

UNIVERSIDAD DE SONORA

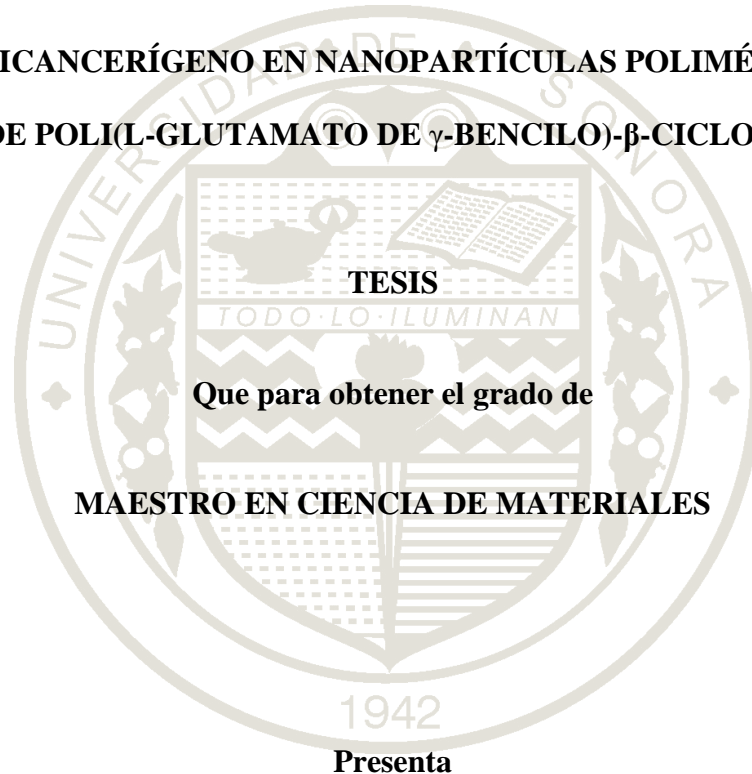
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN DE UN FÁRMACO

ANTICANCERÍGENO EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A BASE DE POLI(L-GLUTAMATO DE γ -BENCILO)- β -CICLODEXTRINA



TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA DE MATERIALES

1942

Presenta

Q.B.C. Francisco Javier Caro León

HERMOSILLO, SONORA

Julio de 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Esta tesis se realizó en los laboratorios del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, bajo la dirección de la Dra. María Elisa Martínez Barbosa y bajo la asesoría del Pr. Gilles Ponchel durante la estancia de investigación en la facultad de farmacia de la Université Paris-Sud 11.

Los estudios de Microscopia fueron realizados en los laboratorios de Microscopia Electrónica de transmisión de la Universidad de Paris XI (Orsay), así como de la Universidad de Sonora.

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado para revisar la tesis profesional de Francisco Javier Caro León, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Maestro en Ciencia de Materiales.

Dra. María Elisa Martínez Barbosa
Presidente

Dra. Judith Celina Tanori Córdova
Secretario

Dra. Rosa Elena Navarro Gautrin
Sinodal

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Sinodal externo

Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix
Sinodal suplente

Agradecimientos

Al departamento de investigación en polímeros y materiales por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.

A CONACyT por el apoyo económico al proyecto, así como la beca otorgada para mis estudios de maestría.

A mi jurado, Dra. Rosa Elena Navarro Gautrin, Dra. Teresa del Castillo Castro, Dra. Judith Celina Tanori Córdova y Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix, por su valiosa aportación a la realización de este trabajo, así como por su disponibilidad y todo su apoyo.

Al Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez de la Facultad de ciencias biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por su valiosa aportación a la discusión de resultados y diseño experimental.

Al Dr. Heriberto Acuña Campa por su asesoría y disponibilidad para el análisis de los resultados de dispersión dinámica de luz y potencial Z.

A mi compañera de laboratorio An Young Taylor Castillo por su apoyo en el trabajo experimental.

Al Pr. Gilles Ponchel por su asesoría y disponibilidad durante la realización de la estancia académica en la facultad de farmacia de la Université Paris-Sud 11. Así como a la estudiante de doctorado Laura de Miguel por su valioso consejo a lo largo de mi trabajo experimental en la estancia.

A la Dra. Hisila Santacruz por su apoyo y amistad.

A mis amigos del departamento de investigación en polímeros y materiales: Micky, Jan, Yakimeshi, Lalo, Blanca, Jesús Martínez, Jesús Quiroz, Adrian, Julieta, Sheila y Arturo por hacer mas amenas las horas de trabajo.

A mis amigos de la casa del estudiante Cananense en Hermosillo: Kristiam, Pedrito, Gabriel, Chino, Gordo, Pollón, Daniel, Timón, Pikin, Carlos y Ferguillas, por compartir conmigo los mejores años de mi época estudiantil

A mi directora de Tesis, Dra. María Elisa Martínez Barbosa por su apoyo académico.

Dedicado a mis hermanas, a mi sobrina

A mi Madre

A mi Padre, el mejor hombre que he conocido

ÍNDICE

FORMA DE APROBACIÓN.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	6
El cisplatino.....	6
Inclusión del cisplatino en sistemas vectores.....	9
Complejos platino-polímero.....	10
Complejos platino-Dendrímero.....	11
Sistemas micelares.....	12
Sistemas vectores de nanopartículas y micropartículas poliméricas.....	13
El Poli (L-glutamato de γ -bencilo) como materia prima para formular sistemas vectores de fármacos.....	15
Las Ciclodextrinas y su aplicación farmacéutica.....	17
Capacidad de encapsulación y liberación de principios activos por los sistemas vectores.....	21

Determinación del perfil de liberación.....	24
OBJETIVOS.....	27
Objetivo General.....	27
Objetivos Particulares.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Reactivos.....	28
Equipos.....	29
Métodos.....	30
Estudio de solubilidad del CDDP.....	30
Síntesis de las nanopartículas poliméricas de PBLG-derivados/CDDP.....	30
Obtención de una curva de calibración de CDDP en DMF.....	32
Obtención de una curva de calibración de CDDP-OPDA en DMF.....	32
Determinación del porcentajes de encapsulación de cisplatino.....	33
Método 1.....	33
Método 2.....	33
Determinación del porcentaje de rendimiento del método de nanoprecipitación.....	34
Determinación de la cantidad óptima de fármaco CDDP a vectorizar.....	34
Efecto del NaCl sobre la encapsulación.....	35
Efecto del pH sobre la encapsulación.....	35
Estudio de liberación de cisplatino <i>in vitro</i>	35
Determinación del potencial Z.....	36
Determinación del diámetro hidrodinámico.....	36
Microscopia Electrónica de Transmisión.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
Estudio de solubilidad del CDDP.....	38
Síntesis de las nanopartículas poliméricas de PBLG-derivados/CDDP y caracterización por DLS y potencial Z.....	38
Estandarización y evaluación de las condiciones de encapsulación del <i>cis</i> -diaminodicloroplatino(II) en los sistemas de nanopartículas poliméricas conteniendo	

PBLG- β -CD-50.....	40
Efecto del NaCl y del pH sobre la encapsulación.....	53
Determinación de la cantidad óptima de fármaco CDDP a vectorizar.....	53
Determinación del porcentaje de rendimiento del método de nanoprecipitación.....	55
Caracterización por Microscopia Electrónica de Transmisión.....	59
Estudio del perfil de liberación de cisplatino de las nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-32/CDDP y PBLG- β -CD-50/CDDP (sistemas 6 y 8).....	65
CONCLUSIONES.....	71
PERSPECTIVAS.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	A) Estructura química del cisplatino. B) Equilibrio inicial del cisplatino en agua.....	6
2	Representación esquemática de la quelación de Pt (NH ₃) ₂ ²⁺ a dos bases de guanina vecinas.....	9
3	Estructura de la molécula del PBLG-β-CD.....	16
4	A) Estructura de la molécula de β-ciclodextrina. B) Representación espacial de la molécula de β-ciclodextrina. C) Representación de la inclusión de una molécula modelo (Aspirina) en la cavidad hidrofóbica de la β-ciclodextrina.....	18
5	Espectros UV-Vis de CDDP disuelto en DMF a diferentes concentraciones	41
6	Curva de calibración de solución de CDDP en DMF.....	41
7	Espectro UV-Vis del PBLG-Bnz-50 en DMF.....	42
8	Espectro UV-Vis del PBLG-β-CD-50 en DMF.....	42
9	Espectro UV-Vis del Poloxamer 188 en DMF.....	43
10	Espectro UV-Vis del sistema CDDP + PBLG-Bnz-50 + Poloxamer 188 en DMF.....	44
11	Espectro UV-Vis del sistema CDDP + PBLG-β-CD-50 + Poloxamer 188 en DMF.....	44
12	Espectro UV-Vis del sistema 1 de nanopartículas poliméricas.....	45

13	Espectro UV-Vis del sistema 2 de nanopartículas poliméricas.....	46
14	Espectro característico del complejo de CDDP (platino) (8.2 µg/mL) con la OPDA (10 mg/mL) en DMF.....	48
15	Curva de calibración.....	48
16	Encapsulación de CDDP por los sistemas de nanopartículas de PBLG-Bnz-32/CDDP incorporando diferentes cantidades de CDDP, manteniendo constante la cantidad de polímero.....	54
17	Micrografía de los sistemas de nanopartículas poliméricas: A) 3, B) 4, C) 5, D) 6, E) 7, y F) 8.....	61
18	Gráfico comparativo de los tamaños de nanopartículas medidos sobre las micrografías de MET para los sistemas de nanopartículas poliméricas del 3 al 8.....	63
19	Espectros del complejo CDDP-OPDA correspondientes al perfil de liberación del sistema 6 de nanopartículas en medio buffer pH 7.4.....	65
20	Espectros del complejo CDDP-OPDA correspondientes al perfil de liberación del sistema 8 de nanopartículas en medio buffer pH 7.4.....	66
21	Perfil de liberación de CDDP correspondientes al sistema 6 y 8 de nanopartículas.....	66
22	Perfil de liberación de CDDP correspondientes a los sistemas 6 y 8 de nanopartículas en medio buffer pH 7.4, haciendo énfasis en las cuatro primeras horas del estudio.....	67
22	Comportamiento esperado en un perfil de liberación de fármaco de un sistema vector.....	68

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Condiciones de síntesis de las nanopartículas de PBLG-Bnz-32, PBLG-Bnz-50 y PBLG- β -CD-50 conteniendo CDDP.....	31
2	Solubilidad del CDDP en diferentes solventes.....	38
3	Caracterización de los sistemas de nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-32 y PBLG- β -CD-50.....	39
4	Porcentaje de encapsulación y porcentaje de eficiencia de encapsulación de los sistemas 6 y 7 de nanopartículas poliméricas.....	50
5	Porcentaje de rendimiento del método de síntesis de las nanopartículas poliméricas del sistema 6.....	55
6	Porcentaje de encapsulación y porcentaje de eficiencia de encapsulación de los sistemas 6 y 8 de nanopartículas poliméricas.....	56

LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

PBLG-Bnz	Poli(L-glutamato de γ -bencilo)
CDDP, cisplatino	<i>Cis</i> -diclorodiaminoplatino II
PBLG- β -CD	Poli(L-glutamato de γ -bencilo)- β -ciclodextrina
PBLG-Bnz-32	Poli(L-glutamato de γ -bencilo) MW= 32000 g/mol
THF	Tetrahidrofurano
DMF	N, N-Dimetilformamida
PBLG- β -CD-50	Poli(L-glutamato de γ -bencilo)- β -ciclodextrina MW= 46000 g/mol
PBLG-Bnz-50	Poli(L-glutamato de γ -bencilo) MW= 45000 g/mol
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
β -CD	β -ciclodextrina
MET	Microscopia electrónica de transmisión
DLS	Dispersión dinámica de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PAMAM	Poli(amidoamina)
CMC	Concentración micelar crítica
PBLG-PEO	Poli(L-glutamato de γ -bencilo)-poli(etilén óxido)
Kc	Constante de equilibrio
Kd	Constante de disociación

UV-Vis	Ultra violeta-visible
PBS	Phosphate buffered saline
HPLC	High-performance liquid chromatography
PLGA-mPEG	Ácido poli(láctico-co-glicólico)-metoxi-poli(etilén glicol)
Conc.	Concentración
OPDA	<i>o</i> -fenilendiamina
NaCl	Cloruro de sodio
ATF	Ácido trifluoroacético
mV	Milivolts
Abs	Absorbancia
mg/mL	Miligramos/mililitro
nm	Nanómetros
Da	Daltons
D. E.	Desviación estándar
PBLG-PEG-60	Poli(etilén glicol)- <i>b</i> -Poli(L-glutamato de γ -bencilo) Mw= 60KDa
μ g/mL	Microgramos/mililitro
HP- β -CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló y caracterizó la formulación del fármaco anticancerígeno *cis*-diclorodiaminoplatino II (cisplatino, CDDP) en nanopartículas PBLG-Bnz-32 y PBLG- β -CD-50, en suspensión acuosa, utilizando el método de nanoprecipitación.

Se evaluaron diferentes condiciones (concentración y solubilidad del CDDP) a fin de determinar el método de nanoprecipitación que permita el mayor porcentaje de encapsulación de CDDP en las nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-32.

Las nanopartículas se caracterizaron mediante MET, DLS y potencial Z. Los diámetros hidrodinámicos de los sistemas de nanopartículas de PBLG- β -CD-50/CDDP y PBLG-Bnz-32/CDDP fueron mayores que los obtenidos en sus sistemas blanco. La medición del potencial Z mostró que todos los sistemas de nanopartículas de PBLG-Bnz-32/CDDP y PBLG- β -CD-50/CDDP estaban cargados negativamente en su superficie.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede sugerir que la presencia de moléculas de β -ciclodextrina (β -CD) en el vector promueve un aumento en el porcentaje de encapsulación del cisplatino. Este incremento puede estar asociado a la capacidad de la β -CD de incluir moléculas huésped en su cavidad hidrofóbica y pudieran reducir el ordenamiento de las moléculas poliméricas de PBLG en forma de bastoncillos en α -hélice, lo

cual permitiría incorporar aun mas moléculas de CDDP en la matriz polimérica de las nanopartículas.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado considerablemente el estudio de los sistemas de vectorización de fármacos. Se define la vectorización como la operación tecnológica destinada a modular y, en el caso ideal, dirigir un principio activo en el organismo. En farmacología, se conoce como vector la forma farmacéutica que engloba al fármaco, de tal forma que es la estructura química del vector la responsable de las propiedades del conjunto "vector-principio activo" ⁽¹⁾. Por consiguiente, un sistema vector debe tener la capacidad de incorporar moléculas de fármaco, permitiendo su liberación controlada en un tejido específico, reduciendo de esta manera sus efectos secundarios y su inespecificidad ⁽¹⁻³⁾. A su vez, el sistema vector permite proteger al principio activo de la degradación enzimática y de la opsonización por adsorción de proteínas, lográndose un aumento del tiempo de vida media del fármaco en el organismo. La liberación controlada es una de las funciones más importantes de un sistema vector, ya que gran parte de los efectos secundarios de los medicamentos están asociados a la dosis, la cual en medicamentos convencionales debe ser alta y repetitiva.

En la actualidad se han estudiado diferentes tipos de sistemas vectores, como lo son liposomas, micropartículas o nanopartículas ⁽⁴⁻¹³⁾. Entre estas se encuentran las nanopartículas poliméricas, las cuales, para funcionar como sistemas vectores de fármacos, deben presentar propiedades específicas tales como:

- Biocompatibilidad, es decir, los sistemas vectores no deben provocar reacciones alérgicas o inmunitarias al entrar en contacto con el organismo.
- Estabilidad, tanto en el torrente sanguíneo como en otros tejidos.
- Capacidad de incorporar y liberar un fármaco.

- Biodegradabilidad, entre otras.

Los polímeros derivados del poli(L-glutamato de γ -bencilo) (PBLG), representan una importante alternativa en la búsqueda de la obtención de sistemas de nanopartículas con propiedades específicas, ya que se le han incorporado diferentes moléculas a la cadena polipeptídica del PBLG, las cuales tienen funciones determinadas dentro del sistema vector ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. Una de estas moléculas es la β -ciclodextrina, cuya función específica es el incremento en la incorporación de principios activos hidrofóbicos al sistema de nanopartículas en suspensión acuosa.

El *cis*-diclorodiaminoplatino II (cisplatino, CDDP) es una molécula de 301.1 g/mol de peso molecular cuya fórmula (inactiva) es $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})_2$. En la actualidad el cisplatino es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer epitelial, tales como de pulmón, ovario, vejiga y testículo ⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. Son bien conocidos los efectos secundarios que provoca en los pacientes la terapia con este quimioterapéutico, como por ejemplo la toxicidad renal, gastrointestinal y la neurotoxicidad, que incluye neuropatía periférica y afeción de la capacidad auditiva ⁽¹⁸⁾.

En el presente trabajo se buscó incorporar el fármaco cisplatino en sistemas de nanopartículas a base de los polímeros poli(L-glutamato de γ -bencilo) y poli(L-glutamato de γ -bencilo)- β -ciclodextrina, por el método de nanoprecipitación.

Con la finalidad de estandarizar las condiciones de síntesis de los sistemas vectores, se llevaron a cabo diferentes estudios buscando la obtención de los mejores porcentajes de encapsulación de CDDP. Se evaluó el efecto de la disolución del fármaco, en el porcentaje de encapsulación en nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-32, disolviendo el principio activo

tanto en la fase orgánica (DMF) como en la fase acuosa. Los resultados mostraron que el método de nanoprecipitación en el que se llevó a cabo la disolución del cisplatino en la fase acuosa, promueve un aumento en el porcentaje de encapsulación de CDDP, en comparación con el método de disolución en DMF.

Se llevó a cabo un estudio en el cual se añadieron diferentes cantidades de CDDP en la síntesis de las nanopartículas de PBLG-Bnz-32/CDDP, manteniendo la concentración del polímero sin variación. Los resultados mostraron que con la adición de 800 µg de fármaco en la síntesis de las nanopartículas se obtienen los más altos porcentajes de encapsulación.

Con estos estudios se logró estandarizar las condiciones de nanoprecipitación para la posterior realización de experimentos con sistemas a base de PBLG-β-CD-50/CDDP.

Se llevaron a cabo estudios de encapsulación con sistemas de nanopartículas a base de PBLG-Bnz-32/CDDP y el PBLG-β-CD-50/CDDP. Los resultados muestran que los sistemas vectores nanoparticulados sintetizados a partir de derivados del PBLG proporcionan porcentajes de encapsulación de CDDP similares a los sistemas previamente reportados en la literatura con otros polímeros, como el PLGA (ácido poli(láctico-*co*-glicólico)), en los cuales se obtuvieron porcentajes de encapsulación menores al 1% ⁽²⁰⁾. Cabe mencionar que en el caso de los derivados del PBLG el porcentaje de eficiencia es mayor debido a que se requiere una menor proporción fármaco-polímero para alcanzar dicha tasa de encapsulación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede sugerir que la presencia de moléculas de β-ciclodextrina en el vector promueve un aumento en el porcentaje de encapsulación del cisplatino. Este incremento puede estar asociado a la capacidad de la β-CD de incorporar moléculas huésped en su cavidad hidrofóbica y a su posible efecto en la disminución del

ordenamiento de las cadenas de PBLG en conformación α -hélice que forman la matriz de la nanopartícula.

Las nanopartículas fueron caracterizadas por microscopia electrónica de transmisión (MET), dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z. Los diámetros hidrodinámicos de los sistemas de nanopartículas de PBLG- β -CD-50/CDDP y PBLG-Bnz-32/CDDP, sintetizados por el método de THF, fueron mayores que los obtenidos en los sistemas blanco de cada suspensión. Sin embargo, el diámetro hidrodinámico obtenido para el sistema de nanopartículas de PBLG-Bnz-32/CDDP sintetizado por nanoprecipitación empleando DMF, fue inferior al de los dos sistemas anteriormente mencionados, y además, muy similar al de su sistema blanco.

La medición del potencial Z, mostró que todos los sistemas de nanopartículas de PBLG-Bnz-32 y PBLG- β -CD-50 están cargados negativamente en su superficie, y que la presencia de moléculas de CDDP y complejos de β -CD/CDDP tienen la capacidad de afectar la carga superficial de los sistemas, aunque dichos resultados deben corroborarse debido a la aparición de valores altos de desviación estándar.

Las micrografías obtenidas por MET muestran diferencia en la morfología de los sistemas cargados con CDDP a la de los sistemas blanco, así como también a la de los dos sistemas de PBLG-Bnz-32/CDDP sintetizados por el método de THF y DMF.

Por otra parte, se llevaron a cabo otros experimentos con la finalidad de incrementar la cantidad de CDDP encapsulado en sistemas de PBLG-Bnz-32/CDDP. En el primero de ellos, se añadieron cantidades de NaCl a la fase acuosa en el proceso de síntesis por nanoprecipitación. En el segundo, se añadieron diferentes volúmenes de ácido trifluoroacético a la fase acuosa. El primer experimento tuvo la finalidad de disminuir el grado de hidrólisis del

CDDP en solución acuosa. El segundo, la desnaturalización de la conformación en α -hélice de las cadenas poliméricas del PBLG. Ambos resultados fueron infructuosos dado que los sistemas de nanopartículas precipitaban en el momento de la síntesis, por lo que fue imposible la realización de otros estudios.

Se buscó determinar los perfiles de liberación de CDDP de nanopartículas de PBLG-Bnz-32/CDDP y PBLG- β -CD-50/CDDP en solución amortiguadora de fosfato pH 7.4, sin embargo los resultados obtenidos no fueron concluyentes, por lo que se sugiere profundizar más en este estudio a fin de obtener resultados reproducibles.

ANTECEDENTES

El cisplatino

Los derivados anticancerígenos de platino consisten en complejos neutros del metal en estado de oxidación platino(II), planares, en configuración *cis* ⁽¹⁸⁾. Dichos complejos pueden ser descritos con la fórmula *cis*-[PtA₂X₂], en el que A₂ representa a dos ligantes monodentados o un ligante bidentado con la presencia de grupos funcionales amino. X₂ representa dos ligantes monodentados o un ligante bidentado aniónico, el cual es un grupo lábil en solución acuosa y bajo ciertas condiciones ⁽¹⁸⁾.

El *cis*-diaminodicloroplatino(II) (cisplatino, CDDP) fue el primer anticancerígeno derivado de platino en ser identificado, en 1847, siendo conocido primeramente como sal de Peyrone ⁽¹⁹⁾. Se trata de una molécula de 301.1 g/mol de peso molecular cuya fórmula (inactiva) es Pt(NH₃)₂(Cl)₂, la cual se muestra en la Figura 1-A).

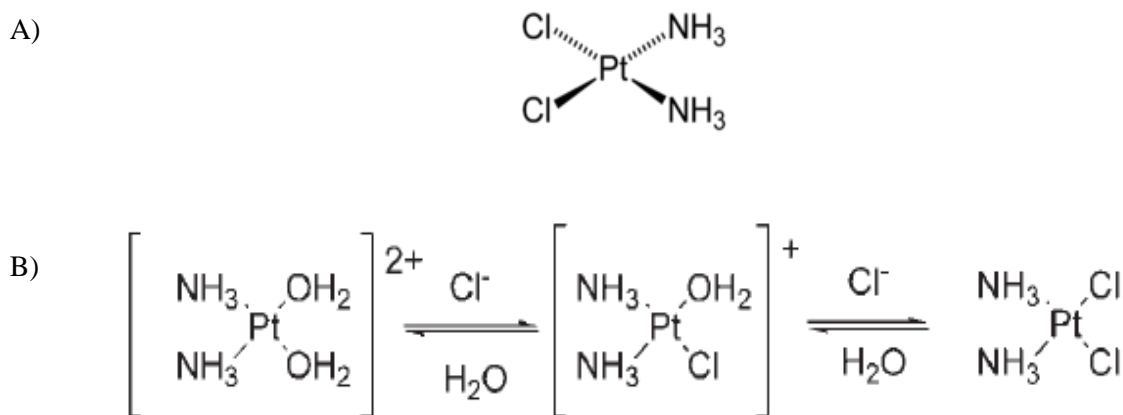


Figura 1: A) Estructura química del cisplatino. B) Equilibrio inicial del cisplatino en agua [Haxton y colaboradores, 2006].

En la Figura 1-B) se muestra el proceso de hidrólisis del cisplatino en solución acuosa. Este fármaco se estableció inicialmente como posible agente quimioterapéutico al descubrirse su capacidad de inhibición de la reproducción bacteriana ^(21,22), siendo aprobado para el tratamiento del cáncer testicular y de ovario en 1978 ^(23, 24). En la actualidad el cisplatino es utilizado en el tratamiento de cánceres epiteliales tales como de pulmón, ovario, vejiga y testículo ^(18, 19).

La pobre biodisponibilidad que presenta el cisplatino al administrarse de manera oral, genera la necesidad de administrar el fármaco como una infusión intravenosa, teniendo en consideración la necesidad de proporcionarle al paciente una extensiva hidratación antes, durante y después de su administración, con el objetivo de reducir la toxicidad renal ⁽²⁵⁾. En la actualidad, son bien conocidos los efectos secundarios que provoca en los pacientes la terapia con este quimioterapéutico, como por ejemplo, la toxicidad renal, gastrointestinal y la neurotoxicidad que incluye neuropatía periférica y afección de la capacidad auditiva ⁽²⁶⁾. Algunos de estos efectos secundarios son irreversibles para el paciente, mientras otros pueden desaparecer con ayuda de agentes quimioprotectores, principalmente que presenten grupos sulfuro libres, los cuales al unirse de manera irreversible al platino, reducen las formas activas del fármaco en medio acuoso ^(27, 28).

La hidrólisis del cisplatino es el proceso en donde los ligantes cloruro son reemplazados por moléculas de agua. En términos generales, el grado de cambio de los ligantes X_2 afecta la toxicidad de los complejos de platino, conociéndose este proceso como hidrólisis de las drogas de platino ^(25, 29). En fluidos biológicos, el grado de hidrólisis depende de la concentración de iones cloruro presentes en el medio. Cuando la concentración de estos iones es alta, como en el torrente sanguíneo por ejemplo, el grado de hidrólisis disminuye, lo

que provoca que la molécula no pueda unirse al DNA, RNA y a las proteínas ⁽²⁴⁾. De igual forma, si la concentración de iones cloruro es muy baja, se producirá una rápida hidrólisis que promoverá un aumento de especies reactivas de cisplatino, aumentando en gran medida la citotoxicidad ^(18, 30).

Se cree que el cisplatino ingresa a la célula por un proceso de difusión pasiva a través de la bicapa lipídica, debido a las restricciones estéricas que impedirían su entrada por los canales iónicos ⁽³¹⁾ o por vía del transportador de cobre CTR1 ⁽³²⁾. El fármaco ingresa a la célula en su forma original, ya que se ha demostrado que el aumento de la forma activa del fármaco no se relaciona con un aumento en la acumulación de platino celular ⁽³³⁾. A su vez, también se conocen mecanismos por los cuales las células cancerosas adquieren resistencia al cisplatino ⁽³⁴⁾, de los cuales destacan la reducción en la acumulación del fármaco intracelular por acción de barreras en la membrana celular, modulación de mecanismos apoptóticos, pérdida en la actividad de la p53 cinasa, aumento en la regulación de factores de transcripción e incremento en la remoción de platino por componentes celulares ricos en sulfuro como el glutatión ⁽³¹⁾.

El mecanismo de acción del cisplatino aun no se encuentra completamente dilucidado, pero se piensa que ocurre por inhibición de la división celular. Los complejos de platino se unen a donantes de nitrógeno en las purinas, bloqueando la síntesis de DNA ⁽³⁵⁾. Estudios cinéticos han demostrado que existe una mayoría en la presencia de aductos de platino-N7 (Nitrógeno 7 de la molécula de guanina) ^(25, 27) como se representa en la Figura 2. Cada molécula del fármaco puede formar dos uniones al DNA, ya sea uniendo una base de la misma cadena a la cual se une la molécula de cisplatino o una base de la cadena complementaria en la doble hélice.

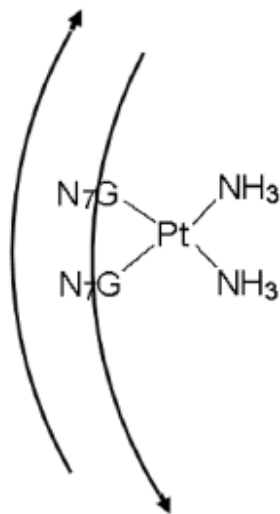


Figura 2: Representación esquemática de la quelación de $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ a dos bases de guanina vecinas. [Reedijk y colaboradores, 1985].

Inclusión del cisplatino en sistemas vectores

Los fármacos basados en platino presentan una limitada solubilidad en agua (2.5 mg/mL para el cisplatino), por lo cual se requiere de la utilización de sistemas vectores que permitan aumentar su incorporación en medios acuosos, reducir su toxicidad, y además, que tengan la capacidad de conducir al principio activo a un blanco específico. Un sistema vector puede estar compuesto por surfactantes, lípidos, polímeros o materiales inorgánicos, mediante los cuales se forman sistemas tales como las micelas ⁽³⁶⁻³⁸⁾, liposomas ⁽³⁹⁾, nanoesferas ⁽⁴⁰⁾, y nanopartículas ^(15, 20,41-44), además de la formación de complejos platino-polímero ⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾. Los sistemas vectores nanoparticulados presentan algunas ventajas en comparación con los otros sistemas vectores, dentro de las cuales se pueden destacar su estabilidad (comparado con los

sistemas micelares o liposomales) y su capacidad de ingreso por difusión pasiva en sistemas biológicos (si se compara con sistemas de mayor tamaño como los microparticulados) ⁽⁴⁵⁾.

Complejos platino-polímero

Estos sistemas constituyen la forma más simple de vectorización de cisplatino ⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾. Para poder generar esta clase de sistemas, se requiere que el polímero presente grupos ligantes disponibles al metal, como grupos amino o hidroxilo. El número de complejos depende tanto de la cantidad de grupos ligantes como del modo de unión, monodentado o bidentado.

Algunos polímeros que pueden presentar este tipo de complejos son el poli(ácido aspártico), el poli(ácido glutámico) o polímeros con grupos ligantes terminales como los dendrímeros de poli(amidoamina) ⁽³⁰⁾ o poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamina) ⁽⁴⁹⁾.

Los complejos platino-polímero se pueden administrar de manera directa o formulando sistemas de micelas u otro sistema vector particulado. Esta clase de complejos deben ser solubles en agua, por lo cual se deben utilizar copolímeros de dos bloques, en el que uno de ellos sea hidrosoluble, como el poli(etilén glicol), o bien, se deben generar sistemas con baja cantidad de fármaco a fin de evitar problemas de solubilidad y precipitación de los complejos. La preparación de complejos platino-polímero, implica la complejación del metal con una fracción de la cadena polimérica ya sintetizada, en lugar de ser sintetizados a partir de monómeros que contengan platino. La forma hidrolizada del cisplatino presenta mayor reactividad para la aparición de complejos. La liberación de los fármacos de platino conjugados con ligando carboxilato es en gran medida controlada por la concentración de

iones cloruro. El cisplatino, por sí solo, presenta mayor estabilidad en altas concentraciones de dicho ión, como ocurre por ejemplo en el plasma sanguíneo, mientras que en los complejos platino-polímero la presencia de iones cloruro promueve la liberación del fármaco del complejo ⁽⁵⁰⁾. El mecanismo de liberación del fármaco implica la división en pequeños complejos de platino de la cadena polimérica principal, bajo condiciones fisiológicas específicas ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾.

Las principales variables a considerar en el diseño de los complejos platino-polímero son el peso molecular, la densidad de los grupos ligantes, la solubilidad del polímero y la concentración del fármaco unido al polímero.

Complejos platino-Dendrímero

Los dendrímeros son polímeros altamente ramificados con distintos grupos funcionales terminales. Los dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) están disponibles actualmente en el mercado y han sido investigados como potenciales sistemas vectores para diferentes fármacos, entre ellos el cisplatino ^(53,54). Se ha demostrado que este fármaco puede formar complejos con grupos carboxílicos y posiblemente con los grupos amino internos ^(55,56), presentándose buena capacidad de incorporación, pero con la presencia de algunos agregados por el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas. Menos del 1% del platino es liberado después de 72 horas en condiciones que mimetizan el plasma sanguíneo. Se ha demostrado que la liberación del fármaco se promueve por el aumento en la acidez en el lisosoma, mientras que en torrente sanguíneo, el complejo se muestra estable, siendo de 200 a 500 veces menos tóxico que el cisplatino libre en roedores con tumores sólidos. Pellechia y

colaboradores ⁽⁵⁷⁾ demostraron la formación de complejos entre el platino y las aminas secundarias y terminales en dendrímeros de PAMAM de segunda y cuarta generación. La unión entre los grupos funcionales de los dendrímeros y el metal presentaba mayor estabilidad que en dendrímeros de primera generación, y por ende, la liberación del fármaco era de manera más prolongada.

Sistemas micelares

Los sistemas vectores micelares han sido investigados con la finalidad de incrementar la solubilidad en agua de compuestos hidrofóbicos ⁽⁵⁸⁾. Una micela puede ser considerada como agregados de moléculas de surfactante formados por encima de la concentración micelar crítica (CMC). En su estructura, en medio acuoso, las micelas presentan una arquitectura “núcleo-coraza”. El núcleo se forma con la parte hidrofóbica de las moléculas y la coraza se forma con la parte hidrofílica. Normalmente presentan una morfología esférica de entre 10 a 100 nm de tamaño, aunque se han reportado micelas tipo “gusano” ⁽⁵⁹⁾. Los fármacos hidrofóbicos pueden ser encapsulados en el núcleo de la micela, lo cual mejora en cierta medida su solubilidad. Sin embargo, en estos sistemas no se puede encapsular moléculas de carácter hidrofílico. El cisplatino presenta una solubilidad considerable en agua para ser encapsulado en micelas. Copolímeros de dos bloques llamados ionómeros se utilizan para superar esta limitación ⁽⁶⁰⁾. Estos copolímeros contienen bloques cargados que pueden reaccionar con moléculas de cargas opuestas, formando complejos capaces de ensamblarse en el núcleo de la micela. Las propiedades de algunos polímeros usados para la formación de

sistemas vectores se controlan mediante la longitud del bloque iónico, la densidad de carga y la fuerza iónica de la solución utilizada durante la formación de las micelas.

Las micelas formadas por polímeros ionómeros son sensibles a los cambios de pH y concentración de sal, lo cual permite controlar la liberación del principio activo, presentándose un potencial mecanismo de selectividad en la liberación, ya que esta se llevaría a cabo solo bajo ciertas condiciones específicas. Los complejos de platino pueden reaccionar con grupos cargados como los ácidos carboxílicos, los cuales inducen la formación de micelas con el complejo platino-polímero formado en el núcleo. La liberación de los complejos de platino de un sistema vector requiere la presencia de agua para lograr hidrolizar el enlace entre el metal y el polímero, así como la presencia de iones cloruro para evitar que se forme de nuevo el enlace platino-polímero.

Se ha estudiado una variedad de copolímeros de bloque formadores de sistemas micelares ^(40,61,62). Se ha encontrado que complejos de platino unidos a poli(ácido aspártico) ^(38,60) o poli(ácido glutámico) ⁽⁶¹⁾ presentan una capacidad de carga de fármaco superior al 40%. Uchino y colaboradores ⁽⁶²⁾ encontraron que la liberación de los complejos de platino depende en gran medida de la concentración de iones cloruro presentes en el medio, al formarse complejos micelares.

Sistemas vectores de nanopartículas y micropartículas poliméricas

La naturaleza química de los fármacos de platino hace que sean moléculas con características adecuadas para la formación de sistemas vectores poliméricos, en los cuales, existe una interacción (formación de complejo) entre el metal y las cadenas poliméricas.

La encapsulación de los fármacos de platino dentro de una matriz de polímero es complicada desde el punto de vista de solubilidad, sin embargo, se han logrado obtener sistemas estables por métodos físicos, ya sea por secado por atomización ⁽⁶³⁾, partición entre fases ⁽⁶⁴⁾ o por conjugación del fármaco con el polímero ⁽⁶⁵⁻⁶⁶⁾. Si bien, la encapsulación tiene sus desventajas, se han reportado buenos resultados en sistemas de micropartículas a base de albúmina ⁽⁶⁷⁾, quitosano ⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾ y ácido hialurónico ⁽⁷²⁾, los cuales presentan grupos capaces de interactuar con el cisplatino y en los que se han logrado incorporaciones de hasta 20%, 80% y 66% de CDDP, respectivamente. Microesferas sintetizadas a partir de un copolímero de dos bloques de poli(ácido láctico)-poli(caprolactona), recubiertas con poli(etilén glicol) como vectores del cisplatino han sido reportados previamente ⁽⁶⁶⁾.

El quitosano se ha utilizado en la formación de sistemas tanto de micro como de nanopartículas con resultados diversos, caracterizándose por ser sistemas con gran capacidad de encapsulación que liberan de manera rápida el principio activo ⁽⁷⁰⁾. Se ha logrado obtener sistemas vectores nanoparticulados de albúmina con resultados de hasta el 50% de encapsulación con una prolongada liberación en la arteria hepática, sin embargo, posteriores estudios demostraron que gran parte del fármaco era liberado durante la solubilización del principio activo antes de la administración, por lo que este sistema no demostró ser una alternativa que permitiera reducir la toxicidad del cisplatino ⁽⁷⁰⁾. Nanopartículas de ácido poli(acrílico-co-metil metacrilato) se han sintetizado, demostrando buenos rendimientos de encapsulación (cerca del 20 %) y una prolongada liberación controlada durante 6 días, la cual depende en gran medida del grado de difusión del medio acuoso, concentración de iones cloruro en la matriz de la nanopartícula y grado de degradación del polímero ⁽⁷⁴⁾.

El Poli (L-glutamato de γ -bencilo) como materia prima para formular sistemas vectores de fármacos

En la actualidad uno de los aspectos más importantes en la ingeniería de biomateriales es la biocompatibilidad. Desde ese punto de vista, el interés en los materiales poli(α -amino ácidos) sintéticos se ha incrementado por los investigadores en los últimos años, sobre todo para posibles aplicaciones en el campo farmacéutico ^(15,45,75-82). El poli(L-glutamato de γ -bencilo) es una poliamida perteneciente a la familia de los materiales poli(α -amino ácidos). En su estructura, este material presenta propiedades interesantes que hace posible su aplicación en la vectorización de principios activos. Este polímero presenta en su cadena principal una función amida degradable ⁽⁸³⁾. Además, tiene grupos amina y carboxilo en los extremos de la molécula, en los cuales pueden incorporarse moléculas con propiedades y funciones específicas, como se muestra en la Figura 3 para el caso de la β -ciclodextrina.

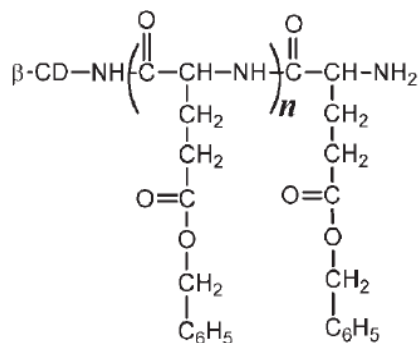


Figura 3: Estructura de la molécula del PBLG- β -CD [Martínez Barbosa y colaboradores, 2008].

La molécula del PBLG tiene en sus grupos laterales anillos bencénicos, los cuales pueden ser desprotegidos químicamente a fin de incorporar, de igual manera, moléculas específicas ⁽⁸³⁾.

A pesar de las citadas ventajas, el PBLG no ha sido muy utilizado para la preparación de sistemas vectores, a diferencia de los polímeros lineales como el ácido poli(láctico-co-glicólico) y sus copolímeros.

Li y colaboradores ⁽⁴⁵⁾ sintetizaron sistemas de microesferas de PBLG de 100 a 200 μm de diámetro, en las cuales encapsularon cisplatino. Encontraron que la viscosidad del solvente juega un papel importante en la capacidad de incorporación del fármaco en los sistemas de macropartículas, la cual está ligada a la proporción de polímero en la síntesis de las nanopartículas, con respecto a la concentración del cisplatino. Mostraron que el incremento en la concentración del polímero produce microesferas con una distribución de fármaco uniforme, en el que los cristales de cisplatino se encuentran en la matriz de la microesfera. A su vez, el incremento en la concentración del polímero promueve un aumento en la eficiencia en la incorporación del principio activo. Estudios de liberación *in vitro* mostraron que las microesferas con alto contenido de fármaco presentan una liberación prolongada, en la cual, menos del 70% del cisplatino era liberado en 120 horas por un proceso de difusión pasiva.

Jeong y colaboradores ⁽⁸⁴⁾, obtuvieron sistemas de nanopartículas modelo “núcleo-coraza” a partir de un copolímero de bloque de poli(L-glutamato de γ -bencilo)-poli(etilén óxido) (PBLG-PEO), el primero con características hidrofóbicas, y el segundo, con carácter hidrofílico. En las nanopartículas encapsularon clonazepam, presentando un comportamiento micelar en el que la concentración micelar crítica está relacionada con la longitud del segmento de PBLG, el cual forma el núcleo de la micela donde se encuentra encapsulado el fármaco. Los valores de la CMC decrecen en los sistemas en los que el segmento hidrofóbico de PBLG es más extenso con respecto al de PEO. Los sistemas con mayor longitud en el segmento PBLG presentaron la mayor capacidad de encapsulación de clonazepam y la

liberación del principio activo fue más prolongada, liberándose menos del 40% del principio activo en los primeros seis días del estudio. La liberación se llevó a cabo por difusión pasiva.

Oh y colaboradores ⁽⁸⁵⁾ encapsularon adriamicina en nanopartículas de dibloque PBLG-PEO, sintetizadas a partir de diferentes proporciones del segmento de PBLG con respecto al de PEO. Se obtuvieron resultados de liberación del fármaco del 20% en las primeras 24 horas de encapsulación en plasma sanguíneo, demostrándose que los sistemas en donde existía mayor longitud del segmento PBLG se prolongaba el tiempo de liberación y existía una mayor encapsulación de adriamicina (12.6 %).

Las ciclodextrinas y su aplicación farmacéutica

El estudio de la estructura y las propiedades de las ciclodextrinas inició desde la primera mitad del siglo XX ⁽⁸⁶⁾ pese a que frecuentemente se piensa que son un nuevo grupo de moléculas con aplicaciones farmacéuticas. Sin embargo, no es hasta las últimas dos décadas que la producción de ciclodextrinas ha aumentado considerablemente debido a los avances en el campo de la biotecnología, lo que ha permitido además una reducción en sus costos de producción ⁽⁸⁶⁾. Las ciclodextrinas son utilizadas para incrementar la biodisponibilidad, estabilidad y solubilidad en medio acuoso de diferentes tipos de moléculas, por lo que son comúnmente utilizadas en la industria de los alimentos, agroquímica, cosmética y farmacéutica ⁽⁸⁶⁾. Desde el punto de vista estructural, las ciclodextrinas son complejos de oligosacáridos cíclicos con enlaces (α -1-4) de α -D-glucopiranososa, que adoptan una forma de cono truncado hueco, la cual presenta unos bordes hidrofílicos y una cavidad hidrófoba, como se muestra en la Figura 4 ⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾.

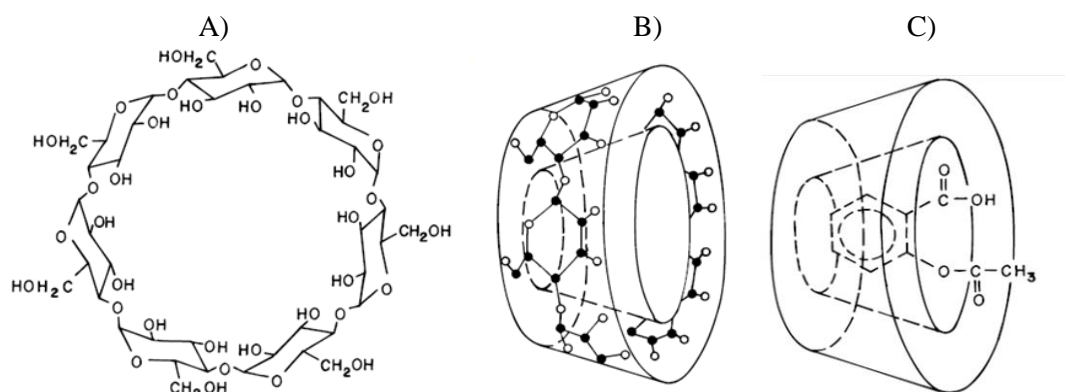


Figura 4: **A)** Estructura de la molécula de β -ciclodextrina. **B)** Representación espacial de la molécula de β -ciclodextrina. **C)** Representación de la inclusión de una molécula modelo (aspirina) en la cavidad hidrofóbica de la β -ciclodextrina [Loftsson y colaboradores, 1996].

Las ciclodextrinas pueden incorporar diferentes compuestos poco polares, entre ellos, moléculas con actividad farmacológica ⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾. Su morfología se debe a la falta de rotación en los enlaces que unen las unidades de glucopiranosas. Debido a las características de su estructura, los grupos hidroxilo primarios se localizan en el lado más estrecho de la estructura toroidal, mientras que los grupos hidroxilo secundarios, se encuentran en el borde más ancho. Las ciclodextrinas más comunes son la α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y la γ -ciclodextrina, las cuales consisten en seis, siete y ocho unidades de glucopiranosas respectivamente ⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾. Hasta el momento no se han reportado ciclodextrinas que presenten menos de seis unidades de glucopiranosas debido a factores estéricos, sin embargo, se han sintetizado ciclodextrinas que contienen de nueve a trece unidades.

Los puntos de fusión de los tipos más comunes de ciclodextrinas varían de 240 °C a 265 °C, consistentes con su estructura cristalina estable.

Como se mencionó anteriormente, estas moléculas han sido reconocidas como vectores con potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, dado que tienen la capacidad de formar complejos de inclusión en su cavidad central hidrofóbica. Dichos complejos no covalentes ofrecen una variedad de ventajas físico-químicas sobre las moléculas del fármaco sin complejar, como por ejemplo, el incremento en la solubilidad en agua y el aumento en la estabilidad en solución ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾.

Las ciclodextrinas, en particular la β -ciclodextrina, tienen una solubilidad limitada en agua (18.6 g/L a 25°C) comparada con la de los azúcares acíclicos (2000 g/L para la sucrosa a 25°C). Esta pobre solubilidad puede explicarse debido a las fuertes uniones entre las moléculas que conforman su estructura. La sustitución de los grupos OH secundarios por grupos metoxi ó etoxi, da como resultado un aumento considerable en la solubilidad de la β -ciclodextrina en medio acuoso, el cual se debe a la transformación de la estructura cristalina en mezclas amorfas de isómeros derivados.

La cavidad central de las moléculas de ciclodextrina está compuesta por un esqueleto de carbonos y oxígenos etéreos provenientes de los residuos de glucosa que conforman la molécula, presentando un comportamiento hidrofóbico. La polaridad de la cavidad provee de un microambiente apropiado para la inclusión de moléculas hidrofóbicas, formando uniones no covalentes, en el que la cantidad de principio activo no incorporado se encuentra en equilibrio con el que se encuentra dentro de la cavidad ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. Las fuerzas que intervienen en la formación de los complejos de ciclodextrina incluyen fuerzas de Van der Waals, transferencia de carga, puentes de hidrógeno y liberación de moléculas de agua de la cavidad ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. La determinación de la estequiometría del complejo formado, así como sus constantes de estabilidad se lleva a cabo mediante la observación de cambios en propiedades físico-químicas

tales como la solubilidad, absorbancia UV-Vis, retención del principio activo, reactividad química, entre otras ⁽⁸⁹⁾, con lo cual se puede determinar a su vez las constante de equilibrio (Kc) o de disociación (Kd).

Existen varios métodos para la preparación de complejos de ciclodextrinas con moléculas modelo, entre ellos se encuentran el método de solución, co-precipitación, neutralización, suspensión, molienda, entre otros ⁽⁹⁰⁾. En solución, los complejos de ciclodextrinas se preparan mediante la adición de cantidades en exceso de moléculas modelo a soluciones acuosas de ciclodextrina.

Se ha estudiado la utilización de ciclodextrinas a fin de incrementar la eficiencia de encapsulación de fármacos en sistemas vectores a base de liposomas y micropartículas ⁽⁹¹⁾. Sin embargo, la actividad conjunta de sistemas de nanopartículas poliméricas y moléculas de ciclodextrinas, presenta una alternativa aun más interesante. Esto debido a que, primeramente, los sistemas de nanopartículas presentan una mayor estabilidad en comparación a los liposomas. Comparado con las micropartículas, los sistemas de nanopartículas presentan una mayor área superficial, permitiendo un mejor contacto con las membranas biológicas y promoviendo un aumento en la biocompatibilidad. Son en particular interesantes los estudios que se han realizado con ciclodextrinas y nanopartículas de poli(alquil cianoacrilatos), dado que dichos polímeros presentan alta biodegradabilidad y procesos de polimerización simples ⁽⁹²⁾. Se logró demostrar que la presencia de moléculas de ciclodextrinas promueve un aumento en la solubilidad e incorporación de moléculas de esteroides tales como la progesterona en sistemas de nanopartículas de poli(isobutil cianoacrilato) ⁽⁹²⁾.

Capacidad de encapsulación y liberación de principios activos por los sistemas vectores

Para conocer la eficiencia y la viabilidad de un sistema vector, se debe tener la capacidad de cuantificar la cantidad de fármaco que se logra incorporar, ya que, hasta nuestros días, no existe un sistema que sea capaz de encapsular la totalidad del principio activo durante la síntesis del vector.

Los sistemas vectores de fármacos a base de polímeros biodegradables pueden clasificarse en cuatro diferentes categorías, como lo son los sistemas controlados por difusión, sistemas controlados químicamente, sistemas activados por solvente y sistemas controlados magnéticamente. Los sistemas controlados por difusión pueden incluir sistemas de reservorio y sistemas matriz. El primer tipo de sistema se basa en una membrana polimérica, la cual rodea a un núcleo contenedor del principio activo, mientras que el segundo está basado en una matriz polimérica, en la cual, el fármaco se encuentra distribuido homogéneamente. En ambos casos, la liberación del fármaco inclusionado se lleva a cabo por un proceso de difusión pasiva (considerando la posible liberación abrupta del fármaco debido a la ruptura de la envoltura polimérica).

Los sistemas controlados químicamente incluyen conjugados de las moléculas del fármaco con las moléculas del polímero que conforman el sistema vector. La liberación del fármaco se lleva a cabo rompiendo el enlace fármaco-polímero, ya sea mediante un proceso de hidrólisis o por acción enzimática (dicho proceso se lleva a cabo dentro del medio biológico en el cual se pretende vectorizar el principio activo).

Los sistemas activados por solventes pueden ser controlados tanto por hinchamiento como por ósmosis. Los primeros son sistemas basados en el entrecruzamiento de cadenas de polímero hidrofílico, las cuales tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua sin disolverse. El intercambio de moléculas de agua dentro del sistema permite que las moléculas del fármaco sean liberadas. Los sistemas controlados por ósmosis se basan en un dispositivo que contiene una membrana semipermeable a través de la cual se lleva a cabo un flujo de solvente hacia una cámara con alto contenido de fármaco. La velocidad en la liberación del principio activo se basa en la concentración de las moléculas del mismo, y en la velocidad de intercambio entre las moléculas del solvente con las del fármaco.

Finalmente, los sistemas controlados magnéticamente se obtienen mediante la combinación de sistemas particulados a partir de polímeros biodegradables y materiales magnéticos. Debido a las propiedades presentes en esta clase de sistemas, el movimiento de los mismos puede ser controlado dentro del organismo mediante la aplicación de un campo magnético. Los sistemas empleados hasta el momento se basan en la utilización de partículas de hierro, cobalto y níquel, principalmente. La estrategia más utilizada para la obtención de un sistema vector controlado magnéticamente se basa en la utilización de polímeros denominados inteligentes, los cuales son sensibles y presentan determinadas respuestas a estímulos externos, como cambios de temperatura o pH⁽⁹³⁾.

La eficiencia de encapsulación suele representarse con porcentajes, denominados parámetros de encapsulación, comúnmente llamados porcentaje de encapsulación y porcentaje de eficiencia. Si bien, la exposición de resultados en porcentajes es común, también existen modificaciones a los parámetros mencionados, o en su defecto, también los resultados pueden ser expresados en unidades de concentración, esto es, evaluando la concentración del fármaco

ya incorporado al vector con respecto a la cantidad de polímero que se emplea para sintetizarlo. La cuantificación del principio activo depende del tipo de fármaco encapsulado. Li y colaboradores ⁽⁴⁵⁾ incorporaron cisplatino en microesferas de PBLG. Se conoce que este fármaco presenta un máximo de absorción a los 310 nm en el espectro UV-Vis. Habiendo realizado previamente una curva de calibración, determinaron parámetros de “encapsulación final del fármaco” y “eficiencia en la incorporación”, disolviendo el producto liofilizado de las microesferas en DMF y obteniendo el espectro por la técnica UV-Vis.

Jeong y colaboradores ⁽⁸⁴⁾ sintetizaron micelas de PBLG-PEO, encapsulando clonazepam. Para la cuantificación del fármaco, las micelas liofilizadas fueron suspendidas en metanol, centrifugándose a 12000 rpm. La cantidad de principio activo fue cuantificado en el sobrenadante, obteniéndose el espectro UV-Vis, conociendo que el clonazepam presenta un máximo a los 309 nm. Con ello obtuvieron el porcentaje de encapsulación y el porcentaje de eficiencia.

Se han sintetizado nanopartículas de poli(ácido γ -glutámico)-poli(láctico) cargadas con paclitaxel ⁽⁹⁴⁾, obteniéndose de igual forma parámetros de porcentaje de encapsulación y porcentaje de eficiencia por la técnica de HPLC, monitoreándose la columna con un detector UV-Vis a 227 nm.

Avgoustakis y colaboradores ⁽²⁰⁾ sintetizaron nanopartículas de poli(láctico-co-glicólico)-monometoxi poli(etilén glicol) encapsulando cisplatino. Determinaron porcentaje de encapsulación mediante un método directo y uno indirecto de cuantificación. En el método directo, nanopartículas liofilizadas fueron disueltas en DMF. El contenido de fármaco fue determinado a 310 nm por la técnica de UV-Vis. En el método indirecto las nanopartículas

fueron centrifugadas a 28000 rpm y el sobrenadante se estudió por espectroscopia de absorción atómica, midiendo la absorción a 269 nm.

Nanopartículas de sílica funcionalizadas con cisplatino fueron analizadas mediante su actividad en condrocitos ⁽⁹⁵⁾. Se llevó a cabo una estimación del fármaco, midiendo la cantidad de platino presente en plasma sanguíneo mediante la técnica espectrometría de masas de plasma acoplado.

De manera general, los parámetros de encapsulación podrían representarse de la siguiente manera:

$$\% \text{ Encapsulación} = \frac{\text{Peso del fármaco}}{\text{Peso total de las nanopartículas}} \times 100 \% \quad \text{ec. 1}$$

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{\text{Peso del fármaco}}{\text{Peso inicial del fármaco}} \times 100 \% \quad \text{ec. 2}$$

Determinación de perfil de liberación

Es de gran importancia que los sistemas vectores tengan la capacidad de liberar de manera controlada el principio activo. La determinación del perfil de liberación se lleva a cabo generalmente en medios que intentan mimetizar condiciones fisiológicas, esto es, a determinados valores de pH, concentración de iones, en la presencia de proteínas y otras biomoléculas. El perfil de liberación muestra cómo cambia la concentración del fármaco

liberado con respecto al tiempo, iniciando con variaciones notables a tiempos cortos (efecto Burst), para que finalmente se alcance una concentración estable en tiempos largos.

Li y colaboradores ⁽⁴⁵⁾ determinaron el perfil liberación de cisplatino de su sistema de microesferas de PBLG en medio buffer de fosfato a pH 7.4. El medio con las partículas se centrifugó y el sobrenadante se analizó por UV-Vis. A su vez también determinaron el perfil de liberación del fármaco en plasma canino a 37°C a fin de determinar si la presencia de biomoléculas presentaba alguna injerencia en la liberación. Los estudios llevados a cabo en medio buffer mostraron que los sistemas de microesferas en los cuales presenta una mayor encapsulación de CDDP (44%), muestran liberaciones más prolongadas. En dichos sistemas, solo el 9.8% del fármaco es liberado en las primeras tres horas del estudio. Por otra parte, sistemas de microesferas con encapsulación de CDDP de hasta el 21.5%, presentan tasas de liberación de principio activo de 46.3% en las primeras tres horas del estudio. Estas diferencias se atribuyen al tipo de inclusión del fármaco en el sistema. Las moléculas de CDDP presentes en la matriz de la partícula, se liberarían por difusión pasiva de manera más lenta en comparación con las adsorbidas en la superficie de la misma. En la determinación del perfil de liberación del fármaco en plasma canino, los resultados son muy similares a los obtenidos en PBS, con lo cual se demostró que la presencia de biomoléculas en el medio no presentó injerencia en el perfil de liberación de CDDP.

Jeong y colaboradores ⁽⁸⁴⁾ determinaron el perfil de liberación de clonazepam de sistemas micelares de PBLG-PEO en buffer de fosfato, utilizando una membrana de diálisis a fin de separar el medio en el que se encuentran las micelas del medio externo en donde el fármaco es liberado. El volumen de micelas que se extrajo para la medición en UV-Vis se reemplazó por medio buffer fresco a fin de evitar saturación de clonazepam.

El perfil de liberación de un sistema de nanopartículas de poli(ácido γ -glutámico)-poli(láctico) encapsulando paclitaxel se obtuvo en buffer PBS ⁽⁹⁴⁾. El medio con las nanopartículas se centrifugó a fin de separar el sobrenadante, el cual se liofilizó y el producto se disolvió en una mezcla de etanol-agua. La concentración de paclitaxel se determinó a distintos intervalos de tiempo utilizando HPLC.

Avgoustakis y colaboradores ⁽²⁰⁾ cuantificaron la persistencia en sangre de nanopartículas de PLGA-mPEG encapsulando cisplatino, en modelos murinos BALB/c. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca, después se liofilizaron y el contenido de platino se obtuvo por fluorescencia de rayos X.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Desarrollar y caracterizar una formulación de un fármaco anticancerígeno en nanopartículas poliméricas a base de PBLG- β -ciclodextrina.

Objetivos Particulares

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas poliméricas conteniendo PBLG- β -CD-50 por las técnicas de microscopia electrónica de transmisión (MET), Potencial Z y dispersión dinámica de luz (DLS).
- Estandarizar la técnica de nanoprecipitación para optimizar la encapsulación del *cis*-diaminodicloroplatino II (cisplatino, CDDP) en los sistemas de nanopartículas poliméricas conteniendo PBLG- β -CD-50.
- Determinar el porcentaje de encapsulación y la eficiencia de encapsulación del fármaco cisplatino en nanopartículas poliméricas conteniendo PBLG- β -CD-50.
- Obtener el perfil de liberación del fármaco cisplatino en la formulación de nanopartículas poliméricas conteniendo PBLG- β -CD-50.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

- Poli(L-glutamato de γ -bencilo) PM=45000 g/mol (sintetizado por la Dra. María Elisa Martínez Barbosa y col. ⁽¹⁴⁾)
- Poli(L-glutamato de γ -bencilo)-*b*-Poli(etilén glicol) PM= 51000 g/mol (sintetizado por la Dra. María Elisa Martínez Barbosa y col. ⁽¹⁴⁾)
- Poli(L-glutamato de γ -bencilo) PM=32000 g/mol (sintetizado por estudiantes de la Facultad de Farmacia Université Paris-Sud 11)
- *cis*-diaminodicloroplatino II (cisplatino, CDDP) (Sigma-Aldrich)
- OPDA (Sigma-Aldrich)
- THF (Sigma-Aldrich)
- DMF (Fluka)
- Agua deionizada (Mili Q)
- Solución Buffer de fosfato pH 7.4 (Sigma-Aldrich)
- Poloxamer 188 (Lutrol[®])
- Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich)
- Ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich)
- Ácido fosfotúngstico (Sigma-Aldrich)

Equipos

- Balanza analítica, Olaus y Sartorius. DIPM-UNISON.
- Deionizador de agua, Mili Q. DIPM-UNISON.
- Placa de agitación, Barnstead thermolyne. DIPM-UNISON.
- Ultracentrífuga, LE-80 K Beckman Coulter. Facultad de Farmacia, Université Paris-Sud 11.
- Espectrofotómetro, Perkin Elmer UV/visible Lambda 2. DIPM-UNISON.
- Espectrofotómetro, Perkin Elmer UV/visible Lambda 25. Facultad de Farmacia, Université Paris-Sud 11.
- Liofilizador, Labconco FreeZone, DCQB-UNISON.
- Liofilizador, Labconco FreeZone, DIPM-UNISON.
- Liofilizador, Alpha 1-2/LD plus. Facultad de Farmacia Université Paris-Sud 11.
- Equipo de dispersión de luz, Malvern Zetasizer Nano ZS. Facultad de Farmacia Université Paris-Sud 11.
- Microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM-2010F. Université Paris-Sud 11-Orsay.
- Microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM-2010F. Universidad de Sonora.

Métodos

Estudio de solubilidad del CDDP

Se pesaron 2.5 mg de CDDP en distintos viales, a los cuales se les añadió un volumen de 5 mL de THF, DMF y agua deionizada por separado. Después de 24 horas en agitación magnética, cada vial se calentó en 5 ocasiones a 100°C durante 30 minutos en agitación magnética constante, a fin de promover la disolución.

Síntesis de las nanopartículas poliméricas de PBLG-derivados/CDDP

En la Tabla 1 se muestran los parámetros modificados en la síntesis de los diferentes sistemas nanoestructurados preparados durante este trabajo. Dicha síntesis se llevó a cabo por el método de nanoprecipitación ⁽⁹⁶⁾, ligeramente modificado por Martínez Barbosa ⁽¹⁴⁾, el cual consiste en lo siguiente: una cantidad de polímero se disolvió en un solvente miscible en agua (DMF ó THF) a 30°C. La solución de polímero se vertió lentamente en una solución acuosa con 0.125% de poloxamer 188. La formación de las nanopartículas se llevó a cabo en agitación magnética constante. Posteriormente, el solvente se eliminó, con lo que se obtuvo una suspensión coloidal de nanopartículas poliméricas en suspensión acuosa, conteniendo el fármaco anticancerígeno cisplatino. La incorporación del fármaco al sistema se llevó a cabo de diferentes formas (ver Tabla 1). Para eliminar el CDDP no incorporado, las nanopartículas se filtraron en filtros Millipore de 0.45 µm de poro. Posteriormente se llevó a cabo una

purificación del sistema de nanopartículas en suspensión acuosa (ver Tabla 1). Finalmente, las nanopartículas se almacenaron a 4°C para futuros estudios.

Tabla 1: Condiciones de síntesis de las nanopartículas de PBLG-Bnz-32, PBLG-Bnz-50 y PBLG-β-CD-50 conteniendo CDDP y sus respectivos sistemas blancos

Sistema	Polímero	Conc. del polímero	Solvente	Eliminación del solvente	Purificación	CDDP incorporado en	Conc.
1	PBLG-Bnz-50	3 mg/mL	THF	Evaporación	Diálisis	H ₂ O	1.5 mg/mL
2	PBLG-Bnz-50	3 mg/mL	THF	Evaporación	Diálisis	THF	1.5 mg/mL
3	PBLG-Bnz-32	3 mg/mL	THF	Evaporación	Ultra centrifugación	-	-
4	PBLG-Bnz-32	3 mg/mL	DMF	Diálisis	Diálisis	-	-
5	PBLG-β-CD-50	3 mg/mL	THF	Evaporación	Ultra centrifugación	-	-
6	PBLG-Bnz-32	3 mg/mL	THF	Evaporación	Ultra centrifugación	H ₂ O	8 μg/mL
7	PBLG-Bnz-32	3 mg/mL	DMF	Diálisis	Diálisis	DMF	8 μg/mL
8	PBLG-β-CD-50	3 mg/mL	THF	Evaporación	Ultra centrifugación	H ₂ O	8 μg/mL

Obtención de una curva de calibración de CDDP en DMF

Se preparó una solución madre de CDDP en DMF a una concentración 3 mg/mL, a temperatura ambiente. A partir de dicha solución se obtuvieron diluciones a concentraciones: 2.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.0 mg/mL y 0.5 mg/mL. De estas soluciones se obtuvieron espectros UV-Vis en un rango de 190 nm a 500 nm a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/visible Lambda 2, empleando DMF como blanco.

Obtención de una curva de calibración de CDDP-OPDA en DMF

Se obtuvo una curva de calibración de complejos de CDDP-OPDA utilizando el método descrito por Golla y colaboradores ⁽⁹⁷⁾. Se preparó una solución madre de CDDP en DMF, de concentración 2.09 mg/mL a temperatura ambiente. A partir de dicha solución se prepararon disoluciones a concentraciones: 1.025 µg/mL, 2.05 µg/mL, 4.1 µg/mL, 8.2 µg/mL y 16.4 µg/mL. A cada solución de CDDP se le añadió 1 mL de solución OPDA en DMF (10 mg/mL). Cada mezcla se calentó en baño de agua a 100°C durante 10 minutos. Posteriormente, las mezclas se introdujeron en baño de hielo durante 10 minutos. Se obtuvieron espectros UV-Vis en un rango de 250 nm a 850 nm de cada solución, a temperatura ambiente, empleando DMF como blanco. Las concentraciones finales de los complejos CDDP-OPDA que se usaron en la curva de calibración fueron: 0.5125 µg/mL, 1.025 µg/mL, 2.05 µg/mL, 4.1 µg/mL y 8.2 µg/mL. El complejo CDDP-OPDA presenta un máximo de absorción a los 707 nm.

Determinación del porcentaje de encapsulación de cisplatino

Método 1

Las nanopartículas poliméricas previamente congeladas a -80°C durante 12 horas, de los sistemas 1 y 2 (ver Tabla 1), se liofilizaron durante 7 horas en un equipo Labconco FreeZone. Las nanopartículas liofilizadas se redisolviaron en un volumen de 2 mL de DMF a temperatura ambiente. La cantidad de cisplatino presente en las muestras se determinó midiendo la absorbancia a 310 nm a temperatura ambiente, utilizando la curva de calibración de concentraciones conocidas de cisplatino en DMF. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/visible Lambda 2, utilizando DMF como blanco. El experimento se llevó a cabo por triplicado. El porcentaje de encapsulación se calculó mediante la ecuación 1.

Método 2

Los sistemas del 3 al 8 de nanopartículas poliméricas (ver Tabla 1), previamente congeladas con ayuda de nitrógeno líquido, se liofilizaron durante 24 horas en un instrumento Alpha 1-2/LD plus. Posteriormente las nanopartículas liofilizadas se redisolviaron en un volumen de 1 mL de DMF. A cada solución de nanopartículas se le añadió 1 mL de solución de OPDA en DMF (10 mg/mL). Cada mezcla se calentó en baño de agua a 100°C durante 10 minutos. Posteriormente, las mezclas se introdujeron en baño de hielo durante 10 minutos, a fin de detener la reacción. La cantidad de cisplatino presente en las muestras se obtuvo determinando la absorbancia a 707 nm a temperatura ambiente, utilizando una curva de calibración de concentraciones conocidas del complejo CDDP-OPDA en DMF. El equipo

utilizado fue un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/visible Lambda 25, utilizando DMF como blanco. El experimento se llevó a cabo por triplicado. Se obtiene el porcentaje de encapsulación mediante la ecuación 1.

Determinación del porcentaje de rendimiento del método de nanoprecipitación

El porcentaje de rendimiento del método nanoprecipitación se determinó de la siguiente manera: se llevó a cabo una determinación de CDDP en los sobrenadantes del sistema 6, por triplicado. Después de la centrifugación, 2 mL de sobrenadante se liofilizaron durante 20 horas en un instrumento Alpha 1-2/LD plus. El residuo sólido de los sobrenadantes se redisolvió en 1.5 mL de DMF, a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 1.5 mL de solución de OPDA en DMF (10 mg/mL). Cada mezcla se calentó en baño de agua a 100°C durante 10 minutos. Posteriormente, las mezclas se introdujeron en baño de hielo durante 10 minutos. La cantidad de cisplatino presente en las muestras se obtuvo determinando la absorbancia a 707 nm a temperatura ambiente, utilizando una curva de calibración de concentraciones conocidas del complejo CDDP-OPDA en DMF. El instrumento utilizado fue un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/visible Lambda 25, utilizando DMF como blanco.

Determinación de la cantidad óptima de fármaco CDDP a vectorizar

Se prepararon siete soluciones de polímero en THF, en las cuales se disolvieron 15 mg de PBLG-Bnz-32 en THF. Cada solución fue transferida lentamente a 10 mL de solución acuosa de cisplatino con 0.125 % de poloxamer 188. Las concentraciones de cisplatino fueron de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 16.6 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente. El polímero se precipitó en agitación magnética. Posteriormente, el solvente

de cada preparación se evaporó en una superficie de teflón, con ayuda de aire comprimido. Finalmente, las nanopartículas se filtraron en filtros Millipore de 0.45 μm .

Para eliminar el principio activo no incorporado, 3.9 mL de cada suspensión de nanopartículas obtenidas se centrifugaron a 40000 r.p.m. por 1 hora a 4°C, en una ultracentrífuga Beckman Coulter LE-80 K, retirando el sobrenadante. Finalmente, las nanopartículas se almacenaron a 4°C para futuros estudios.

Efecto del NaCl sobre la encapsulación

Se prepararon cinco soluciones de polímero en THF, en las cuales se disolvieron 15 mg de PBLG-Bnz-32 en THF. Cada solución fue transferida lentamente a 10 mL de una solución acuosa de cisplatino (80 $\mu\text{g/mL}$) con 0.125 % de poloxamer 188. Las concentraciones de NaCl en la fase acuosa fueron de 37.5 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$ y 600 $\mu\text{g/mL}$.

Efecto del pH sobre la encapsulación

Se prepararon tres soluciones de polímero en THF, en las cuales se disolvieron 15 mg de PBLG-Bnz-32 en THF. Cada solución fue transferida lentamente a 10 mL de una solución acuosa de cisplatino (80 $\mu\text{g/mL}$) con 0.125 % de poloxamer 188. Se añadieron las siguientes cantidades de ácido trifluoroacético (ATF) a la fase acuosa: 0.25mL, 0.5 mL y 1 mL.

Estudio de liberación de cisplatino *in vitro*

El perfil de liberación se obtuvo por el método de ultracentrifugación. Para ello, 6 alícuotas de 1 mL de suspensión de nanopartículas del sistema 6 y sistema 8 se incubaron por separado a 37°C en un volumen de 1 mL de buffer de fosfato salino (PBS, pH 7.4). En

intervalos de tiempo de 1, 2, 3, 4, 25 y 25 horas, las nanopartículas en el medio buffer se centrifugaron a 40000 r.p.m. por 1 hora a 4°C, en una ultracentrífuga Beckman Coulter LE-80 K. Posteriormente se extrajo el sobrenadante y este se transfirió a 2 mL de una solución de OPDA en DMF (10 mg/mL). La solución se introdujo en baño de agua a 100°C durante 10 minutos. Después, la solución se introdujo en hielo por 10 minutos, para posteriormente determinar la absorbancia a 707 nm a fin de conocer la concentración de cisplatino presente, utilizando una curva de calibración de concentraciones conocidas de cisplatino-OPDA en DMF. El instrumento utilizado para la medición fue un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/visible Lambda 25, tomando como blanco DMF. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

Determinación del potencial Z

El potencial Z de las nanopartículas poliméricas en suspensión acuosa se determinó por la técnica de microelectroforesis. El equipo utilizado para la determinación fue un Malvern Zetasizer Nano ZS. Para este estudio, 5 gotas de suspensión de nanopartículas, se diluyeron en un volumen de agua desionizada. La medición se llevó a cabo por triplicado.

Determinación del diámetro hidrodinámico

El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas poliméricas en suspensión acuosa se determinó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz. El equipo utilizado en la determinación fue un Malvern Zetasizer Nano ZS. Para este estudio, 5 gotas de suspensión de nanopartículas, se diluyeron en un volumen de agua desionizada. La medición se llevó a cabo por triplicado en ambos estudios.

Microscopia Electrónica de Transmisión

El tamaño y la morfología de las nanopartículas poliméricas, se caracterizaron mediante MET. Las nanopartículas se observaron después de una tinción negativa. Para ello, 5 μL de nanopartículas se depositaron en una rejilla de cobre cubierta con carbono-formvar durante 5 minutos. Posteriormente se retiró el exceso y se realizó la tinción negativa agregando una gota de ácido fosfotúngstico al 1%, la muestra se dejó secar a temperatura ambiente. Después, la rejilla se conservó bajo vacío durante 12 horas. Finalmente se observó a través del microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010F. Nota: La muestra F se observó en el Laboratorio de Microscopía de la Universidad de Sonora para la cual la muestra fue depositada sobre una rejilla de carbono (sin la película de Formvar).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de solubilidad del CDDP

Los resultados de las pruebas de solubilidad se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Solubilidad del CDDP en diferentes solventes.

Concentración de CDDP (mg/mL)	Solvente	Soluble
0.5	DMF	Si
0.5	THF	No
0.5	Agua	Si

El fármaco se disolvió tanto en DMF como en agua, siendo insoluble en THF. Estos resultados confirmaron otros reportados previamente ^(20, 66), los cuales permitieron determinar las condiciones de síntesis de las nanopartículas poliméricas a fin de efectuar estudios de encapsulación de CDDP.

Síntesis de las nanopartículas poliméricas de PBLG-derivados/CDDP y caracterización por DLS y Potencial Z

En la Tabla 3 se muestran los diámetros hidrodinámicos y el potencial Z para los diferentes sistemas sintetizados.

Tabla 3: Caracterización de los sistemas de nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-32 y PBLG- β -CD-50. La mediciones de DLS y potencial Z se llevaron a cabo a un ángulo de incidencia de 90° a 25°C. Equipo: Malvern Zetasizer Nano ZS, n= 3.

Sistema	Diámetro Hidrodinámico (nm)	Índice de Polidispersidad	Potencial Z (mV)	D.E.
3	70	0.069	-17.1	13.3
4	75	0.135	-17.3	8.4
5	70	0.081	-12.7	15.8
6	110	0.114	-3.69	7.62
7	63	0.143	-14.18	12.47
8	107	0.206	-9.30	10.71

Los resultados muestran la obtención de nanopartículas de diámetros hidrodinámicos de alrededor de 70 nm para los sistemas 3, 4, 5 y 7, y de alrededor de 110 nm para los sistemas 6 y 8.

Los resultados de diámetro hidrodinámico y potencial Z (con diferentes valores de desviación estándar) de los sistemas 3, 4, 5 y 7 son similares a los reportados previamente por Martínez Barbosa y colaboradores ⁽¹⁶⁾. Dichos resultados se obtuvieron utilizando los equipos Nanosizer Coulter N4 Plus y Zetasizer 4, para cada estudio, respectivamente. Los valores de diámetro hidrodinámico obtenidos previamente por Martínez Barbosa y colaboradores para las suspensiones de nanopartículas de PBLG-Bnz-50 y PBLG- β -CD-50, fueron 68 \pm 25 y 58 \pm 19 nanómetros, respectivamente.

Los valores de potencial Z reportados por Martínez Barbosa y colaboradores ⁽¹⁶⁾, corresponden a -6.6 ± 1.1 mV y -8.4 ± 1.2 mV para las suspensiones de PBLG-Bnz-50 y PBLG- β -CD-50, respectivamente. Las variaciones en el valor del potencial Z obtenidos en el presente estudio y los reportados previamente pueden deberse a diferencias en la precisión de los equipos. Sin embargo, en ambos estudios la magnitud del potencial Z obtenido es negativa, lo cual concuerda con el resultado esperado, considerando la carga negativa del PBLG y derivados. Martínez Barbosa y colaboradores ⁽¹⁵⁾. Sin embargo, debido a las altas desviaciones estándar obtenidas en el presente estudio de potencial Z, los resultados obtenidos deben tomarse con reserva, y se sugiere que dichos estudios deben llevarse a cabo nuevamente.

**Estandarización y evaluación las condiciones de encapsulación del *cis*-
diaminodicloroplatino(II) en los sistemas de nanopartículas poliméricas conteniendo
PBLG- β -CD-50**

Primero, se llevaron a cabo estudios para evaluar la posibilidad de vectorizar al CDDP en nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-50 (sistemas 1 y 2 - Tabla 1), utilizando el método de nanoprecipitación.

En la Figura 5 se muestran los espectros de absorción UV-Vis del CDDP disuelto en DMF a diferentes concentraciones, donde se puede observar un máximo de absorción a los 310 nm, como se describe en la literatura ⁽²⁰⁾. Posteriormente se llevó a cabo una curva de calibración con los valores de concentraciones conocidas de CDDP en DMF contra absorbancia a 310 nm, a fin de realizar estudios cuantitativos, la cual se muestra en la Figura 6.

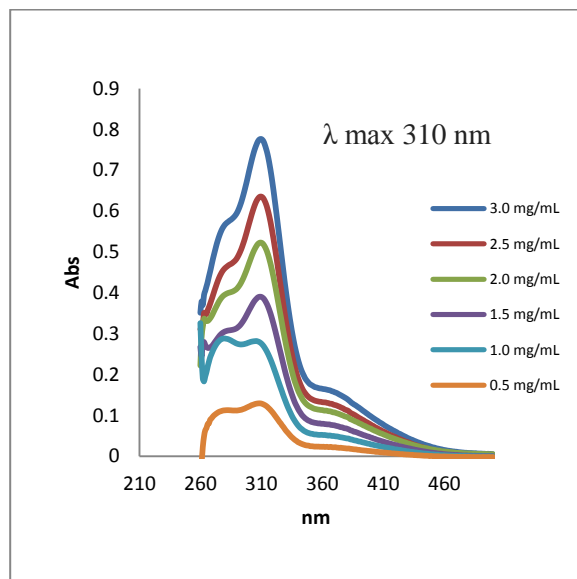


Figura 5: Espectros UV-Vis de CDDP disuelto en DMF a diferentes concentraciones. Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 2.

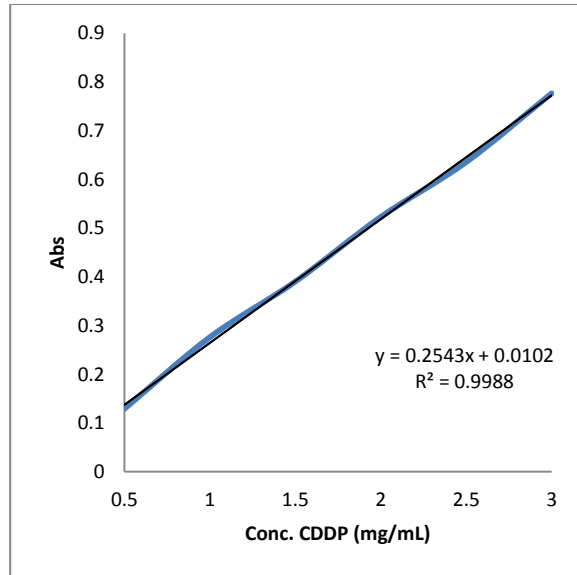


Figura 6: Curva de calibración de solución de CDDP en DMF. Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 2.

En las Figuras 7 y 8 se muestran los espectros UV-Vis obtenidos para el PBLG-Bnz-50 y el PBLG- β -CD-50 en disolución en DMF, respectivamente.

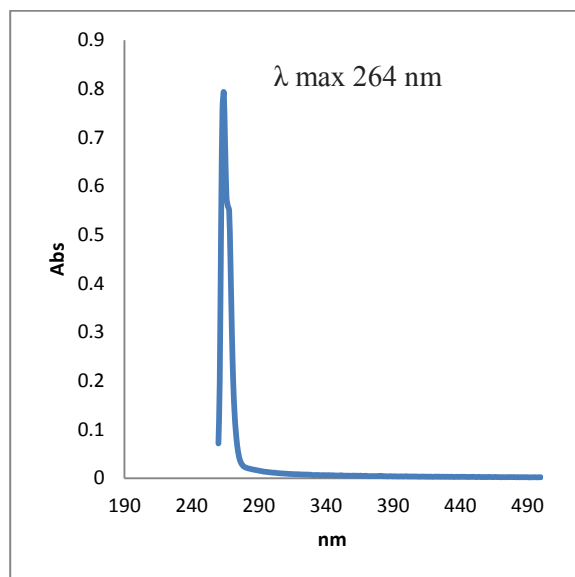


Figura 7: Espectro UV-Vis del PBLG-Bnz-50 en DMF. Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 2.

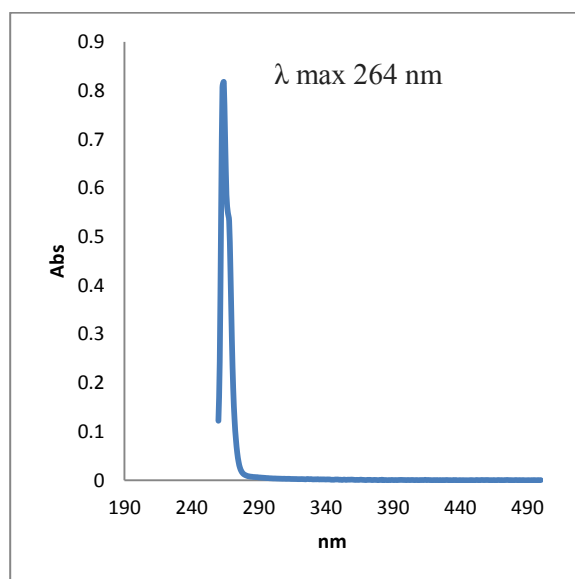


Figura 8: Espectro UV-Vis del PBLG- β -CD-50 en DMF. Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 2.

Los resultados concuerdan con otros obtenidos anteriormente, en los cuales se reportó un máximo de absorción a los 264 nm tanto para el PBLG-Bnz-50, como para el PBLG- β -CD-50 en disolución.

En la Figura 9 se muestra el espectro UV-Vis del tensoactivo poloxamer 188 disuelto en DMF, el cual presenta máximos de absorción a los 261 nm y 263 nm.

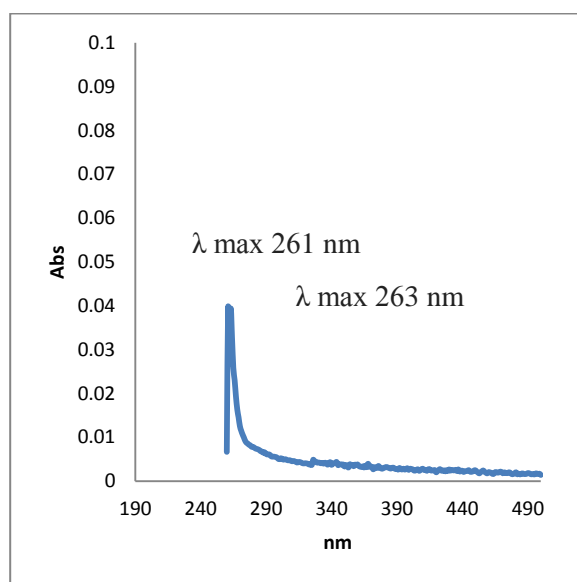


Figura 9: Espectro UV-Vis del Poloxamer 188 en DMF. Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 2.

En la Figura 10 se muestra el espectro UV-Vis de todos los componentes del sistema de PBLG-Bnz-50, CDDP y poloxamer 188 disueltos en DMF, y en la Figura 11 el espectro del sistema de PBLG- β -CD-50, CDDP y poloxamer 188, también disueltos en DMF.

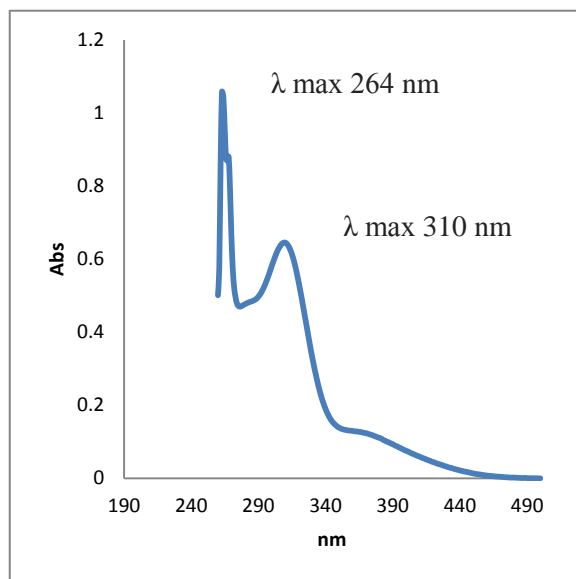


Figura 10: Espectro UV-Vis del sistema CDDP + PBLG-Bnz-50 + Poloxamer 188 en DMF.

Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 2.

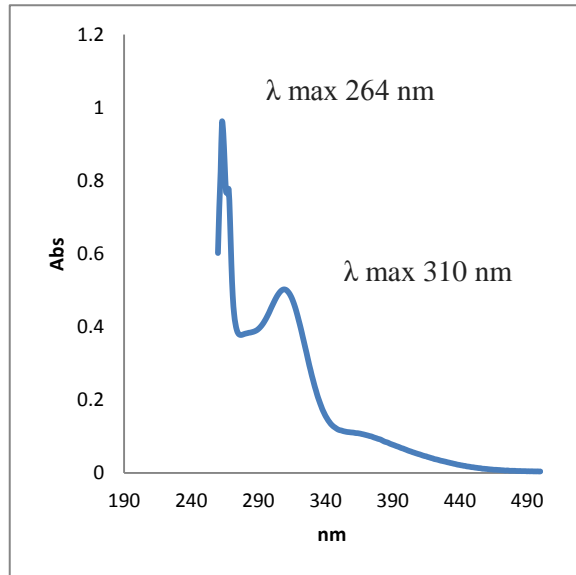


Figura 11: Espectro UV-Vis del sistema CDDP + PBLG- β -CD-50 + Poloxamer 188 en DMF.

Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 2.

Se puede observar en las Figuras 10 y 11 que los espectros muestran los máximos de absorción del polímero a 264 nm y del CDDP a 310 nm, con lo cual se pudo comprobar que ni el polímero (PBLG-Bnz-50 o PBLG- β -CD-50) ni el poloxamer 188, interfiere con la señal a 310 nm, correspondiente al CDDP.

La Figura 12 muestra el espectro UV-Vis correspondiente al sistema 1 de nanopartículas.

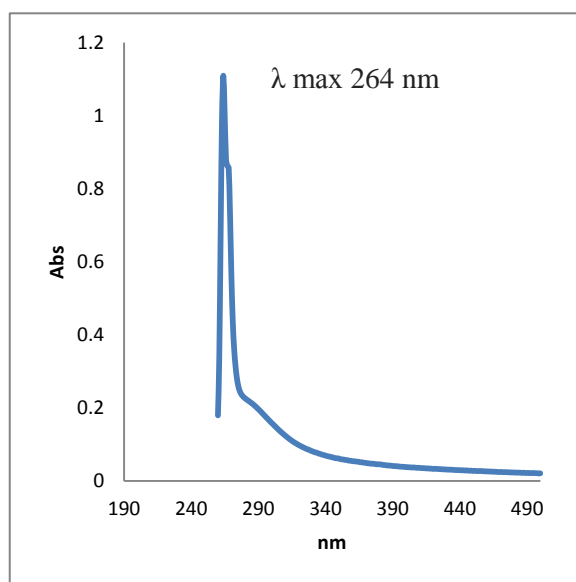


Figura 12: Espectro UV-Vis del sistema 1 de nanopartículas poliméricas. Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 2.

En el espectro obtenido (Figura 12) no se observó el máximo de absorción a 310 nm, lo cual pudiera indicar que no se logró una incorporación de CDDP en el sistema, o que el método de cuantificación no tuvo la sensibilidad para detectar la concentración del fármaco encapsulado. Debido a este inconveniente se optó por hacer cambios en el protocolo de síntesis de las nanopartículas, sin cambiar el método de nanoprecipitación. La modificación

consistió en suspender el CDDP en THF para posteriormente transferir la suspensión a la fase acuosa (sistema 2, Tabla 1). Esta modificación se realizó debido a que se pensó que se podrían tener mejores resultados de encapsulación si el fármaco no se disolvía en la fase acuosa como en el método correspondiente a la Figura 12, ya que, de estar disuelto, gran parte del CDDP podía perderse durante el proceso de purificación por ultracentrifugación.

En la Figura 13, se muestra el espectro correspondiente al sistema 2 de nanopartículas. Al igual que con el espectro de la Figura 12, no se presentó el máximo de absorción a los 310 nm.

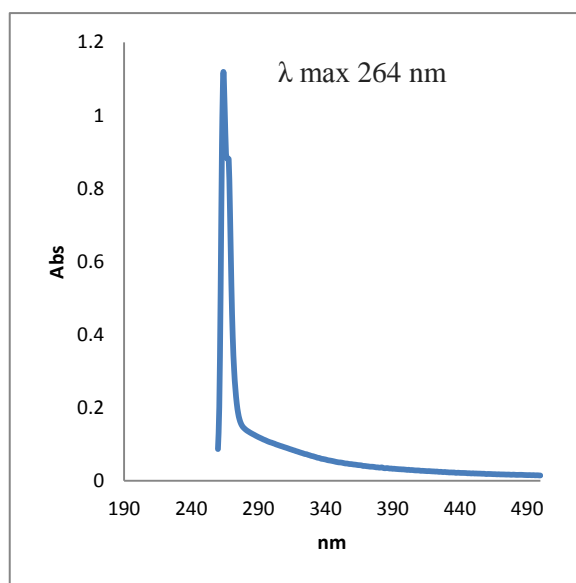


Figura 13: Espectro UV-Vis del sistema 2 de nanopartículas poliméricas. Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 2.

Los resultados obtenidos hasta ese momento indicaban, que lo más probable era que la cantidad de CDDP encapsulado no se podía detectar por esa técnica y requería de otros

métodos de determinación de mayor sensibilidad, que permitieran llevar a cabo estudios cuantitativos, como lo son la determinación del porcentaje de encapsulación de CDDP en las nanopartículas poliméricas, así como su cinética de liberación *in vitro*.

Una posible explicación asociada a la limitada encapsulación de CDDP por parte de los sistemas de nanopartículas, es la posible degradación del polímero. Los polímeros empleados hasta este momento en los estudios de estandarización y evaluación de las condiciones de encapsulación del CDDP, fueron sintetizados por la Dra. María Elisa Martínez Barbosa en 2004.

Las cadenas poliméricas del PBLG y derivados, pueden ser degradadas por diversos factores como lo son temperatura, humedad y cambios de pH ⁽⁸³⁾. Por este motivo se reemplazó el polímero PBLG-Bnz-50 por otro derivado, el PBLG-Bnz-32, el cual fue sintetizado en 2009 por estudiantes de la Facultad de Farmacia de la Université Paris-Sud 11, a cargo de la dirección del Pr. Gilles Ponchel. La diferencia entre ambos polímeros es únicamente el peso molecular. Mientras el peso molecular del PBLG-Bnz-50 corresponde a 45000 Da, el PBLG-Bnz-32 corresponde a 32000 Da.

En la literatura se ha empleado el método colorimétrico con o-fenilendiamina (OPDA), para llevar a cabo la determinación de la concentración de CDDP, el cual ha sido incorporado a diferentes sistemas vectores como hidrogeles ⁽⁹⁸⁾ y nanopartículas ⁽⁶⁸⁾. El Platino forma un complejo colorido con la molécula de OPDA, específicamente ligando a los grupos amino de la molécula, generando un máximo de absorción a los 707 nm, Golla y colaboradores ⁽⁹⁷⁾. El espectro del complejo se muestra en la Figura 14.

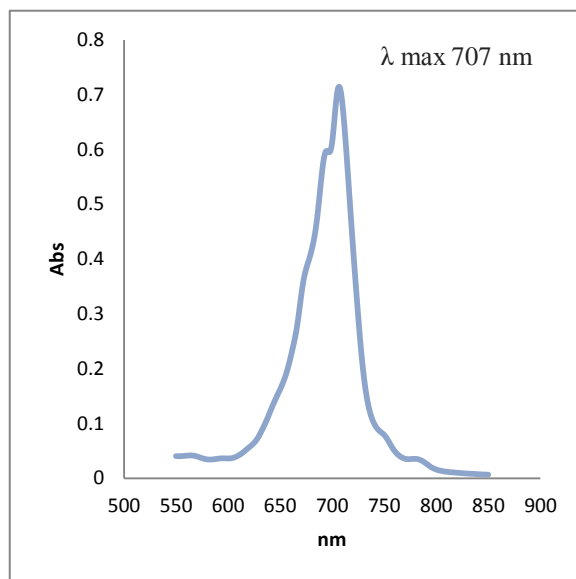


Figura 14: Espectro característico del complejo de CDDP (platino) (8.2 $\mu\text{g/mL}$) con la OPDA (10 mg/mL) en DMF. Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 25.

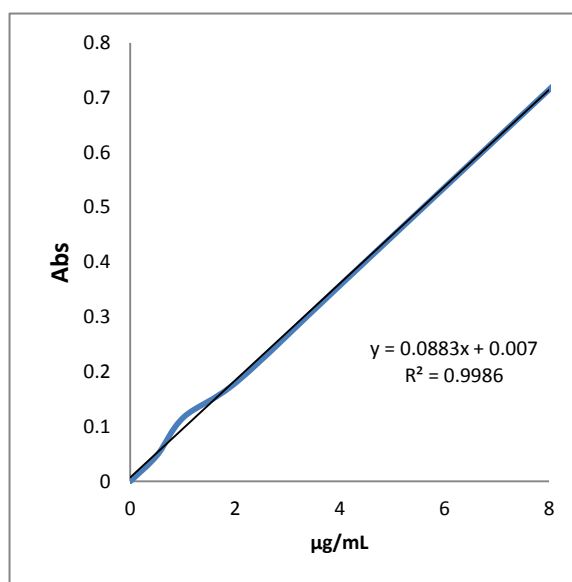


Figura 15: Curva de calibración. Equipo: Perkin Elmer UV/visible Lambda 25.

La Figura 15 corresponde a la curva de calibración con concentraciones conocidas del complejo CDDP-OPDA en DMF a fin de la realizar estudios cuantitativos.

Conociendo la solubilidad del CDDP y del PBLG (y sus derivados) en distintos solventes, se evaluó el porcentaje de encapsulación de CDDP en los sistemas de nanopartículas poliméricas 6 y 7. Estos experimentos se llevaron a cabo con la finalidad de estandarizar las condiciones de síntesis, en las cuales, se podría obtener los mejores porcentajes de encapsulación de CDDP en los sistemas vectores.

El método de nanoprecipitación tiene como característica la obtención de sistemas nanoparticulados a partir de la interacción de una fase orgánica y una fase acuosa miscibles. Tanto THF como DMF son miscibles en agua (100 % m/m para ambos solventes), por lo que se pudieron utilizar para sintetizar las nanopartículas poliméricas por este método.

El CDDP presenta una moderada solubilidad en agua, la cual corresponde a 2.5 mg/mL. Esta solubilidad en agua es menor comparada con la de otros fármacos de uso similar, como el 5- fluoracilo (12.2 mg/mL), y es en gran medida, responsable de los efectos secundarios asociados a la terapia con este fármaco ^(24,19). Esto da como resultado la necesidad de vectorizar al CDDP en la matriz hidrofóbica de las nanopartículas poliméricas de PBLG, y además, en la cavidad hidrofóbica de la β -ciclodextrina, para el caso de nanopartículas de PBLG- β -CD. Además, la vectorización del CDDP es con la finalidad de conseguir una liberación controlada en el organismo, lo que se traduciría en un aumento en la eficiencia en la terapia con el medicamento y una reducción en los efectos negativos asociados a éste.

El CDDP presenta una alta solubilidad en DMF (16.67 mg/mL) comparada con el agua. Se comparó el porcentaje de encapsulación obtenido con dos sistemas de nanopartículas de PBLG-Bnz-32/CDDP (sistemas 6 y 7). Como se indica en la Tabla 1, el sistema 6 se

sintetizó disolviendo el polímero en THF y el CDDP en agua. El sistema 7, se sintetizó disolviendo tanto el fármaco como el polímero en DMF y llevando a cabo la precipitación del polímero en agua a fin de formar las nanopartículas. Los resultados de la encapsulación se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Porcentaje de encapsulación y porcentaje de eficiencia de encapsulación de los sistemas 6 y 7 de nanopartículas poliméricas, n= 3.

Sistema	Polímero	Solvente	% encapsulación	D.E.	% eficiencia	D.E.
6	PBLG-Bnz-32	THF	0.2304	0.0256	4.55	0.51
7	PBLG-Bnz-32	DMF	0.00167	0.000185	0.033	0.002

Comparando el tipo de solvente, se puede observar que el porcentaje de encapsulación obtenido con el sistema 6 es mayor al obtenido con el sistema 7. Esto se debe posiblemente a que la solubilidad del CDDP es mayor en el DMF que en el medio acuoso, propiciando que las moléculas del fármaco permanezcan en disolución en la fase orgánica durante la preparación de las nanopartículas, evitando que las moléculas del fármaco sean inclusionadas. Por otro lado, el método de eliminación del solvente puede contribuir en gran medida a la salida por difusión pasiva de las moléculas del CDDP de las nanopartículas poliméricas, ya que es posible que algunas moléculas del fármaco no se encuentren inclusionadas en la matriz de la nanopartícula, sino que se encuentren adsorbidas en su superficie. El proceso de diálisis

promovería en gran medida la liberación de estas moléculas adsorbidas. La eliminación del solvente se llevó a cabo por diálisis debido a la baja volatilidad del DMF en comparación con el THF. Estos resultados permitieron determinar las condiciones de preparación del sistema vector con el que se obtuvieron mejores resultados de porcentaje de encapsulación de CDDP, por lo que las síntesis de los sistemas de nanopartículas posteriores se llevaron a cabo usando THF como solvente.

Con respecto a los resultados obtenidos de diámetro hidrodinámico (Tabla 3) se puede observar que las nanopartículas poliméricas del sistema 6 presentan diámetros hidrodinámicos mayores en comparación a los del sistema 7. Esta diferencia quizá se deba precisamente a la mayor presencia de CDDP en el interior, o en la superficie de las nanopartículas del sistema 6, ya que además existe una gran diferencia entre los diámetros hidrodinámicos de este sistema con los del sistema blanco (sistema 3).

Por otro lado, el potencial Z es una medición útil e indirecta de la carga superficial de diferentes tipos de sistemas, entre ellos sistemas coloidales ⁽⁹⁹⁾. El potencial Z del sistema 6 corresponde a -3.69 mV, mientras que el del sistema 7, a -14.18 mV. El valor del potencial Z del sistema 6 presenta una magnitud menor al de la suspensión 7 y al del sistema blanco (sistema 3). Esto quizá se deba a la presencia de una mayor cantidad de moléculas de CDDP en la superficie de las nanopartículas de la suspensión 6, las cuales pueden interferir con la carga superficial de las cadenas poliméricas de PBLG, lo que se traduce en un decremento en el valor del potencial Z. La presencia de moléculas en la superficie de las nanopartículas y su efecto en el potencial Z describió previamente. Martínez Barbosa y colaboradores, ⁽¹⁷⁾, reportó que la presencia de moléculas de poli(etilén glicol) en la superficie de nanopartículas de

PBLG-PEG-60 tenía el efecto de disminuir la magnitud del potencial Z, comparadas con nanopartículas de PBLG-Bnz-50, dado que las cadenas de PEG presentan carga neutra.

Pese a que las moléculas de CDDP presentes en la superficie de las nanopartículas pueden tener efecto en la carga superficial, ésta continúa siendo negativa, lo cual concuerda con los resultados reportados por Martínez Barbosa y colaboradores ⁽¹⁷⁾.

La presencia de moléculas de CDDP en la superficie de las nanopartículas es un indicativo de que posiblemente el fármaco no esté completamente encapsulado en la matriz de la misma.

De lo reportado en la literatura se puede ver que estudios realizados de encapsulación de CDDP en diferentes sistemas poliméricos nanoparticulados muestran, de manera general, un bajo porcentaje de encapsulación. Por ejemplo, Avgoustakis y colaboradores ⁽²⁰⁾ obtuvieron porcentajes de encapsulación de entre 0.54 y 0.98% en nanopartículas poliméricas de poli(láctico-co-glicólico)-metoxi-poli(etilén glicol) por el método de doble emulsión. Moreno y colaboradores ⁽¹⁰⁰⁾, obtuvieron nanopartículas de PLGA sintetizadas por un método similar. Obtuvieron porcentajes de encapsulación de CDDP de alrededor de 11%. En ellos encontraron que pese a que el porcentaje de encapsulación es bajo, la saturación con CDDP de la fase acuosa de la segunda emulsión es de suma importancia para el incremento en la encapsulación del fármaco. Por otro lado, Xu y colaboradores⁽⁶⁶⁾, sintetizaron nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona)-poli(etilén glicol) como vector del fármaco cisplatino. Encontraron que la presencia de iones cloro durante la síntesis de las nanopartículas promueve un incremento del porcentaje de encapsulación del fármaco, puesto que estos iones evitan la hidrólisis del CDDP,

disminuyendo su hidrofiliidad y promoviendo su inclusión en la matriz hidrofóbica de las nanopartículas.

Efecto del NaCl y del pH sobre la encapsulación

Con la finalidad de reducir la hidrólisis del cisplatino y buscar incrementar el porcentaje de encapsulación se llevó a cabo un estudio en el que se agregaron distintas cantidades de NaCl en la fase acuosa durante el proceso de síntesis de nanopartículas de PBLG-Bnz-32. Sin embargo, al incorporar el NaCl, las nanopartículas en suspensión se precipitaban, haciendo imposible la realización de este estudio.

Por otro lado, se intentó la desnaturalización de la conformación de las cadenas poliméricas incorporando distintas cantidades de ácido trifluoroacético en la fase acuosa en la síntesis de las nanopartículas. Sin embargo, y al igual que con el estudio de NaCl, las nanopartículas precipitaron, lo que no permitió estudios de encapsulación.

Determinación de la cantidad óptima de fármaco CDDP a vectorizar

La Figura 16 muestra diferentes cantidades de CDDP encapsulado en sistemas de nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-32/CDDP. Estos porcentajes corresponden a diferentes suspensiones de nanopartículas, sintetizadas con una misma cantidad de polímero, pero variando la cantidad de CDDP a encapsular. La realización de este estudio se hizo con la finalidad de conocer la cantidad de fármaco a agregar al sistema y que permita un mayor porcentaje o eficiencia de encapsulación en las nanopartículas poliméricas.

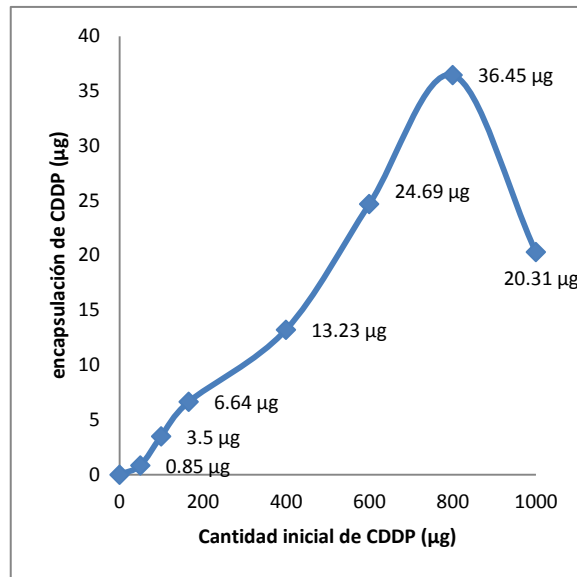


Figura 16: Encapsulación de CDDP por los sistemas de nanopartículas de PBLG-Bnz-32/CDDP incorporando diferentes cantidades de CDDP, manteniendo constante la cantidad de polímero.

Se puede apreciar que la cantidad de CDDP encapsulado en las diferentes suspensiones de nanopartículas, aumenta de manera proporcional a la cantidad de CDDP añadido en la síntesis de los 50 µg a los 800 µg. Al añadir 1000 µg de CDDP, la cantidad de CDDP encapsulado decrece con respecto al obtenido con cantidades menores. Esta disminución puede relacionarse con una posible competencia entre las moléculas de CDDP por su incorporación en las nanopartículas poliméricas. En otras palabras, las nanopartículas presentan un límite de encapsulación de alrededor de 36.45 µg al añadir 800 µg de CDDP, demostrando que con la adición de esta cantidad de fármaco durante el proceso de síntesis se obtiene una mayor cantidad de encapsulación de CDDP.

Determinación del porcentaje de rendimiento del método de nanoprecipitación

Se realizaron estudios a fin de determinar el contenido de CDDP en el sobrenadante del sistema 6, por triplicado. El estudio se realizó con el objetivo de calcular el porcentaje de rendimiento del método de síntesis empleado, es decir, calcular si hay pérdidas del contenido de fármaco durante la preparación del sistema. Esto se llevó a cabo cotejando el contenido de CDDP en el paquete de nanopartículas con la del sobrenadante del sistema, a fin de conocer si la cantidad de CDDP corresponde al 100% añadido en la síntesis (ver Tabla 5). El porcentaje de rendimiento del método se encuentra alrededor del 80%. La pérdida de cantidades de CDDP puede presentarse durante el proceso de evaporación del solvente y durante la filtración de las nanopartículas. Los resultados muestran que el método de nanoprecipitación empleado es eficiente para la síntesis de un sistema vector para CDDP.

Tabla 5: Porcentaje de rendimiento del método de síntesis de las nanopartículas poliméricas del sistema 6, n=3.

Sistema	CDDP en las nanopartículas (µg)	CDDP en sobrenadante (µg)	CDDP Total (µg)	% de Rendimiento del Método
6	36.45	622.05	658.46	82.31

Una vez estandarizadas las condiciones de preparación del sistema vector de PBLG-Bnz-32/CDDP (sistema 6, Tabla 1), se llevaron a cabo experimentos para determinar el porcentaje de encapsulación de CDDP del sistema de nanopartículas conteniendo β -CD (sistema 8, Tabla 1).

Los valores de diámetro hidrodinámico y potencial Z obtenidos se muestran en la Tabla 3. Los diámetros hidrodinámicos muestran la existencia de nanopartículas superiores a 100 nm para los sistemas 6 y 8, específicamente 110 nm y 107 nm, respectivamente. Estos diámetros hidrodinámicos son significativamente mayores a los de los sistemas blanco (sistemas 3 y 5). Estas diferencias pueden atribuirse a la presencia de moléculas de CDDP en el interior o en la superficie de las nanopartículas en ambos sistemas.

Los valores del potencial Z obtenidos para los sistemas de nanopartículas poliméricas 6 y 8 fueron -3.69 mV y -9.30 mV respectivamente. En ambos casos, el valor obtenido para el potencial Z es negativo, lo cual es coherente con los resultados obtenidos en los sistemas blanco. El valor del potencial Z del sistema 8 es similar al de su sistema blanco (sistema 5), aunque muestra una magnitud menor, la cual podría asociarse a la presencia de complejos de β -CD/CDDP en la superficie de la nanopartículas, lo que se traduce en un decremento en el valor del potencial Z.

En lo que respecta a la capacidad de encapsulación, la suspensión de nanopartículas del sistema 8 muestra un mayor porcentaje de encapsulación con respecto al sistema 6 (Tabla 6).

Tabla 6: Porcentaje de encapsulación y porcentaje de eficiencia de encapsulación de los sistemas 6 y 8 de nanopartículas poliméricas, n= 3.

Sistema	Polímero	Solvente	% encapsulación	D.E.	% eficiencia	D.E.
6	PBLG-Bnz-32	THF	0.2304	0.0256	4.55	0.51
8	PBLG- β -CD-50	THF	0.328	0.163	6.49	3.2

La incorporación de moléculas de β -ciclodextrina a las cadenas poliméricas de PBLG tiene como objetivo aumentar la capacidad de vectorización de moléculas (con aplicaciones farmacéuticas en este caso) al formar un sistema de nanopartículas en suspensión acuosa. Esto se logra incorporando las moléculas a vectorizar dentro de la matriz polimérica de la nanopartícula, y además, incorporando aun más moléculas en la cavidad de la β -ciclodextrina, lo que también permite aumentar la solubilidad de principios activos hidrofóbicos. Balaji y colaboradores ⁽¹⁰⁾, sintetizaron y caracterizaron complejos de cisplatino/hidroxipropil- β -ciclodextrina por el método de congelación y secado. Los resultados muestran la formación de un complejo estequiométrico estable 1:1 entre el cisplatino y la HP- β -CD, lo que puede permitirnos pensar en la posibilidad de formar un complejo 1:1 entre el cisplatino y la β -ciclodextrina presente en el PBLG- β -CD-50, al formar nanopartículas.

Los resultados de porcentaje de encapsulación obtenidos con el sistema 8 muestran que la molécula de β -CD permite la incorporación de una mayor cantidad de moléculas del fármaco con respecto al sistema 6. La presencia de β -CD sugiere la generación de un sistema vector multifuncional en el cual, tanto la matriz polimérica del PBLG, como la molécula de β -CD tienen una función específica.

Mediante estudios de calorimetría de titulación isotérmica llevados a cabo por Martínez Barbosa y colaboradores ⁽¹⁵⁾, se logró determinar la disponibilidad de las moléculas de β -CD en sistemas de nanopartículas poliméricas de PBLG- β -CD-50. Utilizaron la molécula hidrofóbica modelo 1-adamantilamina para determinar la interacción existente con la cavidad de la β -ciclodextrina. Los resultados obtenidos demostraron que los complejos formados tienen una estequiometría 1:1, y que la disponibilidad de la β -CD correspondía a un 20% del total en el sistema de nanopartículas. El 80% restante de moléculas de β -CD estaría

interaccionando con otras moléculas, muy probablemente, con las propias cadenas hidrofóbicas del PBLG. Esta disponibilidad pudiera estar relacionada con el moderado incremento en la incorporación de moléculas de CDDP para el sistema de PBLG- β -CD-50/CDDP con respecto al sistema de PBLG-Bnz-32/CDDP.

Los resultados muestran que los sistemas vectores nanoparticulados sintetizados a partir de derivados del PBLG proporcionan porcentajes de encapsulación de CDDP similares a los sistemas previamente reportados en la literatura con otros polímeros, como el PLGA (ácido poli(láctico-*co*-glicólico)), en los cuales se obtuvieron porcentajes de encapsulación menores al 1% ⁽²⁰⁾. Cabe mencionar que en el caso de los derivados del PBLG el porcentaje de eficiencia es mayor debido a que se requiere una menor proporción fármaco-polímero para alcanzar dicha tasa de encapsulamiento.

Comparando con otros fármacos como el docetaxel y el clonazepam resultados obtenidos previamente con el PBLG y derivados ^(84, 102) han demostrado que su actividad como vector de medicamentos formando sistemas de nanopartículas es limitada, en comparación con otros polímeros como el PLGA. Esto pudiera atribuirse al arreglo conformacional en α -hélice, propio de los poli(α -aminoácidos). Dicho arreglo presenta una gran estabilidad debido a la presencia de enlaces peptídicos y puentes de hidrógeno. A su vez, esta estabilidad produce un empaquetamiento rígido entre las unidades de aminoácidos del polímero, la cual reduciría la incorporación de moléculas de CDDP en la matriz de las nanopartículas poliméricas de PBLG y derivados. Una posibilidad de aumentar la incorporación de CDDP podría ser entonces, la modificación de ese arreglo conformacional, por lo que se buscó desnaturalizar las cadenas de PBLG ⁽⁸³⁾. Sin embargo, al añadir ácido trifluoroacético en la fase acuosa durante la síntesis de las nanopartículas, se obtuvo

precipitación del polímero, impidiendo la formación de las nanopartículas. La presencia de moléculas de β -ciclodextrina en las nanopartículas podría reducir el ordenamiento de las moléculas poliméricas de PBLG en forma de bastoncillos en α -hélice, logrando de esta manera una mayor inclusión de moléculas de CDDP en el interior de las nanopartículas. Resultados anteriormente obtenidos por nuestro equipo de trabajo con la técnica de dicroísmo circular, han demostrado que los polímeros PBLG-Bnz-50 y PBLG- β -CD-50 mantienen su arreglo conformacional en α -hélice cuando se encuentra en medio acuoso, formando nanopartículas ⁽¹⁰³⁾. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran una menor elipticidad molar del polímero PBLG- β -CD-50 con respecto a la del PBLG-Bnz-50, lo que se interpreta como un arreglo conformacional menos rígido. Estos resultados motivan a la realización de futuros estudios en los que el objetivo sea la desnaturalización del arreglo conformacional del PBLG y derivados, a fin de evaluar la posibilidad de mejorar su capacidad como vector de principios activos, tomando en cuenta los resultados de encapsulación obtenidos por otros autores con polímeros con una conformación desordenada ^(67, 69, 73, 95), como por ejemplo, eficiencia de encapsulación superiores al 75% de cisplatino en nanopartículas de poli(etilén glicol)-poli(caprolactona) ⁽⁶⁶⁾ y hasta el 90% de ácido retinoico con nanopartículas de PLGA ⁽¹⁰⁴⁾.

Caracterización por Microscopía Electrónica de Transmisión

Los resultados del estudio de MET para los sistemas 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se muestran en la Figuras 17, A), B), C), D), E) y F). El inciso A) corresponde a la micrografía del sistema 4. La micrografía muestra nanopartículas polidispersas en cuanto a morfología y de tamaños similares a los resultados obtenidos por DLS para este sistema. La morfología de las

nanopartículas no corresponde a la obtenida en nanopartículas poliméricas en estudios previos llevados a cabo por Martínez Barbosa y colaboradores ⁽¹⁷⁾, en los cuales se describieron nanopartículas de morfología elipsoidal. La morfología de las nanopartículas observada en la micrografía A se atribuye a la alta solubilidad del polímero en el DMF, así como el proceso de difusión de la fase orgánica en el medio acuoso propio del método de nanoprecipitación, la cual presenta menor miscibilidad que la fase orgánica de THF empleada para la síntesis del sistema 3. La micrografía B, corresponde al sistema 7 de nanopartículas poliméricas. La morfología de este sistema muestra gran similitud en cuanto a tamaño y morfología con su sistema blanco (micrografía A). Esto pudiera deberse a la baja encapsulación de CDDP en este sistema. Tal como indican los resultados presentados en la Tabla 4.

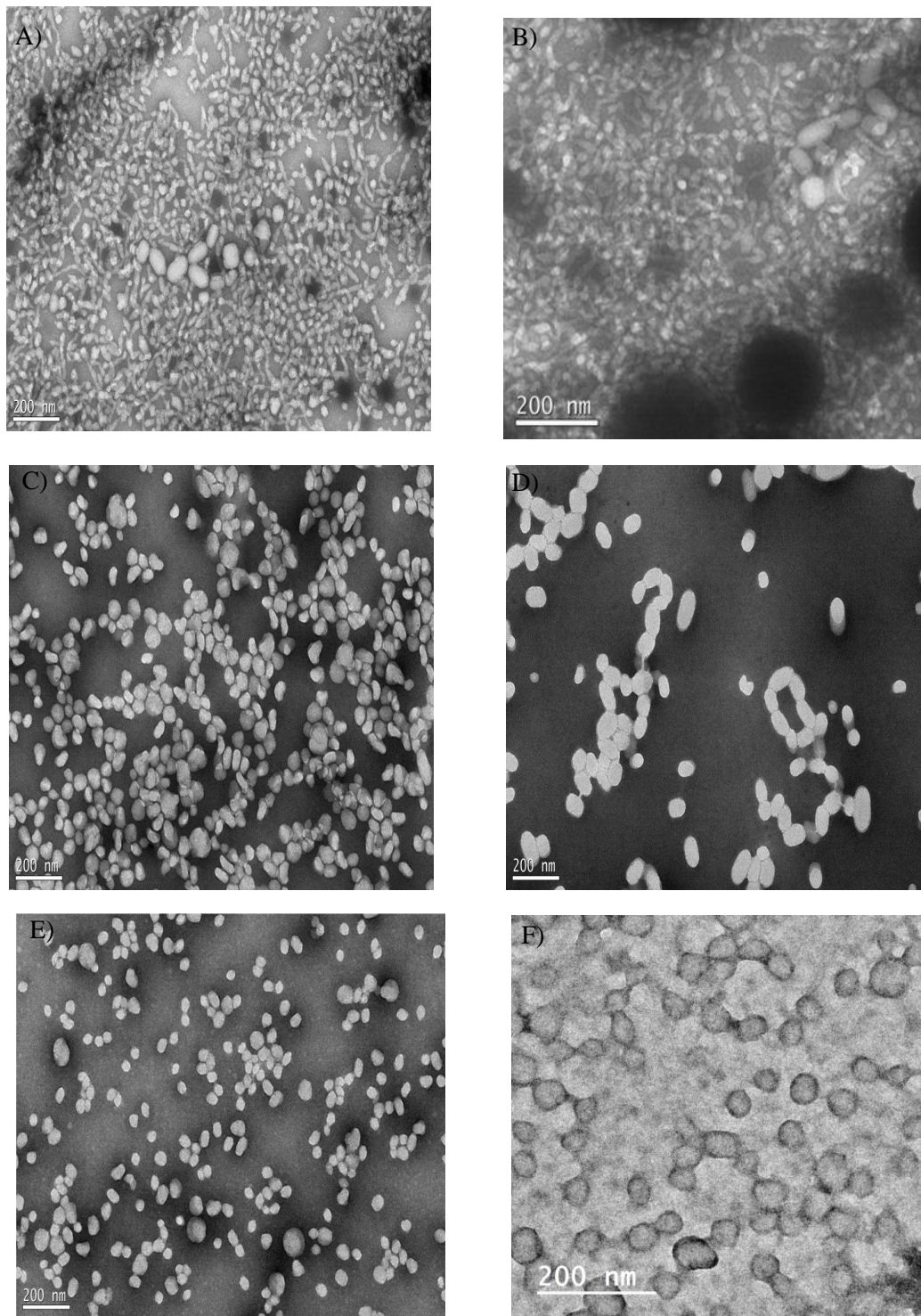


Figura 17: Micrografía de los sistemas de nanopartículas poliméricas: A) 3, B) 4, C) 5, D) 6, E) 7, y F) 8. Equipo: JEOL JEM-2010F (A-E Orsay, F Unison).

La síntesis de sistemas de nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-32, por el método de nanoprecipitación empleando DMF (sistemas 4,7-Tabla 1), sugiere una importante alternativa al método empleando THF, ya que con este método se pueden sintetizar nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-32/CDDP de menor tamaño.

La micrografía C, corresponde al sistema 3 de nanopartículas poliméricas. El tamaño de partícula concuerda con los diámetros hidrodinámicos obtenidos con la técnica de DLS (Tabla 3). La morfología muestra nanopartículas de tipo esferoide, con menos polidispersidad que las obtenidas en el sistema anterior (micrografías A y B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente por Martínez Barbosa y colaboradores ⁽¹⁷⁾.

La micrografía D corresponde al sistema 6 de nanopartículas. Como mostró la medición de diámetro hidrodinámico obtenida por DLS, este sistema es de tamaño mayor a 100 nm. El aumento de tamaño con respecto al sistema blanco (sistema 3) se atribuye a la presencia de moléculas de CDDP en el interior de las nanopartículas. En lo referente a la morfología, también se puede apreciar una diferencia entre este sistema y su sistema blanco (sistema 3). En la micrografía D se pueden apreciar nanopartículas con una apariencia elipsoidal, diferenciándose de las nanopartículas esferoidales de la micrografía C. Esta diferencia puede atribuirse a un reordenamiento de las cadenas del polímero que conforman la nanopartícula, el cual es provocado por la presencia de moléculas de CDDP en el interior de la misma. Se puede observar un caso distinto al anterior en los sistemas 5 y 8 de nanopartículas (micrografías E y F, respectivamente). Se puede apreciar que no existen diferencias en cuanto a tamaño y morfología entre ambos sistemas. Esto se pudiera atribuir a la presencia de CDDP en las moléculas de β -CD en el sistema 8, lo cual no contribuiría a un reordenamiento en las cadenas poliméricas, el cual es producido por el fármaco.

La experimentación con diferentes condiciones de síntesis de nanopartículas de derivados del PBLG, podría permitir la obtención de sistemas con tamaño y morfología característicos, lo que a su vez podría plantear una ventaja para su aplicación como vectores de fármacos en sistemas biológicos.

En la Figura 18 se muestra la relación de los tamaños medidos sobre las micrografías de MET para los sistemas del 3 al 8 de nanopartículas poliméricas (n-200).

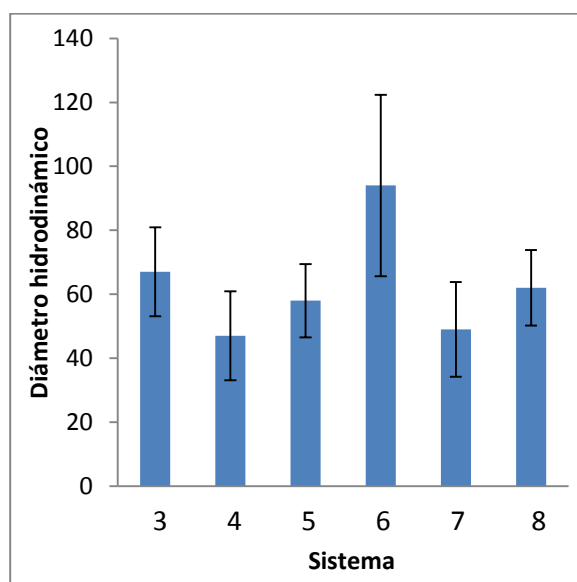


Figura 18: Gráfico comparativo de los tamaños de nanopartículas medidos sobre las micrografías de MET para los sistemas de nanopartículas poliméricas del 3 al 8 (n-200, Progama ImageJ).

Se puede observar que en general los tamaños de los sistemas presentan similitud con los diámetros hidrodinámicos obtenidos por la técnica de DLS, a excepción del sistema 8. Los tamaños obtenidos para este sistema fueron de alrededor de 62 nm \pm 12, mientras que con la

medición de DLS se determinaron diámetros hidrodinámicos de 107 nm. Para el resto de los sistemas, los tamaños obtenidos fueron $67 \text{ nm} \pm 14$, $47 \text{ nm} \pm 14$, $58 \text{ nm} \pm 12$, $94 \text{ nm} \pm 28$ y 49 ± 15 , para los sistemas 3, 4, 5, 6, y 7, respectivamente. Se puede observar que estas mediciones confirman la aparición de nanopartículas más pequeñas cuando se emplea el método de síntesis con DMF (sistemas 4 y 7). A su vez, estas mediciones confirman la presencia de nanopartículas de alrededor de 100 nm para el sistema 6, lo cual puede atribuirse a la presencia de moléculas de fármaco en el interior o en la superficie de las nanopartículas poliméricas.

Estudio del perfil de liberación de cisplatino de las nanopartículas poliméricas de PBLG-Bnz-32/CDDP y PBLG- β -CD-50/CDDP (sistemas 6 y 8)

En las Figuras 19 y 20 se muestra la absorbancia a 707 nm del complejo CDDP-OPDA a diferentes tiempos de liberación para los sistemas 6 y 8, respectivamente. Se puede observar, para ambos sistemas, una mayor absorbancia a la primera hora de liberación del fármaco. Conforme avanzó el tiempo, la magnitud en la absorbancia fue decreciendo.

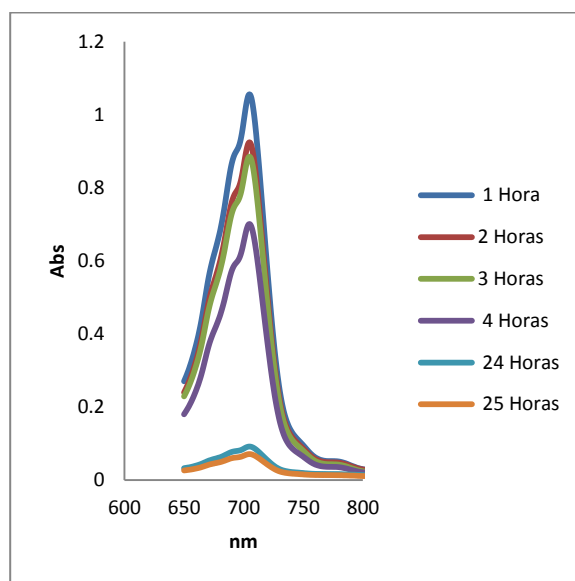


Figura 19: Espectros del complejo CDDP-OPDA correspondientes al perfil de liberación del sistema 6 de nanopartículas en medio buffer pH 7.4, n=3.

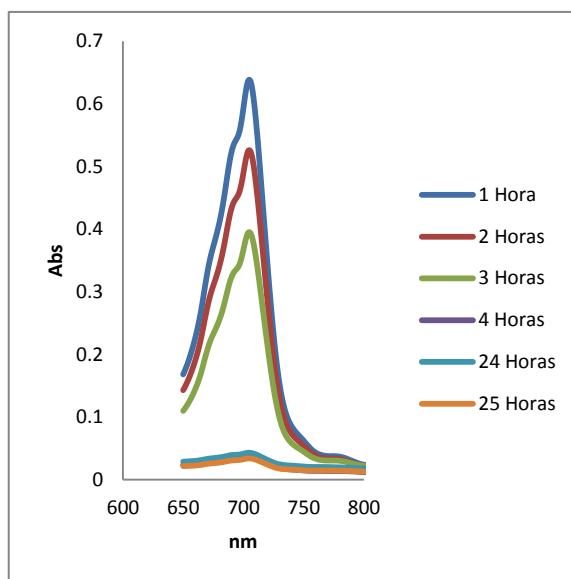


Figura 20: Espectros del complejo CDDP-OPDA correspondientes al perfil de liberación del sistema 8 de nanopartículas en medio buffer pH 7.4, n=3.

Los perfiles de liberación de CDDP de las nanopartículas poliméricas de los sistemas 6 y 8, se muestran en las Figuras 21 y 22.

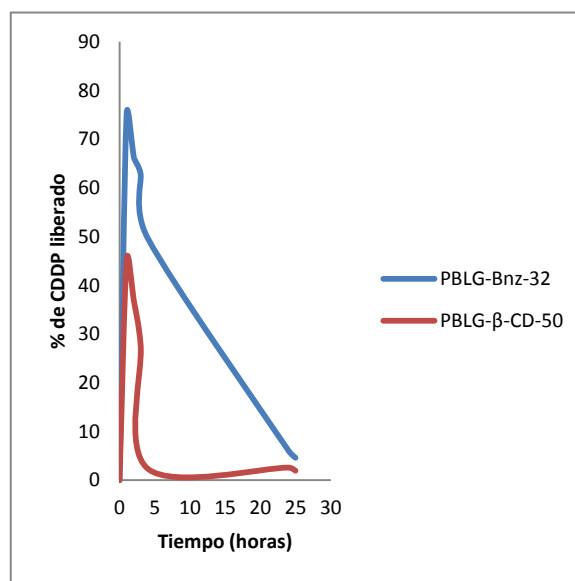


Figura 21: Perfil de liberación de CDDP correspondientes al sistema 6 y 8 de nanopartículas, n=3.

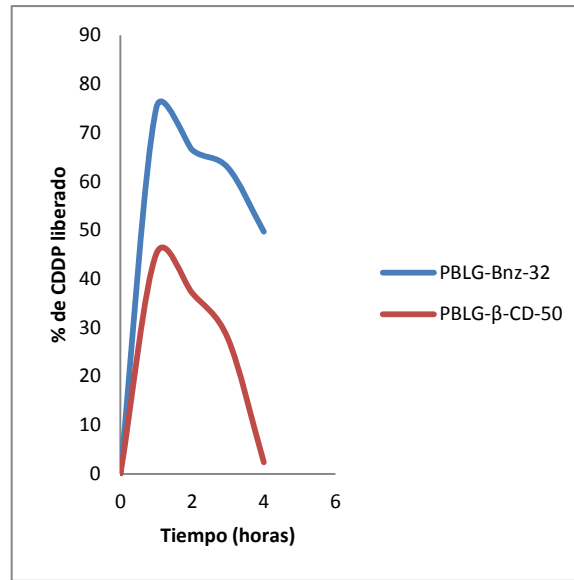


Figura 22: Perfil de liberación de CDDP correspondientes a los sistemas 6 y 8 de nanopartículas en medio buffer pH 7.4, haciendo énfasis en las cuatro primeras horas del estudio, n=3.

Dichos resultados son inesperados, dado que el comportamiento que observamos no coincide con el que esperábamos. En uno de los comportamientos esperados, un importante porcentaje del fármaco sería liberado en tiempos cortos, en un fenómeno conocido como efecto Burst, para posteriormente reducir la tasa de liberación, hasta llegar a un valor constante (como se muestra en la Figura 23). Este efecto Burst se refiere a una liberación de altas concentraciones de fármaco en tiempos cortos. Nuestros resultados difieren en gran medida del comportamiento esperado.

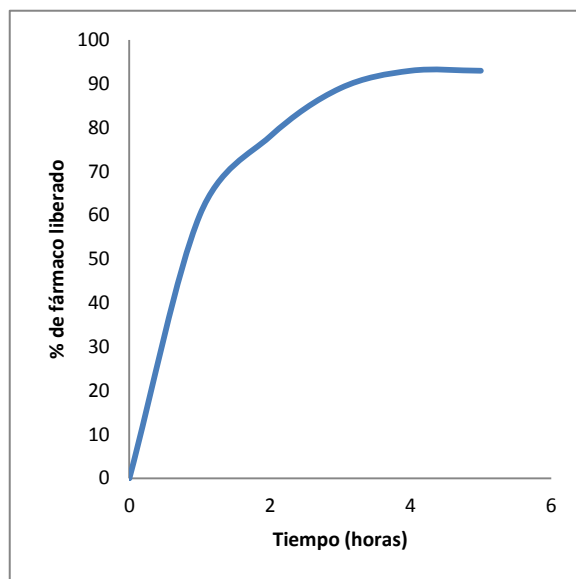


Figura 23: Comportamiento esperado en un perfil de liberación de fármaco de un sistema vector.

Como se observa en la Figuras 21 y 22, el comportamiento inicial en la liberación del CDDP pudiera corresponder al mencionado efecto Burst, sin embargo, las mediciones posteriores muestran una aparente disminución de la cantidad de CDDP liberado con respecto al tiempo.

Los protocolos comúnmente utilizados en la determinación del perfil de liberación de fármacos se obtienen por métodos acumulativos, en los cuales el principio activo liberado se determina en un mismo medio de incubación.

En este trabajo, el protocolo difiere del método común de determinación del perfil de liberación de principios activos de sistemas vectores nanoparticulados, en cuanto a que la medición del fármaco liberado se lleva a cabo en medios de incubación distintos (es decir no se extraen alícuotas de un mismo medio y no se tiene la necesidad de reemplazar dicho medio

con volumen igual de solución buffer), por lo que la gráfica obtenida, en este caso, no es acumulativa. El hecho de haber obtenido bajos porcentajes de encapsulación fue el principal motivo para evitar reducir la sensibilidad del método, ya que serían cantidades muy bajas de CDDP liberadas en el sobrenadante para cada muestra consecutiva. Por las características del método, en los resultados se esperaría que la absorbancia a 707 nm (directamente proporcionales a la concentración de CDDP presente en el sobrenadante) aumentara conforme al tiempo de incubación, sin embargo esto no ocurrió (ver Figura 19 y 20).

Inicialmente se pensó que el hecho de que la cantidad de CDDP se redujera en los sobrenadantes pudiera deberse a un posible aumento de la cantidad de CDDP que se incluiría en las nanopartículas con el paso del tiempo. Sin embargo, analizando la cantidad de CDDP residual en los paquetes de nanopartículas correspondientes a cada tiempo del estudio del perfil de liberación, con respecto a la cantidad de CDDP de los sobrenadantes, la cantidad total no correspondía al 100% de CDDP añadido al sistema (el total de CDDP detectado corresponde a menos del 30% del total añadido). Estas observaciones nos permiten pensar que debe haber alguna interacción presente en el sistema que haya afectado la formación del complejo CDDP-OPDA, o al menos su detección en el UV-Vis.

Como posibles explicaciones se planteó la posibilidad de que existe una interferencia entre la molécula de la *o*-fenilendiamina con el medio buffer, la cual disminuye la formación del complejo CDDP-OPDA. También se consideró la posibilidad de una interferencia entre moléculas del fármaco y el medio buffer debido a que al aumentar el tiempo de incubación, el pico a 707 nm disminuye, ya que se ha descrito en la literatura que existe un intercambio dinámico entre los átomos de cloro de la molécula de cisplatino con moléculas de agua, lo que implica la aparición de la forma activa del CDDP ⁽¹⁹⁾. La aparición del CDDP activo podría

interferir con la formación del complejo CDDP-OPDA, y de esta manera, afectar la aparición del máximo a 707 nm. A su vez, existe también la posibilidad de que la solución buffer intervenga con la formación del complejo CDDP-OPDA, lo cual impediría la cuantificación del CDDP encapsulado en las nanopartículas.

Nuestro equipo de trabajo plantea la alternativa de realizar estudios de liberación con otras técnicas de determinación de CDDP al encontrarse en medio buffer. Avgoustakis y colaboradores ⁽²⁰⁾ utilizaron la técnica de espectroscopia de absorción atómica para llevar a cabo sus mediciones de CDDP liberado en medio buffer (pH 7.4) con resultados favorables. Nuestro equipo se ha planteado además, la realización de estudios de liberación en medio acuoso, sin modificar el pH, con la finalidad de conocer si este factor interviene en la formación del complejo CDDP-OPDA.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron sistemas de nanopartículas a base de PBLG-Bnz-50, PBLG-Bnz-32 y PBLG- β -CD-50 por el método de nanoprecipitación, obteniéndose nanopartículas de alrededor de 70 nm de diámetro hidrodinámico en suspensión acuosa, para el caso de los sistemas blanco. Por otro lado, para el caso del sistema 6 (conteniendo CDDP y sintetizados con THF) se obtuvieron nanopartículas de alrededor de 110 nm de diámetro hidrodinámico.

Se consiguió estandarizar condiciones experimentales a fin de conseguir sistemas de nanopartículas poliméricas estables al incorporar el fármaco anticancerígeno CDDP. De acuerdo a los resultados obtenidos para la determinación del porcentaje de encapsulación, el método que involucra la disolución del principio activo en el medio acuoso, y el PBLG-Bnz-32 en THF (sistema 6), permite un aumento considerable en el porcentaje de encapsulación de CDDP, con respecto al método en el cual, tanto el fármaco como el polímero PBLG-Bnz-32 se disuelven en DMF (sistema 7).

De acuerdo a los resultados obtenidos por DLS, se obtuvo una mayor incorporación de CDDP en el sistema preparado en THF (sistema 6) con respecto al sistema preparado en DMF (sistema 7). Estas diferencias son atribuidas a la cantidad de moléculas de CDDP incorporadas y al tipo de interacción entre el CDDP y la superficie de la nanopartícula, respectivamente. De igual manera los sistemas cargados con el fármaco muestran radios hidrodinámicos mayores que los sistemas blanco.

El sistema de nanopartículas de PBLG- β -CD-50/CDDP (sistema 8) permite un aumento en el porcentaje de encapsulación de CDDP con respecto al sistema de nanopartículas de PBLG-bnz-32/CDDP (sistema 6). Este aumento es adjudicado a la presencia de moléculas

disponibles de β -CD, las cuales tienen la capacidad de incorporar moléculas de CDDP, y a su vez pudieran reducir el ordenamiento de las moléculas poliméricas de PBLG en forma de bastoncillos en α -hélice, lo cual permitiría incorporar aun mas moléculas de CDDP en la matriz polimérica de las nanopartículas. Los valores del diámetro hidrodinámico mostraron similitud con el sistema 6 y diferencias considerables con el sistema blanco (sistema 5).

Los tamaños de partícula observados por MET para cada sistema permiten confirmar resultados obtenidos por DLS, a excepción del sistema 8. Dichos resultados mostraron que en el sistema 6 se obtenían nanopartículas de mayor tamaño con respecto a sus sistemas blanco.

Los estudios del perfil de liberación de CDDP de las nanopartículas de PBLG-Bnz-32/CDDP y PBLG- β -CD-50/CDDP sugieren que el método de cuantificación basado en la formación del complejo CDDP-OPDA, no es favorable para la obtención de resultados cuantitativos, posiblemente por la presencia de alguna interacción entre el fármaco y el medio buffer, por lo que se sugiere la utilización de otros métodos de cuantificación, como la espectroscopia de absorción atómica.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas nuestro equipo de trabajo plantea la realización de estudios de liberación de CDDP en cultivo celular, a fin de conocer si nuestro sistema vector tiene la capacidad de liberar de manera controlada el fármaco anticancerígeno en un medio biológico.

A su vez, se han planteado experimentos que permitirían evaluar las posibilidades de desnaturalizar la conformación de la α -hélice de las cadenas poliméricas del PBLG y derivados a fin de buscar el incremento en el porcentaje de encapsulación del CDDP. Además, se tiene como perspectiva, la posibilidad de llevar a cabo experimentos en los cuales se logre modificar la estructura de los polímeros, a fin de conseguir la presencia de grupos funcionales que permitan una interacción con el fármaco cisplatino (modificar los grupos bencílicos de la cadena lateral del PBLG a fin de obtener grupos OH, por ejemplo), y lograr con ello, de igual manera, un incremento en la vectorización del principio activo.

Es de gran importancia la determinación del perfil de liberación del fármaco de un sistema vector. Por ello, se han planteado experimentos a fin de determinar el perfil de liberación del CDDP de las nanopartículas de PBLG y derivados. Uno de ellos es la utilización de la técnica de espectroscopia de absorción atómica, a fin de determinar las concentraciones de fármaco liberado en función del tiempo, o llevar a cabo los experimentos a distintos pH, a fin de conocer si este factor interviene en la formación del complejo CDDP-OPDA, con el cual se buscó determinar la concentración de principio activo liberado a pH 7.4 en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Murillo M., Espuelas S., Prior S., Vitas A.I., Renedo M.J., Goñi M. M., Irache J. M., Gamazo C. 2001. Adv Drug Deliv Rev 56:1527-1528. Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. Rev Med Univ Navarra 45(4):19-34.
2. Lee V. H. L. 2004. Nanotechnology: challenging the limit of creativity in targeted drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 56:1527-1528.
3. Coelho J. F., Ferreira P. C., Alves P., Cordeiro R., Fonseca A. C., Góis J. R., Gil M. H. 2010. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. EPMA J 1: 164-209.
4. Brannon-Peppas L., Blanchette J. O. 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev 56:1649-1659.
5. Tong R., Cheng J. J. 2007. Anticancer polymeric nanomedicines. Polym Rev 47:345–381.
6. Tomalia D. A., Reyna L. A., Svenson S. 2007. Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging. Biochem Soc Trans 35:61–67.
7. Malik N., Evagorou E. G., Duncan R. 1999. Dendrimer-platinate: A novel approach to cancer chemotherapy. Anticancer Drugs 10:767–776.
8. Malik N., Duncan R. 2004. Method of treating cancerous tumors with a dendritic-platinate drug delivery system. Enviado.
9. Pellechia P. J., Gao J., Gu Y., Ploehn H. J., Murphy C. J. 2004. Platinum ion uptake by dendrimers: An NMR and AFM study. Inorg Chem 43:1421–1428.
10. Riess G. 2003. Micellization of block copolymers. Prog Polym Sci 28:1107–1170.
11. Jun Y. J., Kim J. I., Jun M. J., Sohn Y. S. 2005. Selective tumor targeting by enhanced permeability and retention effect. Synthesis and antitumor activity of polyphosphazene-platinum (II) conjugates. J Inorg Biochem 99:1593–1601.
12. Nishiyama N., Kataoka K. 2006. Nanostructured devices based on block copolymer assemblies for drug delivery: Designing structures for enhanced drug function. Polymer therapeutics II. 1era edición. Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 67–101.
13. Nishiyama N., Yokoyama M., Aoyagi T., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. 1999. Preparation and characterization of self-assembled polymer-metal complex micelle from cis-dichlorodiammineplatinum(II) and poly(ethylene glycol)-poly(alpha, beta-aspartic acid) block copolymer in an aqueous medium. Langmuir 15:377–383.
14. Martínez Barbosa M. E. 2006. (Série Doctorat No. 897) Thèse pour l'obtention du grade de Docteur de la Université Paris XI intitulée: "Synthèse de dérivés du poly(L-glutamate de γ -benzyle). Préparation et caractérisation de nanoparticules multifonctionnelles", In Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, Université Paris XI, Chatenay-Malabry, France.

15. Martínez Barbosa M. E., Montembault V., Cammas-Marion S., Ponchel G., Fontaine L. 2007. Synthesis and characterization of novel poly(γ -benzyl L-glutamate) derivatives tailored for the preparation of nanoparticles of pharmaceutical interest. *Polym Int* 56:317-324.
16. Martínez Barbosa M. E., Bouteiller L., Cammas-Marion S., Montembault V., Fontaine L., Ponchel G. 2008. Synthesis and ITC characterization of novel nanoparticles constituted by poly(γ -benzyl L-glutamate)- β -cyclodextrin. *J Mol Recognit* 21:169-178.
17. Martínez Barbosa M. E., Cammas Marion S., Bouteiller L., Vauthier C., Ponchel G. 2009. PEGylated degradable composite nanoparticles based on mixtures of PEG-*b*-poly(γ -benzyl L-glutamate) and Poly(γ -benzyl L-glutamate). *Bioconjugate chem.*
18. Lippert B. 1999. *Cisplatin: Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*. 1era edición New York: Wiley-VCH.
19. Haxton K. J., Burt H. M. 2009. Polymeric drug delivery of platinum-based anticancer agents. *J Pharm Sci* 98(7):2299-2316.
20. Avgoustakis K., Beletsi A., Panagi Z., Klepetsanis P., Karydas A. G., Ithakissios D. S. 2002. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: In vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J Controlled Release* 79:123-135.
21. Farrell N. 2005. Platinum anticancer drugs: From laboratory to clinic. In: Sessler JL, Doctrow SR, McMurry TJ, Lippard SJ, editors. *Medicinal inorganic chemistry*. 1era edición. New York: Oxford University Press. pp. 62-79.
22. Wong E. 1999. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* 99:2451-2466.
23. Rosenberg B., Vancamp L., Trosko J. E., Mansour V. H. 1969. Platinum compounds—A new class of potent antitumour agents. *Nature* 222:385-386.
24. Reedijk J, Lohman P. H. M. 1985. Cisplatin—Synthesis, antitumour activity and mechanism of action. *Pharm Weekblad-Sci Ed* 7:173-180.
25. Wang D., Lippard S. J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307-320.
26. Cavaletti G. 2008. Peripheral neurotoxicity of platinum-based chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 8:71.
27. Ahmad S., Isab A., Ali S. 2006. Structural and mechanistic aspects of platinum anticancer agents. *Trans Met Chem* 31:1003-1016.
28. Hospers G.A.P., Eisenhauer E.A., de Vries E.G.E. 1999. The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio- and chemoprotective agents. A review, indications for use and prospects. *Br J Cancer* 80:629-638.
29. Kelland L. 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7:573-584.
30. Smit T., Snyman J. R., Neuse E. W., Bohm L., van Rensburg C. E. J. 2005. Evaluation of cisplatin and a novel platinum polymer conjugate for drug toxicity and drug distribution in mice. *Anticancer Drugs* 16:501-506.

31. Andrews P. A. 2000. Cisplatin accumulation. *Cancer drug discovery and development; Platinum based drugs in cancer therapy*. 1era edición. New York: Humana Press. pp. 89–113.
32. Boulikas T, Vougiouka M. 2003. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep* 10: 1663-1682.
33. Jennerwein M., Andrews P. A. 1994. Drug accumulation and DNA platination in cells exposed to aquated cisplatin species. *Cancer Lett* 81:215–220.
34. Siddik Z. H. 2003. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265–7279.
35. Vinje J., Sletten E. 2007. NMR spectroscopy of anticancer platinum drugs. *Anti-Cancer Agents Med Chem (Formerly Curr Med Chem—Anti-Cancer Agents)* 7:35–54.
36. Cabral H., Nishiyama N., Okazaki S., Koyama H., Kataoka K. 2005. Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt)-loaded polymeric micelles. *J Controlled Release* 101:223–232.
37. Mizumura Y., Matsumura Y., Hamaguchi T., Nishiyama N., Kataoka K., Kawaguchi T., Hrushesky W. J., Moriyasu F., Kakizoe T. 2001. Cisplatin-incorporated polymeric micelles eliminate nephrotoxicity, while maintaining antitumor activity. *Jpn J Cancer Res* 92:328–336.
38. Nishiyama N., Kataoka K.. 2001. Preparation and characterization of size-controlled polymeric micelle containing cis-dichlorodiammineplatinum(II) in the core. *J Controlled Release* 74:83–94.
39. Zamboni W. C., Gervais A. C., Egorin M. J., Schellens J. H. M., Zuhowski E. G., Pluim D., Joseph E., Hamburger D. R., Working P. K., Colbern G., Tonda M. E., Potter D. M., Eiseman J. L. 2004. Systemic and tumor disposition of platinum after administration of cisplatin or STEALTH liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077B103) in a preclinical tumor model of melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 53:329–336.
40. Bontha S., Kabanov A. V., Bronich T. K. 2006. Polymer micelles with cross-linked ionic cores for delivery of anticancer drugs. *J Controlled Release* 114:163–174.
41. Cafaggi S., Russo E., Stefani R., Leardi R., Caviglioli G., Parodi B., Bignardi G., De Toter D., Aiello C., Viale M. 2007. Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin-alginate complex. *J Controlled Release* 121:110–123.
42. Bellis E., Hajba L., Kovacs B., Sandor K., Kollar L., Kokotos G. 2006. Three generations of alpha, gamma-diaminobutyric acid modified poly(propyleneimine) dendrimers and their cisplatin-type platinum complexes. *J Biochem Biophys Methods* 69:151–161.
43. Gryparis E. C., Mattheolabakis G., Bikiaris D., Avgoustakis K. 2007. Effect of conditions of preparation on the size and encapsulation properties of PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin. *Drug Delivery* 14:371–380.
44. Gryparis E. C., Hatziapostolou M., Papadimitriou E., Avgoustakis K. 2007. Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm* 67:1–8.

45. Li C., Yang D. J., Nikiforow S., Tansey W., Kuang L. R., Wright K. C., Wallace S. 1994. Formation and characterization of Cisplatin-loaded Poly(benzyl L-glutamate) Microspheres for Chemoembolization. *Pharmaceutical research* 11:1792-1799.
46. Bariyanga J., Johnson M. T., Mmutlane E. M., Neuse E. W. 2005. A water-soluble polyamide containing cis-dicarboxylato-chelated platinum(II). *J Inorg Organomet Polym Mater* 15:335–340.
47. Caldwell G., Neuse E. W., van Rensburg C. E. J. 1997. Cytotoxicity of selected water-soluble polymer-cisdiaminedichloroplatinum(II) conjugates against the human HeLa cancer cell line. *J Inorg Organomet Polym* 7:217–231.
48. Caldwell G., Neuse E. W., van Rensburg C. E. J. 1999. Cytotoxic activity of two polyaspartamide-based monoamineplatinum(II) conjugates against the HeLa cancer cell line. *Appl Organomet Chem* 13:189–194.
49. Johnson M. T., Komane L. L., N'Da D. D., Neuse E. W. 2005. Polymeric drug carriers functionalized with pairwise arranged hydroxyl and/or carboxyl groups for platinum chelation. *J Appl Polym Sci* 96:10–19.
50. Neuse E. W., Caldwell G. 1997. Cis-diaminedichloroplatinum(II) complexes reversibly linked into the main chain of water-soluble polyamides. *J Inorg Organomet Polym* 7:163–181.
51. Neuse E. W., Caldwell G., Perlwitz A. G. 1996. Carrier polymers for cisplatin-type anticancer drug models. *Polym Adv Technol* 7:867–872.
52. Neuse E. W., Mphephu N., Netshifhefhe H. M., Johnson M. T. 2002. Synthesis and preliminary in vitro evaluation of polymeric dicarboxylato- and dihydroxylatoplatinum(II) chelates as antiproliferative agents. *Polym Adv Technol* 13:884–895.
53. Malik N., Evagorou E. G., Duncan R. 1999. Dendrimer-platinate: A novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 10:767–776.
54. Malik N., Duncan R. 2004. Method of treating cancerous tumors with a dendritic-platinate drug delivery system. *Enviado*.
55. Tong R., Cheng J. J. 2007. Anticancer polymeric nanomedicines. *Polym Rev* 47:345–381.
56. Tomalia D. A., Reyna L. A., Svenson S. 2007. Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging. *Biochem Soc Trans* 35:61–67.
57. Pellechia P. J., Gao J., Gu Y., Ploehn H. J., Murphy C. J. 2004. Platinum ion uptake by dendrimers: An NMR and AFM study. *Inorg Chem* 43:1421–1428.
58. Riess G. 2003. Micellization of block copolymers. *Prog Polym Sci* 28:1107–1170.
59. Geng Y., Discher D. E. 2005. Hydrolytic degradation of poly(ethylene oxide)-block-polycaprolactone worm micelles. *J Am Chem Soc* 127:12780–12781.
60. Nishiyama N., Yokoyama M., Aoyagi T., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. 1999. Preparation and characterization of self-assembled polymer-metal complex micelle from cis-dichlorodiammineplatinum(II) and poly(ethylene glycol)-poly(alpha, beta-aspartic acid) block copolymer in an aqueous medium. *Langmuir* 15:377–383.

61. Nishiyama N., Okazaki S., Cabral H., Miyamoto M., Kato Y., Sugiyama Y., Nishio K., Matsumura Y., Kataoka K. 2003. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res* 63:8977–8983.
62. Uchino H., Matsumura Y., Negishi T., Koizumi F., Hayashi T., Honda T., Nishiyama N., Kataoka K., Naito S., Kakizoe T. 2005. Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br J Cancer* 93:678–687.
63. Manunta M. L., Gavini E., Chessa G., Passino E. S., Careddu G. M., Giua S., Mollica A., Demontis M. P., Leoni A., Muzzetto P. 2005. Carboplatin sustained delivery system using injectable microspheres. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med* 52:416–422.
64. Matsumoto A., Matsukawa Y., Suzuki T., Yoshino H., Kobayashi M. 1997. The polymer-alloys method as a new preparation method of biodegradable microspheres: Principle and application to cisplatin-loaded microspheres. *J Controlled Release* 48:19–27.
65. Tauro J. R., Gemeinhart R. A. 2005. Development of amine-containing polymeric particles. *J Biomater Sci Polym Ed* 16:1233–1244.
66. Xu P., Van Kirk E. A., Li S., Murdoch W. J., Ren J., Hussain M. D., Radosz M., Shen Y. 2006. Highly stable core-surface-crosslinked nanoparticles as cisplatin carriers for cancer chemotherapy. *Colloids Surf B Biointerf* 48:50–57.
67. Verrijck R., Smolders I. J. H., McVie J. G., Begg A. C. 1991. Polymer-coated albumin microspheres as carriers for intravascular tumor targeting of cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 29:117–121.
68. Kim J. H., Kim Y.-S., Park K., Lee S., Nam H. Y., Min K. H., Jo H. G., Park J. H., Choi K., Jeong S. Y., Park R.-W., Kim I.-S., Kim K., Kwon I. C. 2008. Antitumor efficacy of cisplatin-loaded glycol chitosan nanoparticles in tumor-bearing mice. *J Controlled Release* 127:41–49.
69. Wang Y. M., Sato H., Adachi I., Horikoshi I. 1996. Optimization of the formulation design of chitosan microspheres containing cisplatin. *J Pharm Sci* 85:1204–1210.
70. Akbuga J., Bergisadi N. 1999. Effect of formulation variables on cis-platin loaded chitosan microsphere properties. *J Microencapsul* 16:697–703.
71. Cha J., Lee W. B., Park C. R., Cho Y. W., Ahn C. H., Kwon I. C. 2006. Preparation and characterization of cisplatin-incorporated chitosan hydrogels, microparticles, and nanoparticles. *Macromol Res* 14:573–578.
72. Jeong Y.-I., Kim S.-T., Jin S.-G., Ryu H.-H., Jin Y.-H., Jung T.-Y., Kim I.-Y., Jung S. 2008. Cisplatin-incorporated hyaluronic acid nanoparticles based on ion-complex formation. *J Pharm Sci* 97:1268–1276.
73. Chandy T., Wilson R. F., Rao G. H. R., Das G. S. 2002. Changes in cisplatin delivery due to surfacecoated poly (lactic acid)-poly(epsilon-caprolactone) microspheres. *J Biomater Appl* 16:275–291.
74. Yan X. L., Gemeinhart R. A. 2005. Cisplatin delivery from poly(acrylic acid-co-methyl methacrylate) microparticles. *J Controlled Release* 106:198–208.
75. Anderson J. M. 1985. In vitro and in vivo studies of drug-releasing poly(amino acids). *Ann N Y Acad Sci* 446:67-75.

76. Anderson J. M., Gibbons D. F., Martin R. L., Hiltner A., Woods R. 1974. The potential for poly- α -amino acids as biomaterials. *J Biomed Mater Res* 5:197-207.
77. Yang J.-Z., Wang M., Ottenbrite R. M., and Milstein S. 1996. Amino acid oligomer microspheres as drug delivery systems. II. Oligomerization of NCAs initiated with L-tyrosine methyl ester. *J Bioactive Compat Polym* 11:236-247.
78. Yang J.-Z., Antoun S., Ottenbrite R. M., and Milstein S. 1996. Amino acid oligomer microspheres as drug delivery systems. I. Synthesis of oligo(amino acids) via NCAs and their microsphere formation. *J Bioactive Compat Polym* 11:219-235.
79. Hirayama C., Ihara H., Ishimara S.-I., and Imanishi Y. 1994. Preparation of porous spherical poly(γ -methyl L-glutamate) particles containing β -structure. *Polym J* 26:61-66.
80. Hayashi T., and Iwatsuki M. 1990. Biodegradation of co-poly(L-aspartic acid/Lglutamic acid) *in vitro*. *Biopolymers* 29:549-557.
81. Cammas S., and Kataoka K. 1995. Functional poly[(ethylene oxide)-*co*-(β -benzyl-L aspartate)] polymeric micelles: block copolymer synthesis and micelles formation. *Macromol Chem Phys* 196:1899-1905.
82. McCormick Thomson L. A., Sgouras D., and Duncan R. 1989. Poly(amino acid) copolymers as a potential soluble drug delivery system. 2. Body distribution and preliminary biocompatibility testing *in vitro* and *in vivo*. *J Bioactive Compat Polym* 4:252-268.
83. Block H. 1983. Poly (γ -Benzyl-L-Glutamate and Other Glutamic Acid Containing Polymers). Adonai books.
84. Jeong Y. I., Cheon J. B., Kim S. H., Nah J. W., Lee Y. M., Sung Y. K., Akaike T., Cho C. S. 1998. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles *in vitro*. *Journal of Controlled Release* 51:169–178.
85. Oh I., Lee K., Kwon H. Y., Lee Y.B., Shin S.C., Cho C.S., Kim C.K. 1999. Release of adriamycin from poly(γ -benzyl-L-glutamate)/poly(ethylene oxide) nanoparticles. *Int J Pharm* 181:107–115.
86. Loftsson T., Brewster E. E. 1996. Pharmaceutical applications of Cyclodextrins. *J Pharm Sci* 85:1017-1025.
87. Duchêne D., Ponchel G., Wouessidjewe D. 1999. Cyclodextrins in targeting Application to nanoparticles. *Adv Drug Deliv* 36:29-40.
88. Singh M., Sharma R., Banerjee U. C. 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv* 20:341-359.
89. Kondo H., Nakatani H., Hiromi K. 1976. Interaction of cyclodextrins with fluorescent probes and its application to kinetic studies of amylase. *J Biochem* 79:393-405.
90. Challa R., Ahuja A., Alí J., Khar R. K. 2005. Cyclodextrins in drug delivery: An update review. *AAPS PharmSciTech* 6(2):29-57.
91. Furusaki E., Ueno Y., Sakairi N., Nishi N., Tokura S. 1996. Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polym* 29(1):29-34.

92. Da Silveira A. M., Ponchel G., Puisieux F., Duchene D., 1998. Combined poly(isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs. *15(7):1051-1055*.
93. Betancourt T. 2009. Controlled release and nanotechnology. American Association of Pharmaceutical Scientists. Capítulo10.
94. Liang H. F., Chen S. C., Chen M. C., Lee P. W., Chen C. T., Sung H. W. 2006. Paclitaxel-Loaded Poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system against cultured HepG2 Cells. *Bioconjugate Chem 17:291-299*.
95. Bhowmick T.K., Yoon D., Patel M., Fisher J., Ehrman S. 2010. In vitro effects of cisplatin-functionalized silica nanoparticles on chondrocytes. *J Nanopart Res 8:2757-2770*.
96. Thioune O., Fessi H., Devissaguet J. P., and Puisieux F. 1997. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *Int J Pharm 146:233-238*.
97. Golla E. D., Ayres G. H. 1973. Spectrophotometric determination of platinum with *o*-phenylenediamine. *Talanta 20(2):199-210*.
98. Zhu W., Li Y., Chen Y., Wang C., Xi F. 2010. Supramolecular hydrogels from cisplatin-loaded block copolymer nanoparticles and α -cyclodextrins with a stepwise delivery property. *Biomacromol 11:3086-3092*.
99. Kirby B. J., Hasselbrink E. F. 2004. Z potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis 25:187-202*.
100. Moreno D., Zalba S., Navarro I., Tros de Ilarduya C., Garrido M. J. 2010. Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice. *Euro J Pharm Biopharm 74:265-274*.
101. Balaji A., Pandey V. P., Srinath M. S., Manavalan R. 2009. Synthesis and characterization studies of Cisplatin/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complex. *Pharmacologyonline 1:1135-1143*.
102. Chan J. M., Zhang L., Yuet K. P., Liao G., Rhee J. W., Langer R., Farokhzad O. C. 2009. PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials 30:1627-1634*.
103. Caro Leon F. J. 2009. Estudio de la Conformación del Poli(L-glutamato de γ -bencilo), Poli(L-glutamato de γ -bencilo)-*b*-Poli(etilén glicol) y del Poli(L-glutamato de γ -bencilo)- β -Ciclodextrina en Suspensión Acuosa y su Efecto en la Morfología de Nanopartículas Poliméricas.
104. Jeong Y. I., Kim D. G., Kyeong M., Nah J. W. 2008. All-trans Retinoic Acid Release from Surfactant-free Nanoparticles of Poly(DL-lactide-co-glycolide). *Macromol Res 16(8):717-724*.