magnéticas (MB)	54
5.5	Aislamiento de partículas por tamaño mediante centrifugación diferencial	54
5.6	Determinación de tamaño de partícula por DLS	55
5.7	Caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	55
5.8	Lifiolización de los sistemas coloidales poliméricos e híbridos	55
5.9	Cuantificación de NPMs en microburbujas	55

5.10 Gradiente de densidad	55
5.11 Calorimetría Diferencia de Barrido (DSC)	56
5.12 Evaluación de los sistemas como sistemas terapéuticos <i>in vitro</i>	56
5.12.1 Adsorción de fármaco modelo antineoplásico (metotrexato)	56
5.12.2 Liberación de fármaco modelo antineoplásico (metotrexato)	56
5.13 Evaluación de los sistemas como sistemas diagnóstico <i>in vitro</i>	57
Capítulo 6.- Resultados y discusión	58
6.1 Síntesis y caracterización de NPMs	58
6.2 Síntesis y caracterización de sistemas coloidales poliméricos e híbridos	63
6.3 Evaluación de los sistemas como sistemas terapéuticos <i>in vitro</i>	70
6.4 Evaluación de los sistemas como sistemas diagnóstico <i>in vitro</i>	78
Capítulo 7.- Conclusiones	80
Capítulo 8.- Perspectivas	81
Capítulo 9.- Referencias y bibliografía	81
Anexo I. Índice de esquemas, figuras y tablas	87

Glosario de abreviaturas

AIC	Criterio de Akaike
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CB	Microesferas poliméricas
CME	Concentración mínima efectiva
CMT	Concentración mínima tóxica
DLS	Dispersión dinámica de luz
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)
dTMP	Monofosfato de deoxitimida
dUMP	Monofosfato de deoxiuridina
ENT	Enfermedades no transmisibles
ICP-Masas	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
MB	Microburbujas magnéticas
MGS	Escala media de grises
MRI	Resonancia magnética de imagen
MSC	Criterio de selección del modelo
NPMs	Nanopartículas magnéticas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Microburbujas poliméricas
PLA	Ácido poli (D-láctico)
PVA	Alcohol polivinílico
PVH	Virus del Papiloma Humano
RCF	Fuerza centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
Rsqr	Coefficiente de correlación
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SSR	Suma de cuadrados
TC	Tomografía computarizada
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEP	Tomografía por emisión de positrones
USAII	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria
UV	Ultravioleta
XRD	Difracción de rayos X de polvos

RESUMEN

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Debido a que se conoce la relación entre el mejoramiento de la calidad y esperanza de vida de pacientes con neoplasias y las intervenciones en detección y tratamiento temprano, es posible reducir y controlar el desarrollo de cáncer aplicando estrategias de base científica destinadas a la prevención de la enfermedad. Una de estas estrategias es el desarrollo de sistemas que permitan la detección y tratamiento de neoplasias de manera simultánea (sistemas teragnósticos), por lo que en los últimos años se han llevado a cabo diversas investigaciones para el desarrollo de nuevos sistemas.

Esta investigación buscó el desarrollo del sistema teragnóstico basado en microburbujas magnéticas, para ello se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas magnéticas por el método de coprecipitación y su caracterización de tamaño de partícula mediante las técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS), su estabilidad mediante la medición potencial Z, y su morfología mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) Así como la síntesis de sistemas teragnósticos basados en microburbujas magnéticas mediante el método de doble emulsión y su caracterización de tamaño de partícula mediante dispersión dinámica de luz (DLS), la cuantificación de nanopartículas magnéticas mediante análisis elemental, su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Además de realizarse la determinación su capacidad de diagnóstico mediante el análisis de eficiencia ecográfica usando la comparación de contraste en escalas de grises (MGS), determinando la proporción de esta respuesta en función de la cantidad de magnetita dispersa en el polímero, así como la determinación de la eficiencia como sistema de liberación farmacéutico mediante su capacidad de adsorción superficial de un fármaco quimioterapéutico en la pared de los sistemas y su desorción *in vitro* simulando condiciones fisiológicas.

Las distintas pruebas de caracterización se realizaron con la finalidad de obtener evidencia de la obtención de un sistema teragnóstico basado en microburbujas capaz de aumentar la respuesta acústica y la liberación modificada de metotrexato como agente antineoplásico,

demostrando la obtención de un sistema capaz de mejorar la detección de neoplasias mediante ultrasonido, así como la liberación de metotrexato durante 36 horas.

Para llevar a cabo la síntesis se requirió la fabricación previa de nanopartículas de magnetita con ácido oleico quimisorbido en la superficie como recubrimiento; su fabricación fue mediante el método de coprecipitación. Las nanopartículas hidrofóbicas de magnetita tuvieron un tamaño de 16.05 ± 4.05 nm, y un potencial Z de 23.6 ± 3.26 mV, se demostró además la quimisorción del ácido oleico como carboxilato en la superficie por medio de su dispersabilidad en diclorometano y la evaluación de su espectro de infrarrojo por reflectancia. Además, se obtuvieron los difractogramas de rayos X para determinar si las nanopartículas generadas correspondían a la estructura característica de la magnetita.

Se generaron tres sistemas para ser comparados compuestos por microesferas poliméricas (CB), microburbujas poliméricas (PB) y microburbujas magnéticas por medio del método de doble emulsión utilizando ácido poliláctico y alcohol polivinílico. Para llevar a cabo la disminución en la dispersión del tamaño de partícula se realizó la separación mediante centrifugación diferencial de los sistemas. Una vez se obtuvieron las fracciones de la centrifugación se determinó que estos sistemas tuvieron un tamaño de partículas para las microesferas poliméricas de 9.7 ± 0.119 μ m, para las microburbujas poliméricas de 10.4 ± 0.118 μ m y para las microburbujas magnéticas de 11.4 ± 0.299 μ m y una densidad que sigue el siguiente orden:

Microesferas poliméricas > Microburbujas magnéticas > Microburbujas poliméricas.

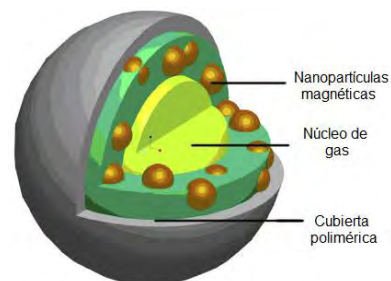
Finalmente, se produjeron sistemas teragnósticos a partir de los sistemas coloidales poliméricos e híbridos generados utilizando la adsorción isortérmica de metotrexato en agua para llevar a cabo la carga de fármaco y la correspondiente evaluación de la liberación de metotrexato a partir de los sistemas imitando condiciones fisiológicas. Para llevar a cabo la evaluación de la mejora en la capacidad de diagnóstico mediante ultrasonido los sistemas fueron inyectados en un medio de referencia que contenía un espécimen de fruto de *Vitis vinifera* y se comparó el aumento en la escala media de grises producida en respuesta a una señal de ultrasonido en modo B a 13 MHz.

INTRODUCCIÓN

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis.¹ Entre los diversos tipos de tratamiento para el cáncer, la quimioterapia es uno de los más utilizados; uno de los agentes quimioterapéuticos de mayor uso es el metotrexato. El metotrexato es un fármaco antineoplásico que toma el lugar de una purina o piridina en la síntesis de DNA durante la fase "S" de la proliferación celular, evitando el desarrollo y proliferación de células.²

Así mismo, la necesidad de modificar la duración o efectividad de los tratamientos ha llevado al desarrollo de sistemas acarreadores de fármacos que permitan la detección de neoplasias. Entre los acarreadores utilizados en diversas terapias contra el cáncer encontramos a las nanopartículas de óxido de hierro, las cuales poseen una superficie fácilmente funcionalizable, así como propiedades superparamagnéticas que permiten su uso como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (MRI), en el tratamiento por hipertermia, como agentes acarreadores y como agentes teragnósticos. Sin embargo, existen pocos productos en el mercado que aprovechen estas características.

Las microburbujas también han sido ocupadas en la práctica clínica, debido a su capacidad de aumento en la resolución en la técnica de imagen por ultrasonido (US) de distintos tejidos en, esta característica ha permitido llevar a cabo mejores estudios de detección y caracterización de tejidos cancerígenos, procesos inflamatorios, y patologías cardiovasculares. Las cubiertas de los agentes de contraste ultrasónicos pueden ser utilizadas no sólo para el transporte de gases o aire, sino que también pueden transportar fármacos en el cuerpo. Así mismo es posible embeber nanopartículas magnéticas en la cubierta de las microburbujas aumentando la susceptibilidad magnética permitiendo su detección por medio de la ultrasonografía, y la posibilidad de llevar a cabo la confirmación de resultados obtenidos mediante la técnica de resonancia magnética de imagen.³



Esquema 1. Modelo de una microburbuja magnética.³

1. ANTECEDENTES

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial, el 63% de las muertes anuales son causadas por enfermedades no transmisibles (ENT) que generalmente son crónicas, es decir, son de larga duración y progresan lentamente. Los cuatro tipos principales de ENT son: las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades respiratorias crónicas, la diabetes y el cáncer, que juntas causan aproximadamente 38 millones de defunciones al año, de las cuales, 75% se concentran en países de bajos y medianos ingresos. Estas enfermedades, además del impacto físico que suponen, tienen consecuencias socioeconómicas, principalmente en comunidades desfavorecidas socialmente en donde el acceso a servicios de salud es limitado, generando con ello un incremento en el gasto público necesario para hacer frente a los costos de la enfermedad y su duración.^{1,4}

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. La característica principal del cáncer es la proliferación acelerada de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir a diversos tejidos, en un proceso conocido como metástasis, siendo esto la principal causa de muerte por esta enfermedad. El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 se reportó un aproximado de 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer; y se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones a 22 millones en las próximas dos décadas.¹ Con el fin de responder a este fenómeno, durante las últimas décadas se han desarrollado diversos tratamientos mediante formas farmacéuticas convencionales que liberan el principio activo antineoplásico inmediatamente después de la administración. Sin embargo, después de darse la absorción del principio activo, las concentraciones plasmáticas comienzan a disminuir, hasta alcanzar concentraciones de ineficacia terapéutica, además de una distribución no específica que lleva a efectos adversos severos para la mayor parte de los agentes antineoplásicos. Para optimizar la duración del efecto terapéutico se han realizado diversos avances en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación. Estos sistemas son capaces de regular la cantidad de fármaco liberada, manteniendo la duración de acción terapéutica, y/o haciendo específico el tejido o sitio de liberación.⁵ Además de poder ser acoplados a sistemas diagnóstico en plataformas denominadas teragnósticos.⁶

1.1. Biología del cáncer

1.1.1. Expresión genética

La expresión de genes es el proceso en que se traduce la información especificada en las secuencias de DNA de un organismo en productos funcionales, tales como las proteínas o el RNA no codificante. En las células eucariotas, sólo una fracción de los genes del material genético es expresada en un momento dado, la variedad de perfiles genético de expresión está determinada por factores reguladores de la transcripción.⁷ La regulación de la expresión de genes ocurre por tres vías principales: genética (donde hay una interacción directa con el DNA), modulación (involucra a la interacción con la maquinaria de transcripción) y epigenética (involucra cambios no secuenciales en el DNA).⁸ En las células cancerígenas existe la desregulación de genes que produce una transformación maligna acompañada de la disrupción de información genética y la expresión de múltiples genes. Estos cambios aumentan la capacidad de supervivencia de las células malignas y alteran su capacidad de proliferación, llevando a la formación de tumores.⁷⁻⁹

1.1.2. Microambiente tumoral

El entorno en que se desarrolla un tumor carece de las condiciones normales reconocidas por la anatomía y fisiología. La proliferación celular y la secreción de factores angiogénicos contribuyen a la generación de tejido con poca o nula organización, altamente vascularizado y con una tasa de productos de eliminación extravascular exacerbada, pues la cantidad de factores angiogénicos en el entorno tumoral produce capilares desordenados, discontinuos y altamente fenestrados. El grado de penetración al endotelio del tejido y la permeabilidad vascular dependen del tipo de cáncer y de la etapa en que éste se encuentre.¹⁰ El ambiente extratumoral se encuentra congestionado con fibras de colágeno y glucosaminoglicanos en una distribución no homogénea de solutos, debido a esto el flujo intersticial se ve disminuido para la población celular, aumentando la presión osmótica del intersticio y la tasa de fármaco excretada al parénquima, dificultando la dosificación de fármacos antineoplásicos.^{4,10} Durante la metástasis, células malignas se desprenden de la masa primaria del tumor e invaden tejidos circundantes. Una vez que viajan a través del cuerpo las células son retenidas en otros tejidos por medio de adherencia microvascular o subendotelial con la membrana basal de las células del tejido invadido, lo que produce la proliferación de nuevos tumores en nuevos tejidos. Por ello, la mayor parte de las muertes provocadas por cáncer son debidas al crecimiento de tumores que conducen a metástasis.

1.1.3. Etiología

A pesar de que los mecanismos de proliferación de células cancerígenas se encuentran regulados por la traducción de material genético, existen factores ambientales, hábitos de comportamiento y socioeconómicos que se han visto correlacionados con este padecimiento, aumentando el número de casos y la intensidad de la proliferación celular de manera proporcional a la exposición de los mismos.⁹ Entre estos factores podemos encontrar:

- **Tabaquismo:** Asociado al cáncer de pulmón, lengua, y vías respiratorias superiores, así como al cáncer de páncreas, estómago, riñones y la leucemia mieloide aguda.
- **Consumo de alcohol:** Asociado al cáncer de laringe, faringe, esófago, colorrectal, estomacal, de páncreas, de hígado y de riñón, así como al cáncer de pulmón, de próstata, cáncer linfático y hematopoyético.
- **Dieta, obesidad y actividad física:** El exceso de grasa corporal se ha asociado a la formación de cáncer de esófago, páncreas, endometrio, y riñón, así como al cáncer de mama postmenopáusico. La actividad física contribuye al control de peso, además de disminuir la probabilidad de desarrollar cáncer de mama y cáncer colorrectal.¹¹
- **Factores ocupacionales:** La exposición a diversas sustancias durante el ejercicio de la práctica profesional ha demostrado tener efectos promotores en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, mediante la correlación entre la incidencia de aparición de algunos tipos de cáncer, la rapidez de crecimiento de tumores, y la exposición a estos agentes. La exposición a sustancias ampliamente reconocidas como carcinógenos, así como circunstancias de riesgo en el trabajo han demostrado ser algunos los factores de mayor influencia en dicho fenómeno. A la fecha, han sido demostrados los efectos carcinogénicos de 32 agentes ocupacionales, así como 11 circunstancias ambientales; además de 27 agentes y 6 circunstancias ambientales como probables carcinógenos. Algunos ejemplos son la exposición a vapores ácidos en la industria petroquímica y el cáncer de laringe, la exposición a compuestos de Cromo (VI) en la industria de recubrimientos anticorrosivos y el cáncer de pulmón, o la exposición a solventes como el tricloruro de etileno en el lavado en seco y el cáncer de riñón.¹²
- **Infecciones:** Virus, bacterias y macroparásitos han demostrado ser factores de riesgo para distintos tipos de cáncer. Algunos ejemplos de estos agentes infecciosos son los presentados en la tabla 1:

Tabla 1. Principales agentes infecciosos carcinogénicos según su tejido afectado.

Tejido canceroso	Agente carcinogénico demostrado
Estómago	<i>Helicobacter pylori</i>
Hígado	Virus de Hepatitis B Virus de Hepatitis C <i>Opisthorchis viverrini</i> <i>Clonorchis sinensis</i>
Cervix	Virus del papiloma humano
Anogenital	Virus del papiloma humano
Nasofaríngeo	Virus Epstein-Barr
Orofaringeo	Virus del papiloma humano
Linfoma No-Hodgkins	<i>Helicobacter pylori</i> Virus Epstein-Barr Virus de Hepatitis C Virus tipo 1 de Células T linfotrópicas
Sarcoma de Kaposi	Herpesvirus del sarcoma de Kaposi
Linfoma de Hodgkin	Virus de Epstein-Barr
Vejiga	<i>Schistosoma haematobium</i>

- Factores hormonales reproductivos y de crecimiento: Asociados a cáncer de mama, endometrio y de ovario. Las células de estos tejidos modulan la proliferación celular mediante el reconocimiento de factores hormonales, sin embargo, una modificación genética permite la proliferación desmedida llevando a la generación de tumores.
- Radiaciones (ionizantes, ultravioletas y electromagnéticas): Se ha demostrado que los distintos tipos de radiación provocan alteraciones en la estructura del DNA celular según la intensidad y el tiempo de exposición a dicha radiación. Ejemplos de ello se encuentran en individuos sobrevivientes de los incidentes de Chernóbil e Hiroshima, con muy alta incidencia de distintos tipos de cáncer (esófago, estómago, colon, pulmón, mama, vejiga, sistema nervioso), así como en técnicos de Rayos X y Rayos gama. Individuos con una alta exposición a luz UV han demostrado ser más propensos a la formación de melanoma.^{13,14}
- Calidad de agua, suelo y aire¹⁵: Distintos contaminantes han demostrado poseer actividad carcinogénica. Algunos ejemplos de estos contaminantes son los presenta en la tabla 2:

Tabla 2. Principales agentes contaminantes carcinogénicos según su tejido afectado.

Agente carcinogénico	Tejido afectado / Tipo de cáncer	Medio de exposición
Arsénico y compuestos que contienen arsénico	Pulmón, piel y vejiga	Agua
Asbesto	Laringe, pulmón, mesotelioma, ovario	Atmósfera
Benceno	Leucemia no linfocítica aguda	Atmósfera (Emisiones de motores)
1,3 Butadieno	Leucemia, linfoma	Atmósfera
Compuestos de Cromo IV	Pulmón	Agua, suelos
Emisiones de motores Diesel	Pulmón	Atmósfera (Emisiones de motores)
Erionita	Mesotelioma	Atmósfera (Regiones particulares)
Óxido de etileno	Mama, tumores linfoides	Atmósfera (Interiores)
Formaldehido	Nasofaríngeo, leucemia	Atmósfera (Interiores, Exteriores)
Combustión de carbono en interiores	Pulmón	Atmósfera (Interiores)
Contaminación de aire en exteriores	Pulmón	Atmósfera
Contenido de partículas en el aire	Pulmón	Atmósfera
Bifenilos policlorados	Piel	Alimentos, atmósfera (Interiores)
Radiación y productos de decaimiento	Pulmón	Atmósfera (Interiores)
Polvo de sílica cristalina	Pulmón	Atmósfera
2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-para-dioxina (TCDD)	Todo tipo de cáncer	Alimentos, suelos
Humo de tabaco	Pulmón	Atmósfera (Interiores)
Tricloroetileno	Riñón	Agua, alimentos

- Exposición a fármacos: Algunos fármacos han demostrado poseer potencial para inducir modificaciones genotóxicas que inicial o promueven el desarrollo de diversos tipos de cáncer; entre ellos encontramos algunos agentes antineoplásicos (bisulfano, clorambucil, ciclofosfamida, melfalan, semustina, tiotepa, y treosufan, entre otros) que muestran actividad genotóxica ligada a su mecanismo de acción mediante la alquilación de purinas en las bases del DNA. Además de los agentes antineoplásicos encontramos diversos inmunosupresores, agentes hormonales y la fenacetina como agentes carcinogénicos.¹⁶
- Sustancias carcinogénicas naturales: Se consideran productos naturales a sustancias sintetizadas por bacterias, plantas, hongos, y líquenes, los seres humanos se ven primordialmente expuestos a estos compuestos bioactivos a través de los alimentos y el agua; sin embargo, se ha determinado que algunas de estas sustancias poseen potencial carcinogénico. Entre los compuestos bioactivos carcinogénicos existen antibióticos, agentes quimioterapéuticos, crocistinas, micotoxinas, y algunos productos del metabolismo de plantas y líquenes.⁹

1.1.4. Desarrollo clínico

Siendo un proceso que ocurre sólo cuando se han acumulado diversas mutaciones genéticas, el cáncer requiere de largos periodos de tiempo para desarrollarse. Usualmente, existe un periodo de latencia entre la exposición a un agente carcinogénico o un evento de mutación celular y la aparición de células cancerígenas; por lo que al incrementar la edad de una persona se aumenta la probabilidad de desarrollo de la mayoría de los tipos de cáncer. El cáncer se desarrolla en tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión; sin embargo, si la proliferación celular en un tejido cancerígeno se expande a otros, se produce una cuarta etapa denominada metástasis.¹⁷

1.1.4.1. Iniciación

En la mayor parte de los casos, la activación de oncogenes y/o desactivación de algunos genes supresores llevan a un aumento descontrolado en la rapidez del ciclo celular y la inactivación de los mecanismos apoptóticos. Estos cambios pueden darse al azar o ser propiciados por la exposición a agentes carcinogénicos, como virus, algunas sustancias químicas o algunas clases de radiación. Solamente en algunas ocasiones las mutaciones azarosas son las responsables de llevar a ese resultado.¹⁷

1.1.4.2. Promoción

Una vez que se he llevado a cabo una primera exposición es necesaria la exposición a ciertas sustancias que aumentan el daño al material genético, y se denominan promotores, como los mencionados en la etiología del cáncer. La acción de los promotores es reversible en una etapa inicial, sin embargo, exposiciones posteriores aumentan la probabilidad de modificaciones al material genético.¹⁷

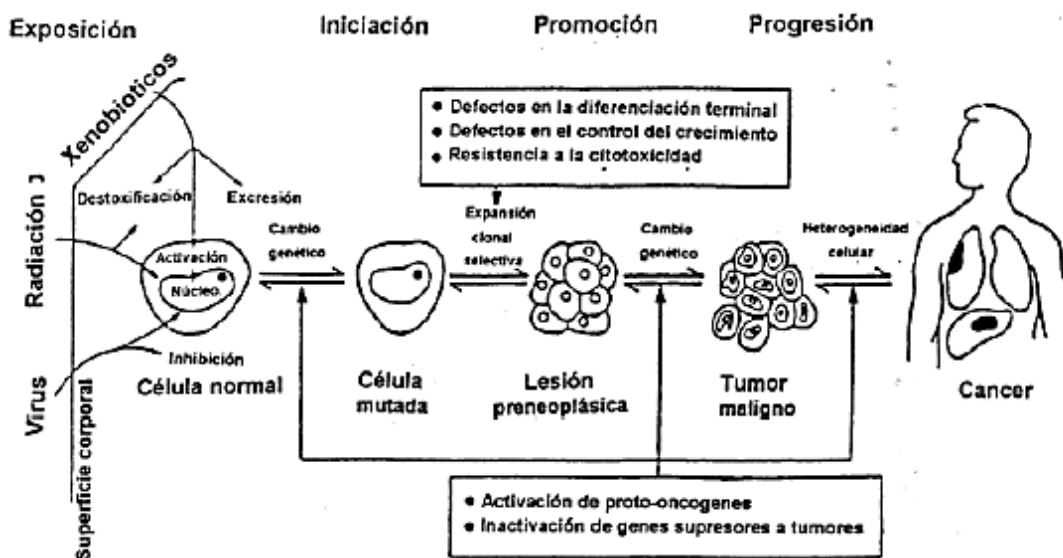
1.1.4.3. Progresión

Durante la progresión, ocurren una serie de cambios en el material genético de la célula normal lo que se ve reflejado en su comportamiento, crecimiento y función lo que obtiene como resultado una célula cancerígena. En la célula cancerígena hay un aumento en la rapidez de crecimiento y división celular. Una célula sana puede tomar de 2 a 6 meses para dividirse mientras que una célula cancerígena puede realizarlo en un tiempo de 1 a 4 semanas, aunque puede variar con respecto al tipo de célula y la agresividad del cáncer.¹⁷

1.1.4.4. Metástasis

Una vez establecido el cáncer en un tejido, si estas células continúan dividiéndose pueden lograr invadir tejidos cercanos, inclusive llegando entrar al tracto sanguíneo o el sistema linfático. Si la célula cancerígena escapa al sistema de detección del sistema inmune puede ser diseminada a través del cuerpo. Este proceso se conoce como metástasis.¹⁷

El siguiente esquema resume las fases del desarrollo clínico del cáncer:



Esquema 2. Cambios en una célula normal que se ha convertido a neoplásica¹⁷

1.2. Aspectos generales del cáncer

1.2.1. Epidemiología

El cáncer es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo con alrededor de 14 millones de casos nuevos, y 8 millones de muertes durante el año pasado, afectando a la población de todos los países y de todas las regiones. Esto se representa en las siguientes figuras (figura 1, y 2)



Figura 1. Distribución de la incidencia de cáncer en hombres durante el año 2012.⁹

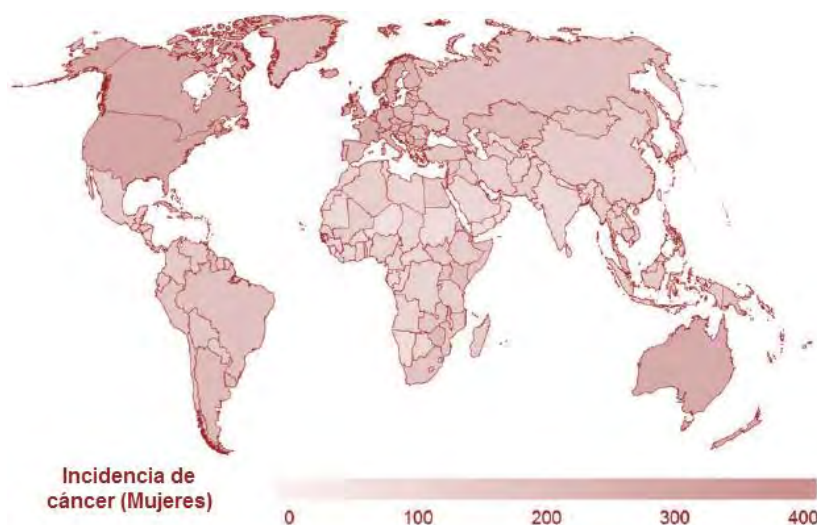


Figura 2. Distribución de la incidencia de cáncer en mujeres durante el año 2012.⁹

1.2.1.1. Cáncer en México

En México se registran 160 mil nuevos casos de cáncer cada año, 80 mil fallecimientos y cerca de 70 por ciento se diagnostican en etapas avanzadas de la enfermedad, lo que complica el tratamiento e impacta en la supervivencia de los afectados. ¹⁸

Durante 2013, la morbilidad hospitalaria por tumores malignos (población que egresa de un hospital por dicha enfermedad) más alta tanto en mujeres como en hombres menores de 20 años, es por cáncer de órganos hematopoyéticos. Los tratamientos contra el cáncer en la infancia y adolescencia tienden a ser exitosos; los niños más pequeños generalmente tienen mejores expectativas de sobrevivencia a la enfermedad lo que posiblemente se debe al oportuno diagnóstico y tratamiento. La vigilancia continua de los pacientes permite monitorear su desarrollo logrando una mayor posibilidad de atención rápida ante algún signo de alarma.¹⁹

En este fenómeno radica la importancia de los programas de atención pública en salud para llevar a cabo la adecuada medición de la morbilidad y mortalidad, tanto para la población total como para su evaluación por sexo y edad, estos datos deben ser analizados continuamente para poder llevar a cabo la generación de nuevos programas de atención pública, y la generación de mejores sistemas tecnológicos para llevar a cabo su detección y tratamiento.

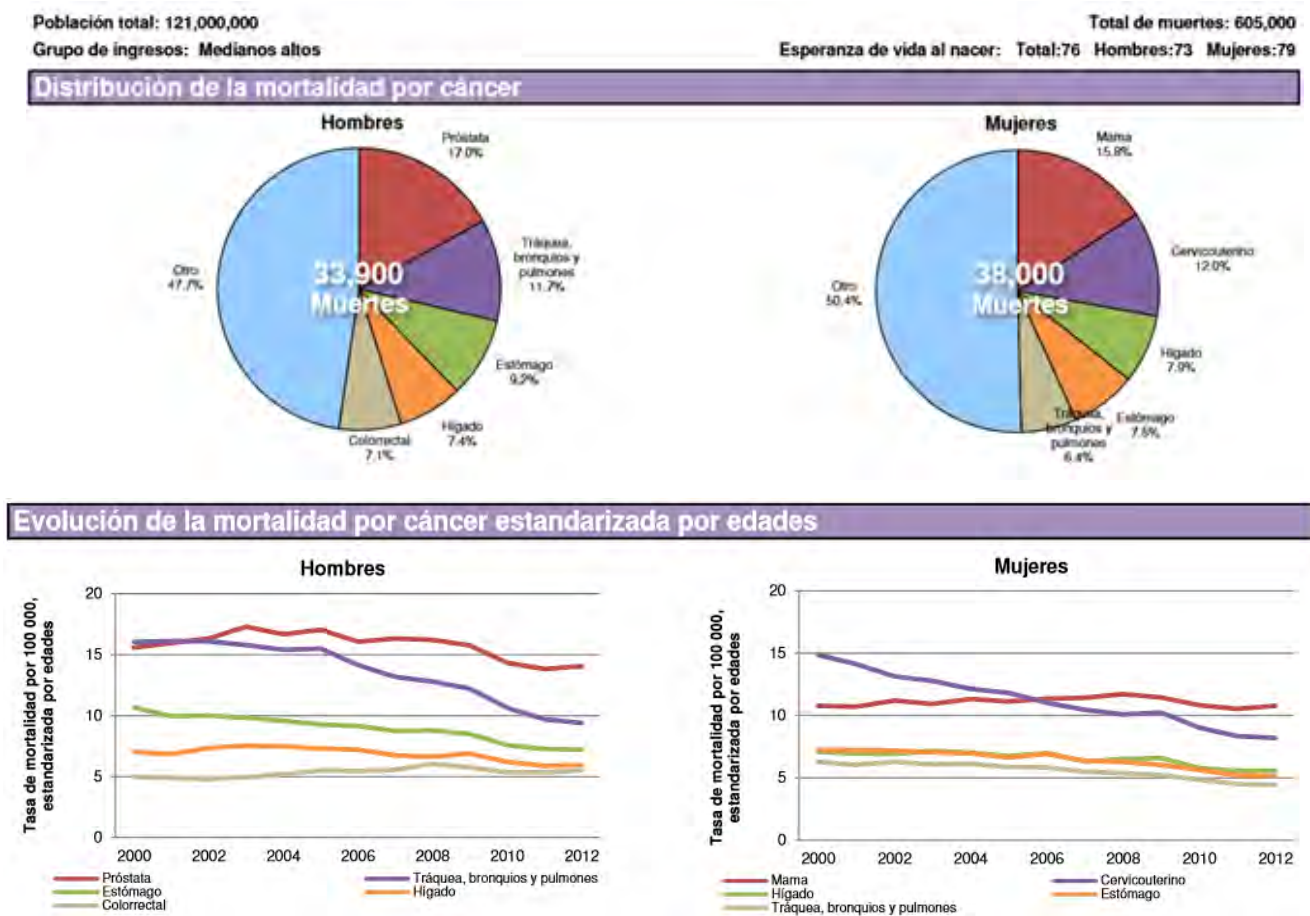


Figura 3. Perfil oncológico de México para el año 2014 realizado por la OMS.¹

Tabla 3. Principales causas de mortalidad en los Estados Unidos Mexicanos para el año 2014. (INEGI, 2014)

Orden de Importancia	Causas	Defunciones	Porcentaje
	Total	633,641	100
1	Enfermedades del corazón	121,427	19.16
	Enfermedades isquémicas del corazón	82,334	12.99
2	Diabetes mellitus	94,029	14.84
3	Tumores malignos	77,091	12.17
4	Accidentes	35,815	5.65
	De tráfico de vehículos de motor	15,882	2.51
5	Enfermedades del hígado	34,444	5.44
	Enfermedad alcohólica del hígado	11,411	1.8
6	Enfermedades cerebrovasculares	33,166	5.23
7	Influenza y neumonía	20,550	3.24
8	Agresiones	20,010	3.16
9	Enf. pulmonares obstructivas crónicas	19,715	3.11
10	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	13,089	2.07
	Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el período perinatal	5,800	0.92
11	Insuficiencia renal	12,788	2.02
12	Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	9,569	1.51
13	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	7,300	1.15
14	Lesiones auto infligidas intencionalmente	6,337	1
15	Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	5,060	0.8
16	Enfermedad por VIH	4,811	0.76
17	Septicemia	3,805	0.6
18	Anemias	3,640	0.57
19	Enfermedades infecciosas intestinales	3,449	0.54
20	Síndrome de dependencia del alcohol	3,361	0.53
	Subtotal	529,456	83.56
	Síntomas, signos y hallazgos anormales clínicos, no clasificados en otra parte	10,583	1.67
	Otras causas	93,602	14.77

1.2.2. Diagnóstico

La esperanza y calidad de vida de los pacientes con cáncer se ve disminuida de manera proporcional al retraso del inicio del tratamiento, por ello las políticas públicas de la OMS han sido dirigidas a la detección temprana del cáncer. Las actividades de detección temprana tienen dos componentes:

- El diagnóstico temprano: El conocimiento de los síntomas y signos iniciales (en el caso de neoplasias como los de la piel, mama, colon y recto, cuello uterino o boca) es fundamental para que se puedan diagnosticar y tratar precozmente. El diagnóstico temprano es especialmente importante cuando no hay métodos de cribado eficaces o, como ocurre en muchos entornos con escasos recursos, o no se aplican intervenciones de cribado y tratamiento. En ausencia de intervenciones de detección temprana o de cribado y tratamiento, los pacientes son diagnosticados en estadios muy tardíos, cuando ya no son posibles los tratamientos curativos.²⁰
- El cribado: El cribado tiene por objeto descubrir a los pacientes que presentan anomalías indicativas de un cáncer determinado o de una lesión precancerosa y así poder diagnosticarlos y tratarlos prontamente. Los programas de cribado son especialmente eficaces en relación con tipos de cáncer frecuentes para los cuales existe una prueba de detección costo-eficaz, asequible, aceptable y accesible a la mayoría de la población en riesgo.²¹

Algunos ejemplos de cribado son:

- Inspección visual con ácido acético para el cáncer cervicouterino en entornos con pocos recursos.
- Pruebas de detección de PVH en el caso del cáncer cervicouterino.
- Frotis de Papanicolaou para el cáncer cervicouterino en entornos con ingresos medios y altos.
- Mamografía para el cáncer de mama en entornos con ingresos altos.

1.2.3. Métodos de diagnóstico

1.2.3.1. Pruebas clínicas

Las concentraciones altas o bajas de ciertas sustancias en su cuerpo pueden ser un signo de cáncer. Por lo que los análisis de sangre, de orina, o de otros fluidos del cuerpo en el laboratorio para medir esas sustancias pueden ayudar a los doctores a determinar un

diagnóstico. Sin embargo, aun cuando los análisis de laboratorio son una herramienta útil en el diagnóstico, estos métodos no son concluyentes en la determinación de neoplasias.

1.2.3.2. Biopsia

Una biopsia es un procedimiento en el que se extrae una muestra de tejido. Luego, un patólogo examina el tejido al microscopio para ver si hay células cancerosas. La muestra puede obtenerse de varias maneras:

- Con una aguja: Mediante una aguja para extraer tejido o fluido.
- Con un endoscopio: Se observan los tejidos del cuerpo mediante un tubo delgado y luminoso llamado endoscopio. El endoscopio se inserta por un orificio natural, como lo es la boca. Luego, el médico usa un instrumento especial para extraer tejido o células por el tubo.
- Con cirugía: La cirugía puede ser de escisión o de incisión.
 - En la biopsia de escisión, el cirujano extrae todo el tumor. Con frecuencia, se extrae también tejido sano que rodea al tumor.
 - En la cirugía de incisión, el cirujano extrae solo una parte del tumor.

1.2.3.3. Imagenología

Para las ciencias de la salud el concepto de la imagenología, el uso de un equipo para capturar imágenes de utilidad médica, es una de las piedras angulares del desarrollo tecnológico. Sus orígenes pueden ser encontrados en la fotografía del siglo XIX con el descubrimiento de W. C. Röntgen, en 1895, de que los rayos X podían producir una imagen del esqueleto de un ser humano viviente, descubrimiento por el cual, en 1901, se le otorgaron el primer premio nobel en física. Desde entonces, los avances en los campos de física y química han sido utilizados para desarrollar un mayor número de técnicas que permitan obtener información del ser humano. Algunos de estas como la resonancia magnética (MRI) o la tomografía computarizada de rayos X (CT), han llevado a la obtención de premios nobel, así como su reconocimiento como algunos de los avances médicos más importantes del siglo XX. Estas técnicas increíblemente complejas y altamente costosas han sido herramientas esenciales para la obtención de imágenes en 3D utilizadas en el diagnóstico y seguimiento de diversos padecimientos, incluyendo el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, las técnicas tradicionales tales como los rayos X siguen siendo de rutina debido a la gran cantidad de información que se puede obtener y al bajo

costo que representa su realización. Aún en países desarrollados, gran parte de los habitantes continúan obteniendo imágenes del feto en desarrollo mediante el ultrasonido, por las ventajas de baja invasividad, alta resolución y bajo costo del mismo.

El requerimiento fundamental para considerar útil la tecnología de obtención de imágenes médicas es el contraste. Es necesario hacer uso de un principio físico que permita obtener señales distintas de cada estructura. Por ejemplo, los rayos X se ven más absorbidos por núcleos de mayor número atómico que por aquellos de número atómico disminuido, por lo que el hueso (que contiene Calcio y Fósforo en hidroxapatita) tiene una señal más alta que aquella producida por el cerebro (esencialmente compuesto por agua), y a su vez una señal más alta que aquella de los pulmones llenos de aire. El contraste observado en la imagenología puede ser clasificado según su fuente en endógeno y exógeno. En los factores que proveen de contraste endógeno se encuentra la diferencia en la señal obtenida por hueso y tejidos blandos en los rayos X, o la diferencia en la señal obtenida por la materia gris y la materia blanca del cerebro por medio de la MRI (debido a las diferencias en la relajación magnética de los protones del agua en ambos tejidos cerebrales).²² Para mejorar el contraste obtenido por las técnicas de imagenología se pueden utilizar sustancias que aumenten la respuesta analizada, estos se denominan medios de contraste, algunos ejemplos son las soluciones de complejos de galodinio en RMI y las microburbujas en ultrasonido. Estos temas se ampliarán en los puntos 1.5 y 1.6.

1.2.3.4. Imagenología en el cáncer

Las imágenes de los órganos internos son muy importantes para llevar a cabo una detección temprana de neoplasias, así como para poder llevar a cabo el seguimiento del progreso de la enfermedad durante el tratamiento. La imagenología ha experimentado un gran progreso tecnológico en años recientes, posibilitando exámenes más avanzados y detallados de la anatomía y fisiología de diversos tejidos. Además de las técnicas tales como la tomografía computarizada (TC), las imágenes de resonancia magnética (IRM) y la tomografía por emisión de positrones (TEP) (las cuales requieren grandes y costosos equipos), existe una sustancial necesidad para métodos fácilmente disponibles y de bajo costo, tales como la ultrasonografía. Sin embargo, en ocasiones la fisiología y anatomía de los tejidos no permiten obtener la resolución adecuada de las estructuras estudiadas, por lo que se han desarrollado diversos medios de contraste que permiten mejorar la calidad del análisis que permitan una elucidación confiable para el personal médico y para los pacientes.^{6,23,24}

1.2.4. Tratamiento

Existen diferentes tratamientos que han sido desarrollados para combatir el cáncer, y estos dependen del tipo de padecimiento y el avance del mismo. La mayor parte de los casos son tratados con una combinación de tratamientos entre los que destacan la cirugía, aunada a quimioterapia o radioterapia. También se han logrado avances importantes en la inmunoterapia, la terapia dirigida, o la terapia hormonal. Sin embargo, gracias al aumento en la tasa de supervivencia de los pacientes se ha observado una serie de efectos adversos causados por los tratamientos, ya que gran parte de los tratamientos utilizados atacan tanto a las células cancerígenas como a las células sanas, es por ello que muchas terapias se realizan en forma conjunta, disminuyendo las dosis o facilitando procedimientos quirúrgicos.

1.2.4.1. Intervención quirúrgica

En diversas situaciones es necesario realizar la extracción quirúrgica de un tumor para evitar su crecimiento y diseminación a través del cuerpo, para ello los cirujanos realizan diversos procedimientos que retiran tejido canceroso, así como tejido sano, para asegurar que las células con alta proliferación celular sean retiradas y no se produzcan más tumores provenientes de las células cancerígenas restantes.

1.2.4.2. Radioterapia

La radioterapia es una técnica que emplea altas dosis de radiación para producir la muerte de células cancerígenas y para disminuir el tamaño de tumores. La radioterapia se clasifica de acuerdo a la fuente de radiación en:

- Radioterapia de haz externo: Una máquina apunta y dirige la radiación ionizante al centro afectado, de esta manera el tratamiento se da en una región específica del cuerpo invadida por células neoplásicas.
- Radioterapia interna (Braquiterapia): Esta técnica involucra la introducción de elementos radioactivos en el sitio de acción, en esta modalidad la radiación solo se desplaza a una corta distancia de manera que hay menos riesgo de daño a los tejidos normales adyacentes.

Sin embargo, la radioterapia presenta una gran cantidad de efectos adversos para el paciente, por lo que procura ser administrada a bajas dosis, junto con quimioterapia o antes de una cirugía para disminuir estas inconveniencias.

1.2.4.3. Inmunoterapia

La inmunoterapia promueve la acción del sistema inmunológico del paciente para atacar células cancerígenas por medio de las siguientes metodologías:

- Anticuerpos monoclonales: Se unen de manera específica a componentes de las células cancerígenas “marcando” las células para provocar el reconocimiento por las células del sistema inmune. Las células del sistema inmune serán las encargadas de llevar a cabo su reconocimiento y eliminación.
- Transferencia de células T adoptivas: Se aíslan células T del tumor, una vez que se han aislado aquellas que poseen una actividad con mayor eficacia en la destrucción de células cancerígenas pueden ser modificadas genéticamente para mejorar el reconocimiento de las células diana.
- Citocinas: Son proteínas endógenas que modulan la respuesta del sistema inmune, las más ampliamente utilizadas son los interferones y las interleucinas.
- Vacunas: Exponen a las células del sistema inmune a componentes de células cancerígenas, células cancerígenas atenuadas o células cancerígenas inactivas para preparar una respuesta más eficaz contra estas células no solo con respecto a células cancerígenas existentes sino las que se produzcan posteriormente.
- Exposición a BCG (Bacillus Calmette-Guérin): Una forma atenuada de este bacilo es utilizado en el tratamiento del cáncer de vejiga ocasionando un aumento de la respuesta inmunogénica contra células cancerígenas de este tejido.²⁵

1.2.4.4. Terapia hormonal

La terapia hormonal ha sido utilizada en el tratamiento de distintas clases de cáncer, y para disminuir los efectos nocivos de los mismos. La terapia hormonal disminuye la cantidad de hormona que puede ser producida por el organismo o interferir en cómo algunas se comportan en el mismo.

Un ejemplo es la manipulación endócrina del cáncer de mama, que busca disminuir el crecimiento de células mediado por factores transcripcionales, activados por un complejo ligando-receptor, beneficiando a pacientes con células cancerígenas receptor positivo de estrógeno o de progesterona. Por su parte el cáncer de próstata ve disminuido su avance mediante la deprivación andrógena en alrededor de un 70-80% de los casos.²⁶

1.2.4.5. Terapia vectorizada

La terapia vectorizada utiliza moléculas que bloquean el crecimiento o división de células cancerígenas interfiriendo con moléculas específicas denominadas “moléculas diana”, las cuales están involucradas en el crecimiento, progresión o diseminación del cáncer. La terapia vectorizada difiere de la quimioterapia en su modo de acción por las siguientes características:

- Idealmente, las moléculas diana son macromoléculas cruciales en el proceso de división maligna que no se expresen significativamente en células normales.
- Por lo general actúan de manera citostática (evitan la proliferación celular) mientras que la mayor parte de agentes quimioterapéuticos son citotóxicos (provocan muerte celular).²⁷

1.2.4.6. Quimioterapia

La quimioterapia es un tipo de tratamiento que utiliza fármacos para matar células cancerígenas; estos fármacos detienen o desaceleran el crecimiento de las células cancerígenas, por lo que la terapia puede ser utilizada para tratar el cáncer directamente o para disminuir su tamaño, permitiendo llevar a cabo cirugías de menor riesgo o disminuyendo sus efectos nocivos. Estas características han sido acopladas a otros tratamientos por lo que la terapia ha mejorado la esperanza de vida en los pacientes; algunos de los usos de la quimioterapia han sido:

- Disminuir el tamaño de un tumor antes de una cirugía o terapia con radiación. (Quimioterapia Neoadyuvante)
- Eliminación de células cancerígenas restantes en el tratamiento con cirugía o radiación. (Quimioterapia Adyuvante)
- Eliminación de células que se han diseminado a través de distintas partes del cuerpo.

Sin embargo, la quimioterapia no solo elimina las células cancerígenas, sino cualquier célula sana que se encuentre a su alcance. Esta situación ocasiona mayores daños en células sanas que poseen de manera natural una mayor velocidad de crecimiento y de división, tales como las células del tracto gastrointestinal.

Entre los efectos adversos ocasionados por la quimioterapia podemos encontrar la anemia, pérdida del apetito, sangrado y aparición de hematomas (Trombocitopenia), estreñimiento, delirio, diarrea, edema, fatiga, alopecia, infección y neutropenia, linfedema, problemas de

memoria o concentración, problemas en boca y garganta, náusea y vómito, neuropatía nerviosa, dolor, problemas sexuales y de fertilidad, incapacidad de conciliar el sueño, así como problemas de vías urinarias y de la vejiga. Estos efectos se ven disminuidos o eliminados una vez se ha concluido el tratamiento con quimioterapia. ²⁸

1.3. Metotrexato

Es un polvo cristalino de color amarillo a anaranjado utilizado como agente en quimioterapia, que interfiere con la síntesis de DNA y RNA. Su estructura química (figura 4) es análoga a la del ácido fólico (figura 5).

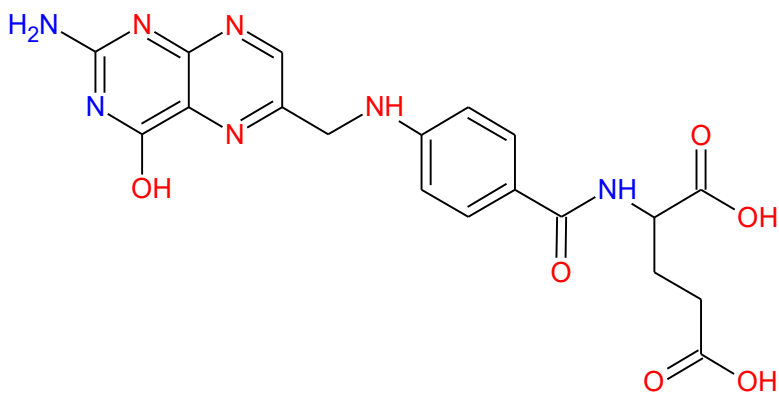


Figura 4. Estructura química del ácido fólico.

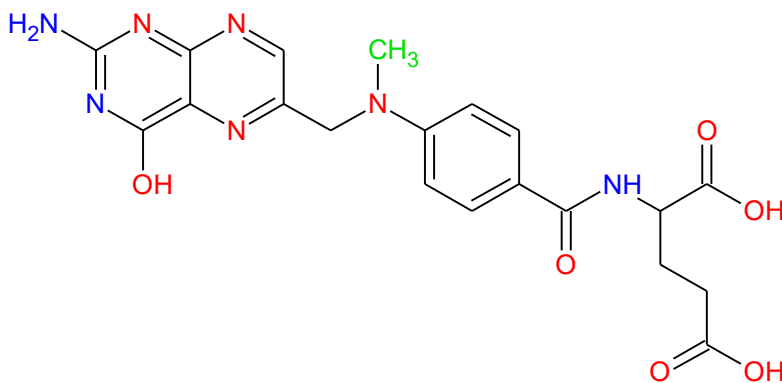


Figura 5. Estructura química del metotrexato (Análogo del ácido fólico)

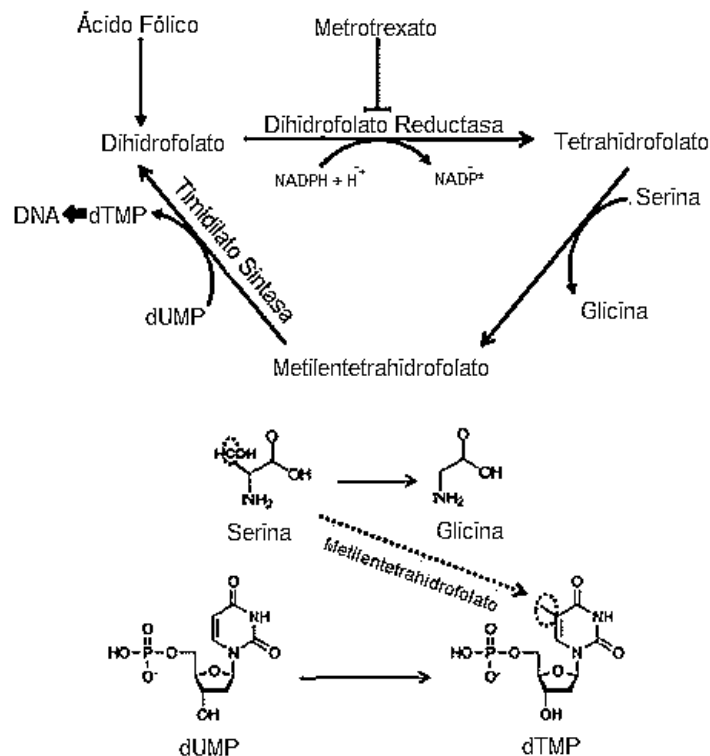
1.3.1. Indicación terapéutica

El metotrexato está indicado en el tratamiento de leucemia aguda linfocítica, coriocarcinoma gestacional, corioadenoma destruens y la mola hidatidiforme; así como en el tratamiento y profilaxis de leucemia meníngea. Es utilizado por sí mismo o en combinación en cáncer de mama, cáncer epidermoide de cabeza y cuello, linfoma de células T cutáneas, cáncer de pulmón, linfoma no Hodgkin. Además de ser utilizado en el tratamiento y profilaxis de distintos tipos de cáncer, el metotrexato está indicado en soriasis, artritis reumatoide activa, y

en artritis reumatoide poliarticular juvenil. La dosis en adulto para el tratamiento de cáncer es de 20 a 60 mg/m².²⁹

1.3.2. Mecanismo de acción

El metotrexato es un análogo del ácido fólico que inhibe la enzima dihidrofolato reductasa, incrementando la disponibilidad de tetrahidrofolato. El tetrahidrofolato tiene un papel importante como cofactor en la síntesis de timidilato y la síntesis de novo de purinas, por lo que inhibe la síntesis de DNA, evitando la proliferación celular.



Esquema 3. Mecanismo de acción de metotrexato como agente antineoplásico.²

El metotrexato bloquea la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato (esquema 3), un paso en el ciclo que resulta en la transferencia de un grupo metilo de la serina al monofosfato de deoxiuridina (dUMP) para producir monofosfato de deoxitimidina (dTMP), el cual es necesario para la síntesis de DNA.²

1.3.3. Características biofarmacéuticas

Absorción: La absorción de metotrexato por administración oral es dosis dependientes para adultos y pacientes pediátricos de leucemia. En adultos la concentración plasmática máxima se alcanza entre una hora y dos después de la administración. A dosis de 30 mg/m² o

menos, el metotrexato posee una biodisponibilidad del 60%. A dosis mayores de 80 mg/m², la absorción es menor debido a la saturación de receptores.

Distribución: Posee un volumen de distribución de 0.18 L/kg inicialmente, y un volumen de 0.4-0.8 L/kg para el estado estacionario. El metotrexato compite con folatos reducidos para realizar el transporte activo a través de membranas celulares en un proceso mediado por un transportador primario.

Metabolismo: El metotrexato es metabolizado en hígado y de manera intracelular a formas poliglutamadas que son convertidas de vuelta a metotrexato por las enzimas hidrolasas. Los poliglutamatos actúan como inhibidores de la hidrofolato reductasa y la timidilato sintasa. Una pequeña cantidad es metabolizada a 7-hidroximetotrexato, disminuyendo la respuesta antineoplásica de la molécula.

Eliminación: La excreción renal es la principal ruta de eliminación. En la administración intravenosa 80-90% se elimina por orina en menos de 24 horas, y 10% por excreción biliar.²⁹

1.3.4. Efectos adversos

La terapia con metotrexato está asociada a náusea, vómito, alopecia, mucositis, neumonitis, daño hepático, inmunosupresión, supresión de la médula ósea y toxicidad gástrica. DL50 = 43 mg/kg (Por vía oral en ratas)²⁹.

1.3.5. Características fisicoquímicas

En la tabla 4 se muestran las propiedades fisicoquímicas del metotrexato

Tabla 4. Características fisicoquímicas del metotrexato.

Fórmula química	C₂₀H₂₂N₈O₅
Peso molecular	454.447 g/mol
Nombre IUPAC	Ácido (2S)-2-((4-(2,4-diaminoteridin-6-il) metilmetilamino)benzoil]amino)pentanodioico
Punto de fusión	195 °C
Solubilidad en agua	2600 mg/L
log P	-1.85
Permeabilidad en Caco2	-5.92
pKa (Ácido carboxílico)	3.41

1.4. Sistemas de liberación farmacéuticos

1.4.1. Sistemas convencionales de liberación de fármacos

Durante las últimas décadas, el tratamiento de diversos padecimientos ha sido realizado mediante la administración de fármacos al cuerpo humano por medio de diferentes formas farmacéuticas, como las tabletas y cápsulas. La mayor parte de estos sistemas farmacéuticos son formulados para liberar el principio activo inmediatamente después de la administración para obtener una absorción sistémica rápida y completa. Estos sistemas de liberación inmediata resultan en una rapidez de absorción relativamente alta, dando inicio a los efectos farmacodinámicos acompañantes. Sin embargo, después de darse la completa absorción del principio activo, las concentraciones plasmáticas comienzan a disminuir conforme al perfil farmacocinético del principio activo. Eventualmente las concentraciones plasmáticas llegan a ser menores a la concentración mínima efectiva (CME), lo que resulta en la pérdida de la actividad terapéutica. Sin embargo, durante un tratamiento farmacológico con estas características es necesaria la administración una nueva dosis antes de ese momento, buscando mantener el efecto terapéutico. Estos sistemas tradicionales son comunes en la prescripción para llevar a cabo la práctica hospitalaria; siendo la forma más frecuente para la administración de fármacos en el mercado mundial. Una alternativa a este planteamiento es la administración de un sistema que provea de una liberación sostenida de principio activo, manteniendo las concentraciones plasmáticas en un tiempo mayor al provisto por los sistemas de liberación inmediata.

1.4.2. Sistemas de liberación modificada de fármacos

El término sistema de liberación modificada describe sistemas farmacéuticos que alteran el periodo de tiempo y/o espacio, y la concentración a la que es liberado un principio activo.⁵ Los sistemas de liberación modificada pueden clasificarse en:

- Sistema de liberación controlada con respecto al tiempo: Permiten modificar la frecuencia de dosificación comparada con respecto al sistema de liberación inmediata; estos sistemas incluyen a los sistemas de liberación controlada, los sistemas de liberación retardada, y los sistemas de liberación acelerada.
- Sistemas de liberación dirigida a un sitio específico: Permiten la liberación de una cantidad de fármaco en un sitio o tejido específico, evitando la toxicidad ocasionada por la distribución no selectiva de fármaco a través del cuerpo. El direccionamiento del sistema

farmacéutico puede darse mediante el acoplamiento a moléculas reconocidas por moléculas endógenas, debido a las modificaciones fisiológicas y anatómicas en el tejido enfermo, o mediante la selección de la vía de administración.³⁰

- Sistemas de liberación sensible a estímulos: Permiten la liberación de fármaco en respuesta a su entorno, por ejemplo, las modificaciones en pH, temperatura, fuerza iónica, presión, o campo magnético. Para realizar el reconocimiento de la modificación de condiciones del entorno se realizan las siguientes estrategias:
 - 1) Targeting interno activo: El sistema es funcionalizado con moléculas reconocidas por las células del sitio de liberación (Antígenos), por anticuerpos que reconozcan moléculas de la superficie de las células para proceder a la liberación o por el reconocimiento de algunas moléculas pequeñas.
 - 2) Targeting interno pasivo: El sistema muestra una respuesta con respecto cambios fisiológicos del tejido blanco, mismos que son propios del estado de enfermedad. Estos cambios fisiológicos pueden ser estímulos físicos o químicos (Temperatura, pH, presión, fuerza iónica, etc.) lo que lleva a una modificación del sistema (cambio de tamaño, forma, solubilidad o disposición estructural) para proceder a la liberación.
 - 3) Targeting externo: El sistema es capaz de reconocer únicamente a un estímulo que se da fuera del individuo (Hipertermia, campo magnético, corriente eléctrica, ultrasonido), lo que permite su modificación (cambio de tamaño, forma, solubilidad o disposición estructural) para proceder a la liberación.³¹

En los últimos años se han realizado diversos avances en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos. Estos sistemas son capaces de regular la cantidad de fármaco liberada, manteniendo la duración de acción terapéutica, y/o haciendo específico el tejido o sitio de liberación.⁵ Estos avances han llevado al desarrollo de muchos medicamentos con uno o varios de los siguientes beneficios:

- Liberación controlada de la cantidad de fármaco a un tiempo deseable.
- Control de la concentración de fármaco dentro de la ventana terapéutica.
- Maximización de la eficacia en la relación dosis-respuesta.
- Reducción de los efectos adversos.
- Minimización de las dosificaciones frecuentes.
- Aumento en la comodidad del paciente, asegurando una mayor adhesión al tratamiento.

La figura 6 representa el curso temporal de la concentración plasmática de un mismo fármaco administrado por distintos sistemas farmacéuticos:

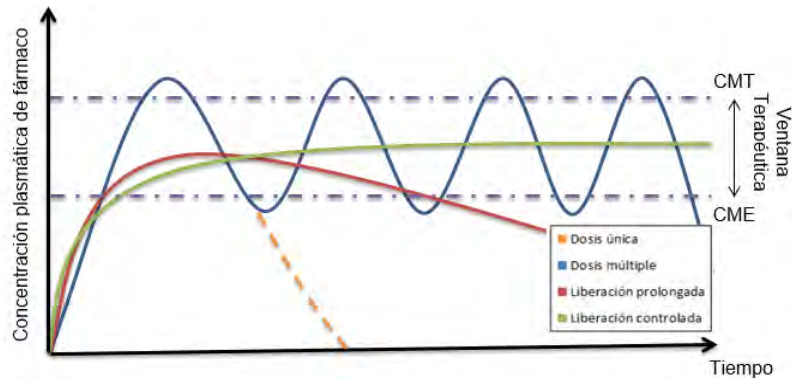


Figura 6. Representación hipotética de la concentración plasmática de fármaco distintos sistemas de liberación de fármacos. (CTM: Concentración tóxica mínima; CEM: Concentración efectiva mínima)

1.4.3. Sistemas teragnóstico

Los sistemas teragnósticos se caracterizan por su actividad dual en el tratamiento y diagnóstico; con el desarrollo de estos sistemas se busca ser capaz de monitorear el avance de un padecimiento y proveer de una terapia en el mismo momento. Este enfoque busca reducir el tiempo de retraso para la administración de un tratamiento, así como facilitar el cuidado del paciente, e inclusive llevar un control de manera individual del régimen de dosificación.⁶ Los sistemas teragnósticos incluyen, pero no se limitan a sistemas de liberación farmacéuticos acoplados a biomarcadores de diagnóstico molecular, sondas de imagenología y de técnicas de detección temprana y nanoplataformas que incorporan sistemas de contraste y componentes terapéuticos.⁶ La figura 7 muestra el impacto del diagnóstico en la calidad de vida del paciente así como su esperanza de vida:

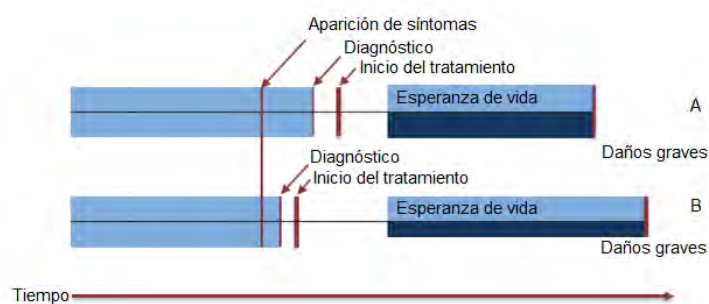


Figura 7. Efectos del diagnóstico temprano de cáncer en la esperanza y calidad de vida de los pacientes. (Adaptado con ligeras modificaciones del World Cancer Report 2015, OMS).⁹

1.4.4. Modelos cinéticos de liberación de fármacos

Para llevar a cabo la caracterización de un sistema de liberación farmacéutico es necesario conocer el mecanismo por el cual lleva a cabo la liberación. Para dicho análisis se han desarrollado diversos modelos que permiten expresar en ecuaciones matemáticas la relación entre la cantidad de fármaco liberado con respecto al tiempo. Estos modelos cinéticos han sido propuestos en torno a diversas consideraciones acerca del funcionamiento de los sistemas y es por ello que la información obtenida en algunos parámetros es capaz de brindar información acerca del funcionamiento de los sistemas de liberación.³²

- **Modelo de orden cero:** El modelo asume que la superficie del sistema permanece constante y que el fármaco se libera continuamente de manera gradual e independiente a la cantidad de principio activo remanente debido a que no se alcanzan condiciones de equilibrio.

$$W_0 - W_t = Kt \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde W_0 es la cantidad de fármaco inicial en el sistema de liberación, W_t es la cantidad de fármaco en el sistema de liberación a tiempo t y K es la constante de proporcionalidad.

Dividiendo la ecuación entre W_0 y simplificando:

$$f_t = K_0t \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde $f_t = 1 - (W_t/W_0)$ y representa la fracción de fármaco disuelto en el tiempo t y K_0 representa la constante de disolución aparente, o la constante de orden cero.

- **Modelo de primer orden:** El modelo asume una dependencia de la liberación de fármaco con respecto al área superficial del sistema de liberación a través del tiempo de acuerdo a la ecuación de Noyes-Whitney modificada por Hixson y Cromwell

$$\frac{dW}{dt} = KS(C_s - C) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde W es la cantidad de fármaco en la solución a tiempo t , S la proporción de área de sólido accesible a la disolución dW/dt es el cambio en la tasa de disolución en el tiempo t y K es una constante de proporcionalidad.

- **Modelo de Korsmeyer-Peppas:** Este modelo semi-empírico relaciona la liberación de fármaco con un lapso de tiempo (t) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f_t = M_t/M_\infty = at^n \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde a es una constante que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación, n es el exponente de liberación, es un indicador del mecanismo de

liberación en función de t , siendo $ft = M_t/M_\infty$ (Fracción de fármaco liberado). El valor de n determinado permite relacionar la liberación de fármaco a un mecanismo de liberación de acuerdo a los siguientes parámetros:

Tabla 5. Mecanismo de transporte de fármaco de acuerdo al valor de n en el modelo Korsmeyer-Peppas.

Exponente de liberación (n)	Mecanismo de transporte de fármaco	Tasa de liberación en función del tiempo
<0.5	Difusión (Ley de Fick)	$t^{-0.5}$
0.5 < n < 1.0	Transporte anómalo	t^{n-1}
1.0	Transporte de caso II*	Liberación de orden cero
> 1.0	Súper transporte de caso II*	t^{n-1}

* El transporte de caso II hace referencia a la liberación de un fármaco por efecto de la relajación de cadenas poliméricas.³³

- **Modelo de Hopfenberg:** Este modelo describe la liberación de fármaco a partir de sistemas con superficie erosionable:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0}\right]^n \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t , M_∞ es la cantidad total de fármaco disuelto a tiempo, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco disuelto, k_0 es la constante de rapidez de erosión, C_0 es la concentración inicial de fármaco en el sistema, a_0 es el radio inicial de la esfera o cilindro o la mitad del ancho de la placa. El valor de n es 1, 2 o 3 para una placa, un cilindro, y una esfera, respectivamente.

- **Modelo de Peppas-Sahlin:** Este modelo considera que el mecanismo de liberación está mediado por hinchamiento del material por interacción con el medio, donde el mecanismo se inicia una vez que al contacto del material con el medio de dispersión las cadenas se separan dando un aumento en el área de contacto entre las fases, lo que aumenta la movilidad del fármaco. Está descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^{2n} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco disuelta en el tiempo t , M_∞ es la cantidad total de fármaco disuelto a tiempo, M_t/M_∞ es la fracción de fármaco disuelto, k_1 es el coeficiente de difusión y k_2 es la relajación del polímero por interacciones con el medio.

- **Modelo de Baker-Lonsdale:** Este modelo describe la liberación controlada de un fármaco desde una matriz esférica desde una microcápsula o microesfera. La siguiente ecuación ha sido utilizada como modelo de respuesta lineal de la liberación:

$$f_t = \frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde M_t es la cantidad de fármaco liberada a tiempo t y M_∞ es la cantidad de fármaco liberada a tiempo infinito, y k es una constante que corresponde a la pendiente.

Para llevar a cabo la selección modelo se considera el coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1, el mayor criterio de selección del modelo (MSC), la menor suma de cuadrados (SSR), y el menor criterio de Akaike (AIC).

1.5. Agentes de contraste para diagnóstico clínico

Los agentes de contraste son sistemas utilizados en el diagnóstico médico para mejorar la calidad de los estudios realizados por imagenología. De esta manera se puede obtener no solo metodologías más sensibles sino con un menor nivel de incertidumbre con respecto a las técnicas sin medios de contraste. Los medios de contraste permiten la diferenciación de tejidos adyacentes a estructuras con una alta similitud de respuesta en los análisis por imagenología, permitiendo obtener una mayor certeza por los profesionales de la salud en la determinación de anatomías morfológicas y fisiológicas.^{22,34,35}

1.5.1. Agentes de contraste para resonancia magnética de imagen (MRI)

La resonancia magnética de imagen (MRI) ha revolucionado el diagnóstico de diversos padecimientos, permitiendo diferenciar a tejidos con desviaciones anatómicas o fisiológicas de tejidos normales sin la necesidad de métodos invasivos. La MRI escanea la anatomía y función mediante la medición de los tiempos de relajación (T1 y T2) de los núcleos de una molécula de agua. Sin embargo, los cambios en estos valores en diversas patologías son muy limitados, volviendo al método poco sensible para su detección. Por esa razón se han utilizado medios de contraste en MRI que acorten el tiempo de relajación T1 (como los quelatos de gadolinio) y T2 (como las partículas de óxidos de hierro), las cuales permiten obtener un mayor contraste, y por ende mayor información para diagnóstico.³⁶ Sin embargo, debido a los costos de los equipos, instalaciones y personal médico calificado, esta técnica de diagnóstico solo es asequible para personas con altos ingresos económicos o sistemas de salud de países considerados como de primer mundo por una baja disponibilidad de

equipos, la necesidad de infraestructura costosa para su mantenimiento y la necesidad de personal altamente especializado para su uso.³⁴

1.5.2. Nanopartículas magnéticas

En los últimos años se han desarrollado una amplia gama de materiales magnéticos en el campo de la nanotecnología; evaluando su uso como acarreadores farmacéuticos por las propiedades fisicoquímicas que presentan. Las nanopartículas magnéticas han demostrado un gran potencial en la liberación de fármacos debido a su capacidad de funcionalización de la superficie que permite llevar a cabo la adsorción de cantidades relativamente alta de fármacos. Estas partículas de menos de 100 nm son empleadas bajo el estímulo de un campo magnético, pero no es sino hasta un tamaño crítico (alrededor de 10-20 nm)³⁷ que muestran comportamientos superparamagnéticos. Es debido a esta propiedad que se han desarrollado sistemas magnéticos nanométricos para uso en la resonancia de imagen, como agente de contraste vascular, agente de diagnóstico, en la ingeniería de tejidos, separación de células, o como sistemas teragnósticos. Las ventajas encontradas hasta ahora son:

- Disminución de los efectos adversos por toxicidad de fármacos.
- Disminución de la frecuencia de administración.
- Aumento en la eficiencia de transfección de genes.
- Separación magnética de células, bacterias y vesículas.
- Disminución de los efectos secundarios de fármacos comparados con sistemas de liberación convencional.
- Liberación dirigida en el sitio de acción.
- Liberación sostenida de fármacos a tejido diana.

1.5.2.1. Magnetismo

El magnetismo es un fenómeno físico mediado por campos magnéticos, corrientes eléctricas, y momentos magnéticos. Debido a la composición de la materia por partículas subatómicas cargadas.³⁸ El comportamiento de los materiales magnéticos puede ser clasificado en los grupos representados en la figura 8:

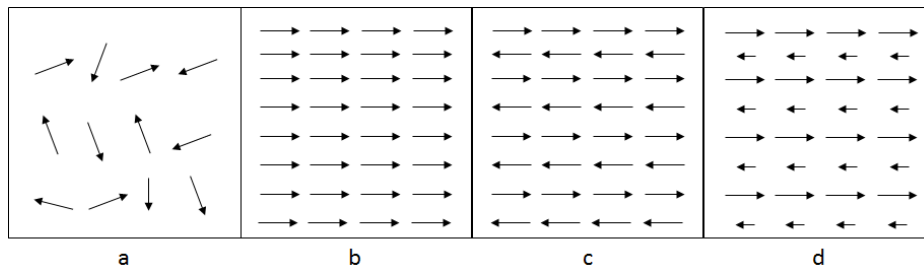


Figura 8. Representación de los momentos dipolares de diversos (a) material paramagnético (b) material ferromagnético, (c) material antiferromagnético, y (d) material ferrimagnético.

- Paramagnético: En este tipo de materiales, algunos de los átomos o iones tienen un momento magnético neto debido a electrones desapareados de orbitales parcialmente llenos. Sin embargo, los momentos magnéticos individuales no están alineados para dar un efecto magnético macroscópico hasta que se presenta un campo magnético.
- Ferromagnético: A diferencia de los materiales paramagnéticos, los momentos magnéticos de los átomos de estos materiales muestran interacciones fuertes. Las interacciones producidas por intercambios electrónicos resultan en un alineamiento paralelo de los momentos magnéticos, lo que resulta en una magnetización aún en ausencia de campo magnético.
- Antiferromagnético: En estos materiales existe una disposición atómica que resulta en un momento magnético igual a cero. Como ejemplo de ello se encuentra la hematita, una estructura con iones oxígeno y iones Fe^{3+} en un empaquetamiento hexagonal. Los momentos magnéticos de los iones Fe^{3+} están acoplados en planos-c, pero antiferromagnéticamente acoplados entre planos, y su estructura se representa en la figura 9.

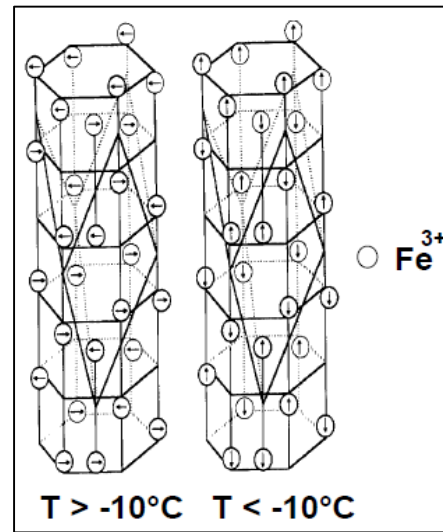


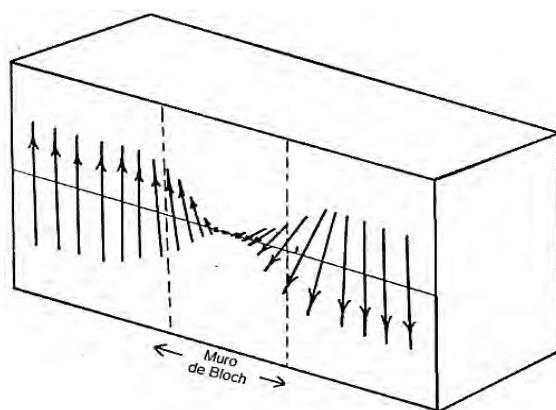
Figura 9. Estructura cristalina de la hematita.

- Ferrimagnético: En compuestos iónicos, como los óxidos, la fuerza neta de los momentos magnéticos considera la estructura cristalina del compuesto. Un tipo de ordenamiento magnético se denomina ferrimagnetismo, en estos compuestos la estructura está compuesta por distintos iones, de distinto tamaño y/o carga lo que resulta en momentos

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

1.5.2.2. Teoría de dominios

Una propiedad de los materiales ferromagnéticos es poseer una baja magnetización espontánea, la cual puede ser aumentada por la aplicación de campos magnéticos bajos. Lo que permite que este fenómeno ocurra es la composición de los materiales por regiones pequeñas denominadas dominios, donde la magnetización local se encuentra saturada pero no necesariamente paralela, los dominios se encuentran separados por los llamados muros de Bloch, las cuales son un volumen estrecho de transición entre dos dominios magnéticos como se representa en el esquema 4, y su momento magnético total es igual a cero en ausencia de un campo magnético externo; cuando esto ocurre se considera que se tiene un material con multidominios magnéticos.³⁹



Esquema 4. Representación de la transición del momento magnético en el muro de Bloch en un material con multidominios magnéticos.

Cuando un material alcanza un tamaño crítico, en orden nanométrico, no existe la posibilidad de formar transiciones entre dominios, es decir, se obtienen partículas con momentos magnéticos independientes, y se denominan monodominios magnéticos. Diversos investigadores han demostrado y hecho uso de la modificación de las propiedades magnéticas de acuerdo al tamaño de partícula, mediante la síntesis de nanopartículas que actúan como monodominios magnéticos.⁴⁰⁻⁴⁷ Debido a este fenómeno es que los materiales ferromagnéticos, como la magnetita, en partículas de tamaño nanométricos muestran un comportamiento superparamagnético en presencia de campos magnéticos bajos.

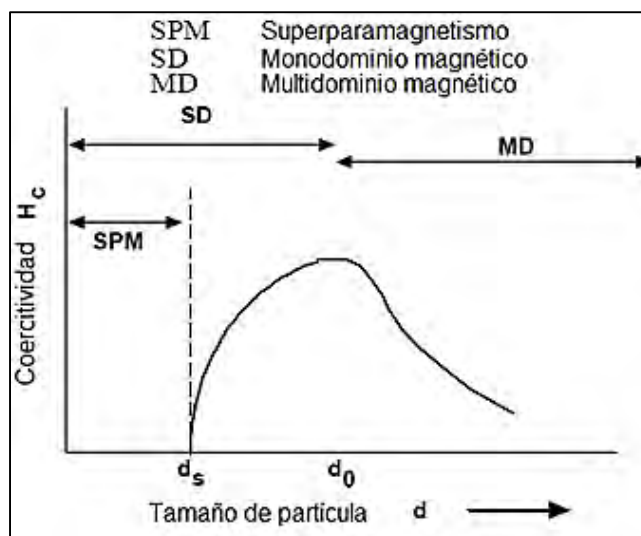


Figura 10. Dependencia la coercitividad magnética conforme a la teoría de dominios.^{37,44}

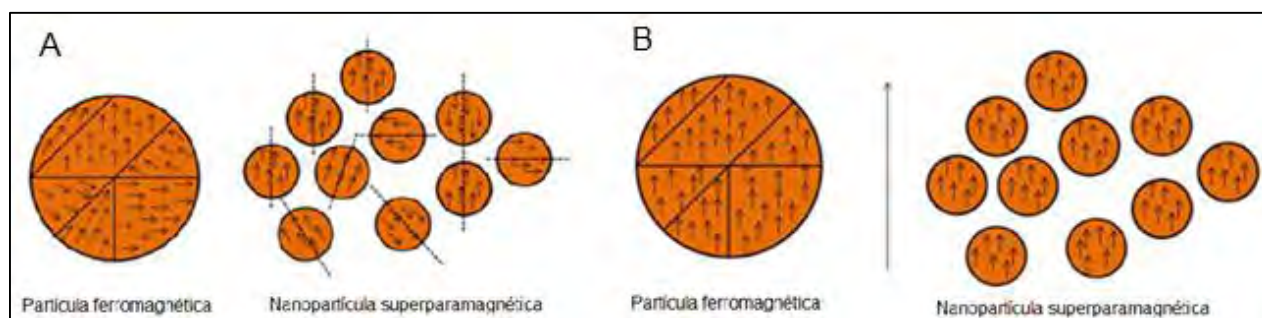


Figura 11. Momento magnético de un multidominio magnético y monodominios magnéticos en presencia (A) y ausencia (B) de un campo magnético impuesto.⁴⁴

Métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas

a) Coprecipitación

La coprecipitación es el método de mayor preferencia debido a la facilidad en que se llevan a cabo estas reacciones, siendo convenientes para la síntesis de partículas de magnetita esférica a tamaño nanométrico. Este método se prefiere, debido a que requiere una baja temperatura, se lleva a cabo en cortos tiempos y no es necesario utilizar solventes orgánicos. Además, es posible controlar la morfología y composición de nanopartículas mediante la concentración de iones, la estequiometría de los iones, la temperatura de reacción, el pH y la fuerza iónica. Para llevar a cabo esta reacción se utilizan agentes oxidantes para oxidar los hidróxidos del metal, mientras que el segundo método involucra la adición de hidróxidos en la presencia de iones en soluciones acuosa.⁴⁸

b) Microemulsiones

Las microemulsiones son ampliamente utilizadas para la síntesis de partículas con tamaño uniforme en una emulsión w/o. En este método de síntesis se utilizan agentes tensoactivos para formar micelas, dentro de las cuales se dará la reacción de síntesis, de esta manera se logra mantener el tamaño de partícula con una baja dispersión. La formación de precipitados es controlada por la concentración de tensoactivos en el medio.⁴⁸

c) Descomposición térmica

Las partículas magnéticas de este proceso se sintetizan a alta temperatura, mediante la descomposición de precursores de complejos metálicos como los acetilacetatos, los cupferratos, y surfactantes como ácidos grasos, ácido oleico y hexadecilamina.⁴⁸

1.5.2.3. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas tienen una amplia variedad de aplicaciones en diversos campos de las ciencias biológicas y de la salud, para liberación de fármacos, separación de células por atracción magnética, liberación de genes (Magnetofección), hipertermia, agente de contraste en MRI y en la producción de músculos artificiales.

- Liberación de fármacos: Las nanopartículas magnéticas han sido utilizadas como sistemas acarreadores para liberación de fármacos. Los fármacos son acoplados a la superficie de las nanopartículas magnéticas o introducidas en un recubrimiento, y una vez que han sido introducidas en el torrente sanguíneo se genera un gradiente de campo magnético para direccionar y mantener las partículas magnéticas en la región de interés. Los sistemas de recubrimiento de nanopartículas magnéticas pueden ser funcionalizados para permitir la liberación sensible a estímulos,⁴⁹
- Separación de células por atracción magnética: Las nanopartículas magnéticas han sido utilizadas para separar células desde su medio para ser purificadas o concentradas para futuros análisis. Su uso está modulado por la diferencia en la susceptibilidad magnética de entidades marcadas y el medio circundante. Las entidades pueden ser células, bacterias y algunos tipos de vesículas, y las nanopartículas magnéticas son recubiertas con antígenos o anticuerpos que reconocen (o son reconocidos) por moléculas de las membranas de las entidades de interés. Una vez se ha dado el reconocimiento se expone a un gradiente de campo magnético para atraer y mantener a las entidades en una región.⁵⁰

- Magnetofección: Esta técnica involucra el uso de nanopartículas magnéticas para incrementar la eficiencia de la transfección de genes (Introducción de DNA distinto a una célula hospedera) y expresión. Un vector viral recubierto de nanopartículas magnéticas, al cual se aplica un campo magnético para ser mantenida en contacto con las células de interés, lo que incrementa la eficiencia de transfección.⁴⁹
- Hipertermia: La hipertermia magnética permite aumentar la temperatura de manera localizada, y puede ser utilizada para destruir células de manera selectiva o para inducir un estímulo en la liberación de fármacos. El mecanismo central es la generación de calor por la inducción de un campo magnético alterno que haga rotar a las partículas o a los monodominios magnéticos, produciendo pérdidas de energía por histéresis.⁴³
- Agente de contraste en MRI: Mientras las otras aplicaciones aprovechan las propiedades magnéticas asociadas a los electrones, los protones también poseen momentos magnéticos, y pueden ser utilizados como sistemas de detección mediante la MRI. En un campo magnético aplicado al material una pequeña fracción de los protones se alinean de manera paralela al campo, y el momento magnético rota su eje en un movimiento de precesión alrededor de este campo. Para medir la señal producida por el alineamiento por el campo, se aplica un campo electromagnético de manera transversal, cuya frecuencia provoque un cambio en el movimiento de precesión que lo vuelva perpendicular al plano del campo. Cuando el segundo campo es apagado, la amplitud de los momentos magnéticos se relaja a sus valores iniciales, y el tiempo en que este fenómeno ocurre es percibido por una bobina de captación.⁴⁰

1.5.2.4. Magnetita

La magnetita es un compuesto conformado por óxidos de hierro de fórmula Fe_3O_4 , donde el oxígeno forma la red cúbica de cara centrada $\text{Y}[\text{XY}]_b\text{O}_4$, $\text{X}=\text{Fe}^{+2}$ y $\text{Y}=\text{Fe}^{3+}$, donde los corchetes denotan los sitios octaédricos (32 espacios) y los restantes los sitios tetraédricos (64 espacios). Su estructura es cúbica con dimensiones de celda de 0.839 nm, y con una densidad de $5.18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Posee una dureza de $5 \frac{1}{2}$ en escala de Mohs, siendo un material ferromagnético con temperatura de Curie de 850 K y resistividad eléctrica de $105 \Omega\cdot\text{cm}$.⁵¹ La magnetita es considerada un material de color negro, ferromagnético, semiconductor que difiere de otros óxidos de hierro al contener hierro divalente y trivalente. Ha sido utilizado en la fabricación de imanes permanentes y es por ello que se encuentra en bocinas, tintas magnéticas, unidades de refrigeración magnética, etc.

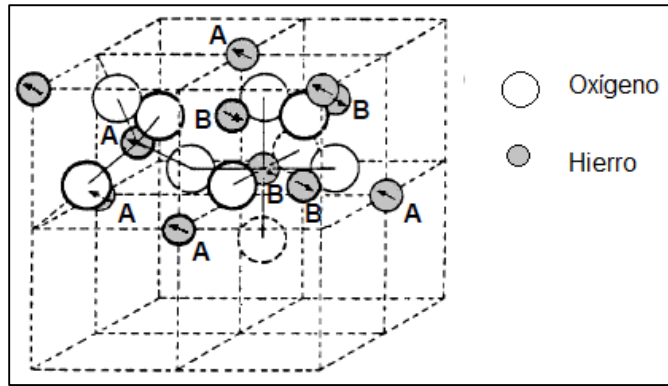


Figura 12. Estructura cristalina de la magnetita (A) disposición tetraédrica y (B) disposición octahédrica.⁵¹

1.6. Agentes de contraste para ultrasonido

Los agentes de contraste para ultrasonido se propusieron hace cuatro décadas, cuando accidentalmente se descubrió que burbujas de aire en el torrente sanguíneo podía ser detectadas después de agitar soluciones acuosas. Desde ese entonces, se han hecho avances lentos pero constantes en el desarrollo de nuevos sistemas y equipos de ultrasonido.^{22,35}

Las desventajas generales del ultrasonido han sido reconocidas por diversos investigadores.

- Los tejidos estudiados pueden presentar una propagación del ultrasonido atenuada por tejidos circundantes tales como el tejido adiposo o el tejido óseo, y no es posible que el ultrasonido sea aplicado sin agente de contraste a la obtención de imágenes en pulmón debido a que el aire dentro de este órgano impide la propagación de ondas sonoras.
- La obtención de imágenes es dependiente del operador y su experiencia; un sonógrafo puede obtener imágenes con alta calidad mientras que un operador con entrenamiento insuficiente podría obtener resultados no concluyentes.
- El campo de visión obtenido en un equipo de ultrasonido es relativamente pequeño, típicamente, no más de 20 – 30 cm y solo unos pocos centímetros a una resolución espacial mayor. Normalmente, se obtienen imágenes de la sección transversal.

El principio básico de los agentes de contraste ultrasónicos es la creación de muchas pequeñas interfases con alta ecogenicidad, lo que puede ser alcanzado usando microburbujas gaseosas. Para incrementar la estabilidad de las mismas en la sangre y alcanzar un tamaño estandarizado, éstas son recubiertas por una capa biocompatible. En una microburbuja cuando las ondas sonoras generadas por el ultrasonido chocan, éstas son

reflejadas desde la superficie, en un fenómeno conocido como dispersión retrógrada. Las ondas sonoras dispersas tienen la misma longitud de onda de las ondas sonoras emitidas, por lo que se reconoce una conducta lineal de dispersión retrógrada. Sin embargo, cuando la presión debido a las ondas sonoras incrementa, las conductas no lineales de las microburbujas se vuelven muy prominentes. Inicialmente comienzan a oscilar, enviando hacia afuera oscilaciones armónicas, y después que la presión aumenta las microburbujas se vuelven inestables y comienzan a fracturarse hasta finalmente romperse, donde envían una señal de alta energía (emisión acústica estimulada, EAS). Durante la oscilación, las microburbujas producen una señal de eco no lineal debido a que la compresión de las microburbujas contra la presión del contenido de gas interior es menor que su expansión.^{22,52}

Al llevar a cabo una comparación del diagnóstico a través de ultrasonido mejorado por medios de contraste con técnicas que son consideradas más confiables, como la MRI y la tomografía computacional, se ha demostrado una eficacia de diagnóstico con el mismo nivel de confianza a través de un procedimiento de menor costo. Mediante un análisis costo-beneficio se considera que el ultrasonido mejorado por medios de contraste supone una opción más adecuada que el uso de técnicas como la resonancia magnética o la tomografía computarizada, por lo que se ha optado por el desarrollo de medios de contraste para ultrasonido que asequibles en la producción a gran escala y que posean altas propiedades ecogénicas.³⁴

1.6.1. Microburbujas

Las microburbujas (esferas gaseosas de diámetro menor a 10 μm) han demostrado ser sistemas dispersos capaces de mejorar la señal ecogénica en el ultrasonido mediante la generación de múltiples interfases de diámetros micrométricos dispersados en el seno de un líquido.³⁴ Sin embargo, su desarrollo comenzó de manera accidentada antes de darse sistemas diagnósticos estandarizados cuya respuesta fuese reproducible y confiable. Los sistemas basados en microburbujas se desarrollaron de la siguiente manera:

- Descubrimiento: Estos sistemas fueron descubiertos al realizar inyección intravenosa cerca del sitio vigilado mediante ultrasonido. Al llevar a cabo el llenado y vaciado del líquido se generan pequeñas turbulencias en el seno del mismo, lo que permite la entrada de aire por difusión, una vez que el líquido estabiliza estas regiones quedan conformadas burbujas de un tamaño submicrométrico (por ello es que no se forma una embolia

gaseosa perceptible). Sin embargo, estos sistemas no poseían agentes que estabilizaran la interfase gas-líquido, lo que terminaba en la destrucción de la burbuja en cuestión de segundos.

- Primera generación: Los agentes de primera generación buscaron mejorar la estabilidad de las burbujas gaseosas mediante el recubrimiento por una cápsula. Para ello han sido utilizados diversos materiales:
 - Proteínas: Las microburbujas compuestas por una cápsula de albúmina fueron los sistemas pioneros como medio de contraste en el ultrasonido con la primera formulación aprobada por la FDA, el Albutex[®]. Este sistema formaba las microburbujas por sonicación, donde el aire es encapsulado por una monocapa de albúmina de 15 nm. Desde entonces otros materiales proteínicos han sido utilizados para el encapsulamiento de microburbujas.
 - Surfactantes: Siguiendo el modelo de Langmuir acerca de la tensión superficial, se han realizado encapsulamientos a través de la disminución de la tensión en la interfase líquido-gas permitiendo que se forme una dispersión más estable.
 - Lípidos: El uso de fosfolípidos permite el auto-ensamblaje de monocapas y bicapas con orientación específica en la interfase líquido-gas, donde las cabezas alquílicas quedan orientadas hacia la fase gas y las cabezas polares se orientan hacia el líquido.
 - Polímeros: Los polímeros ofrecen una gran solución a la inestabilidad de microburbujas dispersas debido a su capacidad de deformación bajo estrés mecánico, lo que permite lograr mantener el sistema intacto a pesar del aumento o disminución de volumen debido a cambios de temperatura o por el mismo efecto del ultrasonido.
- Segunda generación: Estos sistemas buscan mejorar el tiempo en el torrente sanguíneo, aprovechando gases con baja difusibilidad hacia la sangre como son los perfluorocarbonos, al disminuir la difusión del gas de la burbuja hacia el medio aumenta la vida media de circulación.⁵³

1.6.2. Microburbujas magnéticas

Las cubiertas de los agentes de contraste ultrasónicos pueden ser utilizadas no sólo para el transporte de gases o aire, sino que también pueden transportar fármacos en el cuerpo. Así mismo es posible embeber nanopartículas magnéticas en la cubierta de las microburbujas aumentando la susceptibilidad magnética para permitir su detección por medio de la

resonancia magnética de imagen, lo que permitirá llevar a cabo la confirmación de resultados obtenidos mediante la técnica de ultrasonografía.³

El ultrasonido y la MRI tienen sus ventajas y debilidades a ser consideradas en la evaluación de un diagnóstico; el ultrasonido posee una gran sensibilidad, pero una baja resolución espacial, mientras que la MRI posee una alta resolución espacial pero baja sensibilidad. Las microburbujas magnéticas surgieron como un agente de contraste dual para estas dos técnicas de diagnóstico, lo que ha permitido no solo utilizar de manera complementaria ambas técnicas, sino que han mejorado las desventajas de cada uno de estos análisis. Es por ello que muchos investigadores han llevado a cabo diversos estudios que permitan la síntesis de microburbujas magnéticas, evaluando las ventajas de diversos tipos de materiales, y sus efectos en la respuesta acústica y magnética para llevar a cabo el diagnóstico.

Tabla 6. Ejemplos de síntesis de microburbujas magnéticas como agentes duales de ultrasonido y MRI.

Ref.	Tipo de NPM	Microburbujas magnéticas			
		Polímero	Gas	Proceso	Tamaño de MB
54	Fe ₃ O ₄ 8-10 nm	Tipo A-PVA Quitosan Tipo B-PVA	Aire	Tipo A-Unión a superficie Tipo B-Embebidos en polímero	Rango 3.2-4.4 μm
55	Fe ₃ O ₄ 29.4 nm	PLGA 50:50	Aire	Doble emulsión w/o/w Liofilización	Mayormente 9.77 μm
56	Fe ₃ O ₄ <0.22 μm	Albúmina	Perfluorocarbono	Sonicación / Liofilización	Rango de 1.2-1.8 μm
57	γ-Fe ₂ O ₃ 12 nm	Tipo A-PVA telequérico ⁵⁸ Tipo B-PVA	N ₂	Tipo A-Unión a superficie Tipo B-Embebidos en polímero	Mayormente 2 μm
59	Cobalto Ferrita	F8H2Phos	Aire	Sonicación / Liofilización	Mayormente 5 μm
60	Fe ₃ O ₄	PBCA	Aire	Emulsión Triton – X Butilcianoacrilato	2.2-2.4 μm
61	PEI-Mag2, LS-Mag	DPPE /DPPC	Aire	Capmix (Sonicación)	3.9-4.7 μm
62	Fe ₃ O ₄ 8-12 nm	Perfluoro(alquil) fosfato	Perfluorohexano	Sonicación	Mayormente 4.8 μm
63	Fe ₃ O ₄ 12 nm	PLGA / PVA Impresión molecular	Perfluoruros	Doble emulsión w/o/w Liofilización	Mayormente 868 nm
64	Fe ₃ O ₄	DPPE /DPPC	Perfluoropropano	Capmix (Sonicación)	1.5-10 μm
42,65	Fe ₃ O ₄ 8-10 nm	PVA Telequérico ⁵⁸ Tipo A-Quitosan	Aire	Tipo chem-Embebidos en polímero	3.2-4.4 μm
3	Fe ₃ O ₄ 12 nm	PVA / PLA	N ₂	Doble emulsión w/o/w Liofilización	Mayormente 3.98 μm
66	Fe ₃ O ₄ 10 nm	PLGA	Aire	Doble emulsión w/o/w Evaporación	Mayormente 886 nm

Algunos de los métodos de síntesis permiten la introducción de fármacos a los sistemas, lo que brinda una amplia gama de posibilidades para la generación de nuevos sistemas de administración de fármacos. Es debido a estas características que se ha considerado utilizar a las microburbujas magnéticas como sistemas farmacéuticos teragnósticos a través de la disolución de trombos por ultrasonoforesis, el aumento de la eficiencia de permeación de la barrera hematoencefálica por el mismo mecanismo, y en la detección y tratamiento de cáncer a través de la liberación de material genético o de fármacos antineoplásicos.⁶⁷

1.7. Sistemas teragnósticos en cáncer

1.7.1. Avances en los sistemas teragnósticos de cáncer

Los sistemas teragnósticos de cáncer han sido desarrollados mediante enfoques multidisciplinarios que involucran a especialistas en la salud, en el desarrollo de fármacos y el desarrollo de nuevos materiales para:

- Identificar nuevos biomarcadores que permitan el diagnóstico molecular de cáncer.
- Nuevas sondas de imagenología que permitan la detección temprana de cáncer.
- Terapias antineoplásicas dirigidas por imagenología.
- Nanoplateformas que incorporan imagenología y componentes terapéuticos.

Los sistemas teragnósticos de cáncer incluyen, pero no se limitan a biomarcadores teragnósticos, marcadores de reconocimiento molecular, terapias dirigidas a través de la imagenología (Liberación en el sitio de acción), y nanoplateformas teragnósticas.^{6,23,24}

1.7.2. Retos y nuevas perspectivas en el desarrollo de sistemas teragnósticos de cáncer

La búsqueda de terapias individualizadas que permitan el funcionamiento costo eficaz de los sistemas de salud, con el menor tiempo entre la detección y el inicio de los procedimientos médicos proveerá de mejores resultados para los pacientes a un menor costo. A través de los sistemas teragnósticos se busca dar respuesta a estos problemas, pues el desarrollo de sistemas tecnológicos que permitan la detección temprana a la vez que el inicio del tratamiento asegura una máxima efectividad en el tratamiento. Sin embargo, estos sistemas deben superar una serie de retos como:

- Escalamiento de la síntesis: Debido a la formación de estructuras complejas, la síntesis y la reproducibilidad de estos sistemas puede ser un reto a nivel industria pues se debe asegurar su calidad y efectividad.

- Diseño racional de un régimen de dosificación: Debido a las diferencias entre los requerimientos de diagnóstico y la farmacocinética del sistema terapéutico se deberán hacer análisis paralelos para el establecimiento de dosis efectivas.
- Regulación: Al no ser sistemas convencionales su regulación es nula, lo que impedirá ser aceptados por agencias regulatorias sino hasta años después del inicio de su registro.
- Toxicidad: Diversos análisis han demostrado la inducción de citotoxicidad, genotoxicidad, e inmunotoxicidad por sistemas nanométricos. Las propiedades que permiten su posible uso como sistemas acarreadores, de diagnóstico o teragnósticos los que se han asociado con estos posibles efectos secundarios.

1.8. Caracterización de nano y micropartículas

Para asegurar el adecuado desempeño de los sistemas farmacéuticos es necesario llevar a cabo su caracterización mediante sus propiedades fisicoquímicas. Para ello diversos investigadores han desarrollado metodologías para caracterizar a los sistemas nano y microparticulados.⁶⁸

1.8.1. Espectroscopía de infrarrojo

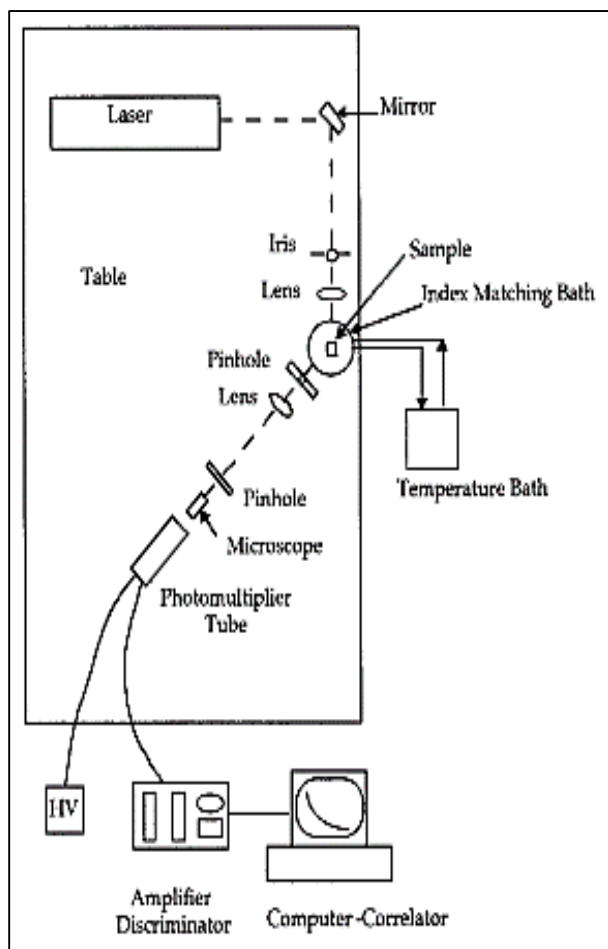
La espectroscopia de infrarrojo cuantifica la radiación electromagnética absorbida por un intervalo al hacer incidir ondas de entre 10000 y 100 cm^{-1} . La mayor fortaleza del análisis de espectroscopia de infrarrojo es su aplicabilidad de manera cualitativa y cuantitativa de la naturaleza química de una amplia variedad de materiales. Un espectro de infrarrojo (IR) es un mapa de las frecuencias de vibración contra la intensidad de interacciones con la radiación IR. La presencia de distintos átomos, enlaces y grupos funcionales modifican las frecuencias e intensidades en que se absorbe la energía electromagnética, por ello es que el análisis de IR ha sido utilizado al comparar con referencias los espectros obtenidos con referencias conocidas (Como huellas dactilares), y a través de relaciones empíricas determinar la asignación de señales de una nueva molécula.⁶⁹

1.8.2. Difracción de rayos X de polvos (XRD)

La difracción de rayos X de polvos es una de las técnicas de caracterización más ampliamente utilizada en productos cristalinos orgánicos e inorgánicos. Este método permite identificar de manera cuantitativa las imperfecciones de una estructura. En la XRD, un haz monocromático de rayos X se hace incidir sobre el material para obtener información de la

disposición de los átomos que lo conforman- Usualmente, estos materiales están compuestos por planos atómicos uniformes que brindan repeticiones de tipo cristalino, y una vez que se ha hecho incidir la radiación sobre estos planos las interacciones con los átomos desvían al haz por fenómenos de difracción, refracción, dispersión o absorción o permiten su transmisión. El grado de modificación de la trayectoria del haz de rayos x depende del arreglo de los planos atómicos del material, por lo que un detector capta los rayos X difractados y una computadora analiza los patrones obtenidos.⁷⁰

1.8.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)



Esta técnica cuantifica la cantidad de luz dispersada, y mediante una correlación con el movimiento Browniano, calcula el tamaño de una partícula dispersa en un medio mediante la iluminación de un sistema dispersión con luz láser y la medición de la intensidad de luz dispersada. Cuando una partícula suspendida es iluminada ésta dispersará luz en distintas direcciones, de manera proporcional a la forma y el tamaño de las partículas, y mediante un fotodetector se puede cuantificar la cantidad de luz dispersada. Sin embargo, las partículas dispersas no se encuentran estáticas en un sitio, sino que ven su posición alterada debido al movimiento browniano en la dispersión.⁷¹

Esquema 5. Sistema de determinación de tamaño de partícula por DLS.⁷¹

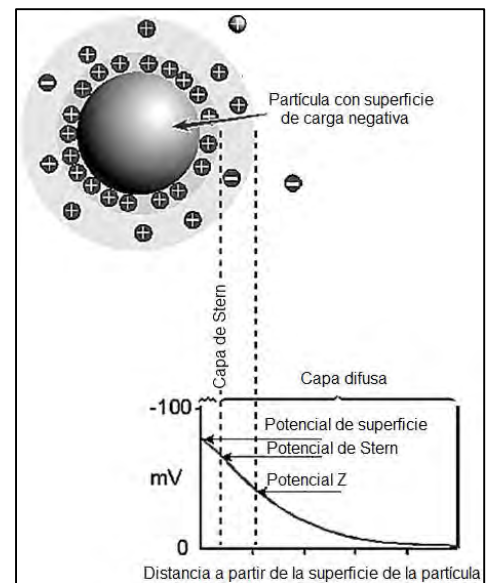
1.8.4. Potencial Z

La distribución de cargas en la superficie de una partícula de acuerdo a las condiciones del medio de dispersión. Las fuerzas de atracción entre las partículas y los contraiones se ven mediadas de manera inversamente proporcional a la distancia entre ellos. En las inmediaciones de las partículas existe una capa conformada por dos regiones (Las cargas de superficie de las partículas y sus contraiones), donde los iones se encuentran fuertemente

ligados, y se denomina capa de Stern. Al aumentar la distancia a partir de la partícula se encuentra una capa difusa en donde los iones y partículas forman una entidad estable, y cuando la partícula se mueve los iones dentro de esta se mueven junto con ella, y se denomina capa difusa. Una distancia pequeña entre las partículas y las capas de contraiones resultarán en la agregación de partículas, mientras que una distancia mayor favorecerá la dispersión. La composición de la doble capa eléctrica, así como la dependencia del potencial Z con respecto a la distancia de la superficie de la partícula se representan en el esquema 6.

El potencial eléctrico que se genera por esta distribución de cargas en la doble capa eléctrica se denomina potencial Z, y este posee signo dependiente de la naturaleza aniónica o catiónica de los iones adsorbidos. La magnitud del potencial es un indicador de la estabilidad del sistema disperso, y se considera que un valor <-25 mV o >25 mV indican la presencia de un sistema disperso estable debido a la repulsión entre partículas impide su agregación permanente en un sólido denominado "cake".⁶⁸

Esquema 6. Representación del potencial Z.



1.8.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)

En una microscopía electrónica tradicional la capacidad de aumento máximo de una imagen es de alrededor de 1000x. Para mejorar la resolución (y aumentar la capacidad de aumento de imágenes) es necesario reducir la longitud de onda de la radiación incidente; esto es posible mediante la microscopía electrónica donde la aceleración de los electrones de entre 2 y 1000 keV permite obtener longitudes de onda de hasta 0.0009 nm.

Para ello se encuentran las modalidades de transmisión de electrones, utilizada en especímenes de grosor moderado que permiten la transmisión de electrones carente de absorción de los mismos (TEM), y el barrido de electrones (SEM), para especímenes de mayor grosor donde no se transmiten electrones a través del material, sino que se obtiene información de las partículas que se encuentran en la superficie.⁷² Las características que pueden ser determinadas mediante estas técnicas son:

- Microscopía de barrido de electrones (SEM)

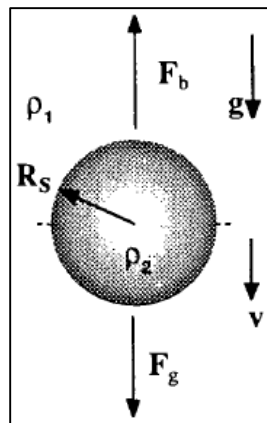
La microscopía SEM es una técnica no destructiva de análisis, que permite analizar muestras de hasta 200 μm para obtener información de la topografía de superficie, la estructura cristalina, la composición química y el comportamiento eléctrico de los especímenes (hasta un grosor de 1 μm), obteniendo una resolución de hasta 1000000x.⁷²

- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía TEM es una técnica que hace incidir un haz de electrones que es capaz de atravesar muestras con un grosor menor a 500 nm, donde el patrón de difracción de electrones es computarizado y transformado a una imagen mediante lentes magnéticas. Las imágenes se pueden producir a partir de los electrones difractados (imágenes de campo oscuro) o a partir de los electrones que lograron atravesar la muestra sin interacción (imágenes de campo claro) y permiten obtener información sobre la estructura cristalina, y la composición química de la muestra con una mayor resolución que la microscopía SEM.⁷³

1.8.6. Sedimentación

La sedimentación afecta muchos de los fenómenos de coloides. La sedimentación ocurre debido a la influencia de la gravedad sobre las partículas, y de manera considerablemente más rápida, en una centrifugación. Las fuerzas involucradas en una partícula de volumen V y de densidad ρ_2 que está sumergido en un fluido de densidad ρ_1 .



Esquema 7. Representación de las fuerzas que actúan sobre una partícula esférica sumergida en un fluido.

La partícula experimenta una fuerza F_g debido a los efectos de la gravedad, de signo positivo en dirección inferior, al mismo tiempo las fuerzas de flotación F_b actúan en dirección opuesta.

$$F_{neta} = F_g - F_b = V(\rho_2 - \rho_1)g \quad \text{Ecuación 8}$$

Como resultado de estas fuerzas la partícula descenderá a través del fluido si F_{neta} tiene el mismo signo que la fuerza de gravedad (g), es decir, ocurrirá la sedimentación si $\rho_2 > \rho_1$. Si este proceso ocurre en sentido inverso, ocurrirá la cremación si $\rho_1 > \rho_2$.⁷⁴

1.8.7. Centrifugación

El análisis de física elemental demuestra que una partícula que circula a través de una trayectoria de radio r a una velocidad angular ω (en radianes por segundo) está sujeta a una aceleración en la dirección radial igual a $\omega^2 r$. En una revolución existen 2π radianes, por lo que ω equivale al número de revoluciones por segundo (rps) veces 2π , o al número de revoluciones por minuto (rpm) veces el radio $2\pi/60$. Es por este fenómeno que a través de una centrifugadora se pueden producir aceleraciones mayores a la aceleración gravitatoria.⁷⁴

1.8.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica altamente sensible que estudia las propiedades térmicas de diversos sistemas, principalmente se utiliza para determinar la energía necesaria para llegar a la temperatura de transición de fase y los cambios conformacionales y permiten cuantificar su dependencia a la temperatura. El análisis por DSC permite determinar las propiedades de proteínas, material genético, péptidos, lípidos, caracterizar los polimorfismos y determinar la pureza de fármacos, y distintas propiedades de materiales nanoparticulados. En el análisis de nanopartículas el análisis térmico puede ser utilizado para analizar la incorporación de fármacos a través de los cambios en la entalpía. Además, permite determinar la estabilidad y eficiencia de acoplamiento de fármacos en acarreadores nanoestructurados. En el diseño y síntesis de polímeros permite relacionar las propiedades mecánicas, las propiedades químicas y las propiedades térmicas con la longitud de cadena, la cantidad de grupos funcionales, y la cantidad de aditivos adicionados.⁷⁵

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que se conoce la relación entre el mejoramiento de la calidad y esperanza de vida de pacientes con neoplasias y las intervenciones en detección y tratamiento temprano, es posible reducir y controlar el desarrollo de cáncer aplicando estrategias de base científica destinadas a la prevención de la enfermedad. De detectarse de manera oportuna muchas neoplasias tienen grandes probabilidades de curarse, si se tratan de forma adecuada. La mortalidad por cáncer se ha visto reducida gracias a los esfuerzos en políticas públicas y el desarrollo tecnológico en materia de detección y tratamiento; sin embargo, es necesario seguir innovando en ambos aspectos para minimizar los efectos de esta enfermedad en la población.

El propósito de esta investigación fue el desarrollo de un sistema teragnóstico que permitiese obtener una mayor eficacia en la detección de tumores, para su uso en el diagnóstico por ultrasonido en modo B y la administración controlada de un fármaco antineoplásico. Se prepararon microburbujas poliméricas con inclusión de nanopartículas de magnetita con metotrexato adsorbido en superficie, y se comparó su eficacia como agente de contraste y como sistema terapéutico.

3. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar microburbujas poliméricas con inclusión de nanopartículas de magnetita y con metotrexato como fármaco modelo adsorbido en superficie, como posible tratamiento y sistema diagnóstico de neoplasias.

3.1. Objetivos particulares

- Sintetizar nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) y llevar a cabo su recubrimiento en ácido oleico por el método de coprecipitación.
- Caracterizar las nanopartículas magnéticas determinando su estructura cristalina mediante la técnica de difracción de rayos X de polvos, su estabilidad mediante potencial Z, y su morfología microscopía electrónica de transmisión.
- Sintetizar sistemas de diagnóstico basados en microburbujas magnéticas por el método de doble emulsión.
- Caracterizar los sistemas generados determinando su tamaño mediante dispersión dinámica de luz (DLS), cuantificando la cantidad de nanopartículas magnéticas incluidas en su interior mediante espectroscopia atómica, su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), así como su evaluación como sistemas de diagnóstico en ultrasonido en modo B y como sistema terapéutico mediante la medición de adsorción superficial de fármaco y como sistemas de liberación.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Es posible preparar microburbujas poliméricas con una doble capa de ácido poliláctico y alcohol polivinílico que contengan inclusiones de magnetita, para llevar a cabo el acoplamiento de metotrexato en su superficie. Este sistema resultará en un depósito de fármaco, sensible a estímulos magnéticos, con propiedades de amplificación ecogénica, y de tamaño micrométrico; que puedan ser utilizadas como agente de contraste del ultrasonido y como un sistema de liberación modificada.

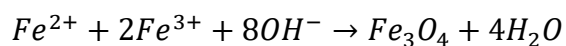
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Materiales

Cloruro ferroso tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pureza >99%), cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pureza $\geq 99\%$), ácido oleico (pureza 90%), Ácido poli-(L)-láctico (PLA), alcohol polivinílico (PVA) (pureza $\geq 99\%$, Mn 50,000) adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA); hidróxido de sodio (NaOH pureza $\geq 95\%$), acetona (pureza $\geq 95\%$) adquirida de Distribuidora Química ALVI (Edo. de México, Méx.); cloruro de metileno (CH_2Cl_2 , pureza 99%) adquirido de J.T. Baker, agua desionizada obtenida de un equipo Nanopure Diamond (Barnstead®), metotrexato Laboratorios Pisa (Ciudad de México, Méx.)

5.2. Síntesis de NPMs hidrofóbicas

Para la síntesis de NPMs de óxidos de Hierro se llevó a cabo una coprecipitación con temperatura controlada. Se agregaron $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.184 g) y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.50 g) en agua (9.3 mL) con una atmósfera de N_2 , la mezcla de reacción fue llevada a una temperatura de 90°C ; al llegar a la temperatura de reacción se adicionó NaOH 2M (3.7 mL) y ácido oleico (0.4 mL); durante la adición se formó un precipitado negro, que fue aislado mediante decantación magnética. El precipitado se lavó dos veces mediante sonicación en acetona para remover el exceso de ácido oleico, y fue secado a temperatura ambiente durante una noche. Se tomó una muestra de 90.0 mg del precipitado suspendiéndose en cloruro de metileno (50 mL) formando un stock de NPMs (NPMs-1). La reacción que se lleva a cabo es:



Así mismo, como referencia se sintetizó magnetita hidrofílica mediante la misma técnica sin adición de ácido oleico, y realizando lavados en agua desionizada previa a su secado durante una noche.

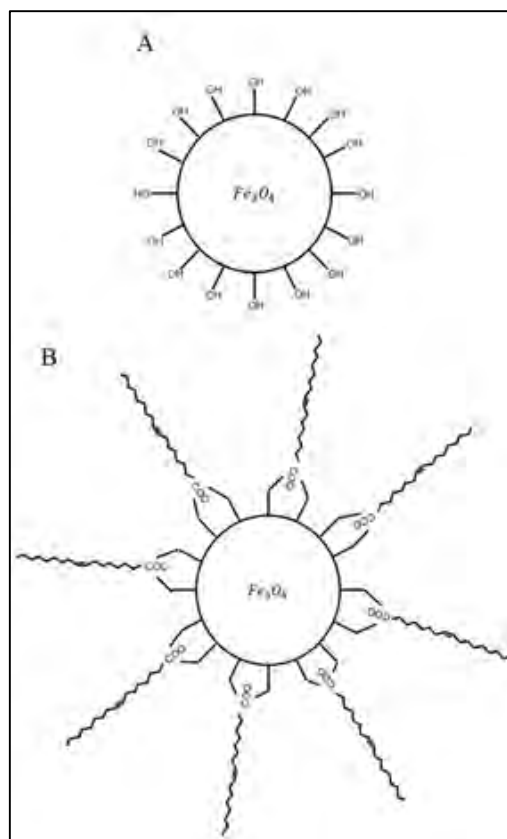


Figura 13. Representación de la superficie de las NPM's hidrofílicas(A) y NPM's hidrofóbicas(B) considerando los resultados obtenidos por Zhang *et al.*⁴¹

5.3. Caracterización de NPMs hidrofóbicas

5.3.1. Tamaño de partícula por TEM

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

5.3.2. Evaluación de la dispersabilidad

La síntesis de microburbujas magnéticas por el método de doble emulsión requiere de nanopartículas magnéticas dispersables en soluciones orgánicas por ello es necesario conocer la distribución que estas tienen en agua y en un disolvente orgánico no miscible, por ello se colocó una pequeña cantidad de cada muestra en un vial que contuviese agua desionizada ($\rho=1.0 \text{ g/cm}^3$) y CH_2Cl_2 ($\rho=1.33 \text{ g/cm}^3$), y se realizó una inspección visual sobre la fase en que se encuentra dispersa,

5.3.3. Espectroscopía de infrarrojo de nanopartículas magnéticas

La estructura química de las nanopartículas magnéticas permite elucidar las interacciones que existen entre la superficie de las nanopartículas y un recubrimiento, así como las interacciones con el medio en que se encuentren dispersas, su determinación se realizó utilizando un equipo Espectrofotómetro de FTIR / FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer de 4000 a 450 cm^{-1} .

5.3.4. Potencial Z

Para conocer la estabilidad de las dispersiones de nanopartículas magnéticas se llevó a cabo la determinación de su potencial Z en agua. La determinación se realizó utilizando un equipo Zetasizer Nano Zen 3600 en una celda de vidrio en las muestras de magnetita hidrofílica dispersada en agua destilada ($\text{pH } 7.0 \pm 0.1$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y la muestra de magnetita hidrofóbica dispersada en agua con agitación manual de la celda entre cada medición para evitar su posible deposición en el fondo de la celda debido a su rápida agregación en un medio acuoso.

5.3.5. Difracción de Rayos X de Polvo

Para determinar la estructura cristalina y llevar a cabo la comparación con una referencia bibliográfica de nanopartículas de magnetita se llevó a cabo el análisis de difracción de rayos X de polvos mediante un difractómetro de rayos X, modelo D8 ADVANCE DAVINCI en modo Theta-Theta.

5.4. Síntesis de sistemas coloidales poliméricos e híbridos

5.4.1. Síntesis de microesferas poliméricas (CB)

La síntesis de microesferas poliméricas con una capa externa de PVA y una capa interna de PLA se llevó a cabo por medio de un proceso de doble emulsión con deposición interfacial (w/o/w), debido a la buena biocompatibilidad y biodegradabilidad que presentan ambos materiales. Se preparó una solución orgánica de PLA (0.50 g) en cloruro de metileno (10.0mL). Para generar las esferas de la primera emulsión se adicionó agua desionizada (1.0 mL) y Span 80 (0.5 mL) a la solución orgánica y fue sonicada (500 Watts, 20% Amplitud, Frecuencia de 20 kHz) por 5 min. La primera emulsión fue adicionada a una solución (10.0 mL) de PVA 5% (m/v) que incluía Tween 80 (0.5 mL) y fue mezclada mecánicamente durante 2 horas; para formar una emulsión con esferas de dos capas sin el disolvente orgánico.³

5.4.2. Síntesis de microburbujas poliméricas (PB)

La síntesis de microburbujas poliméricas con una capa externa de PVA y una capa interna de PLA se llevó a cabo por medio de un proceso de doble emulsión con deposición interfacial (w/o/w). Se preparó una solución orgánica de PLA (0.50 g) en cloruro de metileno (10.0mL). Para generar las burbujas de la primera emulsión se adicionó agua desionizada (1.0 mL) y Span 80 (0.5 mL) a la solución orgánica y fue sonicada (500 Watts, 20% Amplitud, Frecuencia de 20 kHz) con una inyección constante de N₂ por 5 min. La primera emulsión fue adicionada a una solución (10.0 mL) de PVA 5% (m/v) que incluía Tween 80 (0.5 mL) y fue mezclada mecánicamente durante 2 horas; para formar una emulsión con burbujas de dos capas sin el disolvente orgánico.³

5.4.3. Síntesis de microburbujas magnéticas (MB)

La síntesis de microburbujas magnéticas con una capa externa de PVA y una capa interna de PLA se llevó a cabo por medio de un proceso de doble emulsión con deposición interfacial (w/o/w). Se preparó una solución orgánica con la solución NPMs-1 (1.0 mL), y PLA (0.50 g) en cloruro de metileno (10.0mL). Para generar las burbujas de la primera emulsión se adicionó agua desionizada (1.0 mL) y Span 80 (0.5 mL) a la solución orgánica y fue sonicada (500 Watts, 20% Amplitud, Frecuencia de 20 kHz) con una inyección constante de N₂ por 5 min. Las microburbujas sin NPMs fueron separadas mediante aislamiento magnético. La primera emulsión fue adicionada a una solución (10.0 mL) de PVA 5% (m/v) que incluía

Tween 80 (0.5 mL) y fue mezclada mecánicamente durante 2 horas; para formar una emulsión con burbujas de dos capas sin el disolvente orgánico.³

5.5. Aislamiento de partículas por tamaño mediante centrifugación diferencial

Para disminuir la dispersión de tamaños entre las partículas generadas; llevó a cabo el uso de la centrifugación diferencial para el aislamiento. Para ello se colocaron las dispersiones en una centrifugadora Sorvall Primo R, y se llevó a cabo la centrifugación, una vez separado el botón de la dispersión se guardaba el sobrenadante y el botón se resuspendió en un volumen de 30 mL de solución PBS filtrada mediante un filtro millipore® de 0.22 µm. La fuerza en que se llevó a cabo la separación se describe en los intervalos de la tabla 7, considerando el sobrenadante obtenido; sin embargo, en las pruebas posteriores solo fue utilizada la fracción A de la centrifugación diferencial debido a sus características de alta ecogenicidad y una mayor área superficial en comparación con las otras fracciones.⁷⁶

Tabla 7. Aislamiento de partículas por centrifugación diferencial.⁷⁶

Fracción	Fuerza centrífuga relativa	Tiempo (min)	Tamaño obtenido (µm)
A	30	1	>10
B	70	1	6-10
C	160	1	4-6
D	270	1	3
E	300	10	1-2

5.6. Determinación de tamaño de partícula por DLS

Se llevó a cabo la comparación de los tres sistemas generados, para realizar la medición fue utilizado un equipo Mastersizer 3000 con una unidad de dispersión húmeda.

5.7. Liofilización de los sistemas sintetizados

Para llevar a cabo las siguientes pruebas se eliminó el agua de 1 mL de muestra mediante liofilización, utilizando N₂ líquido para llevar a cabo la precongelación, y la respectiva liofilización a -35°C y presión ≤ a 0.035 mbar, por 24 horas conservando las muestras en atmósfera de N₂ para ser conservadas a 4°C durante el resto de los experimentos.

5.8. Cuantificación de NPMs en microburbujas

Para determinar la cantidad de magnetita en la capa interna de MB, para llevar a cabo la cuantificación de magnetita se llevó a cabo un estudio de espectroscopia atómica, con atomización por ICP-Masas en CH₂Cl₂.

5.9. Gradiente de densidad

Para determinar si los sistemas obtenidos contaban con una cavidad en su interior se comparó la densidad de CB, PB y MB se prepararon soluciones de diversas concentraciones de sacarosa. Para ello se tomó 1 mL de la fracción A de la centrifugación diferencial de cada uno de los sistemas sintetizados, y fue colocado en 1 mL de cada una de las soluciones de sacarosa y se evaluó su posición relativa pasada 1 hora. La fracción elegida permite la comparación visual de los tres sistemas, y las concentraciones de sacarosa se eligieron al analizar un espectro más amplio de concentraciones, reportando aquellas donde se observaban mayores diferencias.

5.10. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se realizó la evaluación térmica de los sistemas para determinar los efectos en la disposición estructural de los polímeros debidas al método de síntesis y de la inclusión de magnetita en la fabricación de microburbujas magnéticas, mediante un estudio de DSC cíclico de 25-60°C, de 60-25°C y de 25-60°C, el cual fue llevado a cabo en la USAII en un equipo DSC1 Mettler Toledo a 2°C/min utilizando PLA y PVA con pureza $\geq 99\%$ como referencia.

5.11. Evaluación de los sistemas terapéuticos *in vitro*

5.11.1. Adsorción de fármaco modelo antineoplásico (metotrexato)

Para llevar a cabo la inclusión de fármaco en el sistema teragnóstico se realizó la adsorción de metotrexato en disolución de acuosa a temperatura constante. El estudio de adsorción se realizó por triplicado colocando una masa aproximada de 5 mg de cada sistema sintetizado en viales con 10 mL de solución de metotrexato, a 25°C y con agitación magnética a 600 rpm durante 24 horas, con una concentración de metotrexato en el medio de acuerdo a la tabla 8:

Tabla 8. Concentraciones de metotrexato utilizadas para la evaluación de la adsorción.

Muestra	Concentración de metotrexato (% m/v)
1	0.5
2	0.4
3	0.3
4	0.2
5	0.1
6	0.05

Para evaluar la isoterma descrita en el proceso de adsorción de metotrexato en los tres sistemas se realizó un seguimiento de la cinética de adsorción de metotrexato para las

muestras en una solución de metotrexato (5% m/v). De los datos obtenidos se determinó un tiempo óptimo de 6 horas para realizar la separación de los sistemas del medio con fármaco, para llevar a cabo su liofilización previa al estudio de desorción. Se realizó la cuantificación de metotrexato a lo largo del estudio mediante espectroscopia UV a longitud de onda de 307 nm, midiendo la cantidad no adsorbida en el medio.

5.11.2. Liberación de fármaco modelo antineoplásico (metotrexato)

El estudio de liberación se realizó por triplicado en solución PBS con pH 7.4 a 37°C con agitación magnética constante, colocando por vial 5 mg de cada sistema en 10 mL de medio. Para determinar la cantidad de fármaco liberado fueron tomadas muestras de 200 µL durante 36 horas (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 180, 240, 360, 720, 1440, 1800, y 2160 min) con reposición de volumen a cada muestreo, considerando condiciones sink para la solubilidad de metotrexato de 2600mg/L; finalmente se realizó la cuantificación de metotrexato mediante espectroscopia UV a longitud de onda de 307 nm. Los datos obtenidos se analizaron mediante el macro DDSolver 1.0 para Excel para analizar el modelo de liberación más adecuado para los sistemas.⁷⁷ Para llevar a cabo la selección del modelo se considera el coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1, la menor suma de cuadrados (SSR), el mayor criterio de selección del modelo (MSC), y el menor criterio de Akaike (AIC).³²

5.12. Evaluación de los sistemas como sistemas diagnósticos *in vitro*

Para llevar a cabo la evaluación de la respuesta ecogénica de los sistemas generados se utilizó como tejido modelo el fruto de *Vitis vinifera*, y como medio de propagación una dispersión de gelatina al 5%. Se utilizó un sistema ecográfico Sonosite Edge ® (Fujifilm-SonoSite Inc, Bothell, WA) con un transductor lineal HFL-38X a 13 MHz.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Síntesis y caracterización de NPM's.

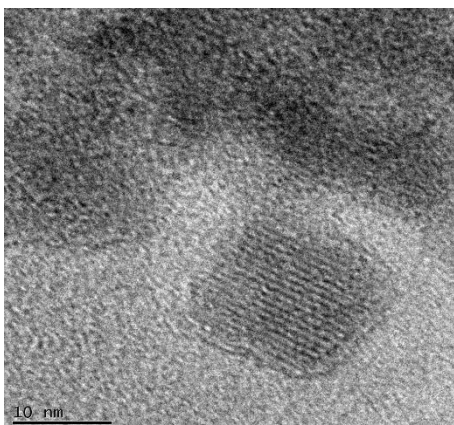


Figura 14. Micrografía TEM de Magnetita hidrofóbica.

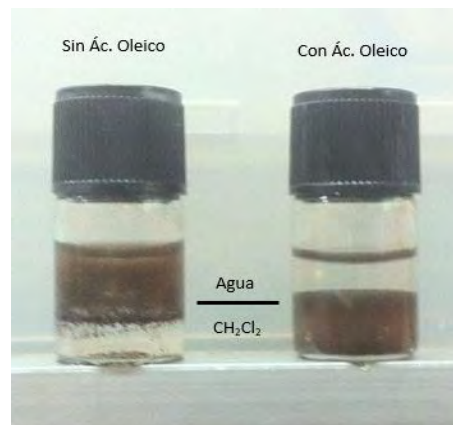


Figura 15. Comparación de NPM's en presencia o ausencia de ácido oleico en su síntesis.

Los resultados de la microscopía TEM de la figura 14 muestran la formación de partículas de 16.05 ± 4.05 nm, lo que concuerda con lo esperado por el método de síntesis reportado por M. Ahmad *et. al*⁴⁸ para la obtención de nanopartículas por método de coprecipitación. En la figura 13 puede observarse como las nanopartículas formadas muestran sus propiedades superficiales hidrofóbicas, ya que las nanopartículas muestran preferencia por la fase orgánica no miscible con el agua como lo reportado por Zhang *et. al*⁴¹, mientras que las nanopartículas hidrofílicas afinidad únicamente por el agua.

Se realizaron estudios de FTIR de ácido oleico para verificar y comprender el mecanismo de adsorción del ácido en la superficie de las nanopartículas magnéticas hidrofóbicas mediante la comparación con las nanopartículas hidrofílicas y el ácido oleico utilizado para su síntesis, los cuales corresponden a la figura 16. El espectro de absorción del ácido oleico muestra dos señales agudas en 2922 y 2852 cm^{-1} atribuidas al estiramiento asimétrico y el estiramiento simétrico de CH_2 respectivamente, estas señales también se encuentran en el espectro de las NPMs en 2919 y 2853 cm^{-1} . En el espectro del ácido oleico la señal a 1708 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del doble enlace del grupo carbonilo, junto con dos señales; una ancha en 1320 - 1200 cm^{-1} y otra más débil en 1440 - 1390 cm^{-1} , debido a la torsión y estiramiento del grupo carboxilo. La torsión de O-H del grupo carboxilo en el plano y fuera del mismo aparecen a 1461 y 934 cm^{-1} , respectivamente. En el espectro de NPMs la señal

asimétrica y la señal simétrica de estiramiento de $-CH_2-$ se desplazan a 2919 y 2853 cm^{-1} respectivamente. Las moléculas de ácido oleico se adsorbieron en la superficie del sólido, por lo que las señales características se desplazaron a un región de frecuencias menor a la indicada por la cadena hidrocarbonada.⁴¹ Este fenómeno sugiere la obtención de una monocapa en la superficie de las nanopartículas con un alto empaquetamiento de moléculas de adsorbato en estado cristalino. Es importante observar que la señal de estiramiento de C-O del grupo carboxilo presente a 1708 cm^{-1} en el espectro de ácido oléico se encuentra ausente en el espectro de las NPMs, y aparecen dos señales nuevas a 1561 y 1347 cm^{-1} en su lugar, siendo características de la vibración asimétrica ($\nu_{as} -COO^-$) y la vibración simétrica ($\nu_s -COO^-$). Este resultado se explica debido a que las secuencias de unión de los ácidos carboxílicos en la superficie de las nanopartículas fue una combinación de moléculas unidas de manera simétrica y de moléculas que se unieron con ángulo a la misma. Se demuestra una fuerte adsorción debido a la aparición de la señal a 1050 cm^{-1} del estiramiento C-O por un enlace sencillo.

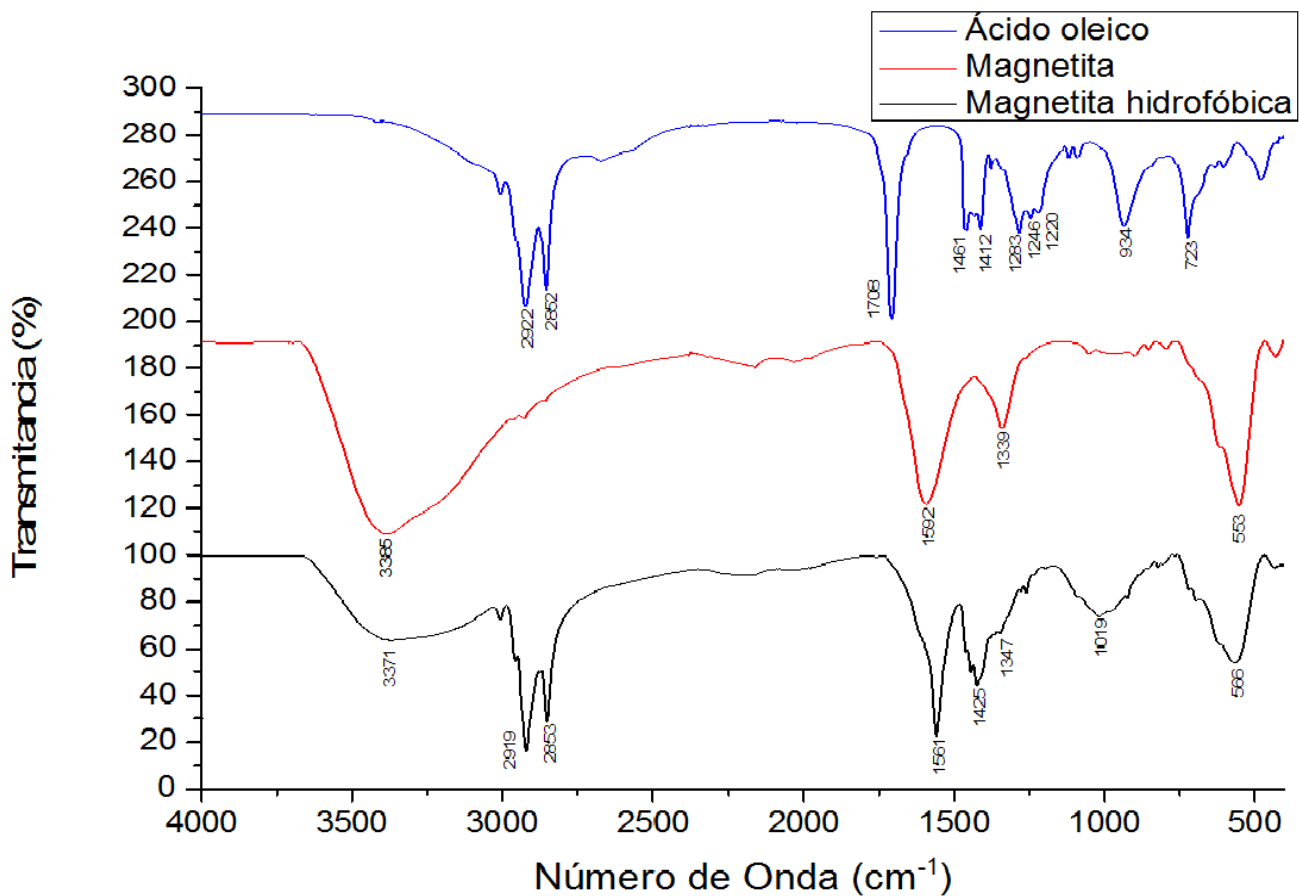
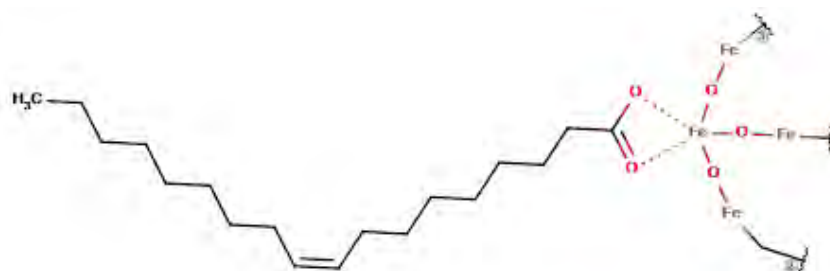


Figura 16. Espectro de FTIR para las NPMs de magnetita.

Tabla 9. Señales del espectro de FTIR de NPMs.

Material	Señal (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Atribución de señales
Ácido Oleico	2922	-CH ₂ -	Estiramiento asimétrico de -CH ₂ -
	2852	-CH ₂ -	Estiramiento asimétrico de -CH ₂ -
	1708	C=O	Estiramiento del carbonilo
	1461	-COOH	Torsión en el plano del dímero del carboxilo
	1412	C=O	Torsión/estiramiento del carboxilo
	1283	C=O	Torsión/estiramiento del carboxilo
	934	-COOH	Torsión fuera del plano del dímero del carboxilo
Magnetita	3385	O-H	Estiramiento del enlace O-H
NPM's	3371	O-H	Estiramiento del enlace O-H
	2919	-CH ₂ -	Estiramiento asimétrico de -CH ₂ -
	2853	-CH ₂ -	Estiramiento asimétrico de -CH ₂ -
	1561	-COO ⁻	Vibración asimétrica (u _{as} -COO ⁻)
	1347	-COO ⁻	Vibración simétrica (u _s -COO ⁻)
	1019	C-O	Estiramiento de enlace sencillo C-O

La tabla 9 resume las señales obtenidas, demostrando la quimisorción de ácido oléico en la superficie de magnetita, lo que es consistente con los resultados obtenidos por medio del análisis de la dispersabilidad. Estos resultados confirman la obtención de nanopartículas recubiertas por ácido oléico, lo cual corresponde a lo reportado por Zhang *et al*⁴¹, mismos que proponen la interacción del ácido oleico con magnetita según el esquema 8:



Esquema 8. Interacción de quelato bidentado entre el grupo -COO⁻ del ácido oleico y los átomos de Fe.⁴¹

Se llevaron a cabo estudios de potencial zeta de ambos tipos de partículas para determinar su estabilidad cinética en suspensión, mismos que se observan en las figuras 17 y 18. Como se puede ver en las hidrofílicas el potencial es -25.3 ± 0.503 mV lo que indica la adsorción de iones negativos a la capa de Stern a una distancia que permite la rápida agregación⁶⁸ y en

las hidrofóbicas el potencial es 23.6 ± 3.26 mV, lo que indica la adsorción de iones positivos a la capa de Stern a una distancia que permite la rápida agregación.⁶⁸

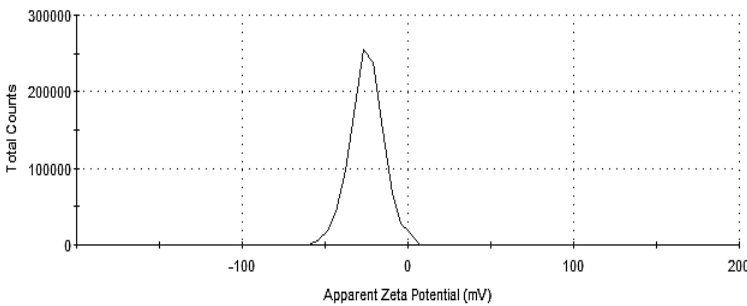


Figura 17. Distribución de potencial Z para las nanopartículas magnéticas hidrofílicas en agua destilada.

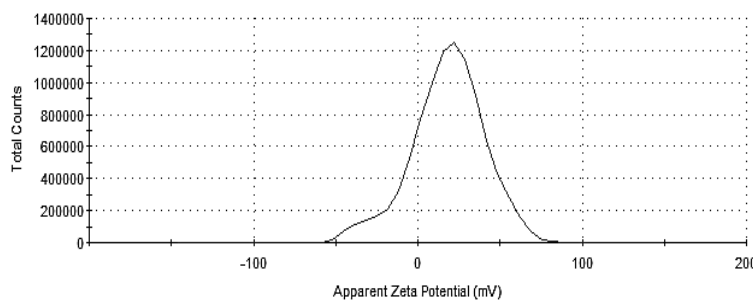


Figura 18. Distribución de potencial Z para las nanopartículas magnéticas hidrofóbicas en agua destilada.

El análisis de la distribución de potencial Z de las partículas muestra que ambos sistemas tienden a flocular de manera rápida, fenómeno que concuerda con lo observado visualmente., adicionalmente al analizar los valores de potencial Z se observa un cambio no solo en la intensidad del mismo, sino en la carga entre las nanopartículas hidrofóbicas e hidrofílicas. Este fenómeno puede ser explicado al analizar la estructura de la superficie de las nanopartículas. En el caso de las nanopartículas hidrofílicas, la superficie contiene una gran cantidad de grupos hidroxilo que atraen cationes a la capa de Stern y a su vez atraen aniones como contraiones para completar la capa difusa (por lo que se obtiene un signo negativo), en cambio el recubrimiento con ácido oleico disminuye la cantidad de grupos hidroxilo disponibles, y por asociación de las cadenas hidrocarbonadas adsorbidas con las cadenas hidrocarbonadas de ácido oleico libre es probable que los grupos carboxilos sean los que estén al exterior de la capa de Stern, atrayendo cationes como contraiones para completar la capa difusa.⁷⁸ Los resultados obtenidos son consistentes con los resultados de la evaluación de la dispersabilidad y de IR por lo que se considera se obtuvieron nanopartículas de magnetita con ácido oleico quimisorbido en superficie, y su dispersión en agua queda representada en la figura 19:

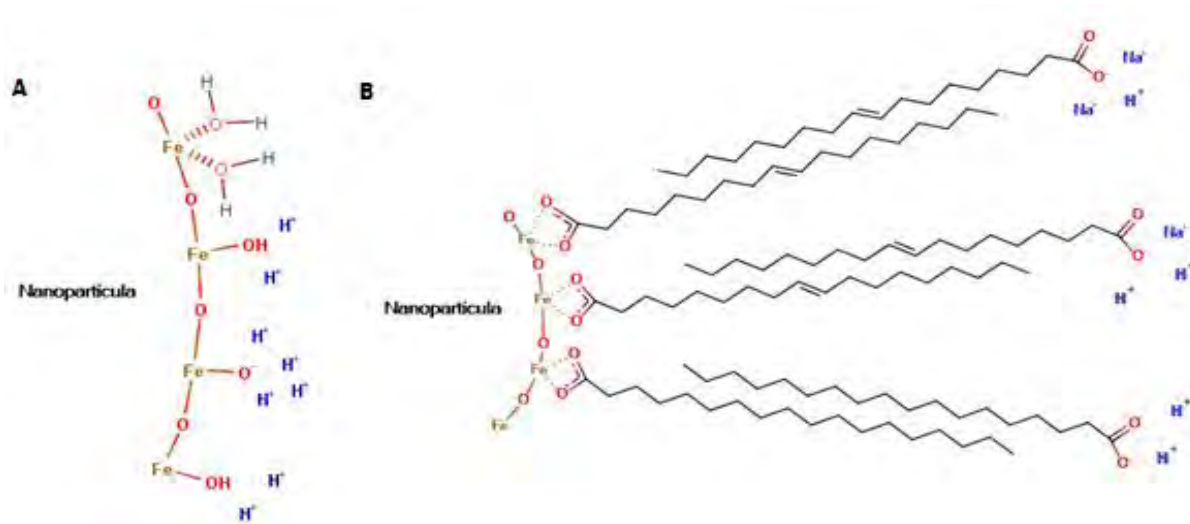


Figura 19. Representación de la adsorción de iones en superficie de las nanopartículas hidrofílicas (A) y de las partículas hidrofóbicas (B).

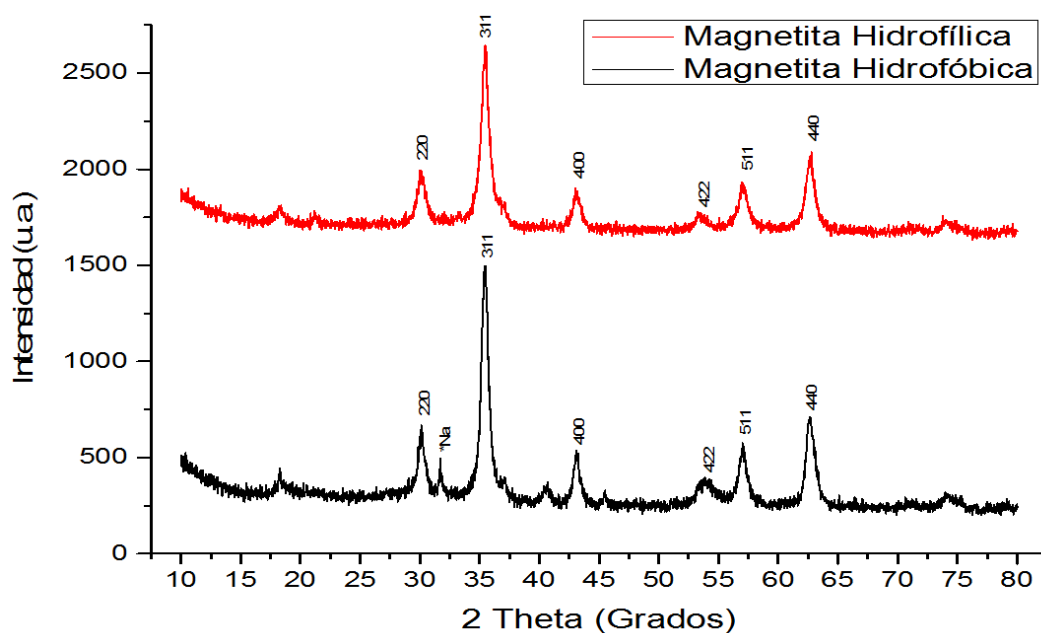


Figura 20. Difracción comparativa de rayos X de polvos en NPMs de magnetita.

Los resultados presentados en los difractogramas de rayos X muestran una mayor señal a 35.5° asociada al plano (311) y señales (220), (311), (400), (422), (511) y (440) características de una celda unitaria cúbica.⁴⁷ La señal en que difieren ambos difractogramas es una asociada al Na, esto puede ser explicado debido a que mientras que la magnetita hidrofílica es lavada con agua (un disolvente de los cationes Na^+) la magnetita hidrofóbica es lavada con acetona, lo que impide llevar a cabo la eliminación de Na^+ .

La comparación de síntesis en cuanto a la presencia o ausencia de ácido oléico muestra una diferencia en las características de dispersión en solventes polares y no polares, siendo necesario el ácido oleico para lograr su dispersión en diclorometano para su posterior uso en la elaboración de las microburbujas.

6.2. Síntesis y caracterización de sistemas coloidales poliméricos e híbridos

Se llevó a cabo la síntesis de microburbujas poliméricas, con y sin nanopartículas magnéticas, así como la síntesis de microesferas poliméricas como referencia.

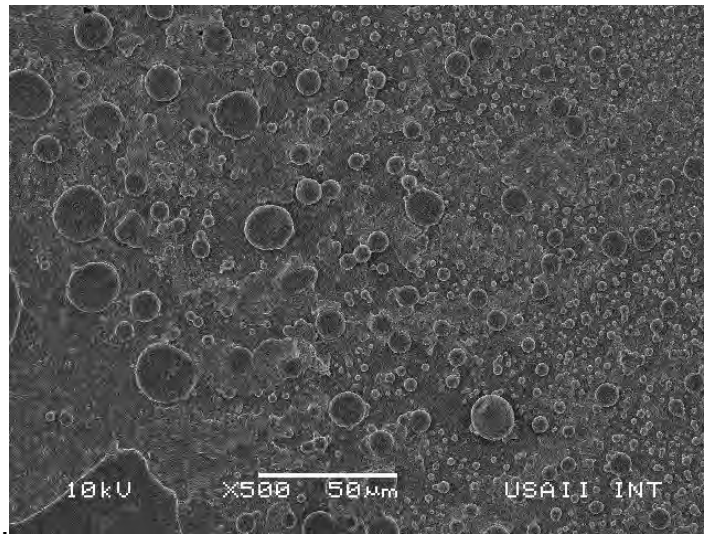


Figura 21. Micrografía SEM de microburbujas magnéticas antes de su separación mediante centrifugación diferencial.

La figura 22 muestra la distribución de tamaño de partículas para las microesferas poliméricas de $9.7 \pm 0.119 \mu\text{m}$, para las microburbujas poliméricas de $10.4 \pm 0.118 \mu\text{m}$ y para las microburbujas magnéticas de $11.4 \pm 0.299 \mu\text{m}$ para la fracción A de la centrifugación diferencial descrita en el apartado 5.5.

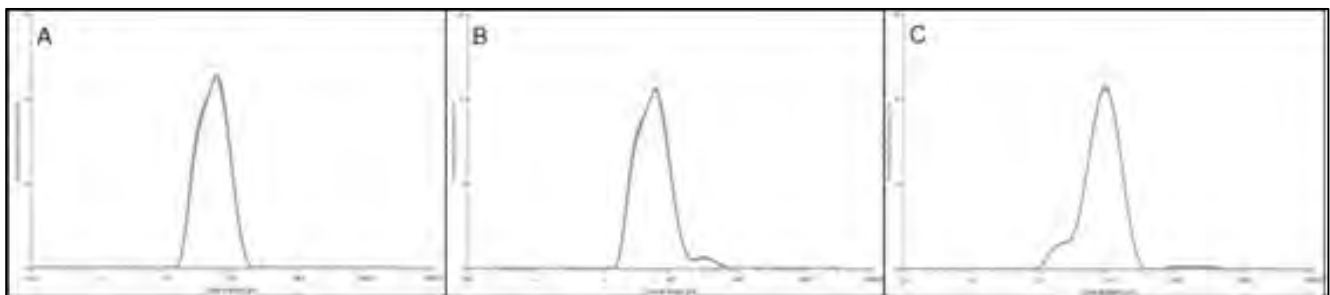


Figura 22. Distribución de tamaño de partícula de Microesferas Poliméricas (A), Microburbujas Poliméricas (B), y Microburbujas Magnéticas (C) fracción A.

Los resultados de la distribución de tamaño de partícula de la figura 22 muestran un aumento en el tamaño de 0.7 μm cuando se realiza la inyección de N_2 al comparar las microburbujas poliméricas con las microesferas poliméricas, así como un aumento en el tamaño de 1 μm cuando se agregan NPMs hidrofóbicas, durante la síntesis de la primera emulsión, al comparar las microburbujas magnéticas y las microburbujas poliméricas. Para explicar este fenómeno es necesario considerar a las microburbujas como sistemas liofóbicos, por lo que su comportamiento puede ser caracterizado como el de los sistemas coloidales.

En un sistema coloidal se define a la tensión interfacial como el trabajo necesario para la creación de una unidad de área en la interfase, por lo que el trabajo necesario para incrementar la superficie del sistema se define como $dw = \gamma dA$, y el trabajo del sistema para disminuir la superficie del sistema como $dw' = -\gamma dA$, es decir, una disminución en el área (un dA negativo) corresponde al trabajo realizado por el sistema, y un aumento del área requiere de trabajo ejercido sobre el sistema cuando se cambia su área (un dA positivo).

Considerando lo anterior la adición de NPMs recubiertas con ácido oleico aumenta la tensión interfacial de las burbujas generadas durante la primera emulsión, lo que resulta en un aumento en el trabajo realizado por las microburbujas magnéticas para la generación de una mayor superficie (mayor volumen) debido a las interacciones no covalentes de atracción que existen entre el PLA y el ácido oleico de las superficie de las NPMs, y las interacciones no covalentes de repulsión entre el ácido oleico de las superficie de las NPMs y la solución acuosa de PVA.

De acuerdo a la primera ley de la termodinámica, se define a la energía del sistema como:

$$dE = dq - dw \quad \text{Ecuación 9}$$

En donde dw es el trabajo realizado por el sistema y dq el calor absorbido por el sistema. El trabajo realizado por el sistema puede ser dividido en aquel relacionado a cambios en términos de presión-volumen y los independientes de los mismos como:

$$dw = dw_{pV} + dw_{ind\ pV} = pdV + dw_{ind\ pV} \quad \text{Ecuación 10}$$

La segunda ley de la termodinámica establece que para procesos reversibles

$$dq_{rev} = TdS \quad \text{Ecuación 11}$$

Y sustituyendo la ecuación 10 y la 11 en la ecuación 9 se obtiene que:

$$dE_{rev} = TdS - pdV - dw_{ind\ pV} \quad \text{Ecuación 12}$$

Y considerando la definición de la energía libre de Gibbs como:

$$G = H - TS = E + pV - TS \quad \text{Ecuación 13}$$

Y su forma diferencial como:

$$dG = dE + pdV + Vdp - TdS - SdT \quad \text{Ecuación 14}$$

Sustituyendo la ecuación 12 en la ecuación 14 se tiene que:

$$dG_{rev} = TdS - pdV - dw_{ind\ pV} + pdV + Vdp - TdS - SdT \quad \text{Ecuación 15}$$

Por lo que para un proceso reversible a temperatura y presión constantes:

$$dG = -dw_{ind\ pV} \quad \text{Ecuación 16}$$

Considerando que el proceso de aumento de área es independiente de la relación presión volumen entonces se considera que $-dw_{ind\ pV}$ corresponde al trabajo realizado por dw' es decir:

$$dG = \gamma dA \quad \text{Ecuación 17}$$

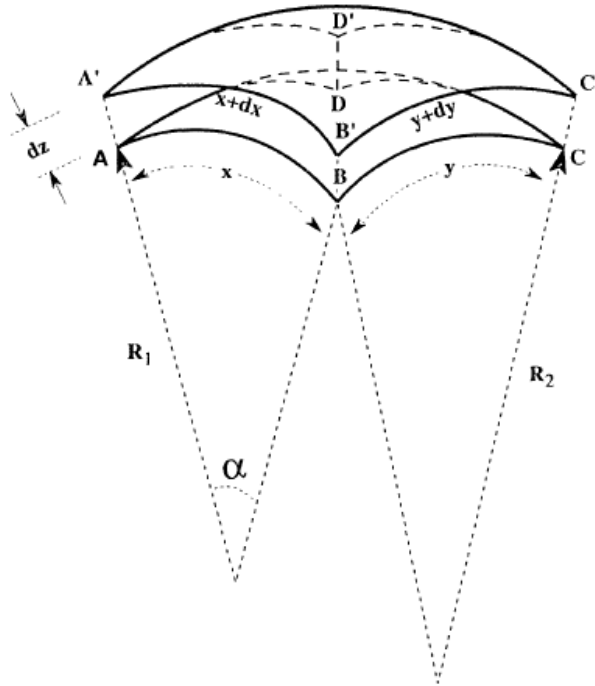
El crecimiento de los sistemas coloidales debido a la inyección de N_2 puede ser descrito mediante el modelo de Laplace, considerando que al observar la micrografía electrónica figura 18 se establece que las partículas son esféricas responden al modelo de Laplace para una superficie curva con un solo radio:

El modelo de Laplace considera una esfera con una superficie interfacial delimitada por el plano ABCD con un área delimitada por dos arcos (x , y) y radios de curvatura R_1 y R_2 , que aumenta de tamaño hasta el plano A'B'C'D', aumentando su radio de manera infinitesimal dz hasta alcanzar incrementando la longitud de los arcos a $x + dx$ y $y + dy$ (Incrementando el área). El trabajo requerido para que se lleve a cabo este proceso es debido a la diferencia de presión Δp a lo largo del área. El incremento del área está dado por:

$$dA = (x + dx)(y + dy) - xy = xdy + ydx + dxdy = xdy + ydx \quad \text{Ecuación 18}$$

Y la energía libre asociada al incremento del área está dado por γdA :

$$dG = \gamma(xdy + ydx) \quad \text{Ecuación 19}$$



Esquema 9. Representación del aumento de tamaño de una esfera por aumento de la presión.⁷⁴

El trabajo ocasionado por la relación presión-volumen es responsable de la expansión de la superficie y donde de manera ordinaria el trabajo es igual a $\Delta p dV$, donde dV es el cambio en el volumen por una fuerza motriz:

$$dw = \Delta p dV = \Delta p x y dz \quad \text{Ecuación 20}$$

Al considerar que $\Delta G = dw$, se igualan las ecuaciones 19 y 20 se obtiene que:

$$\gamma(xdy + ydx) = \Delta p x y dz \quad \text{Ecuación 21}$$

Considerando la longitud de los arcos x y $(x + \Delta x)$ con el ángulo α se tiene que $x = R_1 \alpha$ y $(x + \Delta x) = (R_1 + dz) \alpha$ por trigonometría se obtienen las siguientes proporciones:

$$\frac{x+dx}{R_1+dz} = \frac{x}{R_1} \quad \text{Ecuación 22}$$

Y:

$$\frac{y+dy}{R_2+dz} = \frac{y}{R_2} \quad \text{Ecuación 23}$$

Lo que se simplifica como:

$$\frac{dx}{xdz} = \frac{1}{R_1} \quad \text{Ecuación 24}$$

Sustituyendo las ecuaciones 23 y 24 en la ecuación 21 se obtiene la ecuación de Laplace:

$$\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad \text{Ecuación 25}$$

Y para una partícula esférica $R_1 = R_2 = R_s$ por lo que

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{R_s} \quad \text{Ecuación 26}$$

Considerando la inyección de aire como un aumento en la diferencia de presión (por la relación presión-volumen) y la incorporación de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas (recubiertas por ácidos grasos de cadena larga que poseen una gran tensión interfacial con el agua) entonces el trabajo realizado al expandir la superficie no miscible se demuestra en las ecuaciones 20 y 26.⁷⁴

Los resultados de distribución de tamaño de partícula por los métodos de microscopía electrónica y DLS muestran la obtención de poblaciones de los sistemas de tamaño variable según la fracción tomada una vez realizada la centrifugación diferencial. Estos resultados son consistentes con la premisa de de Feshitan *et al*⁷⁶. que describen a las microburbujas magnéticas como cápsulas llenas de gas (N₂), donde la fuerza de flotación debida a la diferencia de densidad ajusta el balance de fuerzas de tal modo que al aumentar el volumen de las esferas poliméricas por introducción de N₂ (un fluido de menor densidad) la fuerza de flotación produce que las microburbujas de menor tamaño (2 μm) requieran menor fuerza de centrifugación en comparación con las de mayor tamaño (10 μm).

Según lo reportado por la USAI mediante el análisis de espectroscopia atómica se encontró una concentración de 69.92 µg de Fe por mg de MB. Considerando la composición de magnetita como: Fe₃O₄ se determinó lo siguiente:

$$\frac{69.92 \mu\text{g de Fe}}{1 \text{ mg de MB}} \left(\frac{1 \mu\text{mol de Fe}}{55.845 \mu\text{g de Fe}} \right) \left(\frac{1 \mu\text{mol de Fe}_3\text{O}_4}{3 \mu\text{mol de Fe}} \right) \left(\frac{231.54 \mu\text{g de Fe}_3\text{O}_4}{1 \mu\text{mol de Fe}_3\text{O}_4} \right) = 96.63 \frac{\mu\text{g de Fe}_3\text{O}_4}{\text{mg de MB}}$$

Tabla 10. Gradiente de densidad para los sistemas generados.⁷⁹ Donde las flechas representan su posición relativa a lo largo del tubo.

Concentración de sacarosa (% m/v)	Densidad absoluta (g/dm ³)	Microesferas poliméricas (CB)	Microburbujas poliméricas (PB)	Microburbujas magnéticas (MB)
0	1.00000	↓	↓	↓
3	1.01173	↓	↓	↓
3.2	1.01252	↓	↓	↓
3.4	1.01331	↓	↓	↓
3.6	1.01410	↓	↕	↓
3.8	1.01490	↓	↑	↓
4	1.01569	↓	↑	↓
5	1.01968	↓	↑	↕
6	1.02369	↕	↑	↑
7	1.02773	↑	↑	↑

Distribución en el medio: ↓Sedimentación, ↑ Cremación y ↕ Distribución a lo largo del medio.

Al considerar el modelo de la microburbuja magnética y las variaciones del método de síntesis de los sistemas, la ausencia de inyección de N₂ durante la síntesis produce esferas sin cavidades que demuestran ser más densas que un sistema relativamente hueco, como las microburbujas poliméricas y microburbujas magnéticas. Sin embargo, la presencia de magnetita en la capa interna de las microburbujas magnéticas provee de masa que aumenta la densidad del sistema en comparación con las microburbujas poliméricas.

Para determinar los efectos del proceso de síntesis de microburbujas sobre la disposición estructural de los polímeros en la cubierta de la microburbuja se llevó a cabo la determinación de los termogramas de los tres sistemas generados, así como de los termogramas de PLA y PVA como referencias. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 21:

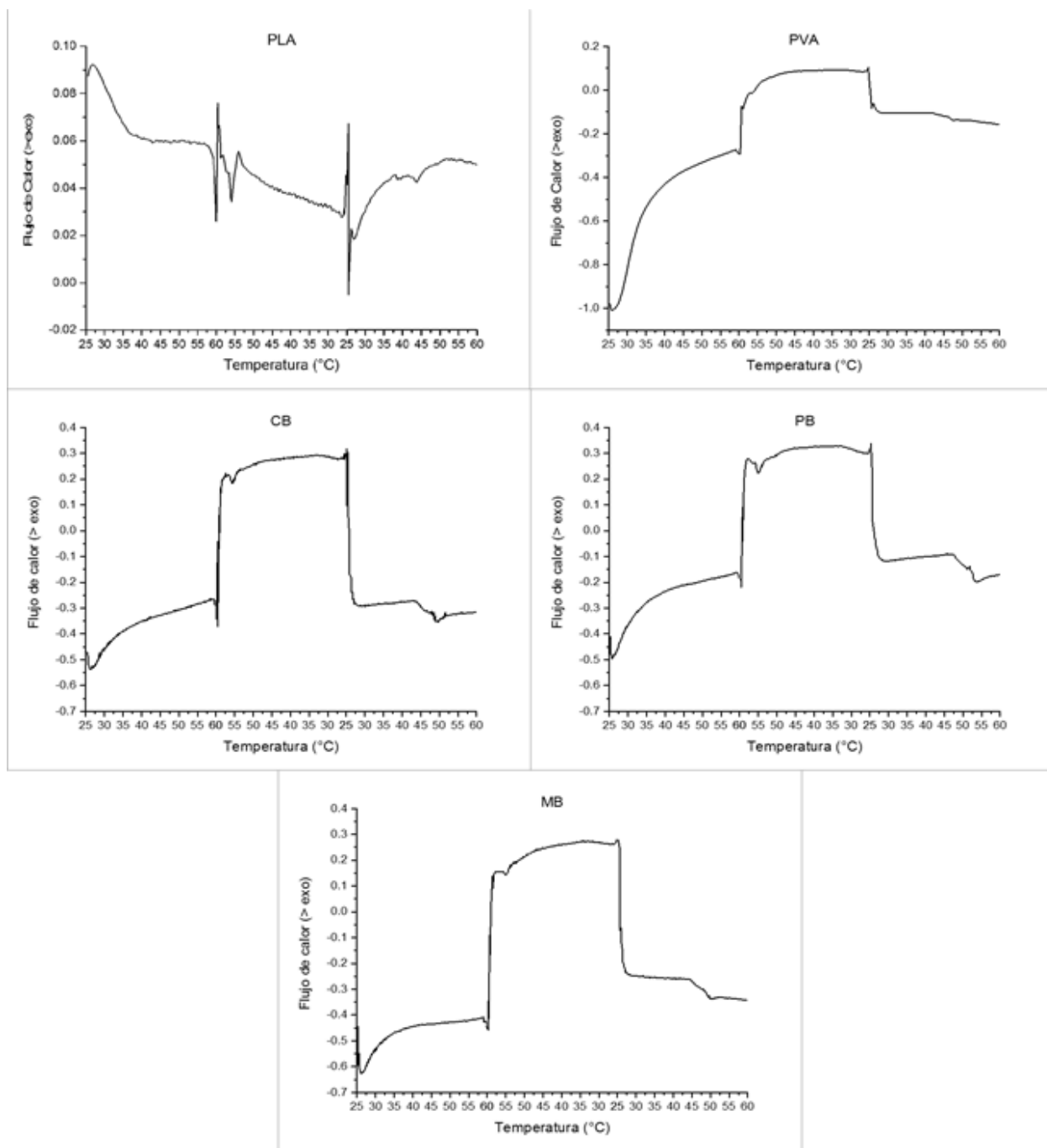


Figura 23. DSC de los sistemas generados.

En la figura 23 se muestran los DSC de los diferentes sistemas elaborados, así como los correspondientes a los polímeros, PLA y PVA, en un estudio de dos ciclos con la finalidad de eliminar la historia térmica del material y que realmente la transición medida sea independiente de la metodología usada. Es sabido que, la mayoría de los estudios por DSC, en los polímeros amorfos, se refieren a la determinación de la transición vítrea. El fenómeno de la transición vítrea es un proceso de no equilibrio y tiene un carácter cinético. Este hecho

se manifiesta en las medidas de DSC, donde la Tg que se obtiene depende de la historia térmica de la muestra, particularmente de la velocidad de enfriamiento que es la que determina el estado inicial vítreo del polímero que se va a estudiar, así como la de la posterior velocidad de calentamiento del aparato durante la obtención del termograma. Por ello, se realiza el experimento con dos corridas iniciales, una de calentamiento y otra de enfriamiento en condiciones iguales para cada sistema y así asegurar borrar la memoria térmica.

En los termogramas correspondientes a las microburbujas y microesferas se observa la misma transición que el PLA solo, lo que indica que no hay cambios significativos en su estructura durante el proceso. Parece que disminuye la Tg con las partes, lo que indicaría que aumenta la flexibilidad de las cadenas poliméricas, por el contrario, si aumenta la Tg hablaría de una disminución en la flexibilidad de las cadenas. Como es un efecto neto, es probable que debido a la baja cantidad de magnetita incluida no se vea un cambio significativo.

6.3. Evaluación de los sistemas como sistemas terapéuticos *in vitro*

Para llevar a cabo la evaluación como sistemas terapéuticos se llevó a cabo la adsorción de metotrexato a temperatura constante, utilizando soluciones acuosas de distintas concentraciones para cuantificar su deposición en el sistema mediante los modelos matemáticos de isotermas, así como su desorción en solución PBS pH 7.4 a 37°C simulando condiciones fisiológicas para cuantificar la liberación de fármaco mediante los modelos matemáticos de liberación. Para llevar a cabo la cuantificación de fármaco adsorbido o liberado del sistema se realizó una curva de calibración mediante espectroscopia UV-Visible, donde se determinó un pico máximo de absorción a 307 nm, además de llevar a cabo una evaluación de la estabilidad del espectro de absorción UV-Visible durante la adsorción de metotrexato durante 24 horas.

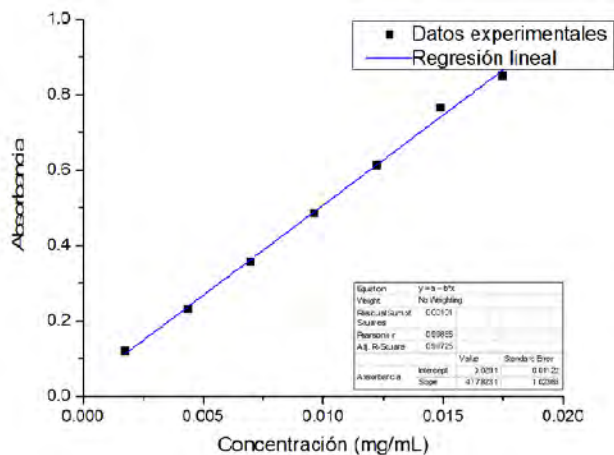


Figura 24. Curva de calibración de metotrexato mediante espectroscopia UV.

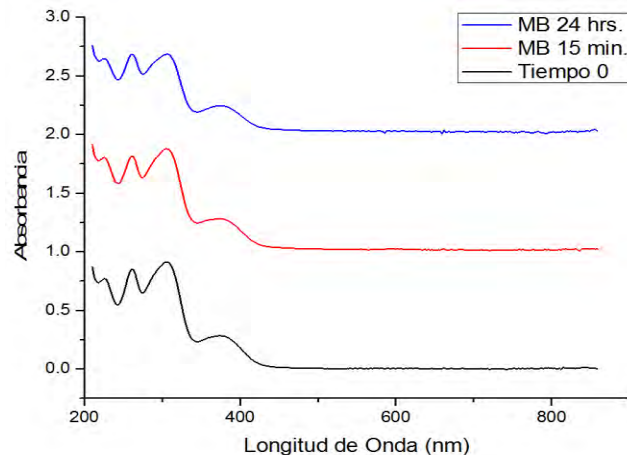


Figura 25. Evaluación de la estabilidad del espectro de absorción UV-Visible durante la adsorción de metotrexato.

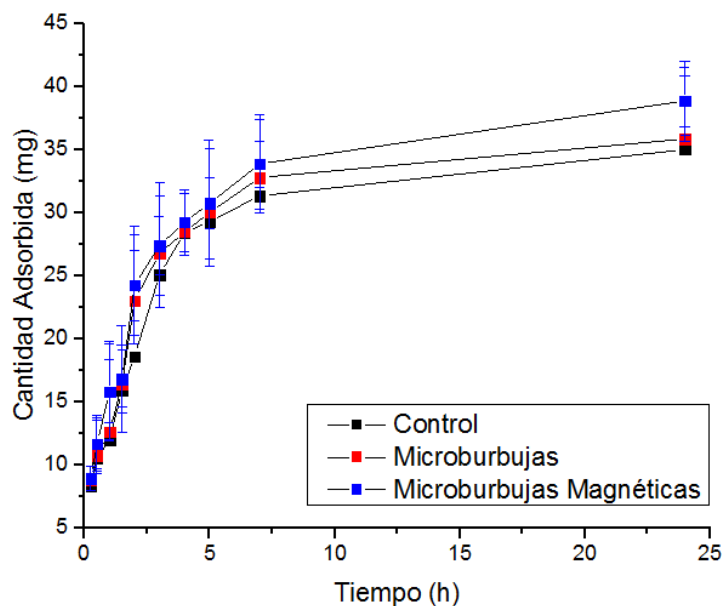


Figura 26. Cinética de adsorción de metotrexato por cada 5 mg de sistemas.

La cinética de adsorción del metotrexato muestra una similitud en la rapidez con que se da este fenómeno entre los tres sistemas, pero existe una diferencia significativa en la cantidad de fármaco adsorbida con el paso del tiempo. De considerar las distribuciones de tamaño de partícula existe una clara tendencia de los sistemas a adsorber más fármaco conforme aumenta el tamaño. Esto puede ser explicado mediante los modelos cinéticos de adsorción, ya que existe un aumento en el número de sitios que pueden ser ocupados por el metotrexato como adsorbato.

Para llevar a cabo el análisis de la cantidad adsorbida de metotrexato se requiere la evaluación y comparación estadística de diversos modelos. Los modelos seleccionados fueron:

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

La ecuación que describe este modelo es:

$$y = \frac{q_s * b * x}{1 + b * x} \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde y representa la cantidad de adsorbato adsorbido (mg/g), q_s la máxima cantidad de adsorbato en la monocapa (mg/g), b la constante de la isoterma de Langmuir (L/mg) y x la concentración de adsorbato al equilibrio (mg/L).⁷⁴

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

$$y = \frac{N * (K^m) * (x^m)}{1 + (K^m) * (x^m)} \quad \text{Ecuación 19}$$

En donde y representa la cantidad de adsorbato adsorbido (mg/g), N el número de sitios de unión disponibles por gramo de adsorbente, K es la constante de afinidad (L/mg), m el índice de heterogenicidad y x la concentración de adsorbato al equilibrio (mg/L).⁸⁰

- **Modelo de Jovanovic-Freundlich:** Al igual que el modelo de Langmuir-Freundlich considera que existen interacciones adsorbato-adsorbato en superficies heterogéneas, pero además considera las interacciones laterales de las moléculas de adsorbato por lo que se representa como:

$$y = N * (1 - (e^{(-K * x^m)})) \quad \text{Ecuación 20}$$

En donde y representa la cantidad de adsorbato adsorbido (mg/g), N el número de sitios de unión disponibles por gramo de adsorbente, K es la constante de afinidad (L/mg), m el índice de heterogeneidad y x la concentración de adsorbato al equilibrio (mg/L).⁸¹

Los modelos evaluados para los sistemas coloidales poliméricos e híbridos sintetizados se presentan en la figura 27:

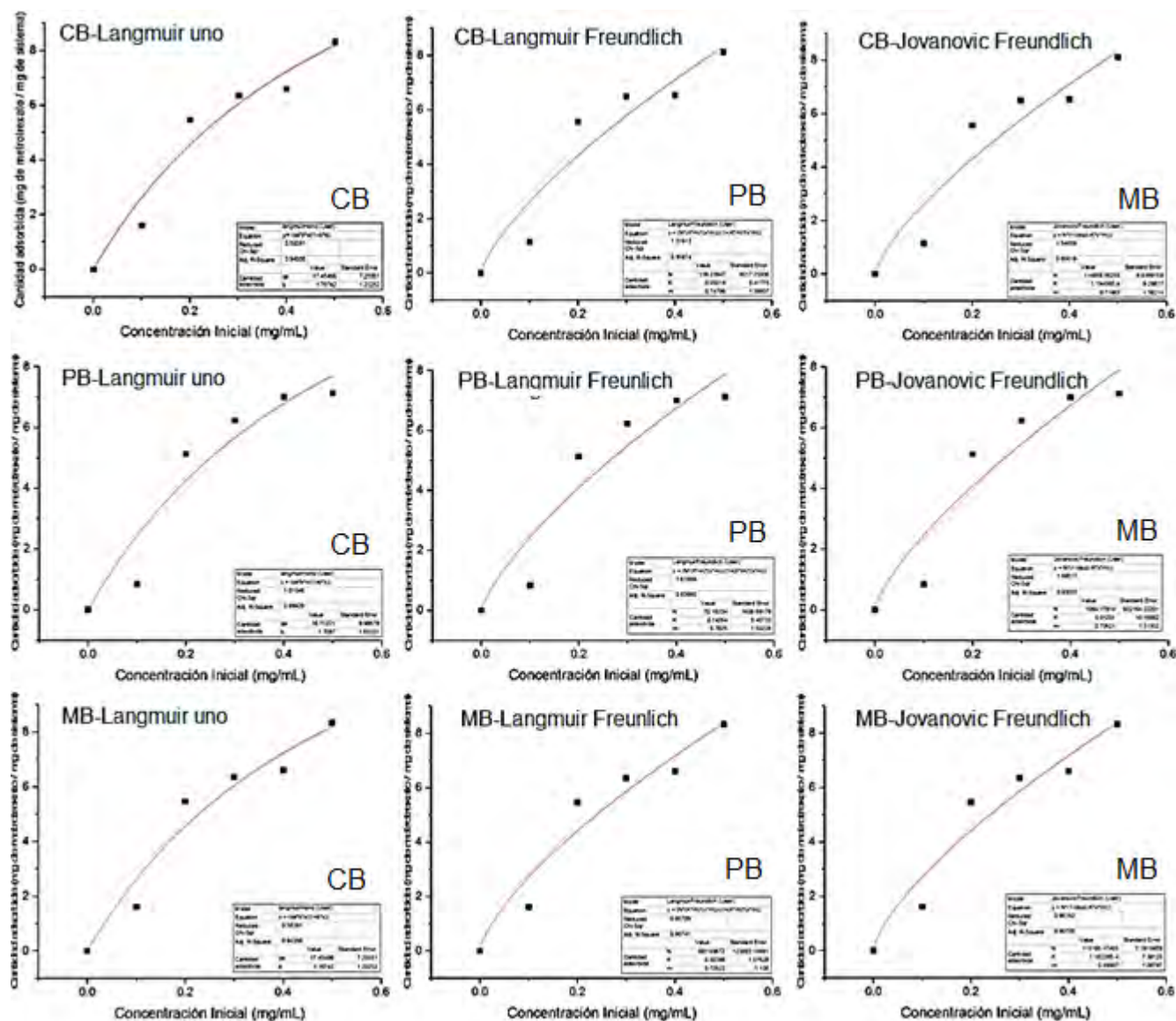


Figura 27. Modelos de adsorción de metotrexato.

Para caracterizar la capacidad de adsorción de metotrexato en los sistemas generados se llevó a cabo la selección del mejor modelo se consideró un coeficiente de correlación (Rsqr) más cercano a 1 y con la menor chi cuadrada (Chi-Sqr), para ello la tabla 11 resume los

parámetros estadísticos calculados para los modelos de adsorción evaluados en los sistemas coloidales poliméricos e híbridos sintetizados, así como las constantes asignadas a cada modelo de adsorción.

Tabla 11. Parámetros estadísticos de los modelos de adsorción de metotrexato en los sistemas generados.

Microesferas poliméricas (CB)					
Modelo	Constantes determinadas			Parámetros estadísticos	
Langmuir	Qs	b		Rsqr	Chi-Sqr
	17.7109	1.6926		0.9103	0.9646
Langmuir Freundlich	N	k	m	Rsqr	Chi-Sqr
	139	0.0502	0.7480	0.8587	1.5191
Jovanovic Freundlich	N	k	m	Rsqr	Chi-Sqr
	114858	1.1946 x 10.4	0.7196	0.8562	1.5466
Microburbujas poliméricas (PB)					
Modelo	Constantes determinadas			Parámetros estadísticos	
Langmuir	Qs	b		Rsqr	Chi-Sqr
	16.71	1.7097		0.8993	1.0105
Langmuir Freundlich	N	k	m	Rsqr	Chi-Sqr
	70.1623	0.1426	0.7825	0.8389	1.6167
Jovanovic Freundlich	N	k	m	Rsqr	Chi-Sqr
	1094.18	0.0120	0.7262	0.8320	1.6852
Microburbujas magnéticas (MB)					
Modelo	Constantes determinadas			Parámetros estadísticos	
Langmuir	Qs	b		Rsqr	Chi-Sqr
	17.4550	1.7674		0.9436	0.5839
Langmuir Freundlich	N	k	m	Rsqr	Chi-Sqr
	681.6987	0.0040	0.7052	0.9074	0.9579
Jovanovic Freundlich	N	k	m	Rsqr	Chi-Sqr
	115195.17	1.1822 x 10-4	0.6999	0.9071	0.9616

Los resultados muestran una mayor correlación con el modelo de Langmuir, probablemente por la generación de partículas con superficie relativamente homogénea y por el uso de concentraciones lo suficientemente bajas como para que solo se pudiese formar una monocapa de adsorción, como se observa en la micrografía SEM de la figura 21, por lo que no se llega a ver condiciones de saturación de la monocapa.

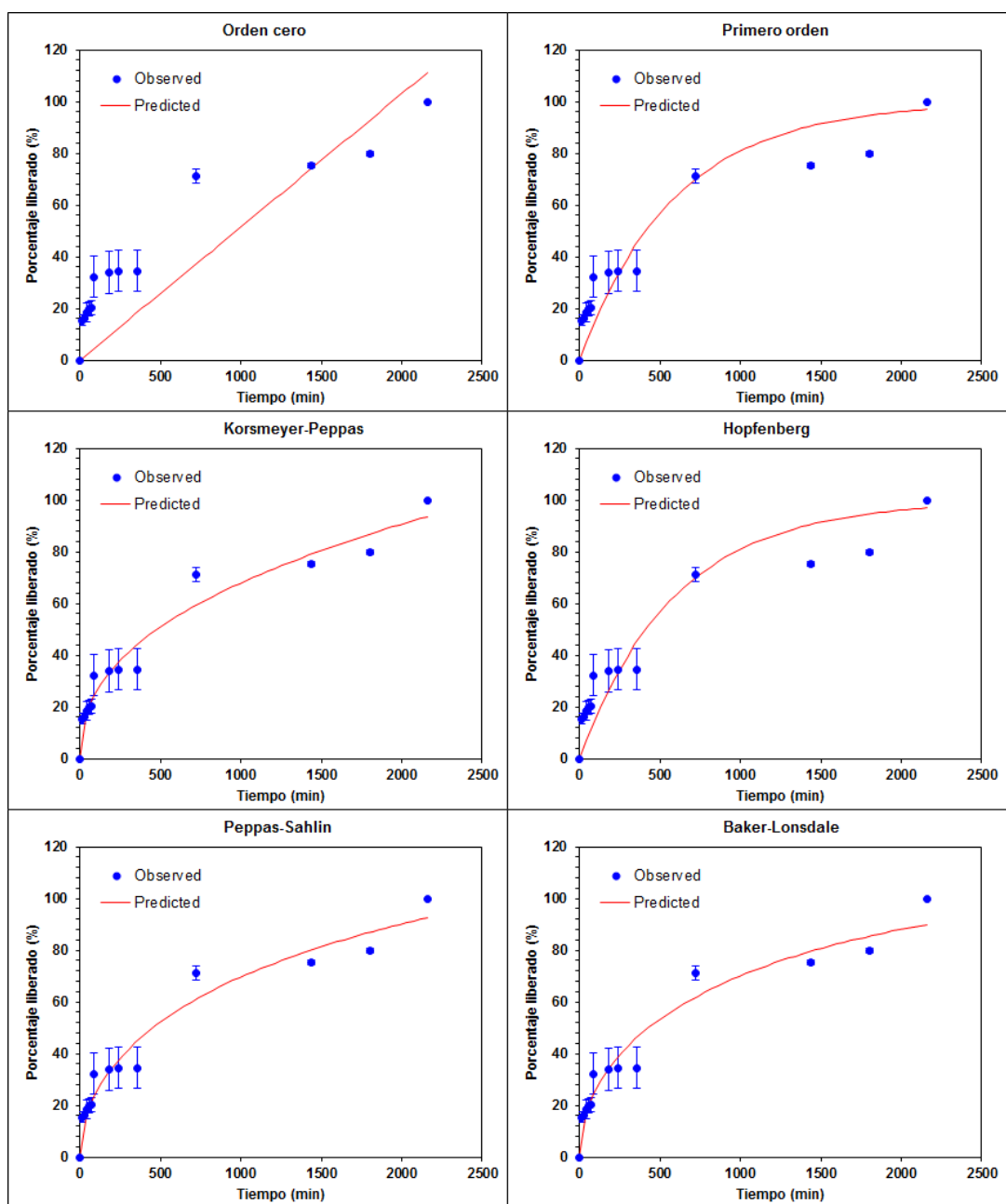


Figura 28. Modelos cinéticos de liberación promedio de CB.

Tabla 12. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de CB.

Microesferas poliméricas						
Modelo	Cinética de Orden cero	Cinética de primer orden	Korsmeyer -Peppas	Hopfenberg	Peppas -Sahlin	Baker-Lonsdale
Parámetros	k_0	k_1	k_1, n	k_{HB}	k_1, K_2	k_{BL}
Rsqr	-0.8814	0.7082	0.9509	0.7082	0.9404	0.3675
MSC	-1.7619	0.5672	2.1802	0.4241	2.5698	-0.2344
AIC	144.37	111.76	89.18	113.77	93.25	122.99
SS	26270.77	2603.04	442.4	2603.71	595.16	5807.88

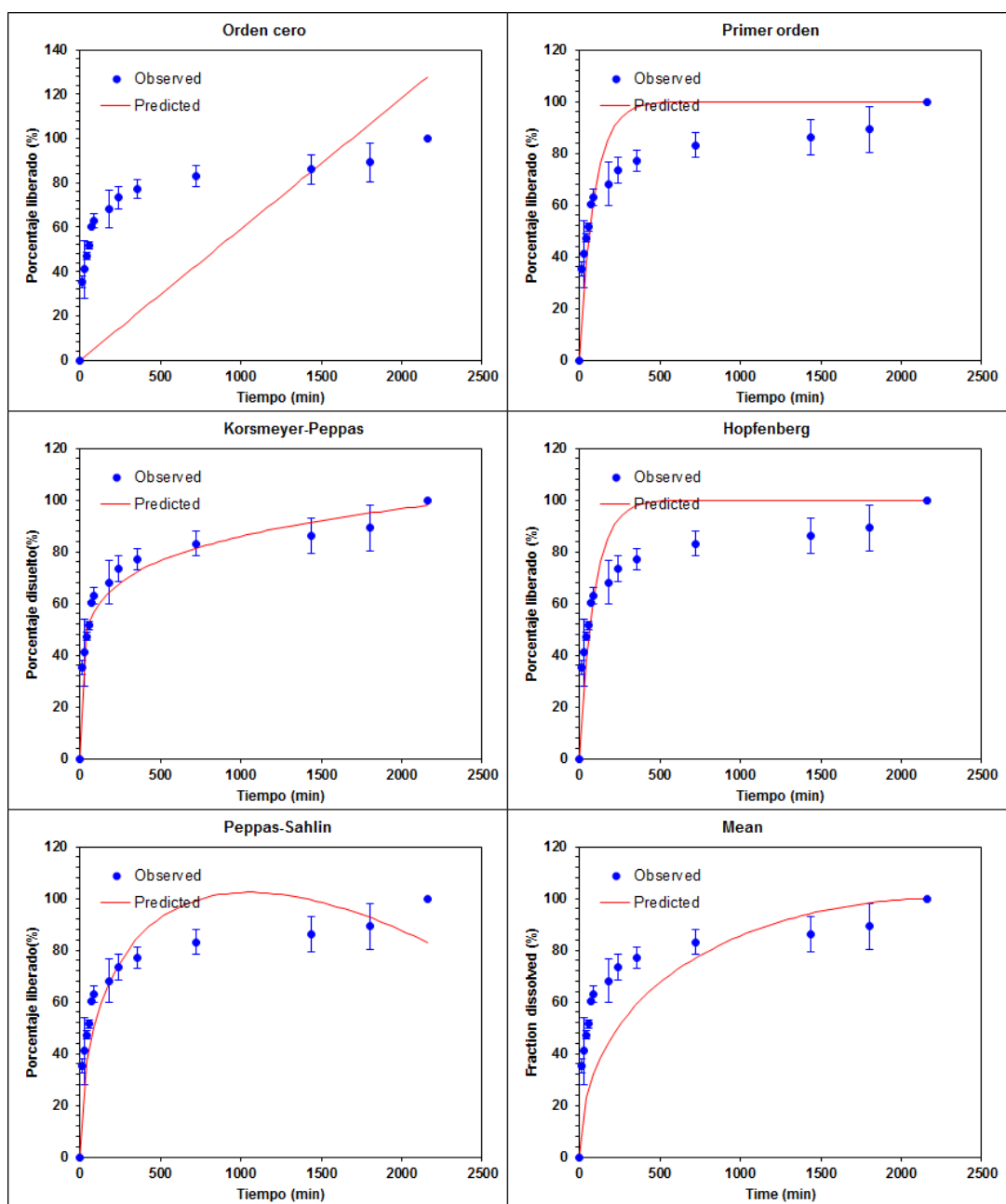


Figura 29. Modelos cinéticos de liberación promedio de PB.

Tabla 13. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de PB.

Microburbujas poliméricas						
Modelo	Cinética de Orden cero	Cinética de primer orden	Korsmeyer -Peppas	Hopfenberg	Peppas -Sahlin	Baker-Lonsdale
Parámetros	k_0	k_1	k_1, n	k_{HB}	k_1, K_2	k_{BL}
Rsqr	0.5775	0.8569	0.9506	0.8568	0.8201	0.9449
MSC	0.5939	1.6603	2.5979	1.5171	0.8709	0.9449
AIC	120.91	105.98	92.85	107.99	107.51	92.29
SS	4990.80	1682.37	582.14	1682.89	1627.77	646.70

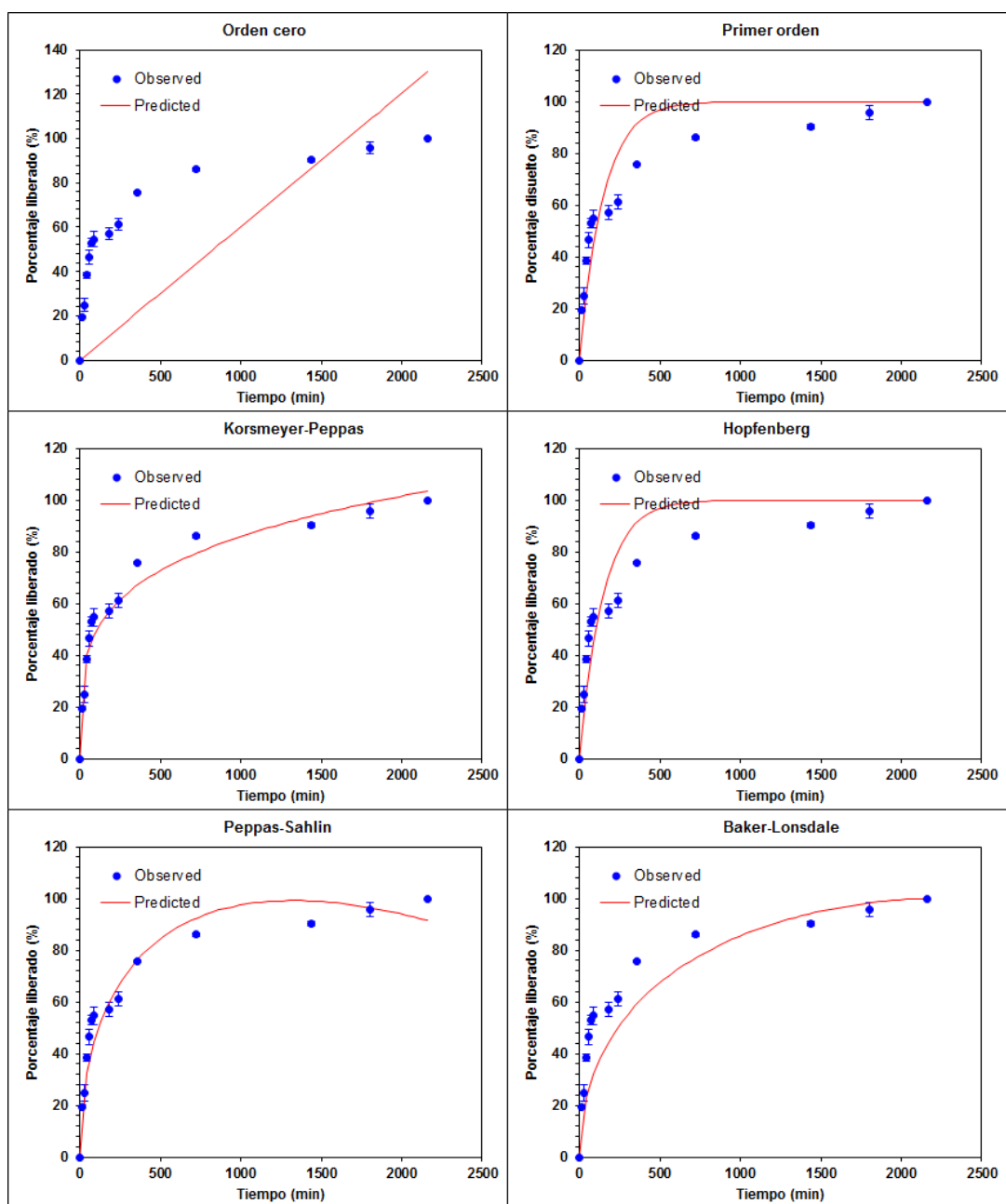


Figura 30. Modelos de liberación promedio de MB.

Tabla 14. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MB.

Microburbujas magnéticas						
Modelo	Cinética de Orden cero	Cinética de primer orden	Korsmeyer -Peppas	Hopfenberg	Peppas -Sahlin	Baker-Lonsdale
Parámetros	k_0	k_1	k_1, n	k_{HB}	k_1, K_2	k_{BL}
Rsqr	-0.5929	0.8465	0.9516	0.8465	0.9500	0.8012
MSC	-0.9324	1.4090	2.4249	1.2657	2.4003	1.1517
AIC	139.85	107.07	92.85	109.08	93.19	110.67
SS	18896.06	1820.19	573.47	1820.88	592.51	2358.67

Tabla 15. Modelos de liberación que muestran mejor ajuste en los sistemas evaluados.

Microesferas polimérica (CB)					
Modelo	Ecuación	Constantes determinadas		Desviación estándar	
Korsmeyer-Peppas	$M_t / M_\infty = at^n$	kKP	n	Kkp	n
		3.862	0.418	0.904	7.168
Peppas-Sahlin	$M_t / M_\infty = k_1t^n + k_2t^n$	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂
		2.650	-0.014	0.398	0.009
Microburbujas polimérica (PB)					
Modelo	Ecuación	Constantes determinadas		Desviación estándar	
Korsmeyer-Peppas	$M_t / M_\infty = at^n$	kKP	n	Kkp	n
		26.712	0.169	0.006	
Peppas-Sahlin	$M_t / M_\infty = k_1t^n + k_2t^n$	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂
		6.309	-0.097	0.478	0.009
Microburbujas magnética (MB)					
Modelo	Ecuación	Constantes determinadas		Desviación estándar	
Korsmeyer-Peppas	$M_t / M_\infty = at^n$	kKP	n	Kkp	n
		16.186	0.242	0.441	0.003
Peppas-Sahlin	$M_t / M_\infty = k_1t^n + k_2t^n$	k ₁	k ₂	k ₁	k ₂
		5.447	-0.075	0.700	0.001

Estos modelos muestran que el mecanismo de liberación dependiente, en mayor medida, de la difusión del metotrexato desde cada uno de los sistemas como en lo reportado en la Tabla 5, estos resultados son consistentes con lo esperado al considerar el método de síntesis de los sistemas y la incorporación de metotrexato únicamente por efecto de la relajación de las cadenas poliméricas de la cubierta de PVA y la adsorción que se diese en superficie. A pesar de que el modelo de Korsmeyer-Peppas muestra un mejor ajuste estadístico a los datos obtenidos, los resultados de las tablas 12, 13, y 14 muestran valores de correlación altos para el modelo de Peppas-Sahlin; al considerar que el PVA es un polímero liofílico en soluciones acuosas se espera que exista una relajación de las cadenas de polímero al llevarse a cabo la adsorción y la liberación de fármaco; es decir, de haber relajación durante la carga de fármaco éste entraría a una mayor profundidad en la capa de la partícula mismo que sería liberado una vez el sistema fuese puesto en agua y se llevaría a cabo un proceso de hidratación similar al inicio del hinchamiento, por lo que el modelo de Peppas-Sahlin resulta adecuado en su descripción.

6.4. Evaluación de los sistemas como sistemas terapéuticos *in vitro*

Para demostrar el posible uso de los sistemas sintetizados como agentes de contraste para ultrasonografía se llevaron a cabo los estudios mencionados en la sección 5.13.

La imagen 29 muestra corresponde a los ultrasonidos de los distintos sistemas:

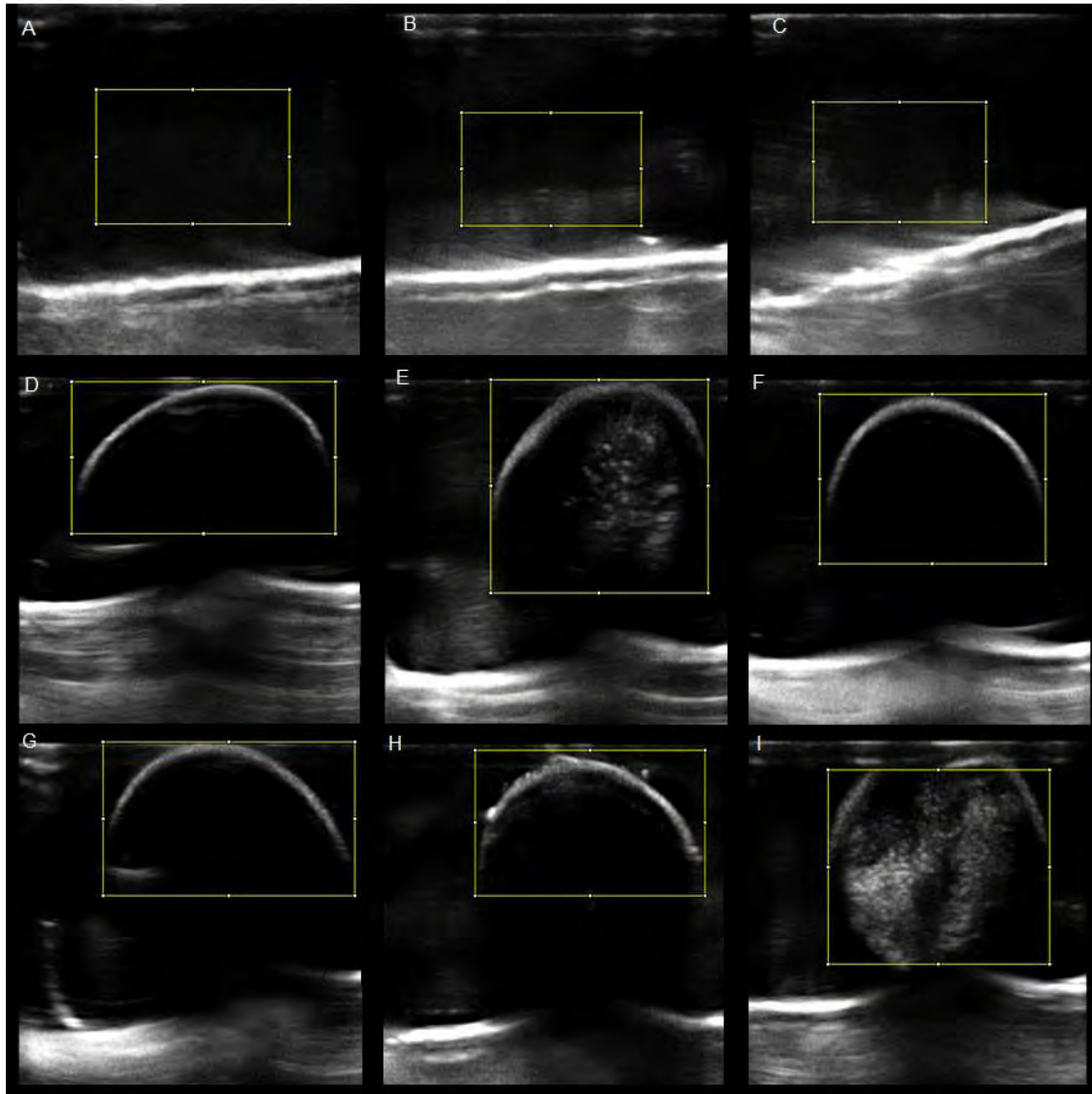


Figura 31. Evaluación de los sistemas como sistema diagnóstico.

(A) Ultrasonido del medio de dispersión control (MGS:8.084).

(B) Ultrasonido del medio de dispersión con microburbujas poliméricas (MGS:16.330).

(C) Ultrasonido del medio de dispersión con microburbujas magnéticas (MGS:15.211)

(D) Ultrasonido del espécimen de *Vitis vinifera* control (MGS:9.194).

(E) Ultrasonido del espécimen de *Vitis vinifera* con solución PBS agitada (MGS:14.882).

(F) Ultrasonido del espécimen de *Vitis vinifera* con dispersión de NPMs (MGS:8.760).

(G) Ultrasonido del espécimen de *Vitis vinifera* con microesferas poliméricas (MGS:10.906).

(H) Ultrasonido del espécimen de *Vitis vinifera* con microburbujas poliméricas (MGS:16.950).

(I) Ultrasonido del espécimen de *Vitis vinifera* con microburbujas magnéticas (MGS:29.913).

Por medio de la escala media de grises (MGS) se relaciona el contraste en la imagen obtenida en el estudio con la respuesta ecogénica producida por las microburbujas al ser expuestas a ondas ultrasónicas; se observa un aumento de la ecogenicidad en el sistema debido a la introducción de solución PBS previamente agitada, el cual es consistente con los hallazgos que llevaron al descubrimiento de las microburbujas como medio de contraste, y una disminución de la respuesta ecogénica debido a la presencia de nanopartículas magnéticas consistente con los hallazgos de Yang et al.³

Las microesferas poliméricas aumentan la respuesta ecogénica en menor medida que los otros dos sistemas debido a que se trata de una fase sólida continua, donde la única interfase en que se ven reflejadas las ondas ultrasónicas es la interfase esfera-medio; para las microburbujas poliméricas y las microburbujas magnéticas se observa un aumento en el contraste no solo debido a la generación de la interfase esfera-medio, sino a la interfase entre la coraza polimérica flexible la cual oscila a bajas energías ultrasónicas y de manera armónica, así como el gas, que permite una mayor propagación de las ondas aumentando la fuerza de la señal.²²

7. CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvieron nanopartículas de magnetita con un recubrimiento de ácido oléico quimisorbido en superficie, capaces de ser dispersadas en CH_2Cl_2 , para su inclusión en la capa interna de microburbujas magnéticas sintetizadas por el método de doble emulsión.
- 3.- El tamaño y potencial zeta de las partículas de magnetita recubierta con ácido oléico fueron de 16.05 ± 4.05 nm y de 23.6 ± 3.26 mV respectivamente.
- 4.- Se obtuvieron microburbujas poliméricas esféricas con tamaño de 11.4 ± 0.299 μm , con inclusiones de magnetita hidrofóbica (96.63 de μg de magnetita hidrofóbica por mg de microburbujas) dispersa en la capa interna del recubrimiento polimérico, mediante el método de síntesis de doble emulsión y después de la separación mediante centrifugación diferencial.
- 5.- Se obtuvo un sistema teragnóstico basado en microburbujas magnéticas mediante el acoplamiento de metotrexato por medio de la adsorción superficial de fármaco en condiciones de temperatura constante.
- 5.- Se demostró el posible uso de microburbujas poliméricas con inclusión de magnetita como sistema de diagnóstico para su uso en ultrasonido, y como posible sistema de liberación modificada de metotrexato.

8. PERSPECTIVAS

A pesar de que las microburbujas magnéticas demostraron su eficiencia como sistemas teragnósticos en los modelos *in vitro* es necesario llevar a cabo su evaluación en sistemas *in vivo* que permitan determinar los datos posológicos, así como la farmacocinética de los sistemas dispersos en el torrente sanguíneo.

Además es necesario llevar a cabo una evaluación de los sistemas generados mediante la misma técnica de síntesis utilizando materiales de menor costo, para permitir la producción de sistemas que se encuentren asequibles lo que permitirá obtener los sistemas tecnológicos necesarios para permitir un mayor alcance poblacional, disminuyendo la mortalidad del cáncer en poblaciones de bajos recursos.

9. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

- 1 OMS. *Cáncer*, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>> (2015).
- 2 Hyoun, S. C., Obican, S. G. & Scialli, A. R. Teratogen update: methotrexate. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* **94**, 187-207, doi:10.1002/bdra.23003 (2012).
- 3 Yang, F. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-embedded encapsulated microbubbles as dual contrast agents of magnetic resonance and ultrasound imaging. *Biomaterials* **30**, 3882-3890, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.03.051 (2009).
- 4 Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O. C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews* **66**, 2-25, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009> (2014).
- 5 Chien, Y. W. *NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS, SECOND EDITION, REVISED AND EXPANDED*,. Vol. 50 797 (Taylor & Francis Group, 1992).
- 6 Chen, X. & Wong, S. T. C. in *Cancer Theranostics* 3-8 (Academic Press, 2014).
- 7 Claverie, J.-M. Fewer Genes, More Noncoding RNA. *Science* **309**, 1529 (2005).
- 8 Bouwman, P. & Jonkers, J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat Rev Cancer* **12**, 587-598, doi:http://www.nature.com/nrc/journal/v12/n9/supinfo/nrc3342_S1.html (2012).
- 9 Organization, W. H. World Cancer Report 2014. (WHO Press, World Health Organization, Lyon, France, 2015).
- 10 Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 417-427 (2011).

- 11 Han, J. *et al.* Dietary Fat Intake and Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE* **10**, e0138580, doi:10.1371/journal.pone.0138580 (2015).
- 12 Lucchini, R. G. & London, L. Global Occupational Health: Current Challenges and the Need for Urgent Action. *Annals of Global Health* **80**, 251-256, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.006> (2014).
- 13 Ozasa, K. Epidemiological research on radiation-induced cancer in atomic bomb survivors. *Journal of Radiation Research* **57**, i112-i117, doi:10.1093/jrr/rrw005 (2016).
- 14 Cardis, E. *et al.* The 15-Country Collaborative Study of Cancer Risk among Radiation Workers in the Nuclear Industry: Estimates of Radiation-Related Cancer Risks. *Radiation Research* **167**, 396-416, doi:10.1667/RR0553.1 (2007).
- 15 Boffetta, P. Human cancer from environmental pollutants: The epidemiological evidence. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **608**, 157-162, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.015> (2006).
- 16 Grosse, Y. *et al.* A review of human carcinogens--Part A: pharmaceuticals. *The Lancet. Oncology* **10**, 13-14 (2009).
- 17 McGregor, D. in *Fundamental Toxicology for Chemists* (eds John H. Duffus & Howard G. J. Worth) 90-100 (The Royal Society of Chemistry, 1996).
- 18 Abelardo Meneses García, I. N. C. A. N. (Secretaría de Salud, Secretaría de Salud, Prensa, 2016).
- 19 INEGI. (ed INEGI) (Aguascalientes, Ags, 2016).
- 20 Etzioni, R. *et al.* The case for early detection. *Nat Rev Cancer* **3**, 243-252 (2003).
- 21 Smith, R. A. *et al.* Cancer screening in the United States, 2015: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **65**, 30-54, doi:10.3322/caac.21261 (2015).
- 22 Dietrich C., G. C. *ULTRASONIDO ENDOSCOPICO. ATLAS Y MANUAL INTRODUCTORIO.* 44-47 (2009).
- 23 Chen, F. & Ni, Y. in *Cancer Theranostics* 95-126 (Academic Press, 2014).
- 24 Chen, Y.-S., Yeager, D. & Emelianov, S. Y. in *Cancer Theranostics* 139-158 (Academic Press, 2014).
- 25 Dalglish, A. G. Vaccines versus immunotherapy: Overview of approaches in deciding between options. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **10**, 3369-3374, doi:10.4161/21645515.2014.980707 (2014).
- 26 Stokes, Z. & Chan, S. Principles of cancer treatment by hormone therapy. *Surgery (Oxford)* **21**, 280-283, doi:<http://dx.doi.org/10.1383/surg.21.11.280.22292> (2003).
- 27 Li, J. *et al.* A review on various targeted anticancer therapies. *Targeted Oncology* **7**, 69-85, doi:10.1007/s11523-012-0212-2 (2012).

- 28 Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* **5**, 65-72 (2005).
- 29 Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research* **34**, D668-672, doi:10.1093/nar/gkj067 (2006).
- 30 Fahmy, T. M., Fong, P. M., Goyal, A. & Saltzman, W. M. Targeted for drug delivery. *Materials Today* **8**, 18-26, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)71033-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(05)71033-6) (2005).
- 31 Kuckling, D. & Urban, M. W. in *Handbook of Stimuli-Responsive Materials* 1-26 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011).
- 32 Costa, P. & Sousa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13**, 123-133, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1) (2001).
- 33 Enscore, D. J., Hopfenberg, H. B. & Stannett, V. T. Effect of particle size on the mechanism controlling n-hexane sorption in glassy polystyrene microspheres. *Polymer* **18**, 793-800, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0032-3861\(77\)90183-5](http://dx.doi.org/10.1016/0032-3861(77)90183-5) (1977).
- 34 Westwood, M. *et al.* Contrast-enhanced ultrasound using SonoVue(R) (sulphur hexafluoride microbubbles) compared with contrast-enhanced computed tomography and contrast-enhanced magnetic resonance imaging for the characterisation of focal liver lesions and detection of liver metastases: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health technology assessment (Winchester, England)* **17**, 1-243, doi:10.3310/hta17160 (2013).
- 35 Ponce C. A., E. D. Microburbujas como Agentes de Contraste para Ultrasonidos. *Revista de Posgrado de la Vla Cátedra de Medicina* **153**, 8-12 (2006).
- 36 Strijkers, G. J., Mulder, W. J., van Tilborg, G. A. & Nicolay, K. MRI contrast agents: current status and future perspectives. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **7**, 291-305 (2007).
- 37 Upadhyay, S., Parekh, K. & Pandey, B. Influence of crystallite size on the magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds* **678**, 478-485, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.03.279> (2016).
- 38 Moskowitz, B. M. *Hitchhiker's Guide to Magnetism*. (1991).
- 39 Mnyukh, Y. Magnetization of Ferromagnets. *American Journal of Condensed Matter Physics* **4**, 78-85, doi:10.5923/j.ajcmp.20140404.03 (2014).
- 40 Stephen, Z. R., Kievit, F. M. & Zhang, M. Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging. *Materials today (Kidlington, England)* **14**, 330-338, doi:10.1016/S1369-7021(11)70163-8 (2011).
- 41 Zhang, L., He, R. & Gu, H.-C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science* **253**, 2611-2617, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.05.023> (2006).

- 42 Sciallero, C., Grishenkov, D., Kothapalli, S. V. V. N., Oddo, L. & Trucco, A. Acoustic characterization and contrast imaging of microbubbles encapsulated by polymeric shells coated or filled with magnetic nanoparticles. *Journal of the Acoustical Society of America* **134**, 3918-3930, doi:10.1121/1.4824337 (2013).
- 43 Bañobre-López, M., Teijeiro, A. & Rivas, J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* **18**, 397-400, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpor.2013.09.011> (2013).
- 44 Vasiliki, D. & Thomas, J. L. Magnetic resonance for in vitro medical diagnostics: superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. *New Journal of Physics* **13**, 025005 (2011).
- 45 Ramos, M. *Nanopartículas magnéticas riesgos y beneficios* Nanopartículas magnéticas riesgos y beneficios thesis, Universidad Nacional Autónoma México, (2016).
- 46 Peralta, C. *Síntesis de nanopartículas magnéticas modificadas en superficie con acrilatos recubiertas mediante el método de impresión molecular usando como plantilla doxorubicina*. Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, (2014).
- 47 Lopez, J. A., González, F., Bonilla, F. A., Zambrano, G. & Gómez, M. E. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ magnetic nanofluid. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* **30**, 60-66 (2010).
- 48 M. Ahmad, M. U. M., M. Sohail, M. Faisal, H. Rashid. Comprehensive Review on Magnetic Drug Delivery Systems: A Novel Approach for Drug Targeting. *Journal of Pharmacy and Alternative Medicine* **2**, 13-21 (2013).
- 49 McBain, S. C., Yiu, H. H. P. & Dobson, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* **3**, 169-180 (2008).
- 50 Wang, E. C., Borysiewicz, L. K. & Weetman, A. P. Cell sorting using immunomagnetic beads. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **80**, 347-357, doi:10.1385/0-89603-204-3:347 (1992).
- 51 Banerjee, S. K. & Moskowitz, B. M. in *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism* (eds Joseph L. Kirschvink, Douglas S. Jones, & Bruce J. MacFadden) 17-41 (Springer US, 1985).
- 52 Komljenovic, D. & Bäuerle, T. in *Cancer Theranostics* 127-137 (Academic Press, 2014).
- 53 Sirsi, S. & Borden, M. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. *Bubble science engineering and technology* **1**, 3-17, doi:10.1179/175889709X446507 (2009).
- 54 Brismar, T. B. *et al.* Magnetite nanoparticles can be coupled to microbubbles to support multimodal imaging. *Biomacromolecules* **13**, 1390-1399, doi:10.1021/bm300099f (2012).

- 55 Chow, A. M., Chan, K. W. Y., Cheung, J. S. & Wu, E. X. Enhancement of gas-filled microbubble R2* by iron oxide nanoparticles for MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* **63**, 224-229, doi:10.1002/mrm.22184 (2010).
- 56 Guo, G. *et al.* Mechanical and dynamic characteristics of encapsulated microbubbles coupled by magnetic nanoparticles as multifunctional imaging and drug delivery agents. *Physics in Medicine and Biology* **59**, 6729-6747, doi:10.1088/0031-9155/59/22/6729 (2014).
- 57 He, W. *et al.* Microbubbles with surface coated by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Materials Letters* **68**, 64-67, doi:10.1016/j.matlet.2011.10.013 (2012).
- 58 Paradossi, G., Cavalieri, F., Chiessi, E., Ponassi, V. & Martorana, V. Tailoring of physical and chemical properties of macro- and microhydrogels based on telechelic PVA. *Biomacromolecules* **3**, 1255-1262, doi:10.1021/bm0256247 (2002).
- 59 Kovalenko, A. *et al.* Hollow magnetic microspheres obtained by nanoparticle adsorption on surfactant stabilized microbubbles. *Soft Matter* **10**, 5147-5156, doi:10.1039/c4sm00318g (2014).
- 60 Liu, Z. *et al.* Iron oxide nanoparticle-containing microbubble composites as contrast agents for MR and ultrasound dual-modality imaging. *Biomaterials* **32**, 6155-6163, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.019 (2011).
- 61 Mannell, H. *et al.* Site directed vascular gene delivery in vivo by ultrasonic destruction of magnetic nanoparticle coated microbubbles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **8**, 1309-1318, doi:10.1016/j.nano.2012.03.007 (2012).
- 62 Nguyen, P. N. *et al.* Compressible multi-scale magnetic constructs: Decorating the outer surface of self-assembled microbubbles with iron oxide nanoparticles. *RSC Advances* **3**, 7743-7746, doi:10.1039/c3ra40908b (2013).
- 63 Niu, C. *et al.* Doxorubicin loaded superparamagnetic PLGA-iron oxide multifunctional microbubbles for dual-mode US/MR imaging and therapy of metastasis in lymph nodes. *Biomaterials* **34**, 2307-2317, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.12.003 (2013).
- 64 Räthel, T. *et al.* Magnetic stents retain nanoparticle-bound antirestenotic drugs transported by lipid microbubbles. *Pharmaceutical Research* **29**, 1295-1307, doi:10.1007/s11095-011-0643-y (2012).
- 65 Sciallero, C. & Trucco, A. Ultrasound assessment of polymer-shelled magnetic microbubbles used as dual contrast agents. *Journal of the Acoustical Society of America* **133**, EL478-EL484, doi:10.1121/1.4804942 (2013).
- 66 Zhou, D. *et al.* Superparamagnetic PLGA-iron oxide microspheres as contrast agents for dual-imaging and the enhancement of the effects of high-intensity focused ultrasound ablation on liver tissue. *RSC Advances* **5**, 35693-35703, doi:10.1039/c5ra00880h (2015).

- 67 Kiessling, F., Fokong, S., Koczera, P., Lederle, W. & Lammers, T. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **53**, 345-348, doi:10.2967/jnumed.111.099754 (2012).
- 68 Singh, A. K. *Engineered Nanoparticles: Structure, Properties and Mechanisms of Toxicity*. 1st edition edn, (Academic Press, 2015).
- 69 McDonald, R. S. Review: infrared spectrometry. *Analytical Chemistry* **58**, 1906-1925, doi:10.1021/ac00122a003 (1986).
- 70 Ivanisevic, I., McClurg, R. B. & Schields, P. J. in *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia* (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
- 71 Pecora, R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research* **2**, 123-131, doi:10.1023/A:1010067107182 (2000).
- 72 Vernon-Parry, K. D. Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review* **13**, 40-44, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0961-1290\(00\)80006-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0961-1290(00)80006-X) (2000).
- 73 de Jonge, N. & Ross, F. M. Electron microscopy of specimens in liquid. *Nat Nano* **6**, 695-704 (2011).
- 74 Hiemenz, P. C., and Raj Rajagopalan. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Third edn, Vol. Volume 14 (Marcel Dekker, 1997).
- 75 Chiu, M. H. & Prenner, E. J. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **3**, 39-59, doi:10.4103/0975-7406.76463 (2011).
- 76 Feshitan, J. A., Chen, C. C., Kwan, J. J. & Borden, M. A. Microbubble size isolation by differential centrifugation. *Journal of Colloid and Interface Science* **329**, 316-324, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.09.066> (2009).
- 77 Zhang, Y. *et al.* DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal* **12**, 263-271, doi:10.1208/s12248-010-9185-1 (2010).
- 78 Hunter, R. J. *Zeta Potential in Colloid Science. Principles and Applications*. First Edition edn, 386 (Academic Press, 1981).
- 79 USDA. (ed United States Department of Agriculture) 28 (U.S.A., 1981).
- 80 Jeppu, G. P. & Clement, T. P. A modified Langmuir-Freundlich isotherm model for simulating pH-dependent adsorption effects. *Journal of Contaminant Hydrology* **129-130**, 46-53, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconhyd.2011.12.001> (2012).
- 81 Quiñones, I. & Guiochon, G. Derivation and Application of a Jovanovic-Freundlich Isotherm Model for Single-Component Adsorption on Heterogeneous Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **183**, 57-67, doi:<http://dx.doi.org/10.1006/jcis.1996.0518> (1996).

Anexo I-Índice de esquemas, figuras y tablas

Índice de esquemas

Esquema 1. Modelo de una microburbuja magnética	8
Esquema 2. Cambios en una célula normal que se ha convertido a neoplásica	15
Esquema 3. Mecanismo de acción de metotrexato como agente antineoplásico	26
Esquema 4. Representación de la transición del momento magnético en el muro de Bloch en un material con multidominios magnéticos	36
Esquema 5. Sistema de determinación de tamaño de partícula por DLS	46
Esquema 6. Representación del potencial Z	47
Esquema 7. Representación de las fuerzas que actúan sobre una partícula esférica sumergida en un fluido	48
Esquema 8. Interacción de quelato bidentado entre el grupo $-\text{COO}^-$ del ácido oleico y los átomos de Fe	60
Esquema 9. Representación del aumento de tamaño de una esfera por aumento de la presión	66

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de la incidencia de cáncer en hombres durante el año 2012	16
Figura 2. Distribución de la incidencia de cáncer en mujeres durante el año 2012	16
Figura 3. Perfil oncológico de México para el año 2014 realizado por la OMS	17
Figura 4. Estructura química del ácido fólico	25
Figura 5. Estructura química del metotrexato. (Análogo del ácido fólico)	25
Figura 6. Representación hipotética de la concentración plasmática de fármaco distintos sistemas de liberación de fármacos. (CTM: Concentración tóxica mínima; CEM: Concentración efectiva mínima)	30
Figura 7. Efectos del diagnóstico temprano de cáncer en la esperanza y calidad de vida de los pacientes.	30
Figura 8. Representación de los momentos dipolares de diversos	35
Figura 9. Estructura cristalina de la hematita	35
Figura 10. Dependencia la coercitividad magnética conforme a la teoría de dominios	37
Figura 11. Momento magnético de un multidominio magnético y monodominios magnéticos en presencia (A) y ausencia (B) de un campo magnético impuesto	37
Figura 12. Estructura cristalina de la magnetita	40

Figura 13. Representación de la superficie de las NPM's hidrofílicas(A) y NPM's hidrofóbicas(B) considerando los resultados obtenidos por Zhang <i>et al.</i>	52
Figura 14. Micrografía TEM de Magnetita hidrofóbica	58
Figura 15. Comparación de NPM's en presencia o ausencia de ácido oleico en su síntesis	58
Figura 16. Espectro de FTIR para las NPMs de magnetita	59
Figura 17. Distribución de potencial Z para las nanopartículas magnéticas hidrofílicas en agua destilada	61
Figura 18. Distribución de potencial Z para las nanopartículas magnéticas hidrofílicas en agua destilada	61
Figura 19. Representación de la adsorción de iones en superficie de las nanopartículas hidrofílicas (A) y de las partículas hidrofóbicas (B).	62
Figura 20. Difracción comparativa de rayos X de polvos en NPMs de magnetita	62
Figura 21. Micrografía SEM de microburbujas magnéticas antes de su separación mediante centrifugación diferencial	63
Figura 22. Distribución de tamaño de partícula de Microesferas Poliméricas, Microburbujas Poliméricas, y Microburbujas Magnéticas en la fracción A de la separación por centrifugación diferencial	63
Figura 23. DSC de los sistemas generados	69
Figura 24. Curva de calibración de metotrexato mediante espectroscopia UV	71
Figura 25. Evaluación de la estabilidad del espectro de absorción UV-Visible durante la adsorción de metotrexato	71
Figura 26. Cinética de adsorción de metotrexato por cada 5 mg de sistemas	71
Figura 27. Modelos de adsorción de metotrexato	73
Figura 28. Modelos cinéticos de liberación promedio de CB	75
Figura 29. Modelos cinéticos de liberación promedio de PB	76
Figura 30. Modelos de liberación promedio de MB	77
Figura 31. Evaluación de los sistemas generados como sistema diagnóstico.	79

Índice de tablas

Tabla 1. Principales agentes infecciosos carcinogénicos según su tejido afectado	12
Tabla 2. Principales agentes contaminantes carcinogénicos según su tejido afectado	13
Tabla 3. Principales causas de mortalidad en los Estados Unidos Mexicanos para el año 2014 (INEGI, 2014)	18

Tabla 4. Características fisicoquímicas del metotrexato	27
Tabla 5. Mecanismo de transporte de fármaco de acuerdo al valor de n en el modelo Korsmeyer-Peppas	32
Tabla 6. Ejemplos de síntesis microburbujas magnéticas como agentes duales	43
Tabla 7. Aislamiento de partículas por diferenciación diferencial	55
Tabla 8. Concentraciones de metotrexato utilizadas para la evaluación de la adsorción	56
Tabla 9. Señales del espectro de FTIR de NPMs	60
Tabla 10. Gradiente de densidad	68
Tabla 11. Parámetros estadísticos de los modelos de adsorción de metotrexato en los sistemas generados	74
Tabla 12. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de CB	75
Tabla 13. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de PB	76
Tabla 14. Parámetros estadísticos promedio de los modelos de liberación de MB	77
Tabla 15. Modelos de liberación de fármacos que muestran un mejor ajuste a los sistemas generados	78