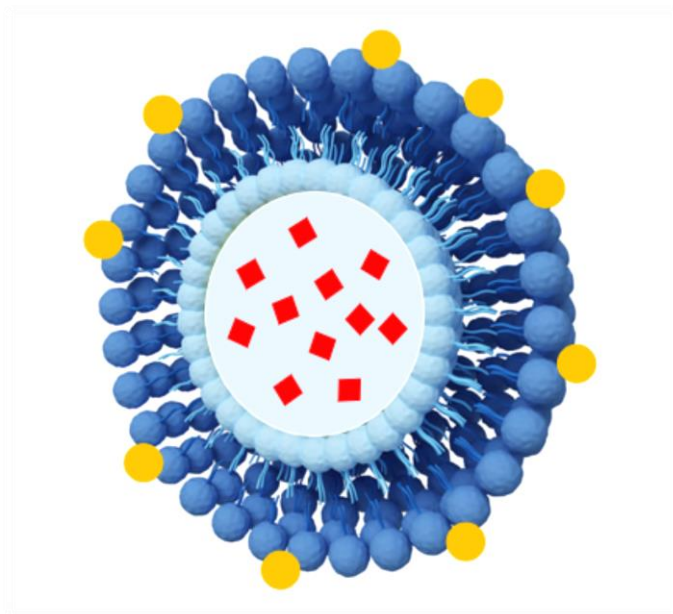




**DISEÑO DE NANOESTRUCTURAS PARA VECTORIZACIÓN SELECTIVA DE
FÁRMACOS MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO
ESTABILIZADAS EN SOPORTES LIPÍDICOS. APLICACIONES EN LA
TERAPIA ANTICANCERÍGENA**



TESIS DOCTORAL

NABILA NAITLHO

Sevilla, 2019



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: galenica@us.es
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

Memoria presentada por Nabila Naitlho para optar al Título de Doctora en
Farmacia por la Universidad de Sevilla

Fdo.: Nabila Naitlho

Vº Bº

Los directores del trabajo

Fdo.: Dra. M^a Luisa González Rodríguez
Doctora en Farmacia
Catedrática de Universidad
Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica

Fdo.: Dr. Francisco Prieto Dapena
Doctor en Química
Profesor Titular de Universidad
Departamento de Química Física

Fdo.: Dr. Antonio M. Rabasco Álvarez
Doctor en Farmacia
Catedrático de Universidad
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: galenica@us.es
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, Doctora en Farmacia, Catedrática de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, FRANCISCO PRIETO DAPENA, Doctor en Química, Profesor Titular de Universidad y ANTONIO MARÍA RABASCO ÁLVAREZ, Doctor en Farmacia, Catedrático de Universidad, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN: Que la memoria de investigación titulada “Diseño de nanoestructuras para vectorización selectiva de fármacos mediante el uso de nanopartículas de oro estabilizadas en soportes lipídicos. Aplicación en la terapia anticancerígena” elaborada por la Licenciada en Farmacia Doña **Nabila Naitlho**, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos para su defensa pública ante el tribunal que ha de juzgarla.

Para que conste, y a petición de la interesada, firman el presente en Sevilla, a veintinueve de octubre de dos mil diecinueve.

Fdo.: M.L. González Rodríguez

Fdo.: F. Prieto Dapena

Fdo.: A.M. Rabasco Álvarez



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: galenica@us.es
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRIGUEZ, Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la memoria de investigación titulada “Diseño de nanoestructuras para vectorización selectiva de fármacos mediante el uso de nanopartículas de oro estabilizadas en soportes lipídicos. Aplicación en la terapia anticancerígena”, realizada por Doña **Nabila Naitlho**, ha sido dirigida por los doctores Francisco Prieto Dapena, Antonio María Rabasco Álvarez y la que suscribe, habiéndose realizado en este Departamento, cumpliendo con todas las normas vigentes.

Sevilla, a 29 de octubre de 2019

Fdo.: Dra. María Luisa González Rodríguez

Agradecimientos

Durante la elaboración de esta Tesis Doctoral he recibido el soporte y la colaboración de muchas personas, que de una u otra manera han contribuido a la realización del presente trabajo de investigación y a las cuales quiero expresar mi agradecimiento.

A María Luisa González Rodríguez, Antonio M. Rabasco Álvarez y Francisco Prieto Dapena, directores de esta tesis, agradecerles su interés, confianza, constante apoyo y el haber contado con las herramientas adecuados para llevar a cabo este trabajo. Me gustaría asimismo destacar el trato cordial recibido por parte de los miembros del Grupo de investigación FQM-202 del Departamento de Química Física de la facultad de química de la universidad de Sevilla, agradecerles su colaboración y sus valiosas aportaciones al proyecto que ampara esta tesis doctoral.

A Oliva, Carmen, Elena, Marcos, Ana, y Sergio, compañeros de despacho, agradecerles su colaboración en distintas tareas y especialmente su amistad, apoyo y buen humor, que han hecho más grata la realización de este trabajo de investigación.

A mi familia, que me dio en todo momento su apoyo desde la distancia y comprensión durante la elaboración del trabajo.

Por último, quiero agradecer muy especialmente a Achraf su paciencia y su cariño, ya que es el quien ha vivido más de cerca los momentos mejores y peores que han surgido en este tiempo.



DISEÑO DE NANOESTRUCTURAS PARA VECTORIZACIÓN SELECTIVA DE FÁRMACOS MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO ESTABILIZADAS EN SOPORTES LIPÍDICOS. APLICACIONES EN LA TERAPIA ANTICANCERÍGENA.

NABILA NAITLHO

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO 1. ANCLAJE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO A LIPOSOMAS CON CARGA SUPERFICIAL POSITIVA	29
CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE LANGMUIR CON COMPONENTES LIPÍDICOS	77
CAPÍTULO 3. ENCAPSULACIÓN DE DOXORUBICINA EN LIPOSOMAS FUNCIONALIZADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO MEDIANTE GRADIENTE DE pH TRANSMEMBRANA	107
CAPÍTULO 4. REDUCCIÓN DE DOXORUBICINA EN PELÍCULAS LIPÍDICAS SOBRE ELECTRODOS DE Au (111) CON APLICACIONES EN SU LIBERACIÓN	147
CONCLUSIONES GENERALES	195
ABREVIATURAS	199
PUBLICACIONES	203



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

ÍNDICE INTRODUCCIÓN GENERAL

1. NANOTECNOLOGÍA Y MEDICINA.....	5
1.1. Nanopartículas como herramientas de diagnóstico	6
1.2. Nanopartículas como herramientas terapéuticas.....	6
2. CÁNCER Y NANOTECNOLOGÍA	7
3. LIPOSOMAS	10
4. NANOPARTÍCULAS DE ORO	12
4.1. Síntesis de AuNPs	15
5. NANOPLATAFORMAS MULTIFUNCIONALES PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR UN PROCESO TUMORAL	16
5.1. Factores desencadenantes de la liberación de fármacos	17
5.1.1. Liberación de fármacos en respuesta a estímulos exógenos.....	17
5.1.2. Liberación de fármacos en respuesta a estímulos endógenos	18
6. IMPORTANCIA DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MONOCAPAS LIPÍDICAS MEDIANTE TÉCNICAS FISICOQUÍMICAS.....	19
6.1. Uso de electrodos recubiertos con películas lipídicas	20
6.2. Empleo de la Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en el estudio de interfases electródicas de interés biológico	21
6.3. Interacciones de DXR con los componentes de los sistemas electródicos biomiméticos	21
7. BIBLIOGRAFÍA	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes tipos de targeting o direccionamiento de las NPs hacia los tumores. El targeting pasivo se basa en el efecto de permeabilidad y retención aumentada por el que las NPs se extravasan más fácilmente de los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales (alta permeabilidad) que de los vasos sanguíneos de los tejidos sanos (baja permeabilidad). En el targeting activo, la superficie de las NPs son funcionalizadas con anticuerpos u otro tipo de ligandos para facilitar su internalización únicamente por las células diana (Kebebe et al., 2018).....9

Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de liposomas (<http://www.integratedhealthblog.com/recent-advances-liposomes-technology/>).....10

Figura 3. Imágenes tomadas mediante TEM de nanopartículas de oro (AuNPs) con distintas formas: (a) Esferas; (b) Bastones o “rods”; (c) Bipirámides; (d) Bastones de oro cubiertos de plata; (e) “granos de arroz” (f) Cubiertas de SiO₂/Au; (g) Cuencos; (h) Cubiertas de SiO₂/Au (i) Tetraedros, Octaedros y Cubotetraedros; (j) Cubos; (k) Cajas de Oro/Plata; (l) Nanolunas. (Dykman y Khlebtsov, 2012).....14

Figura 4. Mecanismos de liberación activada de liposomas: (A) disminución del pH; (B) campo magnético externo; (C) hipertermia; (D) luz; (E) ultrasonido (Eloy et al., 2014).....19

1. NANOTECNOLOGÍA Y MEDICINA

Según la *Royal Society of London*, se define la Nanotecnología como la ciencia que se encarga del diseño, caracterización y aplicación de nuevas estructuras, dispositivos y sistemas, mediante el control de la forma y tamaño de la materia a escala nanométrica, entre 0.1 y 100 nm.

En el ámbito de la medicina, entre los nanomateriales más utilizados se encuentran los liposomas, las nanopartículas (NPs) poliméricas, los dendrímeros, los puntos cuánticos (QD's, *Quantum dots*), los nanotubos de carbono, las NPs inorgánicas y las NPs de óxido de hierro supermagnéticas (SPIONS). Estos nanomateriales pueden ser dirigidos a una diana concreta en función de la enfermedad y ser detectados en el lugar requerido. Además, en función de su composición, tamaño y recubrimiento superficial, el tiempo de permanencia en la circulación sanguínea puede variar. Por otra parte, la elevada relación superficie/volumen que tienen los nanomateriales permite una gran capacidad de carga tanto de fármaco como de agentes para la imagen o estabilizadores (Wang et al., 2012). Por tanto, la modificación del tamaño y la superficie de la NP puede repercutir en una mejora del tiempo de circulación en sangre y ayudar a escapar del sistema retículoendotelial (Lee et al., 2012).

Las diferentes aplicaciones de los nanomateriales en medicina hacen que estos se clasifiquen en sistemas terapéuticos, agentes para la imagen, sistemas para diagnóstico y biomateriales e implantes activos (Wagner et al., 2006). Por otra parte, según su naturaleza, las NPs pueden ser clasificadas en inorgánicas y orgánicas (Xing et al., 2014).

Actualmente existe una gran variedad de NPs inorgánicas con gran potencial terapéutico y de diagnóstico, gracias a su fácil funcionalización y a su elevada relación superficie/volumen. Sus propiedades fisicoquímicas (ópticas y electromagnéticas) varían en función de su composición, tamaño y forma.

Por otra parte, la formación de dispersiones de NPs orgánicas resulta muy útil para transportar y liberar compuestos activos con dificultad para acceder a diferentes tejidos. Este grupo de NPs está conformado principalmente por liposomas y sistemas poliméricos (dendrímeros y micelas), aunque proteínas como la albúmina y la ferritina pueden ser utilizados como nanopartículas orgánicas.

INTRODUCCIÓN

Ambos tipos de NPs presentan un gran número de posibles aplicaciones biomédicas, aplicaciones que se pueden agrupar en dos grandes grupos (Murthy, 2007): como herramientas de diagnóstico y como agentes terapéuticos.

1.1. Nanopartículas como herramientas de diagnóstico

Existen evidencias en la literatura de que las NPs inorgánicas como los *Quantum Dots* o las nanopartículas de oro (AuNPs) constituyen una prometedora alternativa a los convencionales colorantes usados en la visualización *in vitro* e *in vivo* de tejidos, por presentar una gran fluorescencia, elevada resistencia al fotoblanqueo (*Photobleaching*) y capacidad de marcar específicamente tipos celulares concretos en función del ligando conjugado a la superficie de la NP (Chen et al., 2016). Así mismo, el uso de NPs de hierro supramagnéticas como agentes de contraste en resonancia magnética nuclear permite conseguir una mejor visualización de tumores metastásicos.

1.2. Nanopartículas como herramientas terapéuticas

Las NPs pueden actuar como sistemas de transporte de fármacos y material genómico para su posterior liberación en las células diana. Actualmente, la mayoría de NPs utilizadas con este propósito son orgánicas, especialmente liposomas y micelas poliméricas, aunque existen diversos estudios y ensayos clínicos sobre el uso NPs inorgánicas.

Son muchas las ventajas derivadas del uso de NPs como transportadores de fármacos (Zhang et al., 2008). Entre otras, cabe destacar:

- Mejora de la solubilidad de fármacos poco solubles en soluciones acuosas.
- Prolongación de la vida media de los fármacos en circulación, ralentizando su aclaramiento renal y su metabolización hepática.
- Control de la velocidad de liberación del fármaco en las células.
- Minimización de los efectos secundarios sistémicos, al poder liberar fármacos específicamente sobre células diana.
- Generación de efectos sinérgicos y supresión de la resistencia a los fármacos al poder combinar dos o más fármacos en una misma NP.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la investigación está involucrada particularmente en fotodiagnósticos y en la terapia fototérmica de cánceres (Roblero-Bartolón y Ramón-Gallegos, 2015). Además, el objetivo de la vectorización de moléculas en este tipo de patologías se centra fundamentalmente en disminuir o suprimir los efectos secundarios debido a su toxicidad, mejorar la eficiencia terapéutica y la biodistribución, así como superar los problemas de solubilidad, estabilidad y de tipo farmacocinético.

Es por ello que cada vez se hacen más evidentes las ventajas del uso de NPs en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, oculares, microbiológicas y respiratorias, entre otras (Murthy, 2007). Sin embargo, el campo donde las NPs están teniendo un mayor impacto es en el tratamiento del cáncer.

2. CÁNCER Y NANOTECNOLOGÍA

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales que se caracterizan por presentar una división rápida e incontrolada de las células de un tejido, las cuales escapan de los mecanismos de control celular, pudiendo llegar a invadir otros tejidos distantes en el organismo. Se han descubierto más de 100 tipos distintos de cáncer cuyos orígenes pueden estar determinados por componentes genéticos, ambientales o una combinación de ambos (Mendelsohn et al., 2015). Actualmente, el cáncer es una de las principales enfermedades causante de altas morbilidad y mortalidad en todo el mundo, provocando la muerte de 8.2 millones de personas al año, según datos de la OMS.

A pesar de que la investigación biomédica está logrando grandes avances en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (inmunoterapia, hormonoterapia, terapia dirigida...), los tratamientos predominantes hoy en día son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (Cerqueira et al., 2015a). Estos métodos, aunque efectivos en algunos tipos de cáncer, son extremadamente invasivos e inespecíficos, ya que pueden dañar a los tejidos sanos y causar graves efectos secundarios. Por esta razón, los dos mayores retos actuales en el tratamiento contra el cáncer son los siguientes: incrementar la especificidad de acción del agente antineoplásico sobre la célula tumoral y disminuir la dosis necesaria de fármaco hasta reducir el tumor.

INTRODUCCIÓN

A la hora de diseñar un fármaco antineoplásico basado en el uso de NPs es necesario tener en cuenta una serie de características propias de las células tumorales que nos permitan elaborar estrategias para su tratamiento.

Las células tumorales presentan una tasa de división muy alta, y es por ello por lo que necesitan recibir una gran cantidad de nutrientes (oxígeno, glucosa, ácido fólico...) para mantener un metabolismo acelerado (Calvo et al., 2010). Para conseguir esto, dichas células liberan sustancias angiogénicas (VEGF, TGF o TNF- α entre otras muchas) para generar vasos sanguíneos *de novo* alrededor del tumor, aumentando así el flujo de nutrientes en las células cancerígenas (Nishida et al., 2006). Así mismo, las células cancerígenas pueden sobreexpresar proteínas de membrana (transportadores y/o receptores) que les permitan captar una mayor cantidad de nutrientes (e.g. transportador de Glucosa GLUT1, sobreexpresado en cáncer de mama), además de sobreexpresar otros marcadores de superficie (Ruoslahti et al., 2010).

Haciendo uso de estas características, globalmente se pueden funcionalizar las NPs para que actúen contra el tumor, mediante dos posibles sistemas de direccionamiento (*Targeting Systems*) que se encuentran esquematizados en la Figura 1:

- **Direccionamiento pasivo.** Este sistema aprovecha tres diferencias fundamentales entre los tejidos sanos y las células cancerígenas: la vasculatura con un tejido “discontinuo o con fugas” de los vasos sanguíneos que rodean el tumor (Zwicke et al., 2012a), la ausencia de drenaje linfático efectivo en el lecho tumoral y el microambiente ácido presente en el tumor. Debido a la rápida vascularización estimulada por las células tumorales (angiogénesis), estos vasos sanguíneos presentan una permeabilidad mucho mayor (poros de hasta 100 – 780 nm de diámetro) en comparación a la mayoría de los vasos normales (poros < 6 nm de diámetro) (Wang et al., 2011), lo que facilita la entrada de NPs funcionalizadas al tejido canceroso. Además, ya que no hay un drenaje linfático efectivo en el lecho tumoral, dichas NPs quedarán acumuladas en las células cancerígenas. Este efecto combinado se le conoce como “*Enhanced Permeability and Retention*” (EPR).

INTRODUCCIÓN

Asimismo, ya que el pH del microambiente tumoral se encuentra por debajo del pH fisiológico debido a la elevada actividad glucolítica de las células tumorales, se pueden diseñar NPs sensibles al pH que liberen los agentes terapéuticos al entrar en dicho ambiente ácido (Cerqueira et al., 2015).

- **Direccionamiento activo.** Este sistema de direccionamiento se basa en la necesidad de conjugar la NP con algún ligando capaz de reconocer un componente sobreexpresado por las células tumorales, permitiendo así una acumulación preferencial de las NPs en éstas. Además de dichos ligandos, estas NPs deberán cargar a la vez con el fármaco antineoplásico para que ejerza su efecto una vez internalizado en la célula cancerígena (Zwicke et al., 2012).

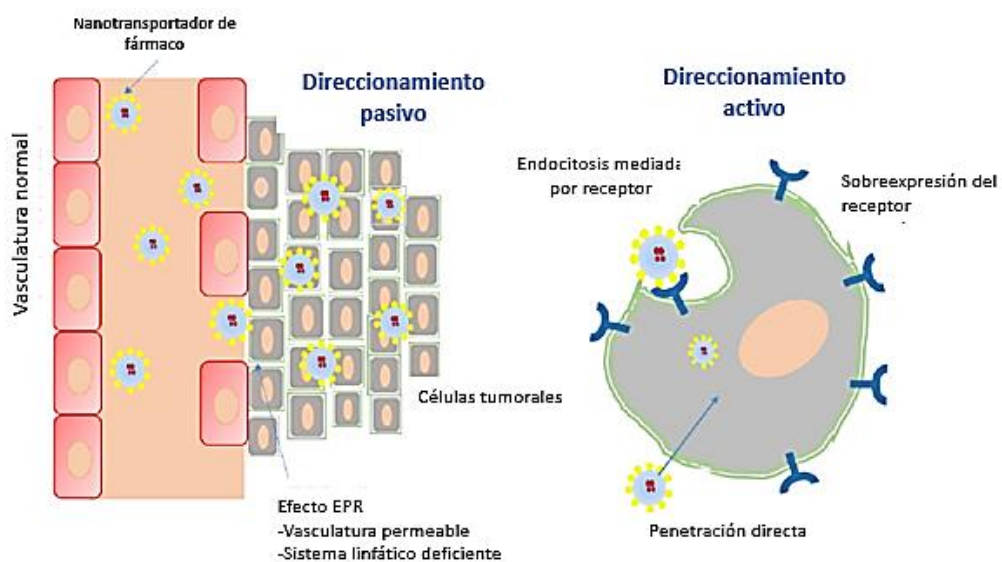


Figura 1. Diferentes tipos de targeting o direccionamiento de las NPs hacia los tumores. El targeting pasivo se basa en el efecto de permeabilidad y retención aumentada por el que las NPs se extravasan más fácilmente de los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales (alta permeabilidad) que de los vasos sanguíneos de los tejidos sanos (baja permeabilidad). En el targeting activo, la superficie de las NPs son funcionalizadas con anticuerpos u otro tipo de ligandos para facilitar su internalización únicamente por las células diana (Kebebe et al., 2018).

3. LIPOSOMAS

El concepto anteriormente mencionado de “direccionamiento pasivo” de fármacos surgió a finales de la década de los 70 con el uso de liposomas termosensibles para la liberación de fármacos aprovechando el efecto de la hipertermia presente en el tejido tumoral. Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre materiales sensibles a estímulos, en especial sobre las características de su diseño y aplicaciones.

Los liposomas son vesículas coloidales esféricas microscópicas constituidas por bicapas fosfolípicas concéntricas que encierran un número igual de compartimentos acuosos, formadas a partir del autoensamblaje de moléculas anfifílicas, tales como fosfolípidos y colesterol. Fueron descubiertos en 1965 por Alex D. Bangham.

Atendiendo a las características estructurales, y en particular al número de bicapas y al tamaño de las mismas, los liposomas se pueden clasificar en vesículas multilaminares (del inglés *multilamellar vesicles* MLV, 100-1000 nm) o unilaminares, pudiendo ser estas últimas de diámetro pequeño (*small unilamellar vesicles* SUV, <100 nm) o grande (*large unilamellar vesicles* LUV, >100 nm) (Lanio et al., 2009). En la Figura 2 se recoge una imagen de cada una de ellas.

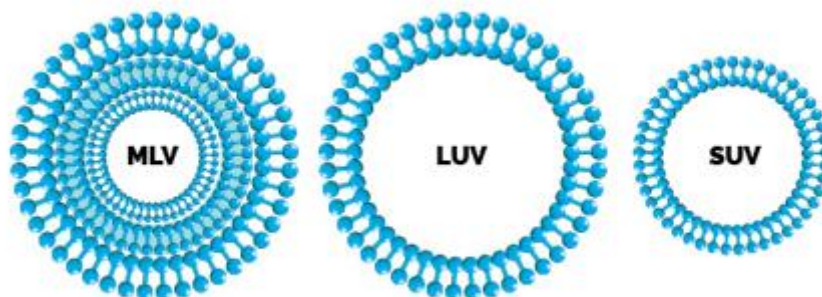


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de liposomas (<http://www.integratedhealthblog.com/recent-advances-liposomes-technology/>).

Los liposomas pueden elaborarse a partir de una gran variedad de lípidos, siendo los fosfolípidos los principales componentes de la estructura liposomal. El fosfolípido más utilizado en la formulación de liposomas es la fosfatidilcolina, debido a su bajo coste de producción, su carga prácticamente neutra y comportamiento químicamente inerte. Se

INTRODUCCIÓN

suele obtener de la lecitina del huevo o la soja. Es una mezcla de moléculas insolubles en agua, formada por tres componentes básicos; una molécula de esfingosina, una molécula de ácido graso y un grupo polar. La esfingosina se une al ácido graso mediante un enlace amida, y su comportamiento está encaminado a minimizar las fuerzas repulsivas entre la fase acuosa y las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Además de este compuesto, en las formulaciones se suelen incorporar cantidades variables de colesterol con la finalidad de aumentar la estabilidad del fármaco en la vesícula y mejorar la eficacia de encapsulación, ya que este esteroide condiciona la permeabilidad y la fluidez de la membrana disminuyendo la libertad de rotación de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en el interior de las bicapas (Fang et al., 2001). Los fosfolípidos pueden incorporarlo hasta una concentración molar aproximada del 50%. Por encima de este valor, los liposomas son metaestables y las vesículas tienden a agregarse y precipitar.

Los lípidos, a bajas temperaturas se encuentran en un estado gel cristalino o fase gel de estructura más bien rígida donde su movilidad está restringida. Conforme aumenta la temperatura, se incrementa la movilidad rotacional de las cabezas lipídicas y aparecen ondulaciones en la superficie de los liposomas, pretransición de fase y, finalmente, cuando la temperatura supera la temperatura de transición de fase (T_c) de los fosfolípidos, estos sufren una transición termotrópica hacia un estado gel líquido o fase fluida donde la fluidez de la bicapa es aún mayor debido al aumento de la libertad rotacional de las colas de los fosfolípidos. Hay que señalar que la temperatura a la cual las cadenas de los ácidos grasos se funden, denominada temperatura de transición de fase (T_c), es función de las propiedades fisicoquímicas de la bicapa y de la naturaleza del medio.

Por otro lado, por regla general, las vesículas lipídicas incluyen diversos agentes para mejorar sus propiedades. Por ejemplo, para obtener vesículas lipídicas cargadas positivamente, se pueden incluir lípidos catiónicos como estearilamina (EA) o el bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) en la bicapa. Por el contrario, para obtener liposomas cargados negativamente, se emplean compuestos aniónicos tales como dicetilfosfato (DP) (Law et al., 2000; González-Rodríguez y Rabasco, 2011). La composición de estas vesículas influye en sus características fisicoquímicas de tamaño,

INTRODUCCIÓN

carga, termodinámica, laminaridad y elasticidad de la bicapa (Maestrelli et al., 2006; González-Rodríguez et al., 2007; González-Rodríguez y Rabasco, 2011). Estas propiedades fisicoquímicas también son determinantes en el comportamiento de las vesículas y, por lo tanto, en su eficacia como potenciadores de la penetración de fármacos (Hironaka et al., 2009).

Los liposomas se han convertido en interesantes sistemas nanotransportadores y han favorecido la difusión de su utilización y la continua aparición de nuevas aplicaciones debido a su composición, en la que se encuentra una importante cantidad de lípidos de la membrana celular, su capacidad de encapsular activos de naturaleza muy diversa (hidrófilos en el espacio acuoso e hidrófobos en la bicapa lipídica), su biocompatibilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad, junto a las posibilidades de vectorizar fármacos (Akbarzadeh et al., 2013).

4. NANOPARTÍCULAS DE ORO

El interés creciente por el desarrollo de nuevos nanomateriales que presenten una mayor funcionalidad y sean capaces de generar una respuesta inteligente, está promoviendo el desarrollo de sistemas híbridos y nanosistemas compuestos que permitan la incorporación de los múltiples requerimientos en tales sistemas. En este contexto, las nanopartículas de oro (AuNPs) ancladas a los liposomas constituyen uno de estos sistemas compuestos que están siendo utilizados en investigación con múltiples fines, tanto terapéuticos como de diagnóstico, englobándose bajo el término nanoteranóstico, que consiste en aprovechar las características ópticas y fototérmicas de las NPs con efectos de visualización, y de éstas y los liposomas con fines terapéuticos.

Las AuNPs no son en absoluto un descubrimiento reciente. El uso del oro coloidal se remonta al siglo V a.C. en China, Arabia y la India, donde se utilizaba con fines médicos. Posteriormente, el alquimista Paracelso (1493 – 1541 d.C.) utilizó también oro coloidal para tratar desórdenes mentales y la sífilis, llegándose incluso a utilizar como tratamiento contra el alcoholismo a finales del siglo XIX. Sin embargo, no fue hasta el siglo XX cuando algunos investigadores comenzaron a explotar sus propiedades fisicoquímicas a través de la Nanotecnología.

INTRODUCCIÓN

Las AuNPs presentan unas propiedades únicas que difieren de aquéllas que presenta el oro macroscópico (*bulk gold*):

- Plasmón de Resonancia. Las propiedades ópticas de las AuNPs son de gran interés, debido a la formación de Plasmones de Resonancia Localizados en Superficie (LSPR), oscilaciones colectivas de los electrones de la banda de conducción de los átomos de oro al ser excitados por un haz de luz de longitud de onda (λ) concreta. En el caso de las AuNPs esféricas con un diámetro inferior a 50 nm, la λ que genera el plasmón es de aproximadamente 520 nm, aunque dicha longitud de onda varía según el tamaño, la forma, el tipo de funcionalización, el ambiente dieléctrico y el grado de agregación de las NPs (Dykman et al., 2012). Esta propiedad es muy útil para la detección de sustancias a muy baja concentración, las cuales alteran el ambiente dieléctrico local de las NPs (*chemical sensing*) (Zeng et al., 2014), o también para posibles terapias por ablación fototérmica contra el cáncer, ya que al excitar las AuNPs a dicha longitud de onda, liberan una gran cantidad de calor localizado en puntos concretos del organismo (Huang y El-Sayed, 2011).

- Biocompatibilidad y baja citotoxicidad. Las AuNPs sin funcionalizar presentan una baja citotoxicidad y una buena compatibilidad biológica. Gracias a ello se pueden llevar a cabo métodos diagnósticos y terapias *in vivo* sin un elevado riesgo de que la partícula cause problemas al organismo (Connor et al., 2005). Sin embargo, en la bibliografía reciente existen excepciones acerca de su citotoxicidad, que podrían guardar relación con los diferentes tamaños y formas de las AuNPs investigadas, así como con los distintos agentes empleados para su estabilización y funcionalización, los cuales otorgan a las AuNPs características superficiales distintas (Hornos y Barbosa, 2016).

- Tamaño y forma variable: Según el método empleado para sintetizar las AuNPs, se puede obtener una amplia variedad de NPs con tamaños y formas diferentes. Las propiedades ópticas y funcionales varían en función de su tamaño y forma (e.g. la longitud de onda de excitación plasmónica, como se detalló anteriormente). En la figura 3 se pueden observar AuNPs con formas muy variadas.

- Funcionalización sencilla. La funcionalización consiste en unir moléculas a la superficie de la NP para que ésta adquiera una función específica. Los átomos de oro presentes en

INTRODUCCIÓN

la superficie de las AuNPs pueden “fisisorber” otras moléculas mediante interacciones no covalentes o bien “quimisorber” mediante enlaces covalentes (gracias a los huecos existentes en los orbitales híbridos 5d-6s formados por los átomos de oro superficiales), donde el enlace covalente “oro-azufre” es el más fuerte que se conoce en este tipo de NPs (Wang, 2010). Las moléculas funcionalizadoras pueden otorgar a la AuNP diversas propiedades, como mayor estabilidad, biocompatibilidad o poder antineoplásico, entre otras muchas funciones.

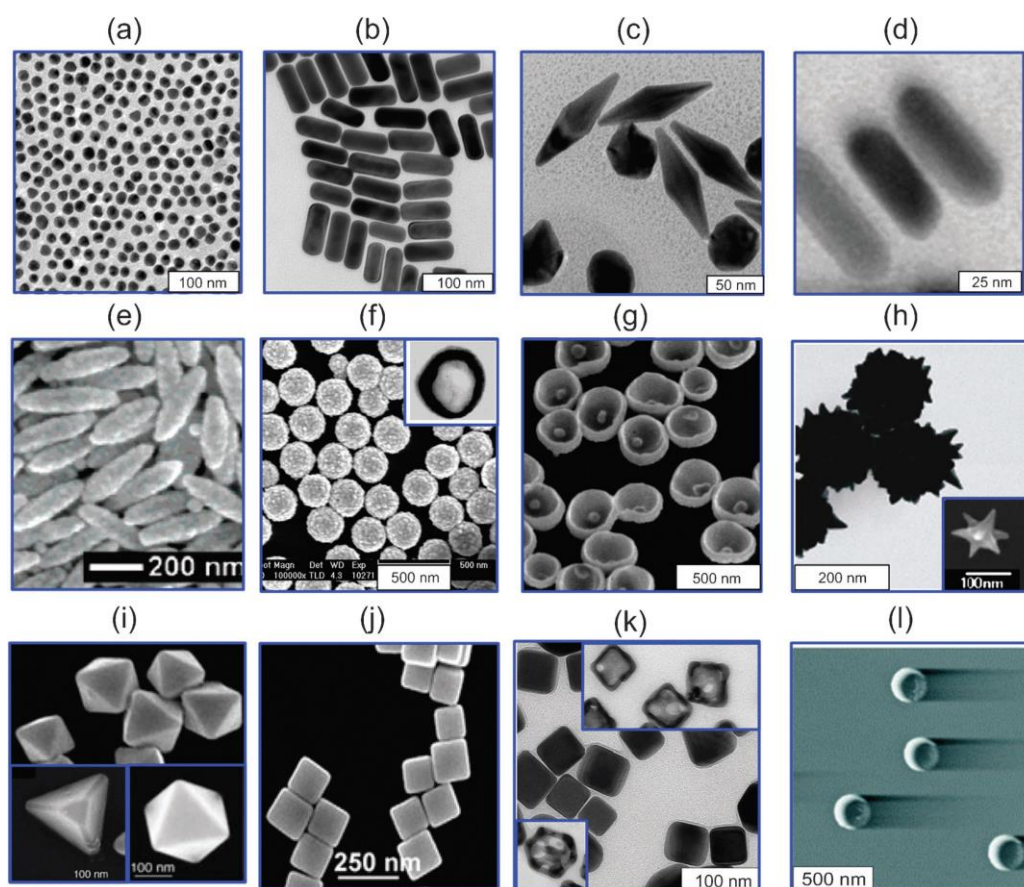


Figura 3. Imágenes tomadas mediante TEM de nanopartículas de oro (AuNPs) con distintas formas: (a) Esferas; (b) Bastones o “rods”; (c) Bipirámides; (d) Bastones de oro cubiertos de plata; (e) “granos de arroz” (f) Cubiertas de SiO₂/Au; (g) Cuencos; (h) Cubiertas de SiO₂/Au (i) Tetraedros, Octaedros y Cubotetraedros; (j) Cubos; (k) Cajas de Oro/Plata; (l) Nanolunas. (Dykman y Khlebtsov, 2012).

4.1. Síntesis de AuNPs

La síntesis de AuNPs se basa, al igual que la síntesis de otros muchos tipos de NPs inorgánicas, en la reducción de una molécula precursora que sea fuente de átomos de oro, los cuales interactuarán entre ellos. Estos átomos metálicos pasan por un proceso de nucleación y posterior crecimiento de la NP. Para evitar un crecimiento excesivo y la posible desestabilización o agregación irreversible de las mismas, se añade a la reacción un agente estabilizante (surfactante), que ayuda a definir el tamaño final de la partícula (Alex y Tiwari, 2015).

Actualmente se ha desarrollado una gran variedad de métodos para sintetizar AuNPs, permitiendo cada uno de ellos la obtención de NPs con tamaños, formas y propiedades distintas. Estos métodos pueden ser agrupados en tres grandes grupos (Vigderman y Zubarev, 2013; Shiringirishi et al., 2015; Herizchi et al., 2016):

- Métodos químicos. Son los más utilizados en la actualidad. En ellos, el agente reductor es de origen químico (borohidruros, aminoboranos, hidracinas, hidroxilaminas, polioles, ácidos oxálico y cítrico, sulfitos, acetileno, azúcares o CO), al igual que el agente estabilizante (citrato de trisodio, taninos, tioles, ligandos fosfatados, oxigenados y nitrogenados, polímeros o albúmina, entre otros surfactantes).
- Métodos físicos. El paso de reducción es ejecutado por un agente físico (radiación gamma, microondas, ondas ultrasónicas, ablación láser, reducción electroquímica y reducción fotoquímica), aunque el paso de estabilización se lleva a cabo normalmente por un agente estabilizante químico.
- Métodos biológicos (*Green chemistry*). Con el objetivo de sintetizar NPs sin el uso de reactivos tóxicos y costosos que puedan dificultar su aplicación biomédica, se están desarrollando nuevos métodos para sintetizar AuNPs con tamaños y formas bien definidas mediante el uso de extractos de plantas (que contienen agentes reductores y estabilizadores naturales) y de microorganismos (levaduras o bacterias) con capacidad reductora natural.

5. NANOPLATAFORMAS MULTIFUNCIONALES PARA DIAGNOSTICAR Y TRATAR UN PROCESO TUMORAL

El estudio y la manipulación de las propiedades fisicoquímicas propias de cada una de las tecnologías referidas anteriormente, junto con diversas estrategias de química de conjugación en combinación con la biología molecular, ha dado lugar a la construcción de nanoplataformas altamente sofisticadas (Di Corato et al., 2015; Liang et al., 2017).

De acuerdo con lo visto anteriormente, uno de los puntos clave de las NPs es la correcta conjugación de éstas con las moléculas de interés. Para llevar a cabo esta etapa existen diversos métodos: interacción electrostática, enlace covalente o conjugación por afinidad (Sperling et al., 2010).

La **interacción electrostática** se produce entre especies cargadas y, a pesar de su simplicidad, es un método ampliamente utilizado, especialmente para la conjugación de especies como los ácidos nucleicos (los grupos fosfato de su estructura aportan una gran carga negativa) con sustancias catiónicas. Aunque puede parecer que se trata de un acoplamiento moderadamente débil, la gran cantidad de grupos presentes en las NPs por su elevada relación superficie/volumen, hacen posible aumentar notablemente el número de puntos de interacción con el compuesto buscado, lo cual aumenta, a su vez, la fuerza de la interacción. Este tipo de enlace será sensible al pH y a la fuerza iónica del medio, lo que permite buscar especies que aseguren la liberación de los compuestos en el medio adecuado.

Respecto al **enlace covalente**, se trata de un tipo de acoplamiento fuerte y existen multitud de posibilidades dependiendo de los grupos funcionales disponibles en las NPs y en las moléculas de interés. Basados en este tipo de reacciones, existen multitud de compuestos comerciales, diseñados para un acoplamiento rápido y directo, pudiéndose seleccionar el más adecuado en cada caso, en función de los grupos funcionales presentes en cada una de las partes. En este apartado, debe reseñarse un tipo de enlace considerado como “cuasi” covalente por multitud de autores, que es el que se establece entre grupos tiol y los átomos de oro, permitiendo una rápida y fácil funcionalización de las AuNPs (Ghosh et al., 2008; Carlini et al., 2017).

Finalmente, el **enlace de afinidad** es el acoplamiento que se establece entre especies distintas a través de un reconocimiento molecular, como por ejemplo las interacciones por puentes de hidrógeno entre bases complementarias del ADN.

5.1. Factores desencadenantes de la liberación de fármacos

Los nanovehículos pueden ser sensibles a estímulos exógenos como temperatura, ultrasonidos, luz, campo magnético y electricidad, o endógenos, como el pH, potencial redox, enzimas dependiendo de su composición y tipo de ligandos acoplados a ellos (Mura et al., 2013).

5.1.1. Liberación de fármacos en respuesta a estímulos exógenos

5.1.1.1. Temperatura. La administración de fármacos con capacidad de respuesta térmica se encuentra entre una de las estrategias más sensibles a los estímulos que se investigan en oncología. Esta respuesta a la temperatura se rige por un cambio agudo no lineal en las propiedades de alguno de los componentes del nanovehículo, al cambiar la temperatura circundante se desencadena la liberación del fármaco. Idealmente, los nanovehículos deben retener su carga a temperatura corporal, ~ 37 °C y liberar el fármaco dentro del tumor, en una zona con una temperatura local de $\sim 40 - 42$ °C para contrarrestar el tiempo de aclaramiento sanguíneo. La hipertermia local se ha utilizado para el control de los sistemas *on-off*, los cuales se ponen en funcionamiento cuando hay un estímulo de cambio de temperatura.

5.1.1.2. Campo magnético. Los sistemas de respuesta magnética permiten una amplia diversidad en la vía de administración debido a la diferente naturaleza que puede adoptar la respuesta magnética, es decir, puede ser un aumento de temperatura cuando se aplica un campo magnético alterno, una guía magnética bajo un campo magnético permanente, o ambos, cuando se usan de manera alternativa. La guía magnética se obtiene focalizando un campo magnético externo en el objetivo biológico durante la administración de la nanoestructura consiguiendo una mejor acumulación del fármaco en los tumores sólidos. El calor generado por un campo magnético oscilante o alterno (AMF) también se puede usar para lograr una liberación de fármaco pulsátil bajo demanda.

INTRODUCCIÓN

5.1.1.3. Ultrasonido. Representa un método muy efectivo para controlar el espacio-tiempo de la liberación del fármaco en el sitio deseado. Se evitan así los efectos secundarios perjudiciales en los tejidos sanos debido a su carácter no invasivo y a la posibilidad de regular la penetración del tejido mediante la frecuencia y tiempo de exposición. En este caso, la liberación del fármaco se produce por efectos térmicos y/o mecánicos generados por fenómenos de cavitación o fuerzas de radiación.

5.1.1.4. Luz. Se han diseñado en los últimos años una gran cantidad de sistemas fotosensibles para lograr la liberación del fármaco por modificaciones estructurales (fotodimerización o fotoisomerización) del sistema en respuesta a la luz a una determinada longitud de onda ultravioleta, visible o regiones cercanas al infrarrojo (NIR), como afirman Wu et al. (2008) y Zhao et al. (2015). El principal inconveniente que presenta esta técnica es la baja profundidad de penetración (< 10 mm) que resulta de las fuertes propiedades de dispersión de los tejidos blandos en la región ultravioleta visible. Por lo tanto, la administración de fármacos inducida por la luz convencional solo es posible en regiones del cuerpo que se exponen a la luz directamente como los ojos o la piel.

5.1.1.5. Electricidad. Los campos eléctricos débiles, de alrededor de 1 V pueden ser usados para lograr la liberación del fármaco pulsada o sostenida a través de mecanismos como electroporación o iontoforesis.

5.1.2. Liberación de fármacos en respuesta a estímulos endógenos

5.1.2.1. pH. El cambio de pH está siendo muy utilizado para activar la liberación del principio activo cuando se producen variaciones de pH asociadas a determinadas patologías. Existen dos estrategias: el uso de polímeros con grupos ionizables que experimentan cambios conformacionales y/o de solubilidad frente a cambios de pH y el diseño de estructuras poliméricas con enlaces sensibles a ácidos cuya rotura provoca la liberación del fármaco.

5.1.2.2. Reacciones redox. Algunos enlaces son propensos a una escisión por parte, por ejemplo, del glutatión; hablamos de los enlaces disulfuros que son sensibles a reacciones redox y se encuentran formando parte de la estructura de micelas del conjunto dendrímero-fármaco. La liberación del fármaco en el citosol puede

INTRODUCCIÓN

desencadenarse por las concentraciones de glutatión que se encuentran en compartimentos extracelulares e intracelulares y en tejidos tumorales. Algunas micelas formuladas con cadenas de polietilenglicol (PEG) se desprenden de estas cadenas en un entorno reductor; otras estructuras tienen respuesta a la oxidación en tejidos inflamatorios ya que estos se caracterizan por la liberación de especies reactivas de oxígeno.

En la Figura 4 se recoge una recopilación de los métodos de liberación de moléculas activas a partir de liposomas.

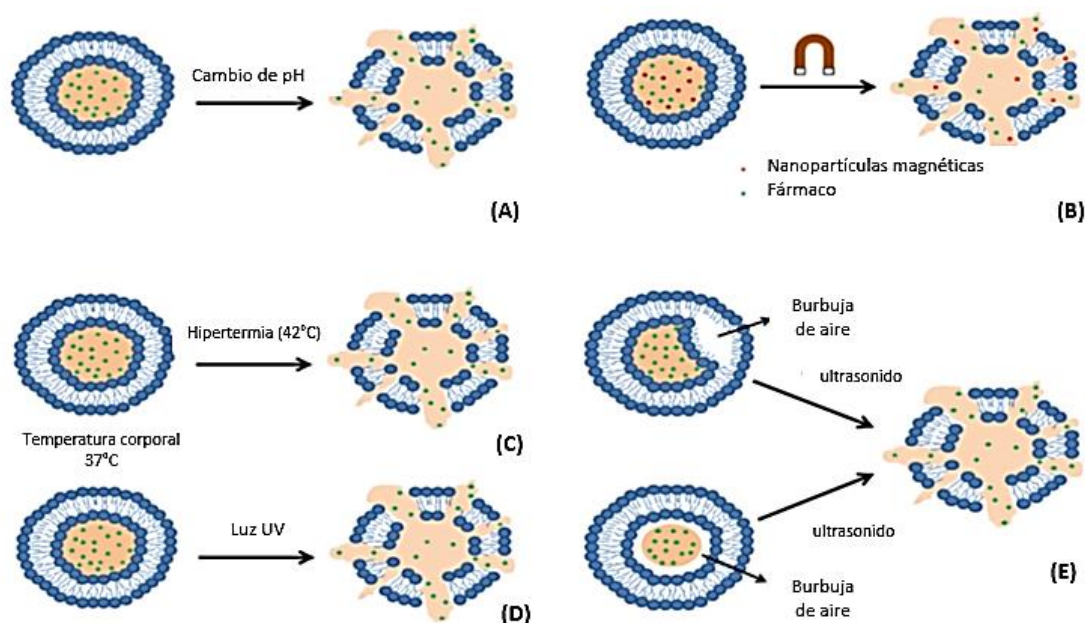


Figura 4. Mecanismos de liberación activada de liposomas: (A) disminución del pH; (B) campo magnético externo; (C) hipertermia; (D) luz; (E) ultrasonido (Eloy et al., 2014).

6. IMPORTANCIA DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MONOCAPAS LIPÍDICAS MEDIANTE TÉCNICAS FISICOQUÍMICAS

La estabilidad de los liposomas y las interacciones con las NPs metálicas dependen de la composición de la capa lipídica de los liposomas. Es por ello que se han utilizado las monocapas de fosfolípidos frecuentemente como biomembranas modelo para investigar estas interacciones y el efecto de la inclusión de distintos ligandos. Uno de los métodos más efectivos para analizar ese tipo de interacciones es el uso de los electrodos modificados con películas lipídicas que pueden ser útiles en el diseño de plataformas de administración de fármacos, ya que pueden proporcionar información sobre la

INTRODUCCIÓN

composición adecuada para formar liposomas, su estabilidad en presencia de campos eléctricos, sus estructuras e interacción con los fármacos para su liberación cuando se aplica la metodología adecuada.

A este respecto, varios grupos de investigación están trabajando. Entre ellos, el grupo de Bilewicz ha estado desarrollando durante los últimos 10 años nuevas estrategias para combinar el conocimiento proporcionado por las películas de Langmuir a través de estudios electroquímicos y espectro-electroquímicos para el diseño de dispositivos de liberación de fármacos (Nazaruk et al., 2014; 2015; Swiech et al., 2016).

6.1. Uso de electrodos recubiertos con películas lipídicas

El uso de este tipo de electrodos constituye un paso adelante para imitar las condiciones biológicas de la membrana. Inicialmente, se usó el electrodo de mercurio altamente hidrófobo (Nelson, 2010; Becucci y Guidelli, 2014) y el grupo de investigación FQM-202 de Química Física de la Universidad de Sevilla hizo contribuciones significativas al aplicar la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) al estudio de los canales iónicos de gramicidina (Mauzeroll et al., 2002; Prieto et al., 2003; Rueda et al., 1998; 1999; 2010). Sin embargo, para poder aplicar métodos que proporcionen información estructural, como los métodos microscópicos y espectroscópicos, se requiere el uso de electrodos sólidos. Lipkowski (Pieta et al., 2012), Bizzoto (Stoodley y Bizzotto, 2003) y Bilewicz (Jablonowska et al., 2011) han formado monocapas de fosfolípidos autoensambladas en electrodos de oro, utilizando las técnicas de Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer y han aplicado técnicas microscópicas y espectroscópicas *in situ* a este tipo de sistemas. De esta manera, se han podido obtener imágenes STM del microscopio de efecto túnel (*Scanning tunneling microscope*) de la organización de moléculas de gramicidina, o de los poros formados por alameticina, sobre monocapas y bicapas lipídicas.

La aplicación de la técnica cuantitativa de espectroscopía de FT-IR de absorción de reflexión infrarroja con modulación de fotones (PM-IRRAS) les permitió analizar los cambios inducidos por el campo eléctrico en la organización de las moléculas de fosfolípidos (Zamlynny y Lipkowski, 2008), determinando los ángulos que los diferentes grupos funcionales adoptan con respecto a la dirección normal al electrodo.

6.2. Empleo de la Espectroscopía de Impedancia Electroquímica en el estudio de interfases electrónicas de interés biológico

La técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) permite separar de forma muy eficiente las diferentes contribuciones que puede tener la respuesta en corriente a una perturbación de potencial de alterna (Lasia, 2014): contribuciones capacitativas, de transferencia de carga y/o de transporte de materia. De esta forma, la EIS proporciona información cuantitativa de procesos electródicos que no se podría obtener por métodos electroquímicos convencionales. Por esta razón, se viene empleando la EIS en campos tan distintos como la corrosión y su control, la ciencia de materiales, estudios cinéticos de reacciones electródicas, permeación en membranas biomiméticas, adsorción de moléculas de interés biológico, etc. En este último campo, son frecuentes los estudios con biosensores impedimétricos (Santos et al., 2014; Xu y Davis, 2014), que emplean una sonda electroactiva, aunque en los últimos años se vienen desarrollando biosensores impedimétricos no-faradaicos para detectar bioanalitos mediante su influencia en la admitancia de la interfase electródica. Recientemente, Lipkowski ha aplicado la EIS en combinación con PM-IRRAS para el estudio de canales iónicos formados por dímeros de gramicidina en bicapas ensambladas sobre electrodos de oro (Su et al., 2017), encontrando la existencia de canales de gramicidina a fracciones molares inferiores a un 0.5%, debido a que esos canales pasan de un estado en el que permiten el paso de cationes monovalentes a un estado aislante a concentraciones superiores a un 10%, dependiendo del campo eléctrico permanente que se genera en el electrodo. Esos resultados se correlacionan con los ángulos de inclinación relativos al electrodo de las cadenas peptídicas, obtenidos de los espectros de PM-IRRA.

6.3. Interacciones de DXR con los componentes de los sistemas electródicos biomiméticos

La doxorubicina (DXR) es una antraciclina citotóxica empleada para el tratamiento de diferentes tipos de tumores. Actúa por un mecanismo combinado que incluye la inhibición de la replicación del ADN nuclear al enlazarse con éste. Su comportamiento electroquímico ha sido estudiado fundamentalmente en electrodos de Hg y de carbono (Yau et al., 2003; Hahn y Lee, 2004). Presenta dos ondas redox, correspondientes con

INTRODUCCIÓN

los dos procesos con los que se transfieren dos electrones y dos protones, y relacionadas con los dos grupos quinona/hidroquinona presentes en la estructura. La reducción electroquímica del grupo quinona sobre electrodos de carbono ha sido utilizada para el seguimiento de la liberación de DXR desde liposomas (Mora et al., 2009), así como para detectar su interacción con diferentes oligonucleótidos (Hynek et al., 2012). Los estudios de la reducción sobre electrodos de oro son más escasos, pues ésta tiene lugar a potenciales muy próximos a la reducción del disolvente (Matyszewska y Bilewicz, 2015).

A pesar de su interés, todavía no se conocen con precisión las interacciones que permiten que la DXR atraviese la membrana plasmática. Recientemente, son varios los estudios que han tratado de analizar estas interacciones en membranas modelo, formadas como monocapas de fosfolípido en la balanza de Langmuir o bien monocapas o bicapas soportadas sobre electrodos sólidos, y a las que se les han aplicado técnicas electroquímicas, electrogravimetría y elipsometría (Nieciecka et al., 2013). Los resultados obtenidos sugieren una fuerte interacción entre la DXR y los grupos polares de las películas lipídicas. Las interacciones del fármaco con monocapas de tioles ensambladas sobre electrodos de oro se han estudiado mediante técnicas electroquímicas (Matyszewska y Bilewicz, 2015). Bilewicz et al. han estudiado la incorporación de DXR con fases lipídicas cúbicas (Nazaruk et al., 2014) así como la interacción con derivados de ciclodextrinas (Swiech et al., 2013).

En el presente proyecto de Tesis Doctoral, se plantea como OBJETIVO GENERAL el estudio multidisciplinar concerniente al diseño de nanoplataformas lipídicas estables de fármacos citotóxicos que sirvan como sistemas transportadores para vectorización de dichos fármacos a nivel celular para tratar patologías de origen celular, como es el cáncer.

Para ello, en el **CAPÍTULO 1**, se inicia el estudio con unos planteamientos preliminares sobre el diseño, caracterización y evaluación de la liberación *in vitro* de formulaciones estables de liposomas de calceína, con características adecuadas de tamaño, carga superficial y eficacia de encapsulación. Asimismo, se realizan los estudios pertinentes mediante distintas técnicas de elaboración y evaluando distintas mezclas de fosfolípidos

INTRODUCCIÓN

con el fin de seleccionar aquella formulación que aporte cargas netas superficiales favorables para anclar AuNPs.

En el **CAPÍTULO 2** se llevará a cabo la preparación y caracterización de películas lipídicas mediante técnicas fisicoquímica basadas en la preparación de monocapas en las interfases aire/agua de la balanza de Langmuir, con el fin de determinar la composición lipídica termodinámicamente óptima para elaborar los liposomas, y su posterior transferencia a electrodos monocristalinos de oro (111), para analizar su estabilidad en presencia de campos eléctricos de intensidades similares a los presentes en las interfases biológicas, mediante EIS.

En el **CAPÍTULO 3** se empleará la plataforma optimizada en el anterior capítulo para encapsular DXR y anclar AuNPs. Tras llevar a cabo los estudios de encapsulación por carga remota en gradiente de pH, y posterior caracterización, se procederá a analizar el proceso de liberación *in vitro*, con el fin de desarrollar una posible nanoplataforma para el tratamiento de cáncer.

Finalmente, en el **CAPÍTULO 4** se llevará a cabo el estudio de las interacciones del fármaco anticancerígeno DXR con los componentes de las nanoplataformas complejas diseñadas para su liberación. Para ello, se estudiará la reducción electroquímica de la DXR sobre electrodos monocristalinos de oro (111) modificados con monocapas lipídicas, de composiciones previamente optimizadas. Se analizará la influencia que un componente catiónico, DDAB, empleado para el anclaje de las NPs, ejerce sobre la inclusión de la DXR en las monocapas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1):102.

Alex S, Tiwari A. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and applications. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015;15:1869–94.

Becucci L, Guidelli R. Mercury-supported biomimetic membranes for the investigation of antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals.* 2014;7(2):136–68.

Calvo MB, Figueroa A, Pulido EG, Campelo RG, Aparicio LA. Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *Int J endocrinology.* 2010; Article ID 205357, 14 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2010/205357>

Carlini L, Fasolato C, Postorino P, Fratoddi I, Venditti I, Testa G, Battocchio C. Comparison between silver and gold nanoparticles stabilized with negatively charged hydrophilic thiols: SR-XPS and SERS as probes for structural differences and similarities. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp.* 2017;532:183-8.

Cerqueira BBS, Lasham A, Shelling AN, Al-Kassas R. Nanoparticle therapeutics: Technologies and methods for overcoming cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;97:140–51.

Chen H, Liu Z, Li S, Su C, Qiu X, Zhong H, Guo Z. Fabrication of graphene and AuNP core polyaniline shell nanocomposites as multifunctional theranostic platforms for SERS real-time monitoring and chemo-photothermal therapy. *Theranostics.* 2016;6(8):1096.

Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 2005;1:325–7.

Di Corato R, Béalle G, Kolosnjaj-Tabi J, Espinosa A, Clement O, Silva AK, Wilhelm C. Combining magnetic hyperthermia and photodynamic therapy for tumor ablation with photoresponsive magnetic liposomes. *ACS nano.* 2015;9(3):2904-16.

Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev.* 2012;41:2256.

Eloy JO, de Souza MC, Petrilli R, Barcellos JPA, Lee RJ, Marchetti JM. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloid Surf B Biointerfaces.* 2014;123:345-63.

Fang JY, Hong CT, Chiu WT and Wang YY. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *Int J Pharm.* 2001;219:61-72.

Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11):1307-15.

González-Rodríguez ML, Barros LB, Palma J, González-R PL, Rabasco AM. Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. *Int J Pharm.* 2007;337(1-2):336-45.

González-Rodríguez ML Rabasco AM. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(7):857-71.

INTRODUCCIÓN

Hahn Y, Lee HY. Electrochemical behavior and square wave voltammetric determination of doxorubicin hydrochloride. *Arch Pharm Res.* 2004;27(1):31–4.

Herizchi R, Abbasi E, Milani M, Akbarzadeh A. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(2):596-602.

Hironaka K, Inokuchi Y, Tozuka Y, Shimazawa M, Hara H, Takeuchi H. Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye. *J Control Release.* 2009;136(3):247-53.

Hornos Carneiro MF, Barbosa F. Gold nanoparticles: a critical review of therapeutic applications and toxicological aspects. *J Toxicol Environ Health B.* 2016;19(3-4):129-48.

Huang X, El-Sayed MA. Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). *Alexandria J Med.* 2011;47:(1)1–9.

Hynek D, Krejcová L, Zítka O, Adam V, Trnková L, Sochor J, Kizek R. Electrochemical study of doxorubicin interaction with different sequences of single stranded oligonucleotides, Part I. *Int J Electrochem Sci* 2012;7(7):13–33.

<http://www.integratedhealthblog.com/recent-advances-liposomes-technology/>

Jablonowska E, Wieckowska A, Rogalska E, Bilewicz R. Phospholipase A(2) activity on supported thiolipid monolayers monitored by electrochemical and SPR methods. *J Electroanal Chem.* 2011;660:360–6.

Kebebe D, Liu Y, Wu Y, Vilakhamxay M, Liu Z, Li J. Tumor-targeting delivery of herb-based drugs with cell-penetrating/tumor-targeting peptide-modified nanocarriers. *Int J nanomedicine.* 2018;13:1425.

Lanio ME, Luzardo MC, Laborde R, Sánchez O, Cruz-Leal Y, Pazos F, Tejuca M, Alonso ME, Fernández LE, Álvarez C. Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev Cub Física.* 2009;26:23-30.

Lasia A. Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. In: *Modern aspects of electrochemistry.* Springer Boston MA. 2002;143-248.

Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery: corneal penetration and absorption. *J Control Rel.* 2000;63(12):135-140.

Lee DE, Koo H, Sun IC, Ryu JH, Kim K, Kwon IC. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2656-72.

Liang R, Xie J, Li J, Wang K, Liu L, Gao Y, Tao J. Liposomes-coated gold nanocages with antigens and adjuvants targeted delivery to dendritic cells for enhancing antitumor immune response. *Biomaterials,* 2017;149:41-50.

Maestrelli F, García-Fuentes M, Mura P, Alonso MJ. A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;63(2):79-86.

Mauzeroll J, Buda M, Bard AJ, Prieto F, Rueda M. Detection of Tl(I) transport through a gramicidin-dioleoylphosphatidylcholine monolayer using the substrate generation-tip collection mode of scanning electrochemical microscopy. *Langmuir.* 2002;18:9453–61.

INTRODUCCIÓN

Matyszewska D, Bilewicz R. Interactions of daunorubicin with Langmuir–Blodgett thiolipid monolayers. *Electrochim Acta*. 2015;162:45–52.

Mora L, Chumbimuni-Torres KY, Clawson C, Hernández L, Zhang L, Wang J. Real-time electrochemical monitoring of drug release from therapeutic nanoparticles. *J Control Release*. 2009;140(1):69–73.

Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Gray JW, Thompson CB. *The molecular basis of cancer*. 4th edn. 2015. Saunders.

Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat Mater*. 2013;12(11):991–1003.

Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine*. 2007;2:129–41.

Nazaruk E, Miszta P, Filipek S, Górecka E, Landau EM, Bilewicz R. Lyotropic cubic phases for drug delivery: diffusion and sustained release from the mesophase evaluated by electrochemical methods. *Langmuir*. 2015;31(46):12753–61.

Nazaruk E, Szlezak M, Gorecka E, Bilewicz R, Osornio YM, Uebelhart P, Landau EM. Design and assembly of pH-sensitive lipidic cubic phase matrices for drug release. *Langmuir*. 2014;30:1383–90.

Nelson A. Electrochemistry of mercury supported phospholipid monolayers and bilayers. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2010;15:455–66.

Nieciecka D, Joniec A, Blanchard GJ, Krysinski P. Interactions of doxorubicin with organized interfacial assemblies. 1. Electrochemical characterization. *Langmuir*. 2013;29(47):14560–9.

Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2006;2:213–9.

Pieta P, Mirza J, Lipkowski J. Direct visualization of the alamethicin pore formed in a planar phospholipid matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:21223–7.

Prieto F, Navarro I, Rueda M. Impedance study of thallos ion movement through gramicidin–dioleoylphosphatidylcholine self-assembled monolayers supported on mercury electrodes: the C–(C)–CE mechanism. *J Electroanal Chem*. 2003;550:253–65.

Roblero-Bartolón GV, Ramón-Gallegos E. Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer. *Gaceta Méd Mexico*. 2015;151(1):85-98.

Rueda M, Navarro I, Ramírez G, Prieto F, Nelson A. Impedance measurements with phospholipid-coated mercury electrodes. *J Electroanal Chem*. 1998;454:155–160.

Rueda M, Navarro I, Ramírez G, Prieto F, Prado C, Nelson A. Electrochemical impedance study of Tl⁺ reduction through gramicidin channels in self-assembled gramicidin-modified dioleoylphosphatidylcholine monolayers on mercury electrodes. *Langmuir* 1999;15(10):3672–8.

Rueda M, Prieto F, Navarro I, Romero R. Phospholipid and gramicidin-phospholipid-coated mercury electrodes as model systems of partially blocked electrodes. *J Electroanal Chem*. 2010;649(1–2):42–7.

INTRODUCCIÓN

Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *The Journal of cell biology*. 2010;188(6):759-768.

Santos A, Davis JJ, Bueno PR. Fundamentals and applications of impedimetric and redox capacitive biosensors. *J Anal Bioanal Tech*. 2014;7(16):1-15.

Shiringirishi M, Prajapati S, Yadav P, Verma A. Gold nanoparticles: promising and potential nanomaterial. *Int J Pharm Sci Res*. 2013;4:4068–82.

Sperling RA, Parak WJ. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos Trans Royal Soc A* . 2010;368(1915):1333-83.

Stoodley R, Bizzotto D. Epi-fluorescence microscopic characterization of potential-induced changes in a DOPC monolayer on a Hg drop. *Analyst*. 2003;128:552–61.

Su Z, Leitch JJ, Faragher RJ, Schwan AL, Lipkowski J. Gramicidin A ion channel formation in model phospholipid bilayers tethered to gold (111) electrode surfaces. *Electrochim Acta*. 2017;243:364–73.

Swiech O, Dutkiewicz P, Wojciuk K, Chmurski K, Kruszewski M, Bilewicz R. Cyclodextrin derivatives conjugated with aromatic moieties as pH-responsive drug carriers for anthracycline. *J Phys Chem B*. 2013;117:13444–50.

Swiech O, Majdecki M, Debinski A, Krzak A, Stępkowski TM, Wójciuk G, Bilewicz R. Competition between self-inclusion and drug binding explains the pH dependence of the cyclodextrin drug carrier – molecular modelling and electrochemistry studies. *Nanoscale*. 2016;8(37):16733–42.

Vigderman L, Zubarev ER. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65:663–76.

Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol*. 2006;24(10):1211.

Wang Q, Cui X, Chen J, Zheng X, Liu C, Xue T, Zheng W. Well-dispersed palladium nanoparticles on graphene oxide as a non-enzymatic glucose sensor. *RSC advances*. 2012;2(15):6245-6249.

Wu G, Mikhailovsky A, Khant HA, Fu C, Chiu W, Zasadzinski JA. Remotely triggered liposome release by near-infrared light absorption via hollow gold nanoshells. *J Am Chem Soc*. 2008;130(26):8175-7.

Xing Y, Zhao J, Conti PS, Chen K. Radiolabeled nanoparticles for multimodality tumor imaging. *Theranostics*. 2014;4:290–306.

Xu Q, Davis JJ. The diagnostic utility of electrochemical impedance. *Electroanalysis*. 2014;26(6):1249–58.

Yau HC, Chan HL, Yang M. Electrochemical properties of DNA-intercalating doxorubicin and methylene blue on n-hexadecyl mercaptan-doped 5'-thiol-labeled DNA-modified gold electrodes. *Biosens Bioelectron*. 2003;18(7):873-9.

Zamlynny V, Lipkowski J. Quantitative SNIFTIRS and PM IRRAS of organic molecules at electrode surfaces. *Adv Electrochem Sci Eng*. 2008;9:315.

Zeng S, Baillargeat D, Ho HP, Yong KT. Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. *Chem Soc Rev*. 2014;43:3426–52.

INTRODUCCIÓN

Zhang L, Gu FX, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:761–9.

Zhao P, Zheng M, Luo Z, Gong P, Gao G, Sheng Z, Cai L. NIR-driven smart theranostic nanomedicine for on-demand drug release and synergistic antitumour therapy. *Scientific Reports.* 2015;5:14258.

Zwicke GL, Ali Mansoori G, Jeffery CJ. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano reviews.* 2012;3(1):18496.



***CAPÍTULO 1: ANCLAJE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO A
LIPOSOMAS CON CARGA SUPERFICIAL POSITIVA***

CAPÍTULO 1

ÍNDICE CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN	35
1.1. Liposomas funcionalizados con nanopartículas de oro	35
1.2. Diseño Experimental	39
1.2.1. Diseños factoriales con variables a dos niveles	41
1.2.2. Diseños de Plackett-Burman	43
1.3. Hipótesis y objetivos	44
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.1. Productos y reactivos	46
2.2. Preparación de liposomas	46
2.2.1. Evaporación en capa fina	46
2.2.2. Congelación y calentamiento	48
2.3. Caracterización fisicoquímica de las vesículas	48
2.3.1. Análisis dimensional: tamaño e índice de polidispersión (IP)	48
2.3.2. Carga superficial: potencial Zeta	49
2.3.3. Porcentaje de encapsulación (PdE)	50
2.4. Selección de los parámetros significativos mediante diseño de Plackett-Burman	50
2.5. Anclaje de las AuNPs a los liposomas.....	53
2.6. Análisis morfológico	53
2.7. Estudios de liberación <i>in vitro</i>	53
2.8. Análisis estadístico	54
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
3.1. Etapa de cribado	55
3.1.1. Influencia del método de preparación (X3 y X5)	58
3.1.2. Influencia de la composición de la bicapa (X1, X2 y X4).....	60
3.2. Anclaje de AuNPs a liposomas cargados con DDAB	61
3.2.1. Efecto del DDAB sobre la estabilidad de las vesículas	61
3.2.2. Selección de la ratio AuNPs:liposomas (v/v).....	62
3.2.3. Efecto de las AuNPs sobre la liberación de calceína a partir de los sistemas nanoestructurados	65
4.CONCLUSIONES	71
5.BIBLIOGRAFÍA.....	72

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Imagen esquemática de los mecanismos de funcionalización de los liposomas con las AuNPs. Adaptada de Chueng et Al-jamal (2018)..... 38

Figura 2. Estructura química de bromuro de didodecildimetil amonio..... 39

Figura 3. Gráficos de Pareto correspondientes a los efectos de los factores en la respuesta evaluada. A) Tamaño. B). Pdl. C) Potencial zeta. X1: lípido inductor de rigidez; X2: lípido catiónico; X3: Método de producción; X4: Concentración de lípido catiónico (% en moles); X5: Extrusión. 57

Figura 4. Imágenes de TEM de las AuNPs ancladas a la superficie de los liposomas que contienen A) DDAB. B) Estearilamina..... 64

Figura 5. Efecto de la temperatura (37 o 42 °C) sobre la liberación de calceína de A) Vesículas extruidas (0.2 µm) sin AuNPs y B) Vesículas extruidas (0.2 µm) con AuNPs ancladas..... 67

Figura 6. Valores de t50% de los perfiles seleccionados de liberación de calceína, realizados a dos temperaturas diferentes: 37 y 42 °C. NE: vesículas no extruidas; E0.8: Vesículas extruidas por filtros de 0.8 µm; E0.2: Vesículas extruidas por filtros de 0.2 µm; AuE0.8: AuNPs ancladas a muestras extruidas por filtros de 0.8 µm; AuE0.2: AuNPs ancladas a muestras extruidas por filtros de 0.2 µm. 69

Figura 7. Efecto de la extrusión sobre la liberación de calceína de A) Vesículas sin AuNPs. B) Vesículas con AuNPs ancladas (0.2 µm). Los experimentos se realizaron a 42 °C.....70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los efectos en un diseño factorial completo 2^7	42
Tabla 2. Factores y sus niveles utilizados en el diseño de Plackett-Burman en la etapa de screening. Ch: colesterol; Chems: hemisuccinato de colesterol; SA: estearilamina; DDAB: bromuro de didodecildimetilamonio; T/S: TLE y sonicación después. T/S/F. TLE, sonicación y congelación-descongelación después.....	52
Tabla 3. Matriz de Plackett-Burman con las respuestas observadas (promedio \pm desviación estándar. N = 3). X1: lípido inductor de rigidez; X2: lípido catiónico; X3: Método de producción; X4: Concentración de lípido catiónico; X5: Extrusión. Y1: tamaño de vesícula (nm); Y2: índice de polidispersión; Y3: potencial zeta (mV).....	56
Tabla 4. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de los resultados experimentales del diseño Plackett-Burman para el tamaño de vesícula, nm (Y1), índice de polidispersión, IP (Y2) y potencial zeta PZ, mV (Y3).....	56
Tabla 5. Resumen de las mejores condiciones para optimizar las diferentes respuestas. X1: lípido inductor de rigidez; X2: lípido catiónico; X3: Método de producción; X4: Concentración de lípido catiónico (% en moles); X5: Extrusión.....	58
Tabla 6. Efecto de la concentración del DDAB (% en moles) en la bicapa lipídica de los liposomas en sus parámetros de caracterización. Lípidos totales: 100% en moles. Para cada formulación, se prepararon al menos tres muestras diferentes. Los valores presentados son valores medios \pm SD y se compararon estadísticamente con el anterior. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001; Prueba t de Student.....	62
Tabla 7. Efecto de la ratio AuNPs/liposomas en los parámetros de caracterización de las vesículas resultantes. Los lotes control se refieren a liposomas sin AuNPs. DDAB y SA (estearilamina) se estudiaron como agentes inductores de carga. X:Y (relación AuNPs: liposomas v/v). Para cada formulación se prepararon al menos tres muestras diferentes; los valores presentados son valores medios \pm SD y fueron significativamente diferentes en comparación con el grupo control. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Prueba t de Student.....	63
Tabla 8. Parámetros analizados en los perfiles de liberación. AUCDP: área bajo la curva de los perfiles de disolución. Q60, Q120, Q240 y Q480: cantidad de calceína liberada (en porcentaje) a 60, 120, 240 y 480 min, respectivamente. t50%: tiempo (min) requerido para liberar el 50% de la cantidad del fármaco. X_Y (X: extruido (E0.8 o E0.2) o no extruido (NE) y precedido por Au si se anclaron las AuNPs; Y: temperatura del ensayo (37 o 42 °C).....	66

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Liposomas funcionalizados con nanopartículas de oro

La administración selectiva de fármacos constituye en la actualidad un importante campo de investigación para el diseño de medicamentos, que persigue superar las limitaciones actuales existentes en diferentes terapias. De ahí que se esté promoviendo un interés continuo por el desarrollo de sistemas de administración de fármacos localizados específica y selectivamente, entre los cuales se encuadrarían los denominados nanotransportadores con funcionalidad mejorada y capacidad inteligente de respuesta (Ramasamy et al., 2017). Estas estructuras poseen propiedades únicas, como tamaño nanométrico, elevada relación superficie-volumen y características fisicoquímicas favorables. Asimismo, su potencial comportamiento en el organismo permitiría modular los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos de las moléculas en ellos incluidas, mejorando así su índice terapéutico.

En la investigación del cáncer, son numerosos los esfuerzos que se han centrado en aprovechar las características fisiológicas de esta enfermedad, así como de su entorno para favorecer la acumulación de los nanotransportadores en el área tumoral, con el objetivo de reducir los efectos secundarios desfavorables en el tejido normal (Wicki et al., 2015). Asimismo, como es bien conocido, el denominado efecto de retención y permeabilidad mejorada (*Enhanced Permeability Retention*, *EPR*) contribuye de forma importante a la acumulación de estos sistemas en el tumor, siguiendo procesos de difusión y convección (Torchilin, 2011). Sin embargo, también es ampliamente aceptado por la comunidad científica que este efecto no es suficiente para controlar los efectos secundarios de los fármacos citotóxicos (Nakamura et al., 2016). Ante este panorama, se han abordado diferentes estrategias basadas en el desarrollo de nanosistemas que responden a determinados estímulos, como diferencias de pH, actividad enzimática, temperatura y luz, entre otros (Deshpande et al., 2013; Zangabad et al., 2018; Zhou et al., 2019).

Entre estos sistemas de liberación controlada que responden a estímulos, la tecnología de liposomas sensibles al calor constituye una alternativa interesante (Allen y Cullis, 2013). Además de considerarlos como nanotransportadores atractivos en virtud de su

CAPÍTULO 1

atoxicidad y elevada biocompatibilidad, se han ido incluyendo algunas estrategias en su formulación capaces de desencadenar el efecto de una liberación masiva, basándose en el ajuste de la temperatura requerida para favorecer la transición de fase cristalina de gel a líquido en la bicapa según la composición lipídica, o bien empleando polímeros termosensibles, así como liposomas activos frente a vibraciones acústicas y liposomas sensibles a la luz láser (Kneidl et al., 2014).

En los últimos años, la investigación en torno a las nanopartículas de metales nobles está adquiriendo una enorme importancia en virtud de sus propiedades físicas (Lee et al., 2016; Pang et al., 2017). Entre ellas, las nanopartículas de oro (AuNPs) son bien conocidas por sus propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas dependientes del tamaño, estabilidad a largo plazo, elevado coeficiente superficie-volumen, así como facilidad de modificación química (Daniel y Astruc, 2004). Así, cabe destacar sus propiedades ópticas, exhibiendo resonancia de plasmón de superficie, por lo que absorben energía en una longitud de onda distintiva en la región UV-vis debido a su tamaño nanométrico (Rana et al., 2012). La mayor parte de la energía absorbida se convierte en calor. Estas características hacen de las AuNPs excelentes candidatas para aplicaciones biomédicas, para su uso como biosensores, marcadores espectroscópicos (Wang et al., 2019) y, como se ha expuesto anteriormente, en la administración dirigida de fármacos (Pissuwan et al., 2011; Kumar et al., 2013).

Las AuNPs pueden diseñarse de diferentes maneras para detectar un estímulo, como por ejemplo, mediante la formación de enlaces moleculares o cambios de concentración iónica, respondiendo con la liberación inmediata de la carga en las células o tejidos. Incluso estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado una posible degradación o modificación química de los fármacos (Dreaden et al., 2011). Además de la aplicación potencial de materiales basados en nanotecnología para combinar múltiples funciones terapéuticas en una sola plataforma, estas nanopartículas también ofrecen la ventaja de poder dirigirse a tejidos específicos, llegando así a compartimentos subcelulares o malignos en diferentes etapas (Schroeder et al., 2012).

Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas, la evaluación *in vivo* de las AuNPs ha revelado una semivida biológica corta, toxicidad celular y acumulación limitada en las

CAPÍTULO 1

células cancerígenas (Alkilany y Murphy, 2010). Por otra parte, se ha observado que las nanopartículas aniónicas son menos citotóxicas que las nanopartículas catiónicas (Schaeublin et al., 2011). Además, estas partículas tienden a agregarse y perder sus propiedades únicas en condiciones fisiológicas.

Todos estos inconvenientes de las AuNPs pueden verse mermados con el anclaje de las mismas a los liposomas (Liu et al., 2015; Yu et al., 2015), ofreciendo esta nanoplataforma numerosas aplicaciones como herramientas biofísicas y bioquímicas de los liposomas en términos de detección e imagen (Sau et al., 2009; Lajunen et al., 2015; Mannaris et al., 2018).

Básicamente, los cambios locales de temperatura en las regiones circundantes de las nanopartículas podrían usarse para desencadenar la liberación del fármaco, que se encontraría ubicado en el interior de los liposomas. El calentamiento de las AuNPs inducido por la luz se ha utilizado ya anteriormente por otros autores para generar daño celular en las células marcadas con nanopartículas (Pitsillides et al., 2003). Este hallazgo, como han demostrado algunos autores, puede tener numerosas aplicaciones terapéuticas futuras (Divya y Dharuman, 2017), ya que en estos sistemas, la temperatura requerida para la transición de fase cristalina de gel a líquido en los liposomas se puede ajustar mediante la composición lipídica sola o en combinación con otras estrategias que ofrezcan estas AuNPs. Como se ha detallado previamente, esta actuación se ha utilizado para el tratamiento del cáncer, donde la temperatura ligeramente más elevada en la zona tumoral desencadena la liberación del fármaco de los liposomas compuestos por fosfolípidos con una transición de fase inferior a 41 °C (Rossi y Monticelli, 2016).

Como se recoge en la Figura 1, existen diferentes métodos para combinar las AuNPs y los liposomas, como describieron Paasonen et al. (2007): A) incorporando las nanopartículas hidrófobas en la bicapa lipídica; B) encapsulando las nanopartículas hidrófilas cargadas en el núcleo de los liposomas; y C) localizando las AuNPs funcionalizadas a nivel lipídico en la superficie interna y externa de los liposomas.

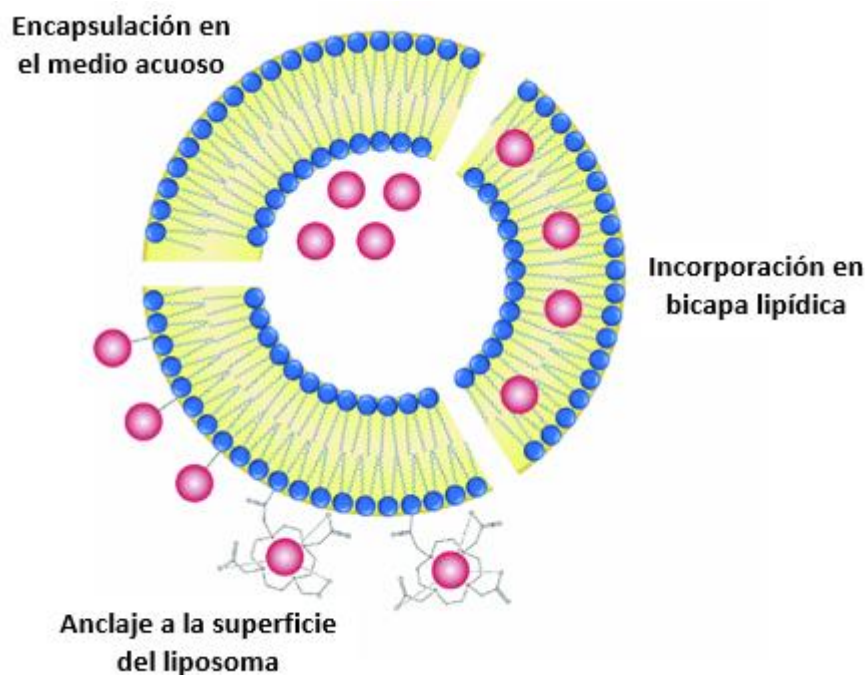


Figura 1. Imagen esquemática de los mecanismos de funcionalización de los liposomas con las AuNPs. Adaptada de Chueng et Al-jamal (2018).

Para reforzar el proceso de anclaje de estas nanopartículas sobre los liposomas, es necesario desarrollar una modificación adecuada de la composición de la bicapa lipídica con el fin de proporcionar características adecuadas de carga superficial de la vesícula.

Los liposomas generalmente se componen de fosfatidilcolina, ya sea mezclas naturales obtenidas de la soja o la yema de huevo, o sus derivados hidrogenados, que muestran una temperatura de transición de fase más alta. La incorporación del colesterol, uno de los componentes principales de las biomembranas, en las bicapas liposomales contribuye de manera importante a la organización, dinámica y función de la membrana. Este esteroide reduce la libertad de rotación de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, lo que ayudaría a reducir la pérdida de compuestos hidrófilos a la vez que estabilizaría la bicapa lipídica (Manojlovic et al., 2008). Otro factor para considerar en la formulación de liposomas es la concentración de lípidos, de manera que la interacción molecular entre el fármaco y la membrana de la bicapa lipídica desempeña un papel importante en la formación de liposomas y la encapsulación de fármacos tanto hidrófilos como lipófilos (Villasmil-Sánchez et al., 2013).

La interacción electrostática fármaco-lípido constituye una estrategia particularmente

interesante para mejorar la encapsulación de fármacos hidrófilos mediante el uso de lípidos con carga negativa o positiva para interactuar con fármacos con la carga opuesta. En este sentido, el bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB), lípido sintético de naturaleza catiónica cuya estructura química se recoge en la Figura 2, ha sido ampliamente utilizado en el estudio de vesículas y otros modelos de biomembranas (Li et al., 2008; Kanwar et al., 2016). Igualmente, la formación de liposomas en soluciones acuosas de este lípido ha sido extensamente estudiada por numerosos autores (Proverbio et al., 2002; Ludzik et al., 2017).

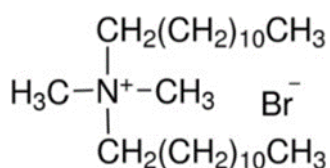


Figura 2. Estructura química de bromuro de didodecildimetil amonio.

En el presente capítulo se abordará el estudio de optimización del anclaje de AuNPs a la formulación de liposomas con carga superficial positiva, el cual se llevará a cabo mediante la aplicación del diseño experimental.

1.2. Diseño Experimental

En el ámbito de la Tecnología Farmacéutica, los estudios de preformulación, formulación, caracterización y evaluación de medicamentos se caracterizan por presentar un elevado y variado número de posibles factores que pueden influir en el desarrollo y optimización de las distintas formas farmacéuticas.

Mediante diversas aproximaciones, es posible acercarse a la consecución de los objetivos fijados, esto es, generar una formulación óptima con relación a determinados parámetros establecidos y/o conocer cómo dichos parámetros afectan a la formulación. Debido a que el procedimiento clásico de “ensayo-error”, caracterizado por la necesidad de efectuar un elevado número de experimentos, se centra de forma exclusiva en el estudio de los efectos introducidos en los sistemas únicamente por los factores principales, no resulta posible conocer si la formulación óptima se ha alcanzado realmente (Wu y Wu, 2000) ni permite conocer la influencia de las interacciones

CAPÍTULO 1

producidas entre los distintos parámetros. Así, el acercamiento clásico a la planificación de experimentos requiere mucho tiempo y esfuerzo y, en aquellos casos en los que puedan aparecer interacciones entre los distintos elementos que conforman el estudio, resulta, en la práctica, un modelo poco factible.

La principal limitación que se presenta a la hora de iniciar el diseño de experimentos reside en decidir qué conjunto de pruebas pondrán de manifiesto de forma más clara y con menor esfuerzo los diversos aspectos de interés del problema. Por esta razón, cada vez es más frecuente acudir a técnicas estadísticas que detecten y evalúen los factores más relevantes implicados en el proceso, aportando la mayor información posible con el mínimo número de experimentos. El camino más eficaz para optimizar el fin buscado y reducir el tiempo en el proceso de obtención de resultados, se basa en el diseño experimental (Ahad et al., 2012).

Se puede definir diseño experimental o diseño factorial de experimentos como la estrategia para proyectar, seleccionar o establecer el menor número de experimentos, de tal manera que la información requerida se obtenga del modo más eficaz y preciso posible, llevando a cabo eficazmente la experimentación necesaria (Politis et al., 2017). El diseño experimental está considerado como una de las técnicas más útiles para hallar aquellos parámetros óptimos con los que llevar a cabo procesos en los que se encuentren involucrados múltiples factores o variables, haciendo posible, además, evaluar la influencia relativa de cada uno de ellos en los resultados experimentales de forma individual. Esta herramienta se convierte en una estrategia que implica la utilización de elementos matemáticos y estadísticos con objeto de obtener la máxima información a través de los datos experimentales y encontrar las condiciones óptimas para la ejecución de un determinado proceso experimental.

Por otro lado, dado que esta herramienta estadística permite definir la influencia de cada factor en las respuestas consideradas, es posible cuantificar y predecir los efectos de cambios potenciales en las formulaciones o en las distintas variables de los procesos, como ya afirmaron algunos autores (Furlanetto et al., 2000).

A modo de resumen, se definen a continuación algunos de los conceptos más habituales que intervienen en el planteamiento de este tipo de diseños experimentales:

- Respuesta: es el nombre genérico que se asigna a la característica estudiada. Se clasifican los estudios en uni-respuesta o multi-respuesta en función de que se analicen una o varias respuestas utilizando los mismos experimentos.
- Factores: se designa de esta forma a las variables que se considera pueden afectar a la respuesta y que, por tanto, se hallan incluidas en el plan de experimentación.
- Niveles: son los valores que toma un factor o una variable en un determinado experimento.

1.2.1. Diseños factoriales con variables a dos niveles

Los diseños factoriales completos permiten experimentar en todas las combinaciones de variables y niveles. Por ello, utilizados secuencialmente, hacen posible acercarse al nivel óptimo de cada factor y estimar las interacciones que pudieran ocurrir entre ellos. Asimismo, proporcionan estimaciones de los efectos de las variables con una varianza reducida, y resultan relativamente sencillos de construir y analizar. En estos diseños completos, el número de experimentos que es preciso realizar queda determinado al fijar el número de variables con las que se llevará a cabo dicho experimento (Zoghi et al., 2018).

La notación utilizada para referirnos a los diseños factoriales es una potencia de n , del tipo n^k . La n significa que cada factor tomará n niveles, y k es el número total de factores que intervendrán en la experimentación. El resultado de la potencia n^k proporciona el número de experimentos que deberán realizarse. La amplia difusión de los diseños 2^k se fundamenta en tres motivos, que fueron descritos por Barrentine (1999):

- a) Proporcionan una excelente relación entre el esfuerzo experimental y la información obtenida.
- b) Resultan relativamente sencillos de construir, analizar e interpretar.
- c) Son fáciles de combinar entre sí para obtener diseños más complejos.

Sin embargo, el principal inconveniente de los diseños completos reside en la necesidad de efectuar un gran número de experimentos, que crece de forma exponencial con el

CAPÍTULO 1

número de factores, como se desprende de la notación 2^k utilizada. Así, en el caso de considerar dos niveles y siete factores, un diseño factorial completo exigiría la realización de 2^7 , es decir, 128 experimentos, siendo el volumen de experimentación, en la mayoría de los casos, inviable.

Esta limitación puede soslayarse mediante el desarrollo de los denominados diseños factoriales fraccionados, con distinto grado de saturación. Los diseños utilizados más frecuentemente son los diseños factoriales a dos niveles (Durakovic, 2017), es decir, diseños del tipo 2^k . En este caso, los valores correspondientes a los dos niveles se codifican asignando al nivel bajo el valor -1 (o simplemente -), y al nivel alto +1 (o simplemente +). Si el factor es cualitativo, se asignaría arbitrariamente el valor -1 a un nivel y +1 al otro. Siguiendo con el ejemplo anterior, a partir de un diseño 2^7 , se pueden estimar 128 efectos que se distribuirían de la forma indicada en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de los efectos en un diseño factorial completo 2^7 .

Número de efectos	Descripción del efecto
1	Media
7	Efectos principales
21	Interacciones de 2 factores
35	Interacciones de 3 factores
35	Interacciones de 4 factores
21	Interacciones de 5 factores
7	Interacciones de 6 factores
1	Interacciones de 7 factores

En la práctica, resulta extremadamente raro que aparezcan interacciones de tres o más factores que resulten ser significativas (Abdel-All et al., 2003). En otras palabras, podría decirse que, de forma general, se obtienen explicaciones suficientemente buenas del comportamiento de los sistemas bajo estudio considerando sólo los efectos principales y las interacciones de 2 factores. Es posible, por tanto, renunciar a parte de la información que proporciona un diseño 2^7 completo, lo que permite a su vez prescindir de la realización de algunos experimentos. Para llevar a cabo el estudio de los efectos de interés es, por tanto, suficiente, realizar una parte (fracción) del diseño completo. Estos diseños reciben el nombre de “diseños factoriales fraccionales” o “diseños fraccionales”.

CAPÍTULO 1

Los diseños fraccionales utilizan la notación 2^{k-p} , donde 2 sigue siendo el número de niveles, k el número de factores con los que se experimentará, y la letra p indica el grado de fraccionamiento. De esta forma, el resultado de elevar 2 a $k-p$ indica el número de experimentos que van a realizarse.

A diferencia de los diseños factoriales completos, donde se estiman por separado los efectos principales y sus interacciones, en los diseños fraccionados, un único valor corresponde a la suma de varios efectos, afirmándose entonces que los efectos están confundidos. Estos términos confundidos pueden ser interacciones de tres o cuatro factores que, generalmente, no tienen importancia y son despreciables. Pero también puede darse el caso que se confunda un efecto principal con la interacción de otros dos factores, con lo que se perdería información útil del sistema. El compromiso está en la reducción del número de experimentos que comporta un diseño factorial fraccionado a costa de la precisión disminuida en la estimación de un efecto.

Existe, asimismo, otra justificación para la realización de diseños factoriales fraccionados, y ésta se encuentra en el hecho de que en la significación de los efectos se cumple, en general, el principio de Pareto, o de la escasez de efectos significativos. Cuando se estudia un elevado número de factores, sobre todo en las fases iniciales de una experimentación, suele cumplirse que unos pocos factores son los responsables de la mayor parte de las variaciones en la respuesta, siendo en estos factores en los que hay que centrar la atención. Los factores restantes producen cambios de menor cuantía en la respuesta, muchas veces indistinguibles del ruido experimental. Cuando esto ocurre, los diseños fraccionales permiten estudiar de manera completa los efectos de las variables activas.

1.2.2. Diseños de Plackett-Burman

En el diseño de experimentos, el método de Plackett-Burman constituye una poderosa herramienta de *screening* (cribado), que permite establecer la relación entre variables de estudio y la variable respuesta. Es un diseño completamente ortogonal, de forma que se reduce substancialmente el número de experimentos a realizarse con un elevado número de variables (Plackett y Burman, 1946).

La ventaja que presenta este tipo de diseños respecto a otros diseños de *screening* (factoriales completos, factoriales fraccionados y Taguchi), son su condición de completa ortogonalidad entre las variables y el número reducido de experimentos cuando se trabaja con muchos factores (Lewis et al., 1999). La utilización de esta tecnología permite diseñar y obtener sistemas robustos, es decir, sistemas menos vulnerables ante determinados factores de ruido no controlados y que pueden ser la causa de un aumento en la variabilidad de la respuesta (Wu y Wu, 2000).

1.3. Hipótesis y objetivos

En base a los antecedentes anteriormente expuestos de forma resumida, la hipótesis del trabajo se plantea teniendo en cuenta las ventajas y el potencial que ofrecen ambos sistemas nanoparticulares, liposomas y AuNPs, en el campo de la vectorización de fármacos hacia la región tumoral.

La preparación de complejos de AuNPs con liposomas por adsorción física supondrá el uso de nanopartículas con carga superficial negativa, estabilizadas por un tampón de citrato, con liposomas catiónicos para mejorar la unión con las AuNPs aniónicas, como se propuso anteriormente por Balazs y Godbey (2011). Dado que las AuNPs se adquirirán con estas características del proveedor, es importante obtener una formulación que presente un lípido catiónico en su composición y que ofrezca características adecuadas de estabilidad tras el anclaje. Se utilizará calceína como molécula modelo para controlar el efecto del anclaje de AuNPs en los liposomas sobre el proceso de liberación.

Para hacer cumplir la hipótesis de trabajo, se planteó como OBJETIVO PRINCIPAL desarrollar y caracterizar una formulación de liposomas con una composición lipídica adecuada para asegurar el anclaje de las AuNPs en su superficie.

Para ello, se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

1) Analizar la influencia de diferentes variables de formulación de los liposomas sobre respuestas propias de un estudio de caracterización, como son parámetros de tamaño, índice de polidispersión y carga superficial, con el fin de seleccionar aquellos factores y sus niveles que pudieran afectar a las propiedades de los liposomas, sobre todo en lo referente a la carga superficial.

CAPÍTULO 1

- 2) Optimizar la composición de los liposomas aplicando dos enfoques estadísticos: medias marginales y análisis de regresión, seleccionando esta última para estudios posteriores.
- 3) Evaluar el proceso de anclaje de las AuNPs sobre los liposomas catiónicos resultantes mediante un proceso de adsorción, seleccionando la proporción adecuada entre ambos sistemas.
- 4) Analizar la liberación *in vitro* de calceína a partir de las nanoplataformas desarrolladas, con el fin de determinar el efecto de determinados factores, como la temperatura (37 °C o 42 °C), la superficie de exposición de la vesícula al medio, y la presencia de las AuNPs, sobre los perfiles de liberación. La diferencia en la composición y las propiedades fisicoquímicas de estas vesículas lipídicas podrían contribuir a mejorar la permeabilidad del fármaco y minimizar la dosis a administrar.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Productos y reactivos

- L- α fosfatidilcolina de yema de huevo, EPC (SigmaBioChemika, Steinhein, Alemania)
- Colesterol, Ch (SigmaBioChemika, Steinhein, Alemania)
- Cloroformo (Panreac Química, España)
- Bromuro de didodecildimetilamonio, DDAB (Sigma-Aldrich, Italia).
- Lauril sulfato sódico, LSS (Acofarma, España)
- Estearilamina, EA (Fluka Biochemika, Suiza)
- Membranas de policarbonato con tamaños de poro de 800, 200 y 100 nm (Millipore, Condado de Cork, Irlanda)
- Hemisuccinato de colesterol, Chems (SigmaBioChemika, Steinhein, Alemania)
- Solución de nanopartículas de oro, AuNPs (Nanovex Biotecnología, Asturias, España)
- Sales del tampón fosfato salino, PBS (Panreac Química, Barcelona)

Se utilizó agua desionizada purificada mediante un sistema Milli-Q® (Millipore). Los disolventes empleados fueron calidad HPLC.

2.2. Preparación de liposomas

2.2.1. Evaporación en capa fina

La elaboración de los liposomas se llevó a cabo utilizando la técnica de evaporación en capa fina o de Bangham (TLE, *Thin Layer Evaporation*) (Maestrelli et al., 2005; López-Pinto et al., 2005). Para ello, la fase lipídica, consistente en una mezcla de diferentes proporciones de EPC, Ch y (EA o DDAB), la cual contenía 14.1 - 14.6 mmol de lípidos totales, se disolvió en cloroformo (4.8 mL) en un matraz de fondo redondo. El disolvente orgánico se eliminó mediante rotaevaporación a presión reducida (Büchi Rotavapor R-210 con Büchi Heating Bath B-491, Suiza) a 58 °C hasta crear una fina película lipídica. La

CAPÍTULO 1

película se mantuvo a presión reducida durante 2 h para eliminar todas las trazas de disolvente, hidratándose posteriormente con 3 mL de tampón PBS pH 7.4. El proceso de hidratación consistió en someter la muestra a cinco ciclos de agitación durante 2 min en vórtex y calentamiento a 58 °C durante 5 min, hasta formar las vesículas multilaminares (MLV). La temperatura se mantuvo a 58 °C hasta el final del proceso, temperatura por encima de la temperatura de transición gel-líquido (T_c) de los compuestos lipídicos y anfifílicos. Las formulaciones MLV se almacenan guardadas en viales de vidrio y en oscuridad a 4 °C hasta su posterior uso.

Para los estudios de liberación *in vitro*, se añadió una solución de calceína en PBS (1 mg/mL) como solución de hidratación, siguiendo el mismo procedimiento al descrito anteriormente hasta la obtención de los liposomas.

Una vez obtenidas las MLV mediante el procedimiento anterior, como proceso previo a la extrusión, se sometieron las muestras a sonicación durante 5 min en un baño ultrasonidos a temperatura ambiente y posteriormente, a un proceso de extrusión secuencial con la finalidad de reducir el tamaño de los liposomas y obtener poblaciones unilaminares y más homogéneas. Esta técnica es aplicable en un amplio rango de concentraciones de lípidos (0-400 mg/mL). El proceso se realizó empleando un extrusor (LIPEXTM Termobarrel Extruder), que consiste en un dispositivo de acero inoxidable que emplea gas nitrógeno para aplicar presiones moderadas (generalmente 100 - 800 psi), forzando de esta forma el paso de las vesículas a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro definido. Para obtener una elevada homogeneidad de los sistemas vesiculares, es conveniente filtrar las muestras sucesivamente por encima de su T_c y emplear filtros con poros de distintos tamaños, empezando por los de mayor dimensión hasta acabar con filtros cuyo poro sea el diámetro deseado de los liposomas. La presión empleada fue de 600 psi y se utilizaron filtros de policarbonato de 0.8 μm y 0.2 μm , a través de los cuales se hizo pasar la muestra 3 veces por cada uno de ellos. Previamente a la extrusión de 200 nm, se diluyeron las muestras hasta una concentración de 1.5% p/v de lípidos con respecto al volumen recuperado después de la extrusión de 800 nm.

Este equipo dispone, además, de adaptadores que pueden conectarse a un sistema de recirculación de agua termostatzada mediante una bomba peristáltica (Rainin Dynamax

RP-1). Gracias a este sistema calefactor, se posibilita la extrusión de lípidos con temperaturas de transición de fase (gel - líquido cristalino) superiores a la temperatura ambiente, ya que los lípidos en estado de gel no extruirían. Esto permitió que el proceso se llevara a cabo a 60 °C.

Mediante este procedimiento se obtuvieron vesículas unilaminares grandes (LUV).

2.2.2. Congelación y calentamiento

Esta técnica constituye una variante de la anterior y consiste en colocar la dispersión coloidal MLV en un tubo de pyrex y someterla a ciclos subsiguientes de congelación y descongelación por calentamiento. La congelación se realizó en N₂ líquido a -196 °C durante 30 segundos y descongelando durante 30 segundos a 58 °C en baño de agua. La secuencia se repitió nueve veces, obteniéndose los denominados FATMLV (vesículas multilaminares congeladas y descongeladas) (Maestrelli et al., 2006).

2.3. Caracterización fisicoquímica de las vesículas

2.3.1. Análisis dimensional: tamaño e índice de polidispersión (IP)

En la estabilidad y el comportamiento físico de los liposomas, adquiere gran importancia su distribución de tamaños, ya que el tamaño de las vesículas influye notablemente en la estabilidad de estos sistemas. De un modo general, se considera que, a mayor tamaño, los liposomas son más estables. Este fenómeno se atribuye a un decrecimiento del radio de curvatura y a un estiramiento de la bicapa de tal forma que se expone menos superficie a la acción de componentes externos.

En este trabajo, los parámetros dimensionales se determinaron mediante *dynamic light scattering* (DLS) en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Esta técnica permite calcular el radio hidrodinámico de las partículas suspendidas o dispersadas en un medio, y su IP, el cual es indicativo de la distribución de tamaños presentada por la muestra. Los parámetros de medición y cálculo establecidos fueron los siguientes: 1.33 de índice de refracción, temperatura de 25 °C, y agua como vehículo dispersante. La intensidad de la luz láser dispersada por las muestras se detectó en un ángulo de 90° por un fotomultiplicador. Para medir el tamaño de las vesículas se diluyeron 200 µL de

dispersión de liposomas con agua purificada para evitar el fenómeno de dispersión múltiple (dilución 1/20 v/v). Para cada lote de dispersión liposomal, se analizaron tres muestras independientes, cada una de las cuales se midió de dos a cinco veces, y fueron analizadas utilizando el método Contin (Manual de Malvern Instruments). Además, el IP nos permite determinar el nivel de homogeneidad entre diferentes tamaños de partículas. Así, un valor pequeño de IP (inferior a 0.2) indica una población de vesículas homogéneas, mientras que un IP mayor (superior a 0.3) indica heterogeneidad.

2.3.2. Carga superficial: potencial zeta

La carga superficial de los liposomas crea un campo eléctrico que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana. Además, esta carga juega un papel trascendental en la estabilidad coloidal de los mismos, ya que los procesos de agregación y fusión de liposomas están controlados, en gran parte, por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas (Ramos et al., 2010). La agregación de liposomas es un fenómeno natural e inevitable para membranas sin carga, y la vía para vencerla es la introducción de carga en la mezcla de lípidos. Así, el efecto de estabilidad podría mejorarse con la incorporación de productos como la EA, por ser éste un agente portador de carga positiva que permite generar la repulsión electrostática suficiente para estabilizar liposomas *in vitro*.

Se ha empleado el potencial zeta (PZ) como una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión a partir de la movilidad electroforética, que refleja el grado de movimiento de coloides en dispersión bajo la influencia de un potencial eléctrico aplicado a través de ella y expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las vesículas. Este parámetro se determinó en el mismo equipo que el del tamaño. Para ello, se diluyeron las muestras con agua purificada y se inyectaron en una célula fotoeléctrica. El movimiento de los liposomas dentro del campo eléctrico permitió precisar su carga eléctrica, determinándose el PZ mediante medidas de movilidad electroforética (μ). La μ se convirtió en PZ por la ecuación de Smoluchowski:

$$PZ = \mu\eta/\epsilon$$

Donde η es la viscosidad y ϵ es la constante dieléctrica de la solución. Para cada lote, se tomaron al menos cinco muestras independientes, cada una de las cuales se analizó al

menos por triplicado.

2.3.3. Porcentaje de encapsulación (PdE)

Con objeto de evaluar el porcentaje de fármaco retenido en los liposomas, se eligió el método de centrifugación para separar la fracción de fármaco encapsulada de la no encapsulada, y posteriormente cuantificar la calceína por su intensidad de fluorescencia mediante el lector de placa (Synergy HT Biotek). La metodología seguida se basó en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, que concluyeron que el método de extracción por centrifugación confiere mejores resultados que el método tradicional de extracción en fase sólida. Este método consiste en la eliminación del fármaco libre por centrifugación (Eppendorf Centrifuge 5804 R) a 8.000 rpm a 4 °C durante 60 min (Chimanuka et al., 2002; Fang et al., 2008). El sobrenadante se filtró y se analizó mediante un lector de placa (Synergy 2, BioTek), determinando así la cantidad no encapsulada de fármaco. Al precipitado se le añadió 1 mL de una solución de lauril sulfato sódico (LSS) 0.5% p/v para facilitar la destrucción de las vesículas. Tras un proceso de sonicación (VWR Ultrasonic) durante 10 min y filtrado, se cuantificó la cantidad de fármaco encapsulado. Este porcentaje de encapsulación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$PdE(\%) = \frac{Q_I}{F_t} 100$$

donde PdE es el porcentaje de fármaco atrapado, F_t es la cantidad total de calceína en la muestra y Q_I es la cantidad de fármaco retenido en las vesículas.

2.4. Selección de los parámetros significativos mediante diseño de Plackett-Burman

En el presente capítulo se aplicó el diseño de experimentos al estudio de la composición de los liposomas, estudiando la influencia de distintas variables en ciertas características de la formulación para obtener vesículas con el mayor PZ y la mayor cantidad de principio activo encapsulado. Para ello, se ha llevado a cabo un estudio de cribado de distintos factores, con el fin de conocer aquellos que influyen significativamente en las respuestas seleccionadas. La secuencia seguida se describe en los siguientes apartados.

CAPÍTULO 1

En primer lugar, se utilizó un diseño de Plackett-Burman (PBD) para detectar las variables significativas de la formulación, sobre el tamaño, el IP y el PZ. Como se detalló en el apartado de Introducción del presente capítulo, el PBD es un diseño de *screening* (cribado), que permite establecer la relación entre variables de estudio y la variable respuesta. Es un diseño completamente ortogonal que reduce substancialmente el número de experimentos a realizarse con un elevado número de variables. En este diseño, cada factor se coloca a 2 niveles y el número de experimentos N es múltiplo de 4. Las variables pueden ser de tipo cualitativo o cuantitativo. La ventaja que presentan los PBD respecto a otros diseños de *screening* (factoriales completos, factoriales fraccionados y Taguchi) es su condición de completa ortogonalidad entre las variables y el número reducido de experimentos cuando se trabaja con muchos factores.

PBD supone que cada factor es independiente y puede describirse mediante el modelo de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i \cdot X_i$$

donde Y es la respuesta objetivo-predicha (tamaño de vesícula, IP y PZ), β_0 es la intersección del modelo, β_i es el coeficiente de regresión y X_i es la variable independiente.

El objetivo de este estudio fue seleccionar la formulación más adecuada de liposomas para su posterior proceso de anclaje con las AuNPs. Para este estudio, se propusieron cinco variables independientes, que presumiblemente pudieran afectar a las características fisicoquímicas de los liposomas. Cada una de las variables se analizó en dos niveles: alto (+1) y bajo (-1), suponiendo la realización de un total de 16 experimentos. Las cinco variables independientes fueron: tipo de lípido inductor de rigidez (X1), tipo de lípido catiónico (X2), método de producción (X3), concentración de lípido catiónico (X4) y extrusión (X5). Las variables de entrada con sus respectivos niveles se describen en la Tabla 2. El tamaño medio de las vesículas (Y1), IP (Y2) y el PZ (Y3) se seleccionaron como las variables de respuesta según los estudios preliminares (González-Rodríguez et al., 2012).

CAPÍTULO 1

Tabla 2. Factores y sus niveles utilizados en el diseño de Plackett-Burman en la etapa de screening. Ch: colesterol; Chems: hemisuccinato de colesterol; EA: estearilamina; DDAB: bromuro de didodecildimetilamonio; T/S: TLE y sonicación después. T/S/F. TLE, sonicación y congelación-descongelación después.

Factor	Nivel codificado	
	Bajo (-1)	Alto (+1)
Lípido inductor de rigidez (X1)	Ch	Chems
Lípido catiónico (X2)	SA	DDAB
Método de producción (X3)	T/S	T/S/F
Concentración lípido catiónico (mol%) (X4)	5	15
Extrusión (X5)	No	Si

El efecto de cada variable en las diferentes respuestas se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$E_{(X_i)} = \frac{\sum Y_{(+)_i} - \sum Y_{(-)_i}}{L/2}$$

donde $E(X_i)$ es el efecto de los niveles de las variables probadas, $Y_{(+)_i}$ e $Y_{(-)_i}$ son las variables de respuesta de los experimentos correspondientes a las variables en sus niveles máximo y mínimo, respectivamente, y L es el número de experimentos realizados. Cuando el valor del efecto ($E_{(X_i)}$) de la variable probada es positivo (> 0), la influencia de la variable es mayor en el nivel más alto, y cuando es negativa (< 0), la influencia de la variable es mayor en el nivel bajo (Imandi et al., 2013).

Los datos experimentales obtenidos fueron validados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) combinado con la prueba F. Para la evaluación estadística se aplicó el coeficiente de determinación (R^2 , concordancia entre los resultados experimentales y los valores pronosticados obtenidos del modelo) y el valor F (relación de variación de Fisher, la relación entre el cuadrado medio para la regresión y el promedio para el residual).

Sobre la base del gráfico de Pareto y los resultados del ANOVA, se establecieron las variables que mostraran efectos principales significativos en las respuestas seleccionadas.

2.5. Anclaje de las AuNPs a los liposomas

El procedimiento de anclaje de las AuNPs a la superficie de los liposomas se llevó a cabo tras agregar un volumen de las AuNPs (tamaño: 10 nm, potencial zeta: -30 mV) a la dispersión de liposomas en diferentes proporciones y manteniendo la agitación durante 1 min. En esta etapa, el uso de muestras extruidas de liposomas presenta ciertas ventajas, como el aumento del área superficial a medida que se reduce el tamaño, de manera que se incrementa la superficie disponible de las vesículas para el procedimiento del anclaje, con la mejora subyacente del proceso de liberación del fármaco modelo, la calceína.

2.6. Análisis morfológico

Las muestras de los liposomas se analizaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, Philips CM 10, EE.UU.). Todas las muestras se diluyeron previamente con una solución de PBS (1/100 v/v). A continuación, se dejó secar una gota de las muestras sobre rejillas de cobre tratadas previamente con colodión y el exceso de muestra se retiró con papel de filtro. Se usó una solución acuosa de acetato de uranilo (2% p/v) como agente de tinción negativa. Tras 15 min de contratinción a temperatura ambiente, las rejillas se secaron con papel de filtro y se dejaron secar durante 3 min dejando la muestra preparada para su visualización a una tensión de aceleración de 75 kV a diferentes aumentos.

2.7. Estudios de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación de la calceína a partir de los sistemas de liposomas se llevaron a cabo mediante el método de diálisis. Para ello, se colocó un volumen de 0.5 mL de dispersión de liposomas en una bolsa de diálisis (Spectra/por membrana MWCO: 12—14000, Spectrum Laboratories, EE.UU.), previamente hidratada, sellando ambos extremos con un clip de diálisis. El dispositivo se incubó en 30 mL de medio de liberación (PBS, pH 7.4), manteniendo la velocidad de agitación a 100 rpm y 37 °C o 42 °C según el experimento (IKA® RT10). A intervalos de tiempo predeterminados, se recogieron alícuotas del medio de disolución, transfiriéndolas a una placa negra (Fluotrac 200, Greiner Bio-One, Monroe, NC 28110), y reponiendo siempre con el mismo volumen de

CAPÍTULO 1

medio fresco. La cantidad de calceína se cuantificó por fluorescencia utilizando Synergy 2 (BioTek) a 485 nm de excitación, 520 nm de emisión. Se generaron curvas estándar para expresar unidades de fluorescencia relativas en la cantidad de calceína liberada.

Hay que decir que la calceína no muestra emisión de fluorescencia en altas concentraciones dentro de los liposomas, pero genera una fuerte fluorescencia al liberarse de los mismos y diluirse en el tampón (Chongsiriwatana y Barron, 2010). La cantidad de calceína liberada con el tiempo t se calculó según la ecuación (Maherani et al., 2013):

$$RF(\%) = 100 \cdot \frac{I_t - I_0}{I_{max} - I_0}$$

Donde RF es la fracción de calceína liberada, I_0 , I_t e I_{max} son las intensidades de fluorescencia medidas al inicio del experimento, en el momento t y la intensidad de fluorescencia de la cantidad total de calceína agregada a la muestra, respectivamente.

Los perfiles de liberación se obtuvieron trazando la cantidad acumulada de calceína liberada (valores normalizados en porcentaje por unidad). Se calcularon parámetros de liberación, como cantidad acumulada liberada de fármaco a los 60 (Q_{60}), 120 (Q_{120}), 240 (Q_{240}) y 480 (Q_{480}) min. Además, el área bajo la curva de los perfiles de disolución (AUCDP) se calculó mediante el método trapezoidal para todas las muestras. Finalmente, se seleccionó el tiempo requerido para la disolución del 50% de la dosis como parámetro indicador de velocidad ($t_{50\%}$).

Se analizó la influencia de la temperatura del medio de disolución (37 °C o 42 °C) y el tamaño de las vesículas (muestras no extruidas, muestras extruidas a 800 nm o 200 nm) sobre la liberación de calceína.

2.8. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba t de Student para evaluar la significación estadística entre dos grupos de muestra. Las diferencias entre los resultados se consideraron significativas cuando los valores de p fueron inferiores a 0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Etapas de cribado

El objetivo de esta etapa fue seleccionar la formulación de liposomas con características adecuadas de carga superficial para proceder a continuación al anclaje de las AuNPs.

Como se detalló en el apartado de metodología, en este estudio se introdujo un diseño factorial de PB de dos niveles, que comprendió 16 experimentos, con el fin de seleccionar aquellas variables que afectaban significativamente las características de la superficie de los liposomas. Basándonos en estudios previos acerca de las propiedades de la superficie liposomal (Yannis, 2001), se consideró que las variables seleccionadas para este estudio (Tabla 3) afectaban tanto al área superficial disponible como a las propiedades de la superficie de las vesículas, para anclar posteriormente a las AuNPs.

Como se muestra en la Tabla 3, las variables seleccionadas mostraron una amplia gama de valores, lo que sugiere inicialmente que los factores independientes tuvieron un efecto significativo en la respuesta elegida.

La prueba estadística F se utilizó para validar el modelo (Tabla 4). Los valores F obtenidos se compararon con los valores teóricos (valor crítico de la prueba de Fisher) $F_{\alpha}(p - 1, N - p)$ (α , riesgo elegido, p el número de términos del modelo, N el número de los experimentos) para probar la importancia del modelo de regresión. El valor teórico $F_{0.05}(4, 15)$ es 3.056. Dado que el estadístico de prueba experimental es mucho más alto (68.72; 65.41 y 849.9 para Y_1 , Y_2 e Y_3 , respectivamente) que el valor crítico, podemos concluir que existe una diferencia (estadísticamente) significativa entre los factores. La magnitud de F , por tanto, sugirió que había una buena linealidad entre los valores pronosticados y observados.

CAPÍTULO 1

Tabla 3. Matriz de Plackett-Burman con las respuestas observadas (promedio \pm desviación estándar. N = 3). X1: lípido inductor de rigidez; X2: lípido catiónico; X3: Método de producción; X4: Concentración de lípido catiónico; X5: Extrusión. Y1: tamaño de vesícula (nm); Y2: índice de polidispersión; Y3: potencial zeta (mV).

Código del lote	X1	X2	X3	X4	X5	Y1	Y2	Y3
PB1	+	+	+	-	+	378.1 \pm 6	0.50 \pm 0.03	-1.54 \pm 0.3
PB2	+	+	+	+	-	424.9 \pm 11	0.55 \pm 0.10	12.30 \pm 0.5
PB3	+	+	-	+	+	329.4 \pm 0.3	0.28 \pm 0.01	10.20 \pm 1
PB4	+	+	-	-	-	958.1 \pm 11	0.12 \pm 0.01	-6.56 \pm 0.4
PB5	+	-	-	-	+	337.8 \pm 2	0.27 \pm 0.01	-8.48 \pm 0.7
PB6	+	-	-	+	-	696.0 \pm 4	0.50 \pm 0.08	13.80 \pm 0.6
PB7	+	-	+	+	+	281.1 \pm 3	0.22 \pm 0.02	13.70 \pm 0.5
PB8	+	-	+	-	-	508.9 \pm 3	0.53 \pm 0.01	-12.60 \pm 0.2
PB9	-	-	+	-	+	327.6 \pm 0.3	0.25 \pm 0.03	-10.83 \pm 0.4
PB10	-	-	+	+	-	1511.3 \pm 11	0.39 \pm 0.08	8.20 \pm 0.6
PB11	-	-	-	+	+	289.7 \pm 9	0.43 \pm 0.02	7.39 \pm 0.8
PB12	-	-	-	-	-	1383.7 \pm 28	0.06 \pm 0.05	-4.08 \pm 0.1
PB13	-	+	-	-	+	583.7 \pm 29	0.60 \pm 0.06	2.98 \pm 0.3
PB14	-	+	-	+	-	692.8 \pm 1	0.56 \pm 0.07	18.30 \pm 1.2
PB15	-	+	+	+	+	235.6 \pm 3	0.23 \pm 0.02	17.80 \pm 0.5
PB16	-	+	+	-	-	508.1 \pm 19	0.10 \pm 0.02	2.83 \pm 0.5

Tabla 4. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de los resultados experimentales del diseño Plackett-Burman para el tamaño de vesícula, nm (Y1), índice de polidispersión, IP (Y2) y potencial zeta PZ, mV (Y3).

Tamaño (Y1)				IP (Y2)		
Factor	Valor F	Valor P	Inferencia	Valor F	Valor P	Inferencia
Modelo	68.72	<0.001	Significativo	65.41	<0.001	Significativo
X1	75.55	<0.001	Significativo	21.99	<0.001	Significativo
X2	43.32	<0.001	Significativo	107.2	<0.001	Significativo
X3	34.63	<0.001	Significativo	56.07	<0.001	Significativo
X4	7.957	0.008	Significativo	2.339	0.136	No significativo
X5	443.5	<0.001	Significativo	66.13	<0.001	Significativo
PZ (Y3)						
Factor	Valor F	Valor P	Inferencia			
Modelo	849.9	<0.001	Significativo			
X1	240.7	<0.001	Significativo			
X2	1222	<0.001	Significativo			
X3	6.552	0.015	Significativo			
X4	9864	<0.001	Significativo			
X5	0.5037	0.483	No significativo			

Nivel de significación: P<0.05

La Figura 3 ilustra los gráficos de Pareto (P < 0.05) correspondientes a los efectos principales. Los valores críticos que representan el efecto estadísticamente significativo

CAPÍTULO 1

de los factores con un nivel de confianza del 95% fueron 11.1, 0.0107 y 0.149 para el tamaño de vesícula, IP y PZ, respectivamente. Los efectos por encima de este límite crítico son significativos y es probable que los efectos por debajo de este valor no sean significativos.

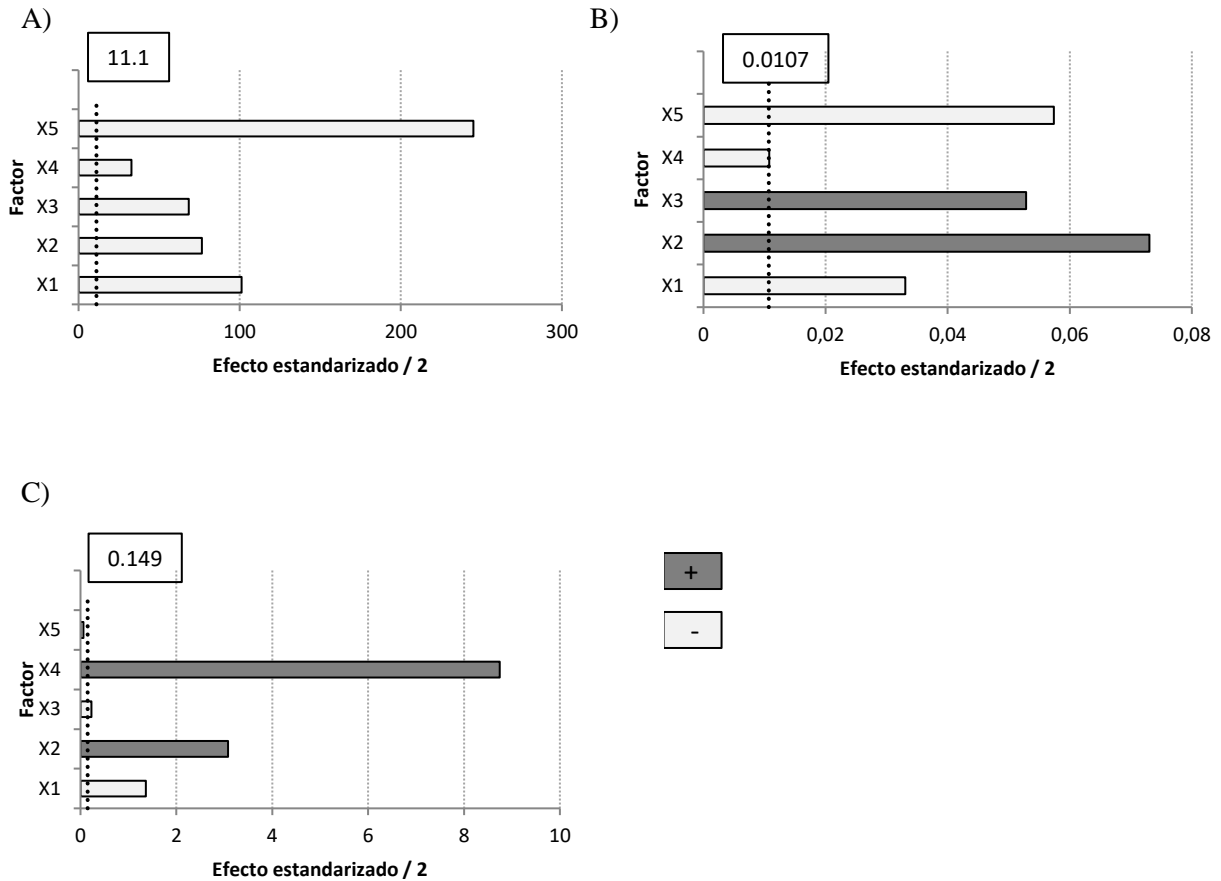


Figura 3. Gráficos de Pareto correspondientes a los efectos de los factores en la respuesta evaluada. A) Tamaño. B) Pdl. C) Potencial zeta. X1: lípido inductor de rigidez; X2: lípido catiónico; X3: Método de producción; X4: Concentración de lípido catiónico (% en moles); X5: Extrusión.

Una vez obtenidos estos diagramas, resulta fácil predecir las condiciones adecuadas y la composición de la formulación para minimizar el tamaño de la vesícula y el IP, y maximizar el PZ. Los resultados de esta evaluación se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de las mejores condiciones para optimizar las diferentes respuestas. X1: lípido inductor de rigidez; X2: lípido catiónico; X3: Método de producción; X4: Concentración de lípido catiónico (% en moles); X5: Extrusión

	X1	X2	X3	X4	X5
Tamaño	Chems	DDAB	T/S/F	15	Si
IP	Chems	SA	T/S	-	Si
Zeta	Ch	DDAB	-	15	-

En la siguiente sección se llevará a cabo un análisis sobre la influencia de los factores más significativos (gráficos de Pareto) en las respuestas evaluadas.

3.1.1. Influencia del método de preparación (X3 y X5)

La reducción en el tamaño de las vesículas se considera una estrategia importante para mejorar el anclaje de las AuNPs en la superficie liposomal, ya que el área de superficie disponible aumenta (Kojima et al., 2008). Entre los diferentes métodos que actúan reduciendo el tamaño de las vesículas se encuentran la sonicación, la congelación y descongelación, y la extrusión (Patil y Jadhav, 2014). En este estudio, la aplicación de ciclos de congelación y descongelación a las muestras sometidas a sonicación dio lugar a vesículas reducidas, como se muestra en la Figura 3A (X3).

El tamaño medio de las vesículas osciló entre 235 y 1511 nm (Tabla 3). La estructura multicapa formada tras la hidratación de una película lipídica da lugar a liposomas de tamaño muy heterogéneo y con un pequeño volumen de fase acuosa por volumen lipídico. Cuando estas vesículas se someten a sonicación, se obtienen liposomas de una sola capa, aumentando el compartimento acuoso y reduciendo el tamaño. Sin embargo, este procedimiento comúnmente utilizado en todas las formulaciones resultó en tamaños grandes en varios lotes, probablemente como consecuencia de los fenómenos de agregación, como ya informó Riaz en sus estudios (Riaz, 1996).

Para analizar la influencia del procedimiento de congelación y descongelación en las propiedades de las vesículas, se sometieron algunas muestras sonicadas a ciclos de congelación y descongelación para formar LUV. Para ello, se utilizó nitrógeno líquido y un baño de agua a 60 °C para favorecer ambos procesos, respectivamente,

CAPÍTULO 1

produciéndose una deshidratación por pérdida de moléculas de agua que se encuentran unidas a la cabeza hidrófila de los lípidos durante la etapa de congelación. Esto causa la ruptura de la bicapa lipídica, que se reconstruye por fusión en la etapa de descongelación. Las fragmentaciones y deformaciones de las bicapas hacen que las vesículas más grandes se dividan en vesículas regulares e irregulares más pequeñas, mostrando una reducción de tamaño con un amplio IP, como se muestra en la Figura 3B (Traïkia et al., 2000). A medida que se repite el proceso de congelación y descongelación, el número de capas lipídicas disminuye, a pesar del hecho de que algunos estudios han demostrado que se forman vesículas multicapa después de la aplicación de la congelación y descongelación, debido a las fuerzas de interacción entre el fármaco y los componentes de la bicapa (Koide et al., 2016).

Los gráficos de Pareto (Figuras 3A y 3B) indicaron que tanto el tamaño de la vesícula como el IP se redujeron cuando se aplicó el proceso de extrusión a las muestras (X5). Es bien sabido que esta metodología se usa ampliamente para homogeneizar el tamaño de los liposomas, ya que es un método relativamente simple y rápido. Las vesículas producidas por esta técnica se extruyen a presión a través de un filtro de tamaño de poro seleccionado (Ming Ong et al., 2016). Por lo tanto, se pueden obtener liposomas unilaminares tras extruir las MLV congeladas y descongeladas, dando como resultado muestras monodispersas con un volumen interno mayor que las LUV preparadas por extrusión de MLV. En este proceso binario, el mantenimiento de la temperatura (durante la descongelación y la extrusión) por encima de la temperatura de transición del fosfolípido principal fue crítico para conservar el compartimento acuoso interno de los liposomas.

Como se esperaba, el gráfico de Pareto reveló que la extrusión tenía un efecto estandarizado máximo, con un intervalo de confianza del 95%, en el tamaño vesicular y el IP, mientras que este factor no tenía ningún efecto significativo en la carga superficial. El IP es un parámetro indicador de homogeneidad muestral y, como se aprecia en la Figura 3, los sistemas evaluados presentaron un tamaño más homogéneo cuando se extruyeron y sin ser sometidos a los procesos de congelación y descongelación, como se esperaba.

3.1.2. Influencia de la composición de la bicapa (X1, X2 y X4)

En este estudio, se han seleccionado el tipo de lípido inductor de rigidez (X1), el tipo de lípido catiónico (X2) y su concentración (X4) como factores variables en el diseño experimental, para seleccionar la formulación combinada más adecuada en términos de tamaño reducido e IP, y valores de PZ más altos.

Se logró una reducción en el tamaño de los liposomas cuando se adicionaron Chems y DDAB (15% en moles) a la bicapa lipídica, probablemente como consecuencia de la reorganización de estas moléculas con el fosfolípido dentro de la bicapa. Sin embargo, esta falta de rigidez en la estructura se convierte en un aumento de la heterogeneidad en términos de tamaño, lo que hace que el IP sea más favorable cuando se agregan Chems y EA (15% en moles). Esta mezcla combinada tendería a favorecer el ángulo de curvatura para producir muestras más homogéneas: Chems es menos rígido que Ch y actúa como un estabilizador de membrana en la preparación de los liposomas (Ding et al., 2005), mientras que EA es un lípido rígido con una estructura pequeña y lineal que actuaría estabilizando el liposoma (Villasmil-Sánchez et al., 2010).

Por otra parte, el PZ es un parámetro indicador de carga superficial que está relacionado con la estabilidad de las muestras coloidales. De los resultados obtenidos, el PZ se maximizó (valores más positivos) al agregar Ch y DDAB a una concentración de 15% en moles, sin someter los liposomas a FAT (congelación y descongelación). Además, el proceso de extrusión no afectó a este parámetro. El Ch es un lípido rígido que estabiliza las vesículas. Este hecho ha sido recientemente demostrado en liposomas formulados con DMPC: DDAB en una relación 3:1 y fijando la relación de Ch después de registrar las isothermas de Langmuir de monocapas lipídicas que contienen diferentes fracciones molares de Ch (Prieto et al., 2018). Por lo tanto, el DDAB ha demostrado tener un papel importante en la estabilización de las vesículas.

Como conclusión de esta sección y con respecto a los resultados obtenidos, la composición de partida que se usará para el próximo estudio fue: bicapa compuesta por EPC: Ch: DDAB en una relación molar de 16:1:3 (80:5:15 mol%). Los liposomas se sintetizarán a partir de la metodología TLE seguido de sonicación.

3.2. Anclaje de AuNPs a liposomas cargados con DDAB

Entre los diferentes tipos de AuNPs, en este estudio se han usado aniónicas sintéticas debido a su estabilidad física. Las AuNPs fueron sintetizadas por Nanovex Biotechnologies (Asturias, España) con un tamaño de 10 nm y -30 mV de PZ. Por lo tanto, la síntesis de liposomas catiónicos se planificó en primer lugar mediante la adición de lípidos cargados positivamente en la bicapa. Como se concluyó en la sección anterior, hemos seleccionado DDAB como lípido catiónico, que conforma la bicapa lipídica junto con EPC y Ch. La carga neta catiónica de la superficie de los liposomas a un pH fisiológico de 7.4 debería convertirla en una formulación adecuada para anclar las AuNPs aniónicas mediante interacción electrostática.

3.2.1. Efecto del DDAB sobre la estabilidad de las vesículas

Se sabe que la magnitud del PZ predice la estabilidad potencial del sistema coloidal de manera que a medida que aumenta este parámetro (valores absolutos), la repulsión entre las vesículas será mayor, lo que llevará a una dispersión coloidal más estable (Mady et al., 2012). También es sabido que la introducción de surfactantes iónicos en la bicapa liposómica cambia las propiedades de las vesículas. En este estudio, se ha seleccionado DDAB como surfactante catiónico, en diferentes concentraciones, debido a que es capaz de modificar la carga superficial de las vesículas y, por lo tanto, el PZ.

Los parámetros de caracterización fisicoquímica de los liposomas sin DDAB mostraron un ligero PZ negativo, de acuerdo con las observaciones de estudios anteriores. Con el fin de aclarar la influencia de la concentración de DDAB en la carga superficial y la estabilidad de las vesículas lipídicas, se elaboraron formulaciones con un % en moles de DDAB incrementado. De la Tabla 6 se puede deducir que el aumento de la proporción de DDAB dio lugar a liposomas con una carga superficial catiónica más alta, de acuerdo con lo informado por otros autores (Scarioti et al., 2011). Sin embargo, las diferencias fueron significativas solo entre 14A y 14B y entre 14C y 14D.

Tabla 6. Efecto de la concentración del DDAB (% en moles) en la bicapa lipídica de los liposomas en sus parámetros de caracterización. Lípidos totales: 100% en moles. Para cada formulación, se prepararon al menos tres muestras diferentes. Los valores presentados son valores medios \pm SD y se compararon estadísticamente con el anterior. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Prueba t de Student.

Parámetros de FORMULACIÓN				Parámetros de CARACTERIZACIÓN		
Lote	EPC (mol%)	Lípido inductor de rigidez (mol%)	DDAB (mol%)	Tamaño (nm)	IP	PZ (mV)
14A	76.62	3.85	19.52	360.5 \pm 1.3	0.46 \pm 0.02	18.43 \pm 0.9
14B	74.20	3.78	22.02	382.3 \pm 2.8	0.469 \pm 0.01	24.3 \pm 1.2**
14C	70.84	3.51	25.65	387 \pm 4.5	0.46 \pm 0.02	25.3 \pm 0.5
14D	65.34	3.22	31.44	399 \pm 11.5	0.497 \pm 0.07	27.6 \pm 0.5
14E	59.91	3.01	37.09	281 \pm 1.3***	0.372 \pm 0.01**	29.9 \pm 1.9

Con respecto al tamaño de estas muestras, no existieron diferencias significativas en el rango de concentración estudiado para DDAB (22.02 a 31.44% en moles). Además, se ha obtenido una disminución importante de este parámetro a partir de la relación EPC: Ch: DDAB (59.91: 3.01: 37.09), mostrando diferencias significativas con la anterior ($p < 0.0001$). Este resultado puede estar relacionado con la disposición de estas micelas formadoras de lípidos por encima de su concentración crítica, creando estructuras con dimensiones más pequeñas (Angelini et al., 2011). La misma tendencia se ha observado para la disminución del IP.

En base a los resultados obtenidos después de aumentar el porcentaje de DDAB en la bicapa lipídica y analizar su efecto sobre parámetros de tamaño y PZ, podemos concluir que este surfactante se debe usar en un 22.02% en moles para los próximos estudios. Por lo tanto, se seleccionará la proporción de componentes lipídicos de EPC:Ch:DDAB (74.20:3.78:22.02% en moles) para el siguiente paso.

3.2.2. Selección de la ratio AuNPs:liposomas (v/v)

En este estudio, las AuNPs se han anclado a la superficie de los liposomas catiónicos. El ensayo se ha realizado utilizando tres relaciones diferentes de AuNPs:liposomas v/v de las dispersiones. Se emplearon muestras extruidas de liposomas con el fin de llevar a

CAPÍTULO 1

cabo el proceso de anclaje de una manera más uniforme, minimizando así la capacidad de dispersión del tamaño de la muestra.

De los resultados mostrados en la Tabla 7, se observa un aumento (estadísticamente significativo) en el tamaño de las vesículas que contienen DDAB (en comparación con el control) al incrementar la proporción de AuNPs, intuyendo que las AuNPs se ubicaron en la superficie del liposoma después del proceso del anclaje. Además, dicho proceso se efectuó de manera homogénea ya que los valores de IP no se vieron afectados significativamente.

Tabla 7. Efecto de la ratio AuNPs/liposomas en los parámetros de caracterización de las vesículas resultantes. Los lotes control se refieren a liposomas sin AuNPs. DDAB y EA (estearilamina) se estudiaron como agentes inductores de carga. X:Y (relación AuNPs: liposomas v/v). Para cada formulación se prepararon al menos tres muestras diferentes; los valores presentados son valores medios \pm SD y fueron significativamente diferentes en comparación con el grupo control. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; Prueba t de Student.

Agente inductor de carga	Lote	Tamaño (nm)	IP	PZ (mV)
DDAB	Control	173 \pm 2.23	0.27 \pm 0.02	26.2 \pm 0.06
DDAB	1:10	179.1 \pm 2.27*	0.25 \pm 0.01	25.93 \pm 0.98
DDAB	2:09	181.5 \pm 1.88**	0.25 \pm 0.03	25.9 \pm 0.35
DDAB	3:08	190.7\pm0.81***	0.26\pm0.00	24.73\pm0.72*
SA	Control	295.7 \pm 1.38	0.43 \pm 0.02	7.39 \pm 0.82
SA	3:08	1416 \pm 360.19**	1 \pm 0***	-14.6 \pm 4.88**

Con respecto a la carga superficial de las muestras de DDAB, está claro que todos los lotes de liposomas tenían un PZ positivo, con un rango de 26.2 en el lote control hasta 24.73 mV después de agregar AuNPs a la superficie liposomal en la proporción más alta (3:08 v/v AuNPs:liposomas). La disminución significativa en los valores de carga superficial (p = 0.0244) fue indicativo del efecto neutralizante de las AuNPs tras el proceso de anclaje. Por lo tanto, se ha propuesto una interacción electrostática entre cargas opuestas como el principal mecanismo de adsorción de superficie AuNPs-cabeza polar de amonio del DDAB.

Esta distribución de las AuNPs en la superficie de las vesículas pudo apreciarse mediante microscopía, como revelaron las imágenes TEM de los liposomas con AuNPs (Figura 4),

CAPÍTULO 1

en las cuales se observaron AuNPs en la superficie del conjunto de liposomas. En las imágenes TEM también se visualizaron AuNPs que tienen diámetros de 12 nm cargadas en la superficie del liposoma.

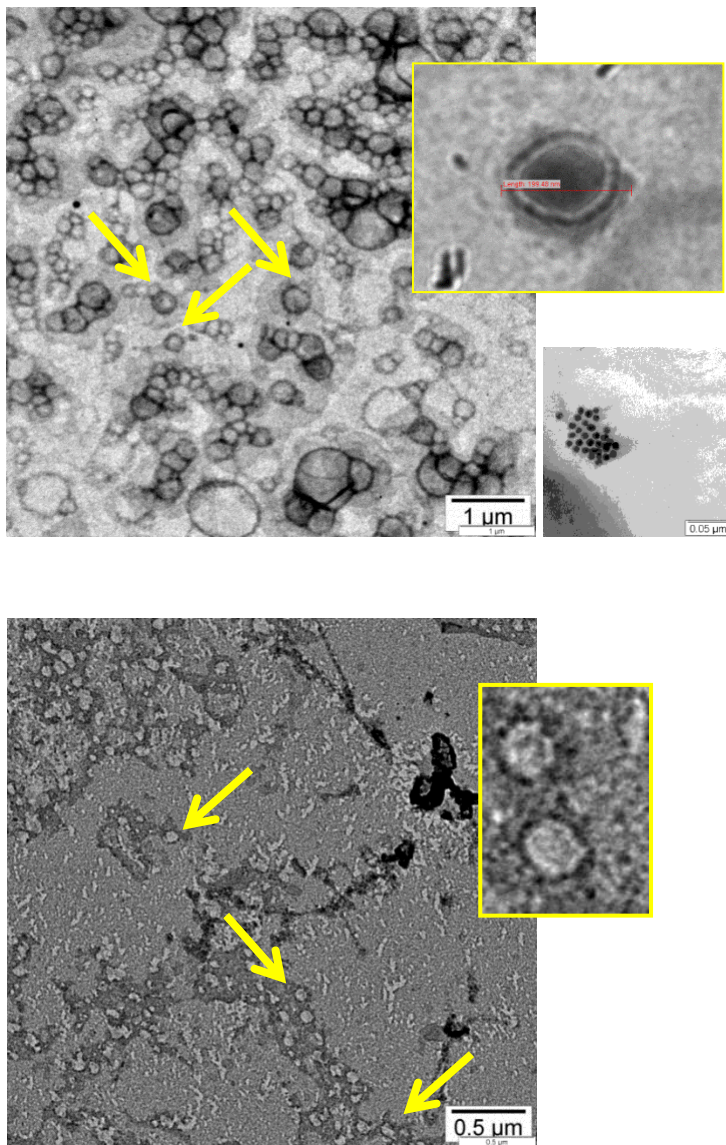


Figura 4. Imágenes de TEM de las AuNPs ancladas a la superficie de los liposomas que contienen A) DDAB. B) Estearilamina.

Los liposomas unilaminares que contienen DDAB pueden asociarse físicamente con las AuNPs en la superficie sin alterar el empaquetamiento de la membrana (Figura 4A). Este comportamiento se comparó con las vesículas que contenían EA (Figura 4B), donde las imágenes TEM mostraron muchas estructuras de vesículas no definidas, probablemente debido a un efecto perturbador de las AuNPs en la membrana. Este último resultado también se puede confirmar a partir de las propiedades de caracterización de los

liposomas EA en términos de tamaño y PZ, después de que las AuNPs se hubieran anclado en la superficie (Tabla 7).

Siguiendo las aportaciones de Kojima et al. (2008), en las que el grupo principal de la EPC se uniría con las AuNPs mediante adsorción física, se sugiere que los liposomas cargados con el DDAB se asociaron físicamente con las AuNPs en la superficie sin alterar la membrana. Por lo tanto, los resultados indican que las AuNPs podrían quedar situadas en la superficie hidrófila de la bicapa lipídica. El color más oscuro de los liposomas se debe a la presencia de AuNPs en la superficie. Las imágenes de TEM teñidas con una sustancia cargada negativamente confirman la naturaleza hidrófoba de las superficies de las AuNPs, ya que permanecerían ubicadas sobre la superficie de los liposomas.

3.2.3. Efecto de las AuNPs sobre la liberación de calceína a partir de los sistemas nanoestructurados

Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron sobre la base de dos parámetros principales relacionados con estos sistemas y que pueden tener un efecto relevante en la liberación de la calceína: la temperatura del medio de liberación y el tamaño de los liposomas.

Los perfiles de liberación se compararon utilizando algunos parámetros de disolución: el área bajo la curva del perfil de disolución (AUCDP), porcentaje de fármaco acumulado liberado a 60 (Q_{60}), 120 (Q_{120}), 240 (Q_{240}) y 480 (Q_{480}) minutos, cuyos valores se recopilan en la Tabla 8. A partir de ellos, se puede tener una idea clara sobre la cantidad acumulada de calceína liberada en el tiempo analizado.

A partir de los valores de AUCDP en la Tabla 8, se puede observar que la cantidad de calceína total liberada a 42 °C desde liposomas con AuNPs ancladas es mayor que sin ellas; sin embargo, este comportamiento no se repitió a 37 °C, mostrando una mayor variabilidad en los resultados. Esta mejora de la liberación de calceína a 42 °C destaca el importante papel de las AuNPs en la funcionalización de la superficie de los liposomas.

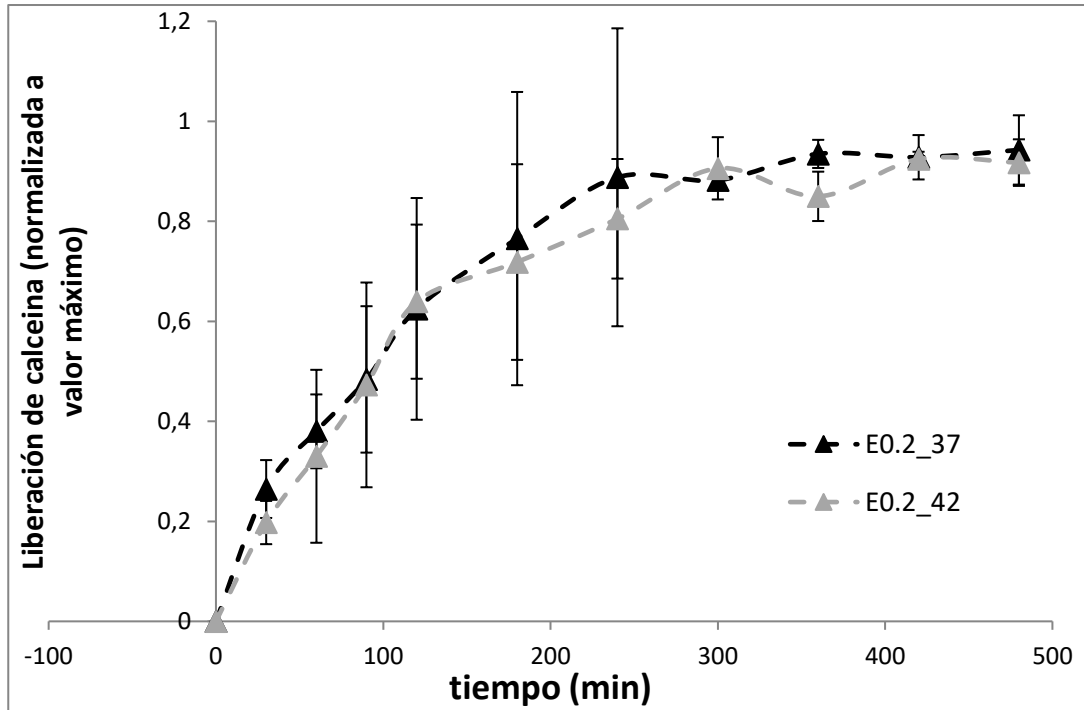
CAPÍTULO 1

Tabla 8. Parámetros analizados en los perfiles de liberación. AUCDP: área bajo la curva de los perfiles de disolución. Q60, Q120, Q240 y Q480: cantidad de calceína liberada (en porcentaje) a 60, 120, 240 y 480 min, respectivamente. t50%: tiempo (min) requerido para liberar el 50% de la cantidad del fármaco. X_Y (X: extruido (E0.8 o E0.2) o no extruido (NE) y precedido por Au si se anclaron las AuNPs; Y: temperatura del ensayo (37 o 42 °C)

Lotes	AUCDP	Q ₆₀	Q ₁₂₀	Q ₂₄₀	Q ₄₈₀	t _{50%}
NE_37	863.6±10.5	0.396±0.001	0.613±0.003	0.763±0.006	0.833±0.005	75.1±4.46
E0.8_37	960.1±9.5	0.491±0.090	0.682±0.111	0.852±0.050	0.937±0.102	75.4±9.15
E0.2_37	971.8±3.6	0.380±0.010	0.639±0.008	0.888±0.005	0.943±0.069	85.6±5.55
NE_42	828.8±4.2	0.313±0.070	0.512±0.050	0.738±0.060	0.820±0.023	105.8±7.49
E0.8_42	739.4±9.5	0.343±0.101	0.546±0.090	0.667±0.040	0.669±0.087	110.5±2.78
E0.2_42	936.9±3.75	0.330±0.070	0.639±0.080	0.805±0.090	0.917±0.047	91.5±2.40
AuNE_37	864.6±5.8	0.313±0.003	0.571±0.005	0.704±0.008	0.901±0.074	96.5±2.17
AuE0.8_37	870.5±5.1	0.397±0.004	0.619±0.003	0.759±0.005	0.857±0.031	82.3±1.72
AuE0.2_37	881.0±3.9	0.307±0.001	0.577±0.003	0.750±0.006	0.941±0.116	93.1±2.11
AuNE_42	871.3±4.3	0.379±0.005	0.619±0.007	0.751±0.010	0.941±0.009	92.5±1.32
AuE0.8_42	924.8±7.7	0.544±0.004	0.726±0.092	0.826±0.003	0.836±0.040	57.3±1.48
AuE0.2_42	1022.9±4.41	0.472±0.002	0.777±0.005	0.904±0.005	0.938±0.050	60.9±2.65

A continuación, se evaluó la liberación *in vitro* de la calceína desde los liposomas, inducida por la temperatura (Figura 5). Aunque la modificación de la temperatura en el medio de disolución de 37 °C a 42 °C no tiene una diferencia significativa en la cantidad total de calceína liberada al final del ensayo (Figura 5A), sin embargo, este parámetro ejerció cierta influencia a lo largo del proceso de disolución. De esta manera, aunque se ha obtenido una gran influencia en el AUCDP en prácticamente todos los lotes, para los otros parámetros de disolución, solo la formulación que contenía AuNPs ancladas a las vesículas extruidas a 200 nm mostró una diferencia muy significativa ($p < 0.0001$) entre 37 y 42 °C, como puede comprobarse en la figura 5B.

A)



B)

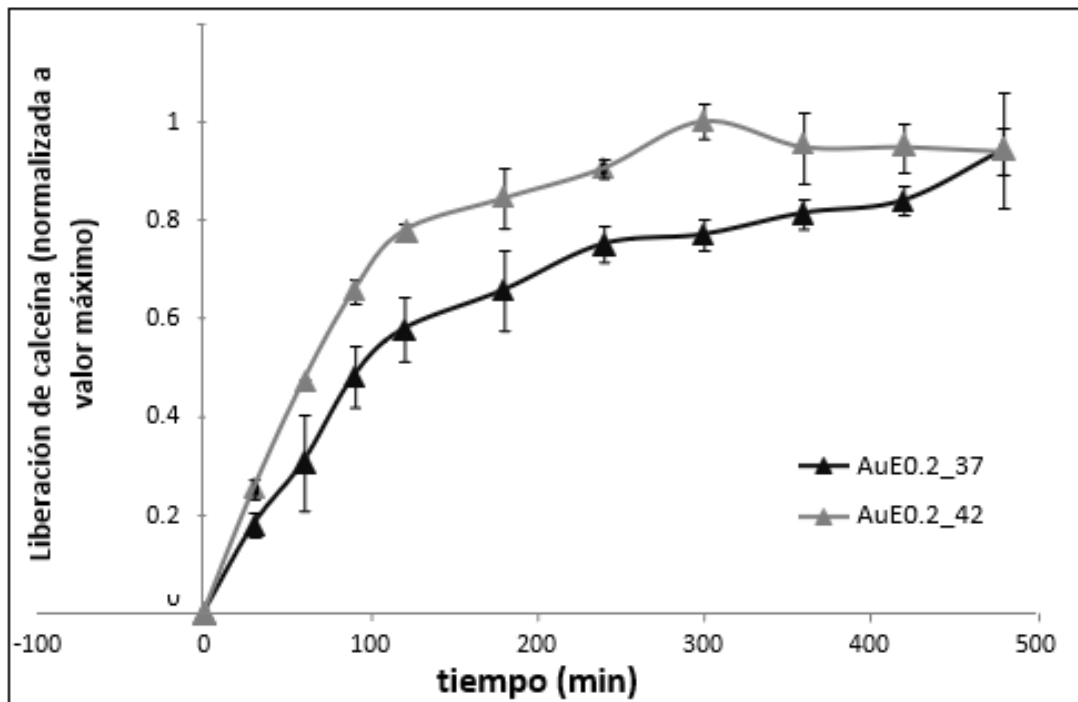


Figura 5. Efecto de la temperatura (37 o 42 °C) sobre la liberación de calceína de A) Vesículas extruidas (0.2 μ m) sin AuNPs y B) Vesículas extruidas (0.2 μ m) con AuNPs ancladas.

CAPÍTULO 1

Ciertamente, el proceso de anclaje de las AuNPs sobre la superficie de los liposomas no ejerce un efecto significativo en la liberación de calceína cuando el ensayo de liberación se realizó a 37 °C. Sin embargo, cuando los experimentos se llevaron a cabo a 42 °C, los perfiles de liberación indicaron que la presencia de AuNPs en liposomas extruidos a 200 nm aumentó la velocidad de liberación de calceína. Probablemente, el calor se condujo más eficientemente a las moléculas lipídicas, induciendo así la transición de fase y la liberación del fármaco modelo. A partir de los resultados obtenidos, se podría intuir que el anclaje de AuNPs en la bicapa podría causar cambios en el empaquetamiento de los lípidos, ocasionando un aumento en la fluidez (Park et al., 2006). Las AuNPs funcionan como fuentes de calor localizadas y se transfieren al microambiente circundante. Dado que las AuNPs asociadas a las bicapas están en contacto directo con los lípidos, el calor se conduce de manera más eficiente a las moléculas de lípidos, la capa lipídica experimenta un cambio estructural al estado líquido cristalino, induciendo así la transición de fase y la liberación de calceína. Una posible hipótesis de este resultado es que las AuNPs hidrófobas forman fases separadas en la bicapa lipídica, induciéndose la liberación de calceína debido a la separación de fases entre los lípidos y las nanopartículas, como lo demuestran Paasonen et al. (2007).

En base a estos resultados, fue interesante realizar un estudio cinético basado en el parámetro cinético de liberación $t_{50\%}$, descrito anteriormente en la sección experimental. Los resultados mostraron que, aunque se consiguió el mismo porcentaje de calceína liberada al final del ensayo, sin embargo, la velocidad de liberación difirió entre las formulaciones a 42 °C, según otros autores (Mathiyazhakan et al., 2015; Lajunen et al., 2015). Este aumento en la velocidad de liberación se evaluó a partir del $t_{50\%}$ de los perfiles de liberación (Figura 6). Este parámetro no modelo mostró diferencias en las muestras extruidas, siendo mayores los valores en el caso de 42 °C y en presencia de AuNPs ($p < 0.0001$ en muestras de AuE0.8 y AuE0.2 a 42 °C en comparación con las mismas muestras a 37 °C).

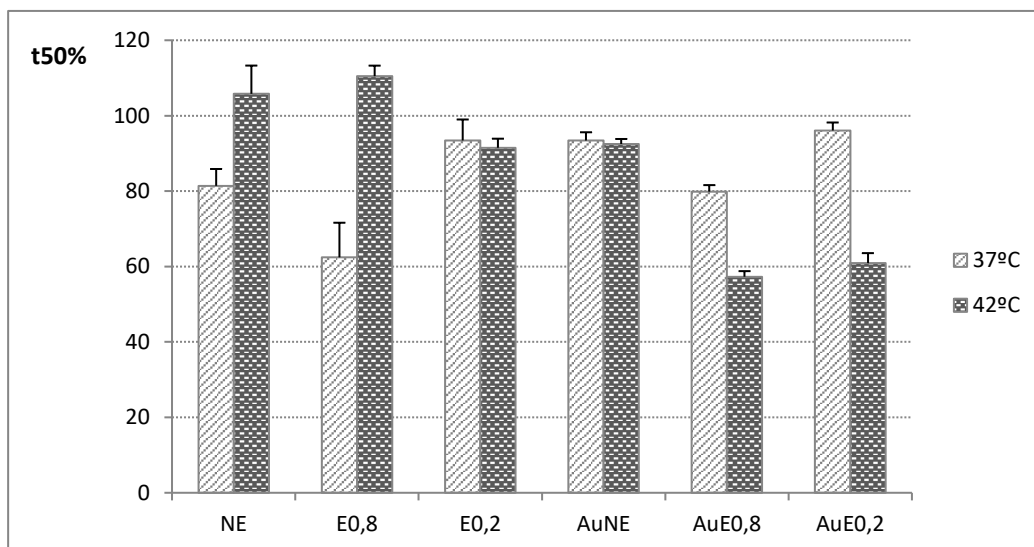
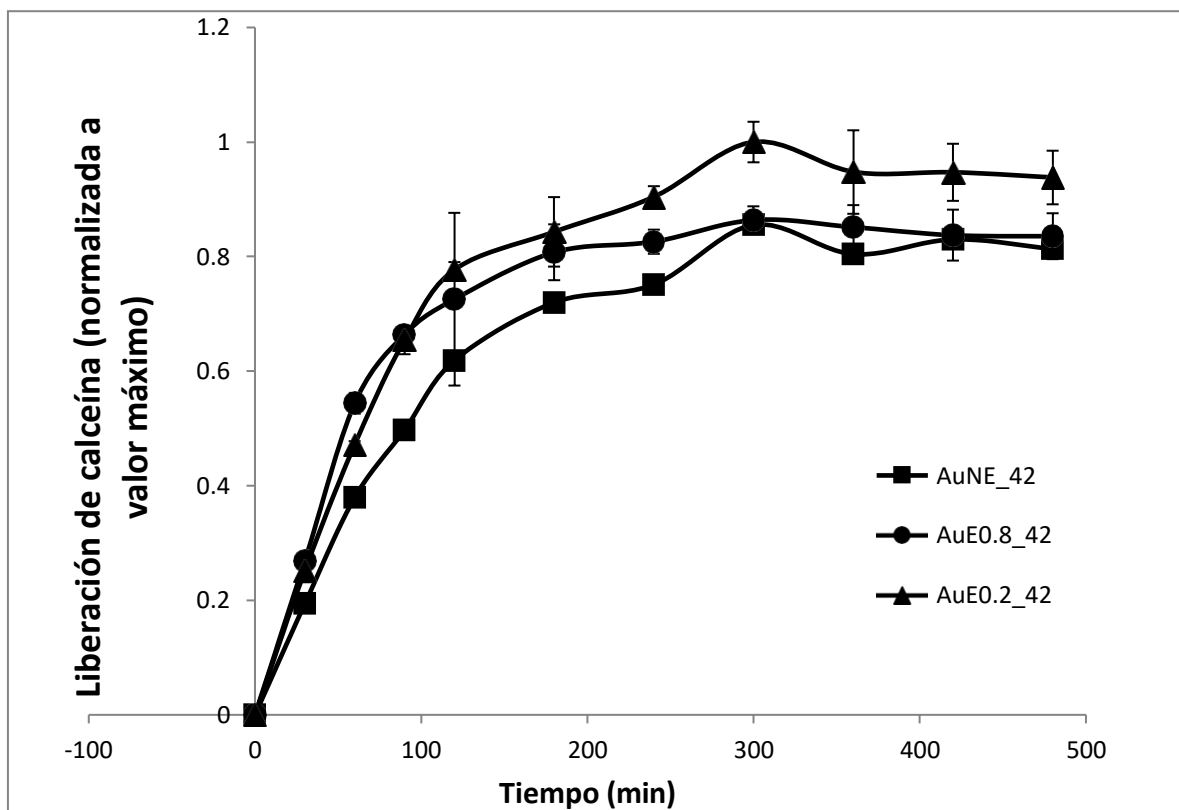


Figura 6. Valores de t50% de los perfiles seleccionados de liberación de calceína, realizados a dos temperaturas diferentes: 37 y 42 °C. NE: vesículas no extruidas; E0.8: Vesículas extruidas por filtros de 0.8 μm ; E0.2: Vesículas extruidas por filtros de 0.2 μm ; AuE0.8: AuNPs ancladas a muestras extruidas por filtros de 0.8 μm ; AuE0.2: AuNPs ancladas a muestras extruidas por filtros de 0.2 μm .

Con el objetivo de analizar el efecto del tamaño de la vesícula en el proceso de anclaje y así, en la liberación de calceína, se llevaron a cabo diferentes ensayos con muestras no extruidas y muestras extruidas (200 nm y 800 nm). Los perfiles de liberación con y sin AuNPs se muestran en la Figura 7 A y B.

La comparación de la liberación entre los perfiles de muestras extruidas y no extruidas proporciona información interesante sobre la influencia del área de superficie de las vesículas en el comportamiento de liberación de calceína. Aunque los resultados obtenidos mostraron varios efectos significativos de la extrusión, no hay una tendencia de los datos a medida que disminuye el tamaño. Solo para la calceína liberada de las vesículas con AuNPs a 42 °C, los valores aumentaron a medida que el tamaño de la vesícula era menor. Como es generalmente aceptado, la reducción del tamaño de partícula puede aumentar la velocidad de disolución debido al aumento subsiguiente en su área de superficie específica, aunque con algunas excepciones (Farahmandghavi et al., 2019).

A)



B)

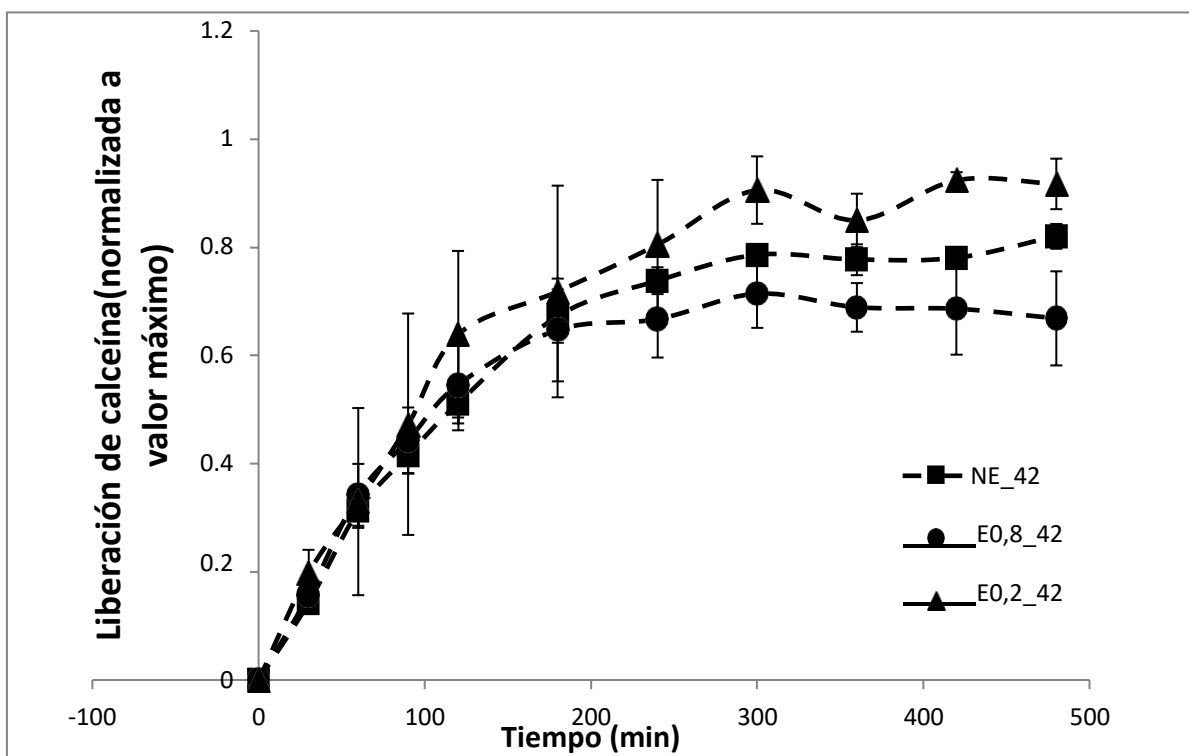


Figura 7. Efecto de la extrusión sobre la liberación de calceína de A) Vesículas sin AuNPs. B) Vesículas con AuNPs ancladas (0.2 μ m). Los experimentos se realizaron a 42 $^{\circ}$ C.

En este estudio, dos factores contribuyen a este supuesto: la presencia de AuNPs en la superficie de los liposomas, con un proceso de anclaje más efectivo en las vesículas extruidas a 0.2 μm ; y realizar la prueba de liberación a 42 °C, temperatura a la cual se incrementó la liberación del fármaco. Esta conclusión puede resumirse visualmente en la Figura 7 B, en la que se demuestra el aumento de la liberación de calceína por el efecto de la extrusión a 0.2 μm a 42 °C.

4. CONCLUSIONES

- En este estudio, se consiguió obtener una formulación de liposomas óptima para anclar las AuNPs, enfatizando el papel del DDAB en la obtención de liposomas catiónicos.
- Las imágenes de TEM y el estudio de DLS demostraron que el anclaje de las AuNPs a los liposomas se produjo con éxito.
- Los estudios de liberación revelaron una mejora en la liberación de calceína en los liposomas con AuNPs, en general a 42 °C. Este hecho se vuelve interesante para el uso de estos portadores nanoestructurados en estudios futuros con fármacos contra el cáncer.
- Por lo tanto, podemos concluir que las AuNPs proporcionan una plataforma eficaz para el diseño de liposomas térmicamente sensibles, y la combinación con biomateriales funcionales en este sistema podría ser una herramienta útil como sistema de administración de fármacos.

5. BIBLIOGRAFÍA

Ahad A, Aqil M, Kohli K, Sultana Y, Mujeeb M, Ali A. Formulation and optimization of nanotransfersomes using experimental design technique for accentuated transdermal delivery of valsartan. *Nanomedicine: NBM*. 2012;8:237-49.

Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanop Res*. 2010;12:2313–33.

Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65:36–48.

Angelini G, Chiarini M, De Maria P, Fontana A, Gasbarri C, Siani G, Velluto D. Characterization of cationic liposomes. Influence of the bilayer composition on the kinetics of the liposome breakdown. *Chem Phys Lipids*. 2011;164(7):680-7.

Balazs DA, Godbey WT. Liposomes for use in gene delivery. *J Drug Deliv*. 2011; 326497.

Barrentine LB. An introduction to design of experiments: a simplified approach. ASQ Quality Press. 1999.

Cheung C, Al-Jamal WT. 2018. Liposomes-based nanoparticles for cancer therapy and bioimaging. In *Nanooncology*. Springer Cham. 2018;51-87.

Chimanuka B, Gabriels M, Detaevernier MR, Plazier-Vercemmen JA. Preparation of beta-artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescant parasitaemia in *Plasmodium chabaudi* malaria infected mice. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;28(1):13–22.

Chongsiriwatana NP, Barron AE. Comparing bacterial membrane interactions of antimicrobial peptides and their mimics. *Methods Mol Biol*. 2010;618:171-82.

Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev*. 2004;104(1): 293-346.

Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine*. 2013;8(9):1509-28.

Ding WX, Qi XR, Li P, Maitani Y, Nagai T. Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-D. *Int J Pharm*. 2005;300(1-2):38-47.

Divya KP, Dharuman V. Supported binary liposome vesicle-gold nanoparticle for enhanced label free DNA and protein sensing. *Biosens Bioelectron*. 2017;95:168–73.

Dreaden EC, Mackey MA, Huang X, Kang B, El-Sayed MA. Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chem Soc Rev*. 2011;40:3391-3404.

Durakovic, B. Design of experiments application, concepts, examples: State of the art. *PEN*. 2017;5(3).

Fang Y, Tsai Y, Wu P, Huang Y. Comparison of 5-aminolevulinic acidencapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. *Int J Pharm*. 2008;356(1):144–152

CAPÍTULO 1

Farahmandghavi F, Imani M, Hajiesmaeliani F. Silicone matrices loaded with levonorgestrel particles: Impact of the particle size on drug release. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019, 49:132-142.

Furlanetto S, Orlandini S, Aldini G, Gotti R, Dreassi E, Pinzauti S. Designing experiments to optimize and validate the adsorptive stripping voltammetric determination of nimesulide. *Anal Chim Acta*. 2000;413(1):229-239.

González-Rodríguez ML, Mouram I, Cózar-Bernal MJ, Villasmil S, Rabasco AM. Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. *J Pharm Sci*. 2012;101(10):3845-63.

Imandi SB, Karanam SK, Garapati HR. Use of Plackett-Burman design for rapid screening of nitrogen and carbon sources for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from mustard oil cake (*Brassica napus*). *Braz J Microbiol*. 2013;44(3):915-21.

Kanwar R, Kaur G, Mehta SK. Revealing the potential of didodecyldimethyl ammonium bromide as efficient scaffold for fabrication of nano liquid crystalline structures. *Chem Phys Lipids*. 2016;196:61–8.

Kneidl B, Peller M, Winter G, Lindner LH, Hossann M. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4387–439.

Koide H, Okamoto A, Tsuchida H, Ando H, Ariizumi S, Kiyokawa C, Hashimoto M, Asai T, Dewa T, Oku N. One-step encapsulation of siRNA between lipid-layers of multi-layer polycation liposomes by lipoplex freeze-thawing. *J Control Rel*. 2016;228:1–8.

Kojima C, Hirano Y, Yuba E, Harada A, Kono K. Preparation and characterization of complexes of liposomes with gold nanoparticles. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2008;66(2):246-52.

Kumar A, Zhang X, Liang XJ. Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system. *Biotechnol Adv*. 2013;31:593–606.

Lajunen T, Viitala L, Kontturi LS, Laaksonen T, Vuorimaa-Laukkanen E, Viitala T, Le Guével X, Liang H, Yliperttula M, Murtomäki L, Urtti A. Light induced cytosolic drug delivery from liposomes with gold nanoparticles. *J Control Rel*. 2015; 203:85–98.

Lee JH, Shin Y, Lee W, Whang K, Kim D, Lee LP, Kang T. General and programmable synthesis of hybrid liposome/metal nanoparticles. *Sci Adv*. 2016;12:1601838.

Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Pharmaceutical experimental design*. Marcel Dekker, New York, 1999.

Li P, Zhang L, Ai K, Li D, Liu X, Wang E. Coating didodecyldimethylammonium bromide onto Au nanoparticles increases the stability of its complex with DNA. *J Control Rel*. 2008;129:128–34.

Liu Y, He M, Niu M, Zhao Y, Zhu Y, Li Z, Feng N. Delivery of vincristine sulfate-conjugated gold nanoparticles using liposomes: a light-responsive nanocarrier with enhanced antitumor efficiency. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:3081–95.

López-Pinto JM, González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *Int J Pharm*. 2005;298:1–12.

Ludzik K, Kacperska A, Kustrzepa K, Dychto R. Interactions between sodium dodecylsulphate and didodecyldimethylammonium bromides vesicles in aqueous solutions. *J Mol Liquids*.

CAPÍTULO 1

2017;20:273-9.

Mady MM, Fathy MM, Youssef T, Khalil WM. Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. *Phys Medica*. 2012;28:288-95.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. *Int J Pharm*. 2005;298:55–67.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *Int J Pharm*. 2006;312(1-2):53-60.

Maherani B, Arab-Tehrany E, Kheiriloom A, Linder M. Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie*. 2013;95: 2018-33.

Mannaris C, Teo BM, Seth A, Bau L, Coussios C, Stride E. Gas-stabilizing gold nanocones for acoustically mediated drug delivery. *Adv Health Mater*. 2018;12:1800184.

Manojlovic V, Winkler K, Bunjes V, Neub A, Schubert R, Bugarski B, Lenewit G. Membrane interactions of ternary phospholipid/cholesterol bilayers and encapsulation efficiencies of a RIP II protein. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2008;64:284–96.

Mathiyazhakan M, Yang Y, Liu Y, Zhu C, Liu Q, Ohl CD, Xu C. Non-invasive controlled release from gold nanoparticle integrated photo-responsive liposomes through pulse laser induced microbubble cavitation. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2015;126:569-574.

Ming Ong SG, Chitneni M, Lee KS, Ming LC, Yuen KH. Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes. *Pharmaceutics*. 2016;8 (36): doi:10.3390/pharmaceutics8040036.

Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, Kobayashi H. Nanodrug delivery: is the enhanced permeability and retention effect sufficient for curing cancer? *Bioconj Chem*. 2016;27(10): 2225–38.

Paasonen L, Laaksonen T, Johans C, Yliperttula M, Kontturi K, Urtti A. Gold nanoparticles enable selective light-induced contents release from liposomes. *J Control Rel*. 2007;122:86–93.

Pang L, Zhang C, Qin J, Han L, Li R, Hong C, Wang J. A novel strategy to achieve effective drug delivery: exploit cells as carrier combined with nanoparticles. *Drug Deliv*. 2017;24:83-91.

Patil YP, Jadhav S. Novel methods for liposome preparation. *Chem Phys Lipids*. 2014;177:8–18.

Park SH, Oh SG, Mun JY, Han SS. Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2006;48 (2):112-8.

Pissuwan D, Niidome T, Cortie MB. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J Control Rel*. 2011;149:65–71.

Pitsillides CM, Joe EK, Wei XB, Anderson RR, Lin CP. Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophys J*. 2003;84(6):4023-32.

Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*.

CAPÍTULO 1

1946;33(4):305-325.

Politis S, Colombo P, Colombo G, M Rekkas D. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm*. 2017;43:889-901.

Prieto F, Rueda M, Naitlho N, Vázquez-González M, González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Electrochemical characterization of a mixed lipid monolayer supported on Au(111) electrodes with implications for doxorubicin delivery. *J Electroanal Chem*. 2018;815:246-54.

Proverbio ZE, Schulz PC, Puig JE. Aggregation of the aqueous dodecyltrimethylammonium bromide-didodecyltrimethylammonium bromide system at low concentration. *Colloid Polymer Sci*. 2002;280(11):1045-52.

Ramasamy T, Ruttala HB, Gupta B, Poudel BK, Choi HG, Yong CS, Kim JO. Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: a comprehensive review. *J Control Rel*. 2017;258:226-253.

Ramos G, Ramírez-Amador S, Esquivel M, Loría A, Vega-Baudrit J, Sibaja M, Madrigal-Carballo S. Estudio a nanoescala de las interacciones entre liposomas recubiertos con biopolímeros y superficies sólidas de biomateriales. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2010;11(7):596-606.

Rana S, Bajaj A, Mout R, Rotello VM. Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:200–16.

Riaz M. Liposome preparation method. *Pakistan J Pharm Sci*. 1996;9(1):65–77.

Rossi G, Monticelli L. Gold nanoparticles in model biological membranes: A computational perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858:2380–9.

Sau TK, Urban AS, Dondapati SK, Fedoruk M, Horton MR, Rogach AL, Stefani FD, Rädler JO, Feldmann J. Controlling loading and optical properties of gold nanoparticles on liposome membranes. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects*. 2009;342:92–6.

Scarioti GD, Lubambo A, Feitosa JP, Sierakowski MR, Bresolin TM, de Freitas RA. Nanocapsule of cationic liposomes obtained using “in situ” acrylic acid polymerization: Stability, surface charge and biocompatibility. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2011;87:267-272.

Schaeublin NM, Braydich-Stolle LK, Schrand AM, Miller JM, Hutchison J, Schlager JJ, Hussain SM. Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale*. 2011;3(2):410-20.

Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:39-50.

Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(3):131-5.

Traïkia M, Warschawski DE, Recouvreur M, Cartaud J, Devaux PF. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and ³¹P-nuclear magnetic resonance. *Eur Biophys J*. 2000;29:184-95.

Villasmil-Sánchez S, Drhimeur W, Ospino SC, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. *Drug Dev Ind Pharm*. 2010;36(6):666-75.

CAPÍTULO 1

Villasmil-Sánchez S, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Thermal and ^{31}P -NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in phosphatidylcholine/cholesterol liposomes. Comparative ^{31}P -NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2013;105:14–23.

Wang D, Zhang Y, Zhao X, Xu Z. Plasmonic colorimetric biosensor for visual detection of telomerase activity based on horseradish peroxidase-encapsulated liposomes and etching of Au nanobipyramids. *Sensor Actuat B-Chem*. 2019;126646.

Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Contr Rel*. 2015;200:138–57.

Wu Y, Wu A. Taguchi methods for robust design. Amer Soc Mechan Engin, New York, 2000.

Yannis LL. A Plackett–Burman screening design directs the efficient formulation of multicomponent DRV liposomes. *J Pharm Biomed Anal*. 2001;26:255-63.

Yu M, Guo F, Tan F, Li N. Dual-targeting nanocarrier system based on thermosensitive liposomes and gold nanorods for cancer thermo-chemotherapy. *J Contr Rel*. 2015;215:91–100.

Zangabad PS, Mirkiani S, Shahsavari S, Masoudi B, Masroor M, Hamed H, Hamblin MR. Stimulus-responsive liposomes as smart nanoplatforms for drug delivery applications. *Nanotechnol Rev*. 2018;7:95-122.

Zhou Q, You C, Ling Y, Wu H, Sun, B. pH and thermo dual stimulus-responsive liposome nanoparticles for targeted delivery of platinum-acridine hybrid agent. *Life Sci*. 2019;217:41-48.

Zoghi A, Khosravi-Darani K, Omri A. Process variables and design of experiments in liposome and nanoliposome research. *Mini-Rev Med Chem*. 2018;18:324-344.



CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE LANGMUIR CON COMPONENTES LIPÍDICOS

CAPÍTULO 2

ÍNDICE CAPÍTULO 2

1. INTRODUCCIÓN	81
1.1. Antecedentes	81
1.2. Metodología	82
1.2.1 Películas de Langmuir	82
1.2.2. Transferencia de las películas a sustratos sólidos	84
1.3. Objetivos	85
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
2.1. Reactivos y disoluciones.....	87
2.2. Instrumentación	87
2.3. Procedimientos de limpieza	88
2.4. Procedimientos	89
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	90
3.1. Películas formadas con mezclas de DMPC, DDAB y colesterol	90
3.2. Películas formadas con mezclas de DPPC, DDAB y colesterol.....	97
4. CONCLUSIONES	105
5. BIBLIOGRAFÍA.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de isoterma de Langmuir y fases que se pueden observar en una monocapa. 84

Figura 2. Estructura química de 1,2-dimiristoil sn-glicero-3-fosfolina (DMPC), 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), colesterol y bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB).....86

Figura 3. Modelo de balanza de Langmuir utilizado (NIMA 611D)..... 87

Figura 4. Isotermas de Langmuir obtenidas para los componentes lipídicos puros y la mezcla DMPC:DDAB con una relación molar 3:1, a 25 °C. 91

Figura 5. Isotermas de Langmuir de las mezclas de DMPC-DDAB-colesterol a distintas fracciones molares de colesterol, registradas a 25 °C. 92

Figura 6. Representación gráfica del área por molécula frente a la fracción molar de colesterol obtenida para tres presiones superficiales, correspondientes a las isotermas de películas ternarias DMPC:DDAB:colesterol. 94

Figura 7. Representación gráfica de los valores de área de exceso frente a la fracción molar de colesterol obtenidas para tres presiones superficiales, correspondientes a las isotermas de películas ternarias DMPC:DDAB:colesterol. 95

Figura 8. Representación gráfica de los valores de la energía libre de exceso frente a los de fracción molar del colesterol para distintas presiones superficiales. 96

Figura 9. Isotermas de Langmuir a 25 °C para DPPC y colesterol puros, la mezcla DPPC:DDAB (3:1) y las mezclas con DPPC:DDAB(3:1):colesterol y las fracciones molares de colesterol indicadas..... 97

Figura 10. Representación del módulo de elasticidad frente a la presión superficial para películas formadas a 25 °C con DPPC puro, mezcla DPPC:DDAB (3:1), colesterol puro y mezcla DPPC:DDAB (3:1) y colesterol ($X_{Col} = 0.37$). 100

Figura 11. Variación del módulo de compresibilidad máximo de monocapas formadas a 25 °C con DPPC:DDAB (3:1) y colesterol, en función de la fracción molar de colesterol. La línea recta representa la regresión lineal sobre la curva, excluyendo el dato para $X_{Col} = 0$ 101

Figura 12. Representación del área por molécula frente a la fracción molar de colesterol a tres presiones superficiales de monocapas formadas a 25 °C con DPPC:DDAB (3:1) y colesterol. . 102

Figura 13. Representación del área de exceso (ΔA_{exc}) frente a la fracción molar de colesterol a tres presiones superficiales de monocapas formadas a 25 °C con DPPC:DDAB (3:1) y colesterol. 103

Figura 14. Representación gráfica de la energía libre de exceso (ΔG_{exc}) frente a la fracción molar de colesterol a tres presiones superficiales de monocapas formadas a 25 °C con DPPC:DDAB (3:1) y colesterol.....104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presión de colapso (π_c), área mínima por molécula (A_0), áreas de exceso (ΔA_{exc}) y energías libres de exceso (ΔG_{exc}) obtenidas para tres distintas presiones, correspondientes a las isotermas de películas ternarias DMPC:DDAB:colesterol.....93

Tabla 2. Datos de la presión de colapso y área mínima obtenidos para todas las películas DPPC:DDAB:colesterol a 25 °C.....99

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La investigación de nuevos métodos en la administración de fármacos implica el uso de plataformas complejas formadas por liposomas funcionalizados como portadores de principios activos (Dhar et al., 2009). Como es bien sabido, los liposomas son estructuras constituidas por moléculas de lípidos polares o moléculas anfifílicas, en los que se distingue un grupo de cabeza polar y una larga cola hidrófoba como, por ejemplo, fosfolípidos (Yeagle et al., 1976), compuestos abundantes en la composición de las membranas biológicas.

Los liposomas con nanopartículas de oro (AuNPs) ancladas en su superficie están siendo investigados para su uso en diversas aplicaciones biomédicas: biosensores, obtención de imágenes biomédicas, y portadores de fármacos, entre otros (Kong et al., 2017). En este campo, se sabe que la estabilidad del liposoma y las interacciones con las nanopartículas metálicas dependen en gran medida de la composición de su membrana. Por otro lado, el anclaje de las AuNPs a su superficie requiere generalmente la inclusión de compuestos cargados en su formulación, como por ejemplo el anfifílico didodecildimetilamonio (DDAB). Además, se sabe que la inclusión de colesterol en monocapas de fosfolípidos tiene efectos significativos sobre la estabilidad y la fluidez de las capas (Lipkowski, 2010).

La formación de monocapas de fosfolípidos y sus caracterizaciones en la interfase aire/agua de la balanza de Langmuir han sido útiles en la interpretación de las interacciones farmacológicas con las membranas celulares tumorales y con los liposomas como sistemas de administración de fármacos. Así, las monocapas lipídicas que se forman en la interfase de la balanza pueden considerarse como la mitad de las biomembranas de las células (Brezesinski y Mohwald, 2003), pero permiten estudiar su estabilidad termodinámica de forma racional, así como su transferencia a soportes sólidos para estudiar su estructura y comportamiento por métodos instrumentales (espectroscópicos, microscópicos, electroquímicos, etc.).

En particular, la transferencia de las monocapas formadas en la interfase aire / subfase acuosa de la balanza de Langmuir a electrodos metálicos, permite la aplicación de técnicas electroquímicas para caracterizar el comportamiento de estas estructuras lipídicas bajo campos eléctricos del mismo orden de magnitud que los que se alcanzan en las membranas biológicas (Ringstad et al., 2008; Lipkowski, 2010; Nascimento et al., 2012; Mohamadi et al., 2014). Entre estas técnicas electroquímicas, destaca el interés de la Espectroscopía Electroquímica de Impedancias (EIS), dado que proporciona información simultánea sobre las propiedades dieléctricas de la película transferida y sobre las posibles transferencias electrónicas que tuvieran lugar (Rueda et al., 2010).

1.2. Metodología

1.2.1 Películas de Langmuir

La formación de películas de Langmuir aprovecha la insolubilidad de las moléculas que forman las monocapas y, particularmente, su estructura anfifílica (Pedrosa, 2002). Su preparación en la balanza de Langmuir se realiza mediante la adición de una disolución (en un disolvente volátil) de la mezcla lipídica sobre la interfase formada por una fase acuosa (denominada subfase) y la atmósfera en contacto. El carácter anfifílico de las moléculas hace que éstas se orienten preferentemente con la cabeza polar hacia la subfase acuosa y la cola hidrófoba hacia la fase de aire. La balanza de Langmuir permite modificar el área de la interfase, mediante una o dos barreras móviles, por lo que permite modificar el área ocupada por cada molécula de la mezcla lipídica adicionada.

La tensión superficial de un líquido que se encuentra en contacto con su vapor se define como *“el trabajo reversible que se necesita para aumentar en una cantidad infinitesimal el área de la interfase, a presión y temperaturas constantes, por unidad de área”*. En estas condiciones, el trabajo es equivalente a la variación de la energía libre del sistema. La definición queda recogida en la ecuación (1):

$$\gamma = dw/dA \quad (1)$$

siendo γ la tensión superficial, w el trabajo y A el área de la interfase.

Las fuertes interacciones intermoleculares que tienen los líquidos polares provocan que estos tengan grandes tensiones superficiales como consecuencia de la disminución de

CAPÍTULO 2

interacciones intermoleculares en las moléculas que se encuentran en la interfase. Dicha tensión superficial puede ser modificada añadiendo un determinado soluto, ya que, si dicho soluto tiene una tendencia menor que el líquido a ocupar la interfase, la tensión superficial aumentará, mientras que si tiene una tendencia mayor a ocupar la interfase (tensioactivo), la tensión superficial disminuirá.

La disminución de la tensión superficial con el tensioactivo (γ) respecto a la del agua pura (γ_0) es la denominada presión superficial (π), definida en la ecuación (2), que posee las mismas dimensiones que la tensión superficial (Gaines, 1966):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2)$$

La representación gráfica de los datos de presión superficial cuando hay un tensioactivo frente al área de la interfase a temperatura constante se denomina *Isoterma de Langmuir* (Langmuir, 1916). En la isoterma de una monocapa lipídica se pueden distinguir distintas regiones, según el grado de empaquetamiento de las moléculas de tensioactivo en la interfase, como se muestra en la Figura 1. Si la monocapa tiene disponible un área elevada, las moléculas que la componen se encuentran muy alejadas entre sí, con lo que las interacciones intermoleculares son pequeñas y el comportamiento es equivalente al de un gas bidimensional. En esta región, la compresión de la monocapa presenta poca influencia sobre los valores de la presión superficial.

Una mayor compresión de la monocapa origina mayores interacciones entre las moléculas, ya que la distancia entre estas va siendo más pequeña, y la monocapa se comporta como un líquido expandido, en el que la presión superficial aumenta más rápidamente con la compresión de la interfase. Si se sigue reduciendo el área, se llega a producir el máximo empaquetamiento de las moléculas, pasando por una fase de líquido condensado y pudiendo llegar a obtenerse un comportamiento de sólido bidimensional, prácticamente incompresible que se caracteriza por un aumento muy rápido de la presión superficial, hasta que se alcanza la denominada presión de colapso en la que se rompe la monocapa originando estructuras tridimensionales, como liposomas, que

incluso pueden pasar a la subfase. Dicha presión es determinada a partir del cambio brusco en la pendiente en la isoterma y de la disminución del valor de presión superficial.

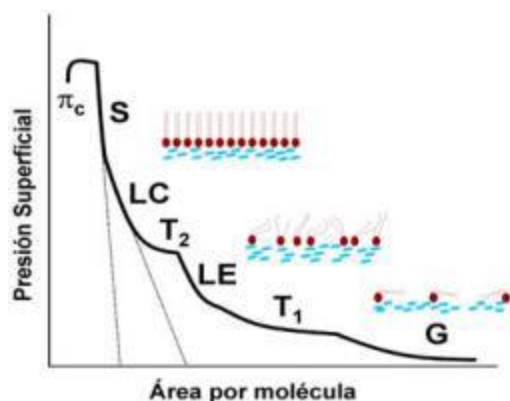


Figura 1. Ejemplo de isoterma de Langmuir y fases que se pueden observar en una monocapa. Fase gaseosa (G), zonas de transición de fase (T1 y T2), fase de líquido expandido (LE), fase de líquido compacto (LC), y fase sólida (S).

En la transición entre dos fases, en la isoterma se detectan a veces zonas planas que corresponden a situaciones en las que las dos fases coexisten en equilibrio. En la práctica, para observar esto es necesario que la compresión sea lo suficientemente lenta para que el sistema esté en equilibrio en todo momento. El número de fases o regiones que se pueden encontrar en una isoterma variará según las características del sistema estudiado (tipo de molécula, subfase, temperatura).

El valor del área mínima que una molécula de tensioactivo ocupa en la interfase (A_0) se puede obtener a partir de la isoterma, extrapolando la región anterior al colapso hasta que se produce el corte con el eje de abscisas. Dicho punto de corte sería el valor del área mínima, como se puede observar en la Figura 1.

En el caso de películas formadas por mezclas de varios lípidos, el análisis termodinámico conducente a determinar la proporción más estable se realiza analizando las variaciones del área por molécula, con la composición de la película. Para una mezcla con comportamiento ideal, el área por molécula debería coincidir con la combinación lineal de áreas moleculares de los componentes independientes (A_1 y A_2), siendo las fracciones molares de cada uno de ellos (X_1 y X_2) los coeficientes de dicha combinación lineal. En el caso de una mezcla binaria, como se recoge en la ecuación (3):

CAPÍTULO 2

$$A_{ideal} = X_1 A_1 + X_2 A_2 \quad (3)$$

La ecuación anterior indica que el área por molécula en una mezcla ideal cambia linealmente con la fracción molar de uno de los componentes. Si las interacciones entre los distintos componentes de la mezcla son diferentes que los que experimentan en estado puro, se producen desviaciones de la idealidad que originan desviaciones negativas o positivas del área por molécula, respecto del valor ideal dado por la ecuación (4), que se denomina área de exceso.

$$\Delta A_{exceso} = A_{real} - A_{ideal} \quad (4)$$

Los valores negativos del área molecular de exceso indican un mayor empaquetamiento de los componentes de la mezcla lipídica, que se traduce en valores negativos de la energía libre de exceso, definida por:

$$\Delta G_{exc} = \int_0^\pi \Delta A_{exceso} d\pi \quad (5)$$

1.3. Objetivos

El objetivo planteado en esta sección ha sido la preparación y caracterización de películas lipídicas en las interfases aire / agua de la balanza de Langmuir. La finalidad última es la posible aplicación de los conocimientos adquiridos en este estudio para el desarrollo de plataformas para la liberación de principios activos y para el diseño de biosensores. Se trata de determinar la composición termodinámicamente óptima de mezclas lipídicas basadas en dos fosfolípidos sintéticos diferentes, dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que incorporan DDAB y colesterol (Figura 2), empleando para ello el estudio de las isothermas de Langmuir correspondientes a mezclas de distinta composición. Se obtendrán las áreas moleculares de exceso y las energías libres de exceso.

Las temperaturas de transición de los dos lípidos base empleados, DMPC y DPPC, son 23 °C y 41°C, respectivamente. Por tanto, cabe esperar que a temperatura ambiente, las películas constituidas por DMPC sean bastante fluidas, facilitando así su transferencia a superficies electrónicas para posteriores estudios o para el desarrollo de biosensores. Por su parte, las películas basadas en DPPC serán más rígidas a temperatura ambiente

(y a temperatura corporal), permitiendo la formación de liposomas más estables y adecuados para la formación de plataformas transportadoras de fármacos.

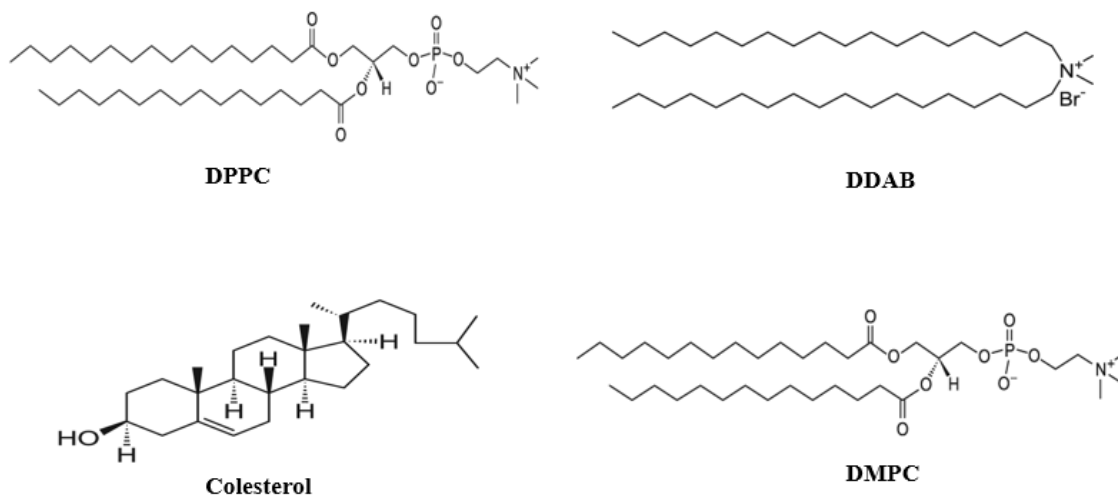


Figura 2. Estructura química de 1,2-dimiristoil sn-glicero-3-fosfolina (DMPC), 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), colesterol y bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y disoluciones

Todas las disoluciones lipídicas han sido preparadas utilizando como disolvente cloroformo de grado analítico Sigma-Aldrich, almacenándose a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En primer lugar, se prepararon disoluciones stock de los componentes puros: DMPC 0.8 mg/mL, DDAB 0.77 mg/mL, DPPC 0.98 mg/mL y colesterol 0.43 mg/mL. Las mezclas de lípidos se prepararon mezclando los volúmenes necesarios de cada disolución stock de lípido puro para obtener la fracción molar deseada, preparándose en la misma jornada en la que iban a ser utilizadas.

2.2. Instrumentación

El modelo de balanza utilizado para realizar los ensayos ha sido NIMA 611D (Figura 3), con una cuba termostatzada cuya capacidad es 150 mL y cuya área máxima es aproximadamente 270 cm^2 . Posee dos barreras móviles de PTFE, que se desplazan por la acción de un motor. Este desplazamiento previamente calibrado, es controlado y registrado en un ordenador que tiene instalado el software de control suministrado con la balanza.

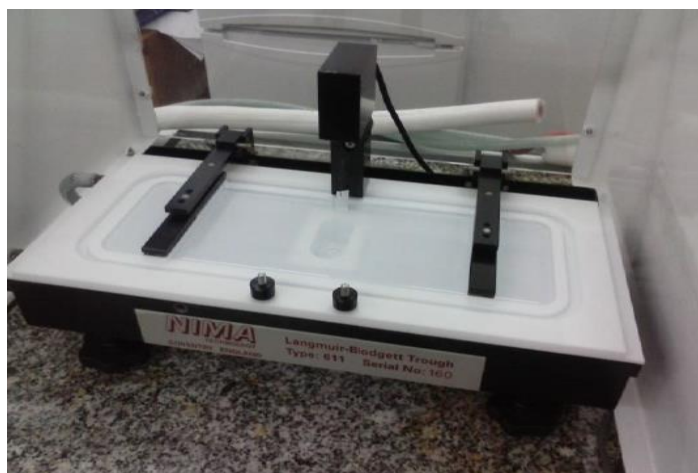


Figura 3. Modelo de balanza de Langmuir utilizado (NIMA 611D).

El sensor de tensión superficial utilizado ha sido el modelo PS4 de NIMA. De este, se suspende la placa de Wilhelmy (creada de una tira de papel cromatográfico modelo Whatman® 1 CHR, con una medida de 1 cm de ancho). Se encarga de medir la fuerza de

suspensión de la placa cuando se encuentra parcialmente sumergida en la subfase. Dicha fuerza es el resultado de la actuación de los componentes siguientes: el peso de la placa, el empuje hacia arriba del líquido de la subfase sobre la placa y la fuerza ejercida por la tensión superficial sobre la placa. Los dos primeros componentes se pueden considerar constantes a lo largo de todo el experimento, en presencia y en ausencia de la película en la interfase. Los únicos cambios en la fuerza sobre la placa obedecerán a los cambios experimentados en la tensión superficial:

$$F = 2 a \gamma \quad (6)$$

donde $2 a$ es el perímetro de la placa de Wilhelmy.

Al realizar la medida de la presión superficial para la obtención de una isoterma, se considera como valor cero la fuerza ejercida por la interfase de la subfase antes de la adición de los tensioactivos, con lo que la lectura del sensor en presencia de película superficial proporciona directamente la presión superficial.

Para evitar contaminación por la atmósfera, así como posibles alteraciones de la medida por corrientes de aire, las medidas se llevan a cabo con la balanza dentro de una urna con compuertas, que se cerraban una vez adicionados los tensioactivos. La temperatura a la que se han llevado a cabo las determinaciones ha sido de 25 °C, y era controlada a partir de un baño termostatzado, del que partía agua que era recirculada bajo la cuba de la balanza.

2.3. Procedimientos de limpieza

Para limpiar la balanza se utilizó agua ultrapura obtenida a partir de un sistema de purificación Milli-Q® de Millipore®. Antes de registrar una isoterma, la superficie de la balanza era limpiada en sucesivas ocasiones con agua ultrapura y con metanol, siendo el último lavado previo a la adición de la subfase únicamente con agua ultrapura. Para aspirar el agua y el metanol, se utilizaron puntas de pipeta de polipropileno que estaban conectadas a un sistema de vacío y también para limpiar posibles restos de metanol se utilizaron unos paños de precisión KimTech Science (Kimberly-Clarck Professional).

La limpieza del material de vidrio se llevó a cabo empleando disoluciones de permanganato potásico en medio ácido o disoluciones “piraña”, formadas por 3 partes

CAPÍTULO 2

de ácido sulfúrico y 1 parte de peróxido de hidrógeno al 30%. En ambos casos, se dejaba el material limpiándose con dicha disolución durante 1 noche. Pasado este tiempo, se limpiaba el material con agua ultrapura, y si se había limpiado con permanganato potásico, se le añadía disolución piraña diluida para eliminar los restos de permanganato que pudieran quedar en el material, lavándose a continuación con gran cantidad de agua ultrapura. Una vez limpio, se dejaba secar en una estufa a 80 °C.

Para limpiar elementos metálicos como espátulas, tijeras o pinzas que se utilizaban para la preparación de la placa de Wilhelmy, así como para cortar la punta de pipeta utilizada para la limpieza de la balanza, se utilizaba calentamiento al rojo en la llama del mechero, que también servía como esterilización.

2.4. Procedimientos

Antes de cada isoterma, se limpió la balanza como se describió anteriormente y, a continuación, se llenó la cuba de agua ultrapura recién obtenida, sumergiendo parcialmente una placa de Wilhelmy nueva. Posteriormente, se cerraban las barreras de la balanza disminuyendo el área de la interfase al mínimo, con el objetivo de que las impurezas que pudieran existir en la subfase fueran eliminadas con mayor facilidad, aspirando para ello la superficie con la punta de pipeta que está conectada al sistema de vacío. A continuación, se abrían las barreras y se tomaba como referencia el valor de tensión superficial en ese instante.

La película se preparó mediante la extensión sobre la interfase de un volumen de entre 20 y 40 μL de la disolución lipídica en cloroformo, con ayuda de una microjeringa. Tras esperar 20 minutos a que se evaporara el disolvente y las moléculas de lípido se distribuyeran homogéneamente por la interfase, se procedió a registrar la isoterma, midiendo la presión superficial mientras que la interfase se comprime por acción de las barreras a una velocidad de $30 \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1}$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Películas formadas con mezclas de DMPC, DDAB y colesterol

La técnica de Langmuir puede proporcionar una información muy importante como primer paso en la evaluación de las propiedades de las mezclas anfífilas de los tres componentes para su uso como nuevos sistemas de transporte de fármacos. El DDAB proporciona a los liposomas de DMPC la carga positiva necesaria para anclar las AuNPs cargadas negativamente. Los liposomas formados por DMPC:DDAB en proporción de 3:1 facilitan el anclaje de las AuNPs (Jin et al., 2015), por lo que en este estudio se ha mantenido esta ratio, mientras que se ha analizado el efecto del colesterol en la estabilidad termodinámica de las películas formadas con estos componentes lipídicos, mediante el registro y análisis de isothermas de Langmuir de monocapas que contienen diferentes fracciones molares de colesterol.

Se han registrado las isothermas de Langmuir correspondientes a distintas películas lipídicas, tanto de DMPC, colesterol y DDAB puros, como de mezclas de estos componentes. En la Figura 4 se muestran las isothermas correspondientes a los tres componentes puros y a la mezcla DMPC-DDAB (proporción 3:1). Es necesario mencionar que en el caso del DDAB, la isoterma correspondiente no es reproducible, desplazándose hacia valores menores de área por molécula a medida que se deja más tiempo la película formada. Ello es debido a la solubilidad relativamente alta del DDAB, que en ausencia de otro componente lipídico se disuelve lentamente en la subfase.

Por el contrario, tanto DMPC como colesterol proporcionan isothermas reproducibles. Para estos componentes se observa el comportamiento esperado; es decir, se aprecia cómo al ir disminuyendo el área, la presión va aumentando lentamente hasta llegar a unos valores de área en los que va aumentando de forma más rápida, alcanzándose el valor de la presión de colapso. Este comportamiento anterior es el que se observa también en el caso de la mezcla DMPC-DDAB, pero la influencia que el DDAB ejerce provoca que la presión comience a aumentar a valores de área menores respecto al caso del DMPC puro.

El área molecular mínima en el caso del DMPC es de 85 \AA^2 ; en el caso de la mezcla DMPC-DDAB es 80 \AA^2 en el caso del colesterol es de 42 \AA^2 . Las presiones aproximadas de colapso son 49, 49 y 43 mN/m, respectivamente. A la temperatura a la que se han registrado las isothermas, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, superior a la temperatura de transición del DMPC, que es $23 \text{ }^\circ\text{C}$ (Needham y Evans, 1988), se puede comprobar que la película de este componente puro no presenta ninguna región en la que se comporte como sólido, aumentando la presión superficial lentamente al disminuir el área, lo que indica una elasticidad elevada. Por el contrario, el colesterol forma películas con una mayor rigidez, lo que supone un aumento muy brusco de la presión superficial al disminuir el área. La incorporación de DDAB a la composición de la película tiene como consecuencia una disminución del área por molécula.

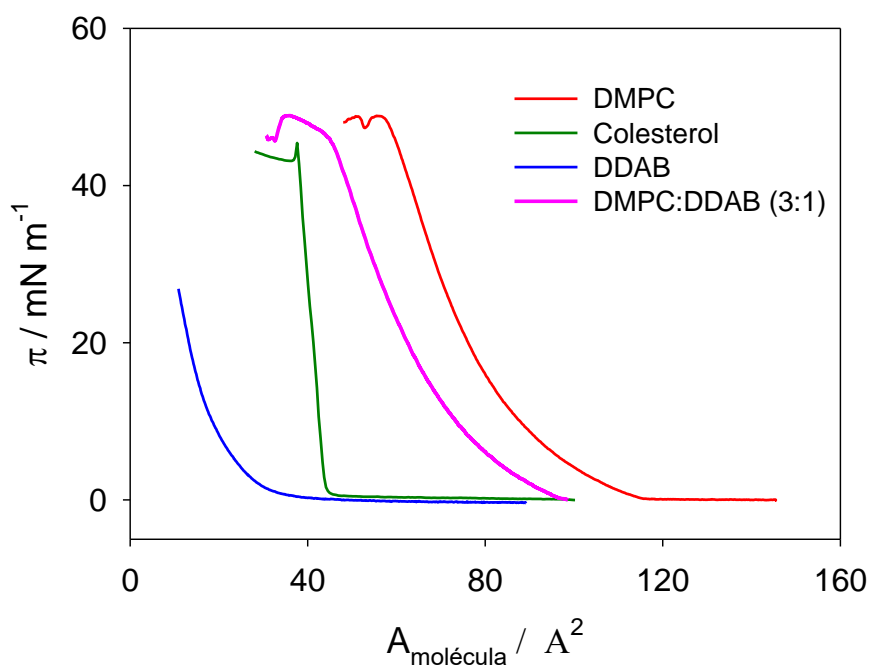


Figura 4. Isothermas de Langmuir obtenidas para los componentes lipídicos puros y la mezcla DMPC:DDAB con una relación molar 3:1, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Las isothermas obtenidas para mezclas ternarias DMPC:DDAB:colesterol, manteniendo la proporción DMPC:DDAB 3:1 y modificando la fracción molar de colesterol, X_{Col} , se muestran en la Figura 5.

Se puede comprobar que el comportamiento que siguen las películas que contienen colesterol es intermedio entre el de los extremos de la serie. Se observa que las isothermas de las fracciones molares bajas de colesterol son muy parecidas a las de la mezcla binaria DMPC-DDAB, especialmente en la pendiente de las curvas, mostrando ausencia de fase cristalina. La principal diferencia es que están desplazadas hacia áreas por moléculas menores, indicando un mayor empaquetamiento molecular. Por otro lado, las isothermas correspondientes a elevadas fracciones molares de colesterol presentan una mayor pendiente a presiones superiores a 10 mN m⁻¹, indicando una mayor rigidez de la película.

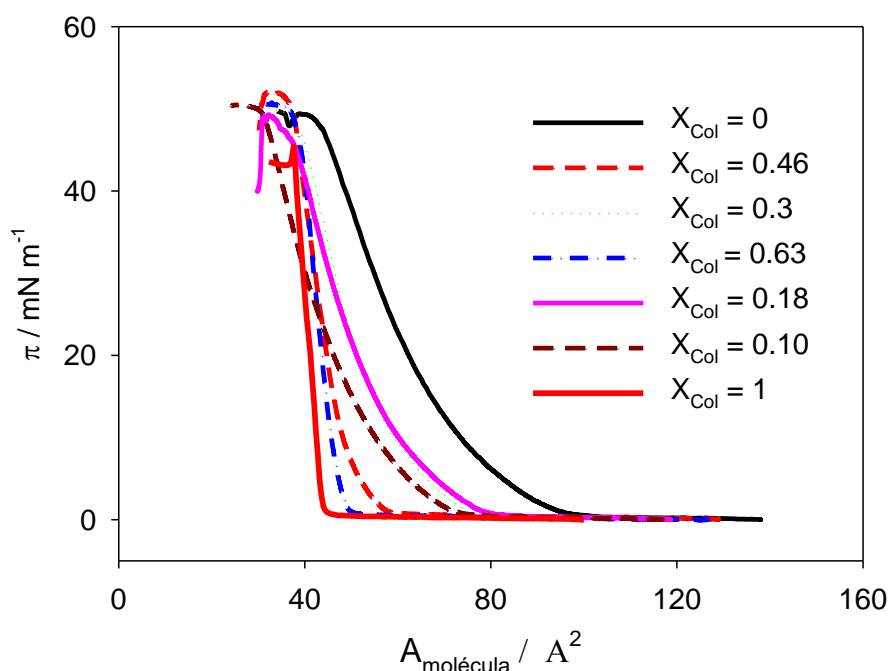


Figura 5. Isothermas de Langmuir de las mezclas de DMPC-DDAB-colesterol a distintas fracciones molares de colesterol, registradas a 25 °C.

El área mínima por molécula (A_0) y la presión de colapso (π_c) obtenidas para cada isoterma de la Figura 5 se muestran en la Tabla 1. Lo más destacado es la disminución de A_0 en las películas formadas con una baja proporción de colesterol, respecto de la película binaria con DMPC:DDAB. Se observa también cómo las presiones de colapso de las mezclas son mayores que las del colesterol puro, lo que indica que estas pueden soportar presiones más grandes antes de que se produzca la rotura de la monocapa.

CAPÍTULO 2

Tabla 1. Presión de colapso (π_c), área mínima por molécula (A_0), áreas de exceso (ΔA_{exc}) y energías libres de exceso (ΔG_{exc}) obtenidas para tres distintas presiones, correspondientes a las isothermas de películas ternarias DMPC:DDAB:colesterol.

X Col	Π_c /mN/m	$A_0/\text{Å}^2$	$\pi=5$ mN/m		$\pi=15$ mN/m		$\pi=30$ mN/m	
			$\Delta A/\text{Å}^2$	ΔG_{exc} /J* mol^{-1}	$\Delta A/\text{Å}^2$	ΔG_{exc} /J* mol^{-1}	$\Delta A/\text{Å}^2$	ΔG_{exc} /J* mol^{-1}
0.00	49.7	81.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.1	50.5	75.2	-16.2	-91.5	-14.5	-244	-13.4	-452
0.18	49.3	64.3	-7.28	-34.5	-7.56	-111	-6.95	-220
0.3	50.2	62.0	-4.40	-25.9	-5.14	-76.3	-4.01	-145
0.46	52.0	52.1	-14.7	-71.1	-11.3	-202	-7.36	-340
0.63	50.6	49.0	-10.4	-57.2	-6.62	-142	-3.46	-215
1	45.1	45.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

En la Tabla 1 también se recogen los datos de áreas (ΔA_{exc}) y de energías libres (ΔG_{exc}) calculados a tres presiones superficiales características de las distintas zonas de las isothermas, tal como se explica a continuación.

El análisis termodinámico se puede llevar a cabo realizando una representación gráfica de los valores de área por molécula de las distintas mezclas a una presión superficial constante frente a los valores de fracción molar de colesterol, como se muestra en la Figura 6.

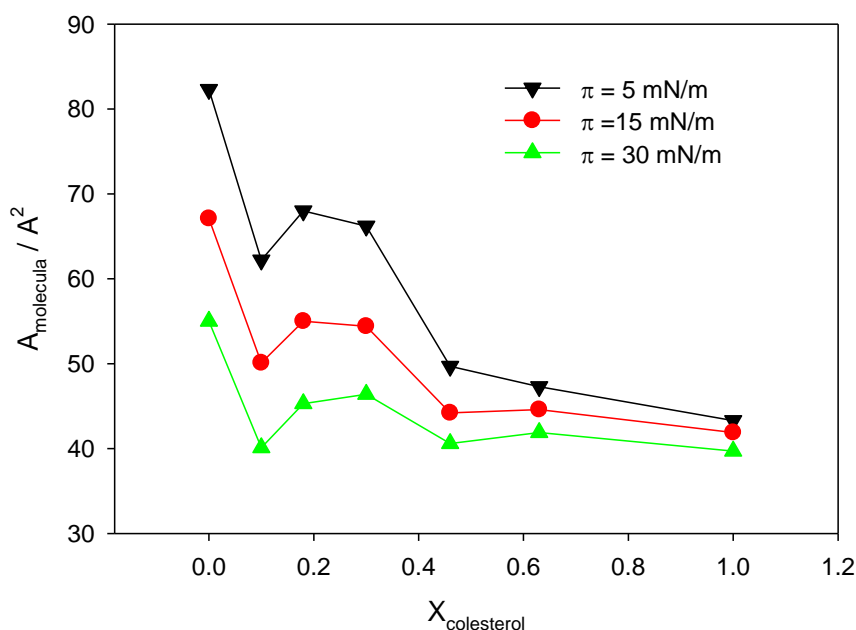


Figura 6. Representación gráfica del área por molécula frente a la fracción molar de colesterol obtenida para tres presiones superficiales, correspondientes a las isoterms de películas ternarias DMPC:DDAB:colesterol.

En la Figura 6 se puede observar cómo el área por molécula no varía linealmente con la fracción molar de colesterol para ninguno de los tres valores de presión, como correspondería a una mezcla ideal, en la que cada tipo de molécula ocupa una misma área en la película ternaria que cuando se encuentra pura. A partir de la ecuación (3):

$$A_{ideal} = A_{X_{col}=0} + (A_{X_{col}=1} - A_{X_{col}=0}) X_{col} \quad (7)$$

Se pueden observar desviaciones negativas de esa linealidad, lo que indica que las películas formadas por mezclas de lípidos son más compactas que las correspondientes películas con comportamiento ideal.

Estas desviaciones se cuantifican mediante el área de exceso, ΔA_{exc} , definida en la ecuación (4), que representa de forma cuantitativa estas desviaciones de la idealidad, que en el caso particular de las mezclas DMPC:DDAB:colesterol se expresa:

$$\Delta A_{exc} = A_{exp} - A_{ideal} = A_{exp} - [A_{X_{col}=0} + (A_{X_{col}=1} - A_{X_{col}=0}) X_{col}] \quad (8)$$

Los valores del área de exceso a las distintas fracciones molares de colesterol y a presión constante quedan recogidos en la Tabla 1 y quedan representados en la Figura 8. Se puede observar cómo para todas las mezclas se obtienen valores de área de exceso

negativos, lo que indica que la presencia de colesterol aporta estabilidad a la película lipídica. La obtención de valores de área de exceso negativos indica que las interacciones intermoleculares que ocurren en las películas mixtas son de naturaleza atractiva y presentan un carácter estabilizante, mientras que si se hubieran obtenido valores positivos, indicaría que estas interacciones son de naturaleza repelente y presentan un carácter desestabilizante. La concentración para la que el grado de empaquetamiento es mayor, y por tanto su estructura tiene una mayor estabilidad, será aquella para la que el área de exceso tenga un valor más negativo (un valor mayor en valor absoluto). Teniendo en cuenta esto, se observan dos mínimos en la Figura 8, en los tres valores de presión superficial, correspondientes a las fracciones molares de colesterol 0.1 y 0.46, lo que indica que dichas composiciones presentan una gran estabilidad. La estabilidad de las mezclas con fracción molar de colesterol 0.46 sugiere la existencia de interacciones lípido / colesterol estables con estequiometría 1:1. La fracción molar de colesterol 0.1 es del mismo orden de magnitud que la presente en las membranas biológicas.

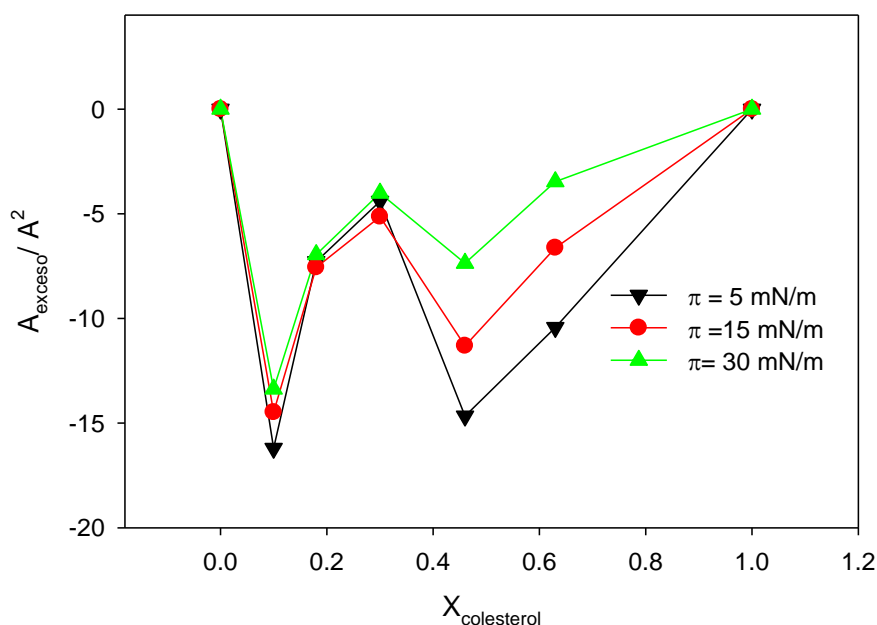


Figura 7. Representación gráfica de los valores de área de exceso frente a la fracción molar de colesterol obtenidas para tres presiones superficiales, correspondientes a las isothermas de películas ternarias DMPC:DDAB:colesterol.

Para completar el estudio termodinámico cuantitativo de las películas lipídicas se determina la energía libre de exceso, ΔG_{exc} , que permite normalizar las desviaciones de la idealidad respecto del área total. Un valor de ΔG_{exc} de cero indica que la mezcla es ideal, mientras que valores negativos indican que las interacciones entre las mezclas son de carácter atractivo y los positivos que las interacciones entre las mezclas son de carácter repulsivo. La energía libre de exceso, definida en la ecuación (9), se obtiene a partir de la integración del área de exceso.

$$\Delta G_{exc} = \int_0^\pi A_{exp} d\pi - X_{col} \int_0^\pi A_{X_{col}=1} d\pi - (1 - X_{col}) \int_0^\pi A_{X_{col}=0} d\pi \quad (9)$$

Las integrales que aparecen en la ecuación (9) han sido calculadas mediante el método de los trapecios. Los valores obtenidos de energía libre de exceso para las distintas fracciones molares de colesterol a distintas presiones constantes quedan recogidos en la Tabla 1 y se representan en la Figura 8.

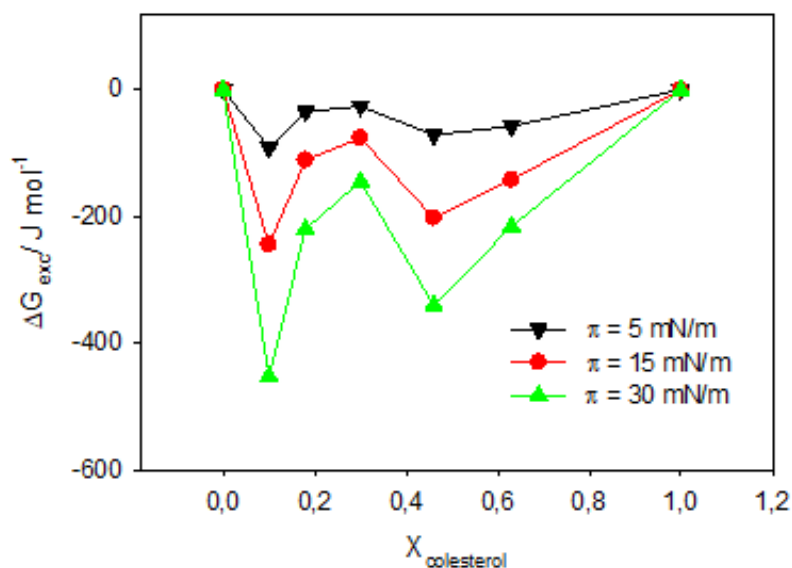


Figura 8. Representación gráfica de los valores de la energía libre de exceso frente a los de fracción molar del colesterol para distintas presiones superficiales.

En la Figura 8 se observa como también se obtienen dos mínimos de energía libre de exceso en las fracciones molares de colesterol 0,1 y 0,46, lo que indica que son las composiciones más estables. Para conseguir una mayor estabilidad en las membranas, la fracción molar más adecuada sería la de 0,1, ya que en la representación de las

isotermas (Figura 5) se puede observar cómo la película lipídica con dicha composición tiene una mayor fluidez que la película lipídica con fracción molar 0.46.

3.2. Películas formadas con mezclas de DPPC, DDAB y colesterol

Se han registrado diferentes isotermas de Langmuir para diversas composiciones lipídicas: DPPC y colesterol puros, una mezcla de DPPC:DDAB (3:1), y mezclas con distintas fracciones molares de colesterol formadas a partir de dicho compuesto puro con la mezcla binaria que se ha mencionado anteriormente.

La finalidad de esta experiencia, al igual que la anterior, fue encontrar una fracción de colesterol que le aporte a la monocapa, con DPPC como componente principal, una mayor estabilidad, pues dicha mezcla se puede usar para elaborar liposomas que incorporen fármacos, a diferencia de lo que ocurre con las películas lipídicas basadas en DMPC, que la elevada fluidez dificulta la obtención de liposomas estables y con baja dispersión de tamaños. Algunos ejemplos de isotermas obtenidas para cada compuesto puro y diferentes mezclas, se observan en la Figura 9.

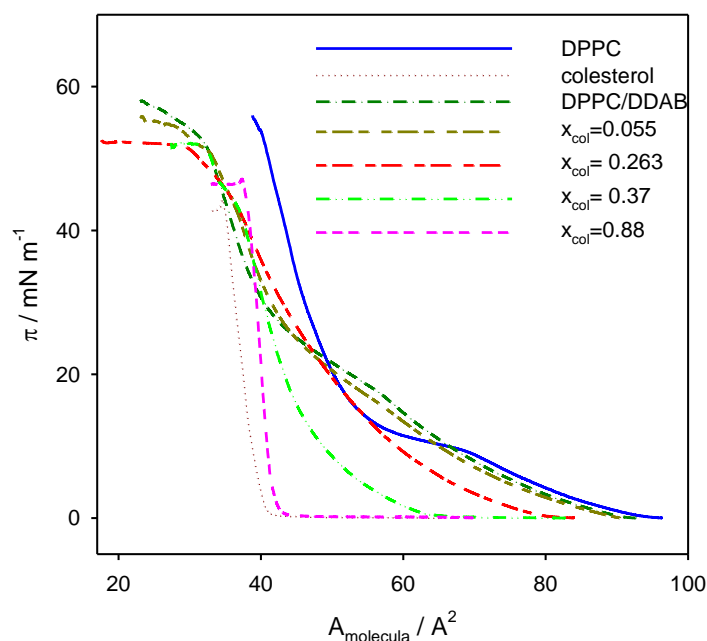


Figura 9. Isotermas de Langmuir a 25 °C para DPPC y colesterol puros, la mezcla DPPC:DDAB (3:1) y las mezclas DPPC:DDAB(3:1):colesterol con las fracciones molares de colesterol indicadas.

CAPÍTULO 2

En la representación gráfica de la isoterma de Langmuir para el DPPC puro, se pueden distinguir las regiones de líquido expandido y líquido condensado, y una región de transición entre ambas, en la que la presión superficial se mantiene aproximadamente constante en 10 mN m^{-1} .

En el caso de la isoterma de la mezcla DPPC:DDAB, se aprecia el efecto que el DDAB ejerce sobre los parámetros característicos anteriores, pues hace que aumente la presión y disminuya el área en la zona de transición LE-LC, de manera que se extiende la región de estabilidad del LE hasta una presión próxima de 21 mN m^{-1} . También se puede contemplar un aumento tanto en el área mínima que ocupa cada molécula en la fase LC como en la presión de colapso. Sin embargo, no se observa la transición de líquido condensado a sólido.

La influencia de la presencia de colesterol en las isotermas de las películas con DPPC:DDAB es diferente a bajas fracciones molares de colesterol, donde las curvas tienen similitudes con la isoterma de Langmuir de la mezcla binaria, donde se mantiene la transición de fase entre el líquido expandido y líquido compacto, mientras que a fracciones molares de colesterol superiores a 0.3 esta transición desaparece y se produce un aumento en la presión superficial de manera más rápida al disminuir el área. Esto se debe a que el colesterol hace que la monocapa lipídica sea más rígida.

Los valores de área mínima y presión de colapso obtenidos para las mezclas investigadas se muestran en la Tabla 2.

CAPÍTULO 2

Tabla 2. Datos de la presión de colapso y área mínima obtenidos para todas las películas DPPC:DDAB:colesterol a 25 °C.

X_{col}	π_i (mN/m)	Área mínima (Å ²)
DPPC	55	58
DPPC/DDAB	50	51
0.05	47	53
0.10	48	61
0.13	50	53
0.18	51	48
0.26	47	48
0.37	50	49
0.52	45	44
0.65	49	47
0.74	47	46
0.88	45	41
Colesterol	41	42

En el caso de las películas que contienen DPPC, que presentan una mayor rigidez en general que las películas que contienen DMPC, resulta interesante analizar las características mecánicas de la película mediante el denominado **módulo de compresibilidad**, que se define de acuerdo con la ecuación (9) como el inverso del coeficiente de compresibilidad (Gaines, 1966):

$$C_S^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right) \quad (10)$$

El módulo de compresibilidad da una idea cuantitativa del estado de la película (Hianik et al., 2017): valores de C_S^{-1} menores de 12.5 mN m⁻¹ se corresponden con un gas bidimensional. Películas en estado de líquido expandido muestran valores entre 12.5 y 50 mN m⁻¹, y de 50-250 mN m⁻¹ para estados de líquido condensado, siendo los valores del módulo de compresibilidad superiores a 250 mN m⁻¹ los que corresponden al estado sólido. El valor máximo de C_S^{-1} se alcanza a presiones superficiales ligeramente inferiores a la de colapso, que se caracteriza por un descenso brusco del módulo de compresibilidad. También, las transiciones entre estados bien definidas muestran un descenso del módulo de compresibilidad. En la Figura 10 se han representado

CAPÍTULO 2

gráficamente los módulos para los componentes puros, la mezcla binaria DPPC/DDAB y la mezcla $X_{Col} = 0.37$ en función de la presión superficial.

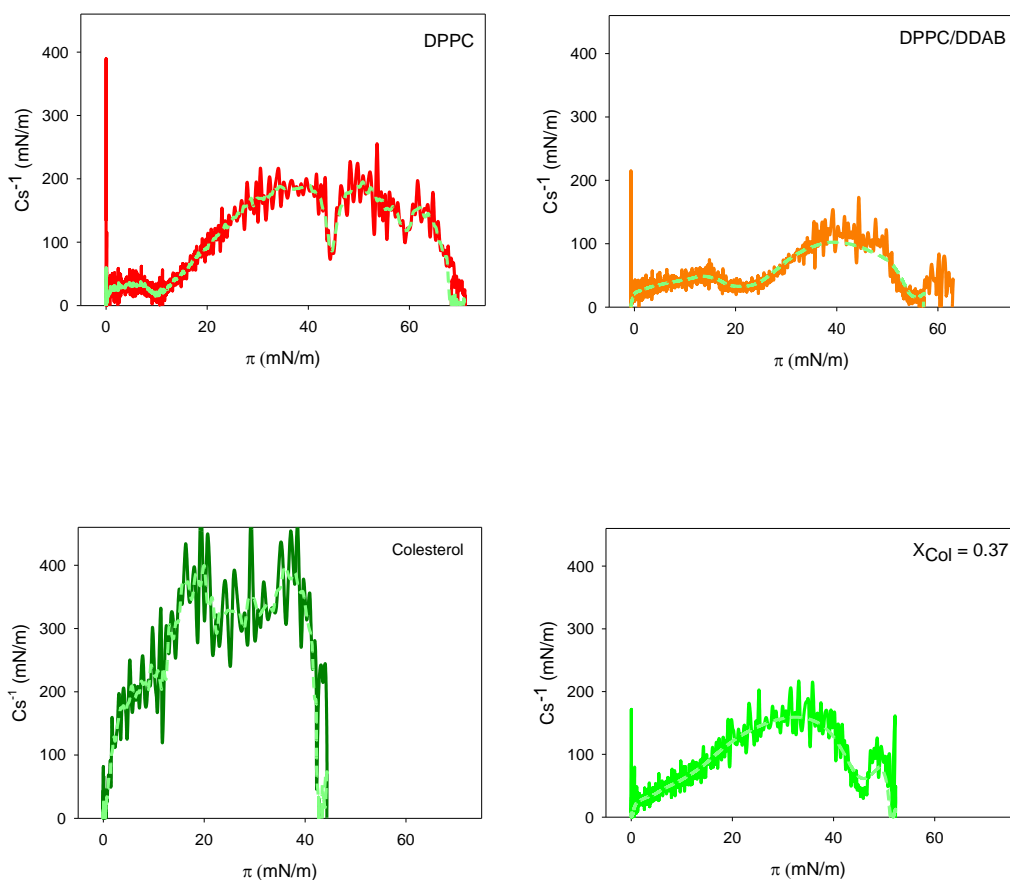


Figura 10. Representación del módulo de compresibilidad frente a la presión superficial para películas formadas a 25 °C con DPPC puro, mezcla DPPC:DDAB (3:1), colesterol puro y mezcla DPPC:DDAB (3:1) y colesterol ($X_{Col} = 0.37$).

La Figura 10.a) representa el módulo de compresibilidad para el DPPC puro. En esta gráfica se observan dos mínimos: el primero, a presiones bajas, en torno a 10 mN/m , indica que se ha producido la transición de fase entre el líquido expandido y el líquido compacto; y el segundo a presiones más altas (aproximadamente a 44 mN/m), correspondiente al colapso.

En la Figura 10.b) se puede apreciar que la presencia de DDAB disminuye el valor máximo de C_s^{-1} de películas con DPPC (de 200 a 120 mN m^{-1}), indicando que el DDAB aporta a la película lipídica más elasticidad, aunque sigue en un estado de líquido condensado.

La Figura 10.c) es el módulo de elasticidad para el colesterol puro, que muestra un módulo de compresibilidad máximo de aproximadamente 400 mN m^{-1} , muy superior al del DPPC, y correspondiente a un sólido. Por su parte, la película con una fracción molar de colesterol $X_{\text{Col}} = 0.37$ tiene un módulo máximo de compresibilidad en torno a 170 mN m^{-1} , ligeramente superior al de la mezcla DPPC:DDAB.

En la Figura 11 se puede observar que el módulo de compresibilidad máximo de las películas formadas con tres componentes varía linealmente con la fracción molar de colesterol, aunque la extrapolación a $X_{\text{Col}} = 0$ proporciona un módulo de compresibilidad significativamente menor (44 mN m^{-1}) que el obtenido experimentalmente para la mezcla DPPC:DDAB sin colesterol (120 mN m^{-1}).

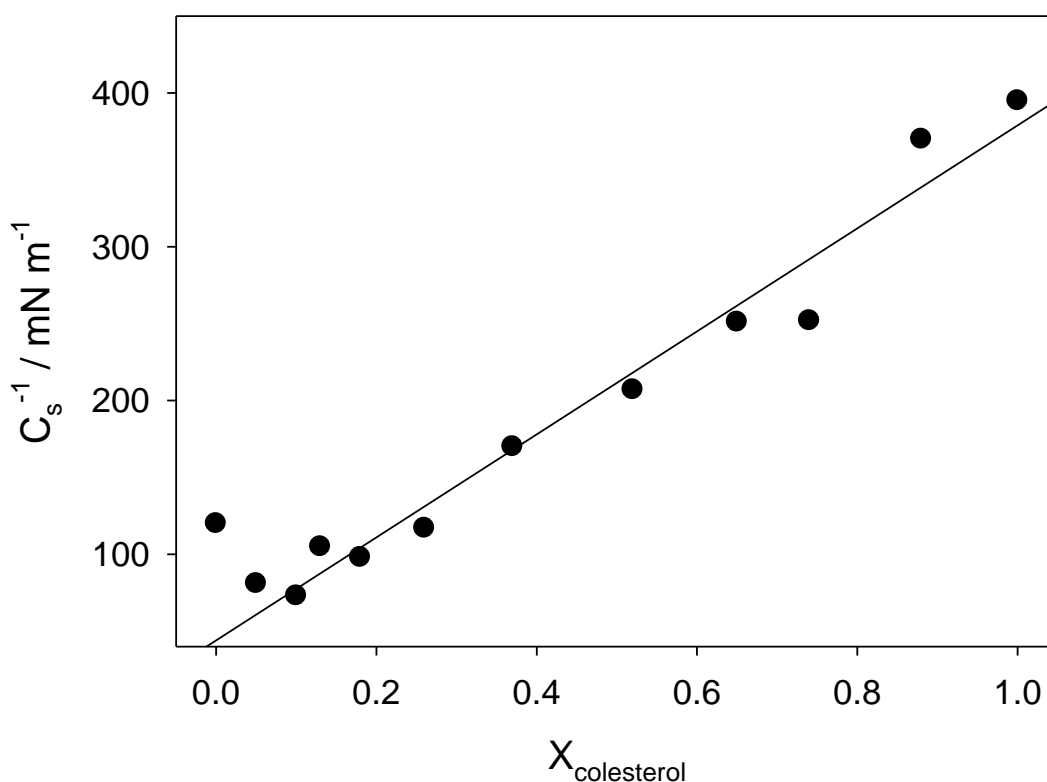


Figura 11. Variación del módulo de compresibilidad máximo de monocapas formadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con DPPC:DDAB (3:1) y colesterol, en función de la fracción molar de colesterol. La línea recta representa la regresión lineal sobre la curva, excluyendo el dato para $X_{\text{Col}} = 0$.

Al igual que para las películas lipídicas basadas en DMPC, se ha realizado el **análisis termodinámico** para películas formadas con DPPC:DDAB (3:1) y fracciones molares de

colesterol variables. El área por molécula a 3 presiones superficiales se muestra en la Figura 12.

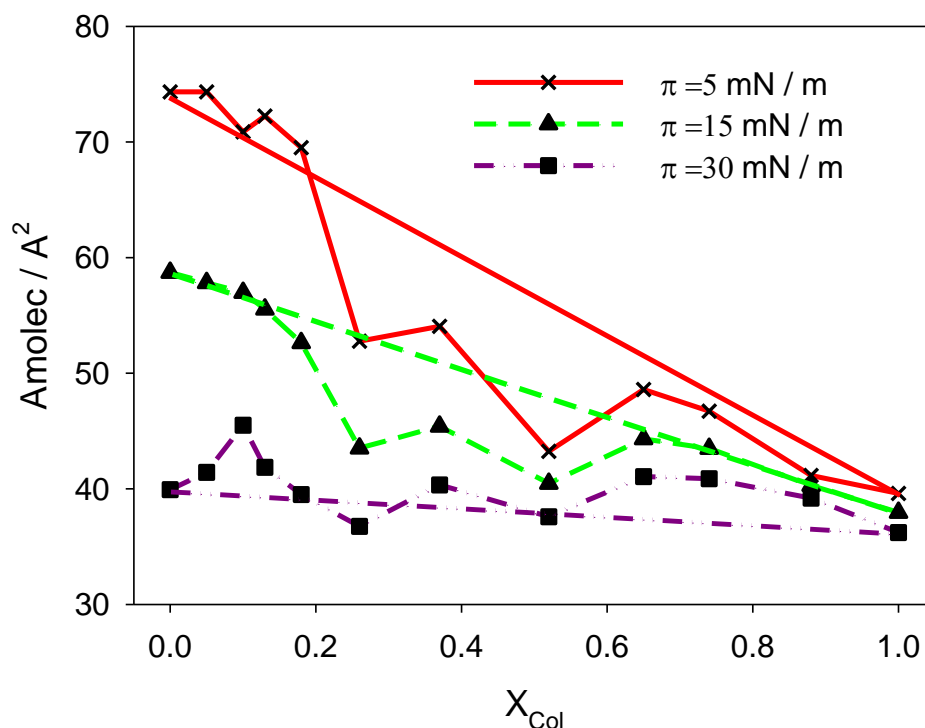


Figura 12. Representación del área por molécula frente a la fracción molar de colesterol a tres presiones superficiales de monocapas formadas a 25 °C con DPPC:DDAB (3:1) y colesterol.

En la Figura 12 se aprecia que la superficie por molécula no varía de manera lineal con la fracción molar de colesterol, sino que se producen desviaciones negativas de dicha linealidad cuando la presión superficial es 5 ó 15 mN/m. Esto indica que las moléculas empiezan a adquirir una estructura compacta de tipo líquido, debido a interacciones atractivas, que son mayores entre los componentes de distinta naturaleza. Cabe destacar que tanto a valores de presiones de 5 y 15 mN/m, las fases que se compararan son LE o LC, según la composición. No obstante, se observan bien los mínimos representativos de las máximas interacciones entre las moléculas.

Por otra parte, se puede contemplar que las desviaciones respecto a las áreas de mezclas ideales son pequeñas, lo que indica que las fases LC para todas las composiciones, que son las existentes a una presión de 30 mN/m, no difieren mucho de las fases LC de los componentes puros. Parece que al comprimir las películas, las interacciones que

predominan son las que ocurren entre las moléculas del mismo componente, sugiriendo la formación de dominios de distinta composición. Esto explicaría la variación lineal del módulo de compresibilidad máximo con la fracción molar de colesterol, mostrada en la Figura 11.

En la Figura 13 se puede contemplar que para casi todas las fracciones molares de colesterol se han obtenido valores negativos de área de exceso a presiones superficiales moderadas, lo cual indica que la presencia de colesterol contribuye a la estabilidad de la película lipídica.

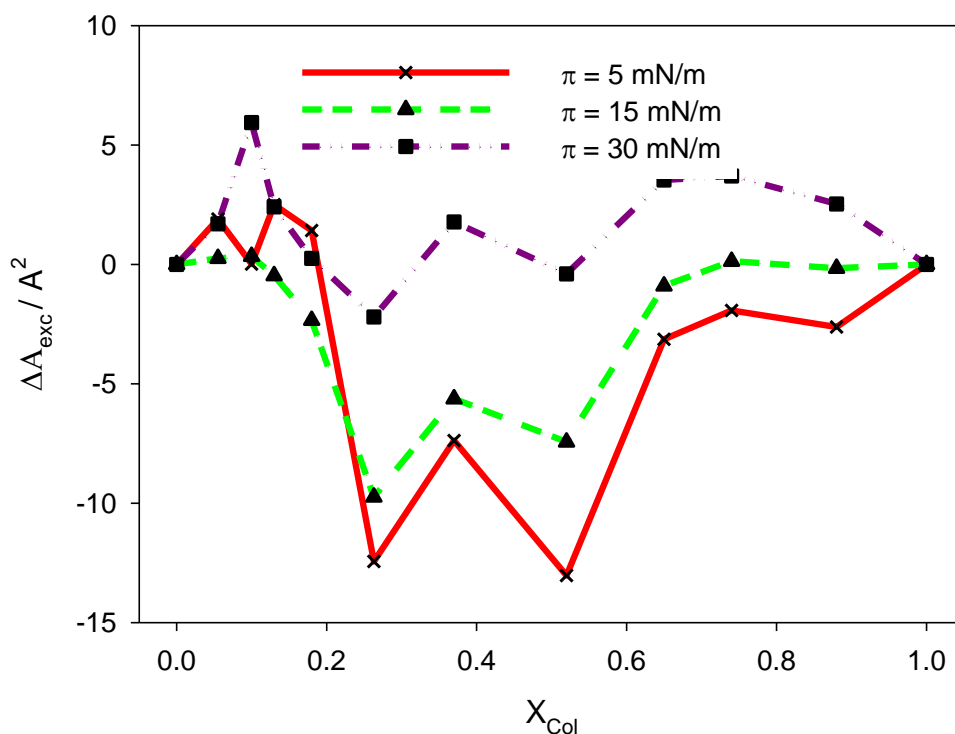


Figura 13. Representación del área de exceso (ΔA_{exc}) frente a la fracción molar de colesterol a tres presiones superficiales de monocapas formadas a 25 °C con DPPC:DDAB (3:1) y colesterol.

También se puede observar en dicha figura que para las tres presiones superficiales existen dos mínimos entre los valores de fracciones molares de 0.3 - 0.5. En este intervalo, el efecto del empaquetamiento es mayor y, en consecuencia, es donde la monocapa presenta una mayor estabilidad.

Por otra parte, se puede analizar cómo influye el colesterol en la película. Si la presión es baja hay más efecto en la región del líquido expandido; es decir, la monocapa

comienza a tomar una estructura más estable. Por el contrario, a altas presiones superficiales prácticamente no existe dicho efecto.

Para seguir con el análisis termodinámico de la monocapa lipídica, se determinó también la energía libre de exceso, ΔG_{exc} . En la Figura 14 se puede apreciar que para casi todas las fracciones molares de colesterol se han obtenido valores negativos de energía libre de exceso. Esto indica que en la película ocurren interacciones intermoleculares atractivas, de modo que el colesterol le aporta una cierta estabilidad. La normalización respecto del área molecular implícita en ΔG_{exc} , permite comprobar que la estabilización es mayor a mayores presiones superficiales.

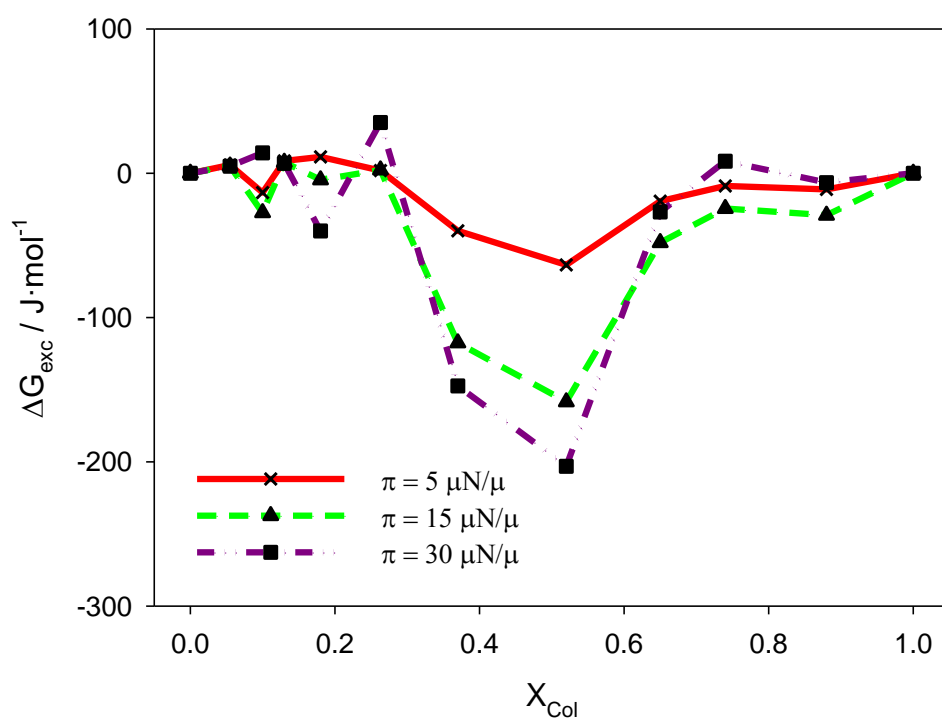


Figura 14. Representación gráfica de la energía libre de exceso (ΔG_{exc}) frente a la fracción molar de colesterol a tres presiones superficiales de monocapas formadas a 25 °C con DPPC:DDAB (3:1) y colesterol.

Hay que destacar también la aparición de un mínimo a las tres presiones, tanto para el líquido expandido como el líquido compacto, en torno a las fracciones molares de colesterol 0.4 y 0.5, lo que supone la mayor estabilidad de la película. A diferencia de lo observado para las películas basadas en DMPC, a fracciones molares de colesterol más bajas, este esteroide no tiene prácticamente efecto en la estabilidad de las películas.

4. CONCLUSIONES

- Las películas de mezclas ternarias DMPC / DDAB / colesterol presentan áreas de exceso por molécula y energías libres de exceso negativas, en comparación con la mezcla ideal formada con DMPC / DDAB (en proporción 3:1) y colesterol. La presencia de colesterol en la monocapa, por tanto, proporciona estabilidad al sistema.
- Existen dos composiciones óptimas en términos de estabilidad: $X_{\text{col}} = 0.5$ y $X_{\text{col}} = 0.1$. Esta última puede usarse para aumentar la estabilidad de los liposomas utilizados como portadores de fármacos.
- Las monocapas de Langmuir formadas con la mezcla ternaria DPPC / DDAB / colesterol tienen valores del área por molécula más bajos que los correspondientes a una mezcla ideal a bajas presiones superficiales. Esto origina valores negativos de área de exceso y de energía libre de exceso, tomando como referencia las películas formadas por una mezcla binaria de DPPC / DDAB y las formadas por colesterol.
- El módulo de compresibilidad máximo de las películas DPPC:DDAB (3:1) / colesterol aumenta linealmente con la fracción molar de colesterol.
- Según el análisis termodinámico, las composiciones más estables en películas formadas por mezclas DPPC:DDAB:colesterol implican fracciones molares de colesterol entre $X_{\text{col}} = 0.3$ y $X_{\text{col}} = 0.5$. Estas mezclas pueden usarse en el desarrollo de plataformas complejas formadas por liposomas funcionalizados como portadores de fármacos.

5. BIBLIOGRAFÍA

Brezesinski G, Möhwald H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Adv Colloid Interf Sci.* 2003;100:563-84.

Dhar S, Daniel WL, Giljohann DA, Mirkin CA, Lippard SJ. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum (IV) warheads. *J Am Chem Soc.* 2009;131(41):14652-3.

Gaines GL. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces (Gaines GL Ed.). Interscience Publishers, Michigan, 1966.

Hianik T, Øpstad CL, Šandorová J, Garaiová Z, Partali V, Sliwka HR. Surface properties of polyene glycol phospholipid monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2017;202:13–20.

Jin Y, Wang S, Tong L, Du L. Rational design of didodecyldimethylammonium bromide-based nanoassemblies for gene delivery. *Colloids Surf B.* 2015;126:257-64.

Kong FY, Zhang JW, Li RF, Wang ZX, Wang WJ, Wang W. Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications. *Molecules.* 2017;22(9):1445.

Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *J Amer Chem Soc.* 1916;38(11):2221-95.

Lipkowski J. Building biomimetic membrane at a gold electrode surface. *Phys Chem Chem Phys.* 2010;12(42):13874-87.

Mohamadi S, Tate DJ, Vakurov A, Nelson A. Electrochemical screening of biomembrane-active compounds in water. *Anal Chim Acta.* 2014;813:83-9.

Nascimento JM, Franco OL, Oliveira MD, Andrade CA. Evaluation of Magainin I interactions with lipid membranes: an optical and electrochemical study. *Chem Phys Lipids.* 2012;165(5):537-44.

Needham D, Evans E. Structure and mechanical properties of giant lipid (DMPC) vesicle bilayers from 20 °C below to 10 °C above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24 °C. *Biochemistry.* 1988;27(21):8261-9.

Pedrosa JM. Organización molecular en películas de Langmuir y Langmuir-Blodgett: propiedades electroquímicas y aplicación a la detección de dióxido de nitrógeno. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 2002.

Ringstad L, Protopapa E, Lindholm-Sethson B, Schmidtchen A, Nelson A, Malmsten M. An electrochemical study into the interaction between complement-derived peptides and DOPC mono-and bilayers. *Langmuir.* 2008;24(1):208-16.

Rueda M, Prieto F, Navarro I, Romero R. Phospholipid and gramicidin-phospholipid-coated mercury electrodes as model systems of partially blocked electrodes. *J Electroanal Chem.* 2010;649(1–2):42–7.

Yeagle PL, Hutton WC, Huang CH, Martin RB. Structure in the polar head region of phospholipid bilayers: a phosphorus-31 {proton} nuclear Overhauser effect study. *Biochemistry.* 1976;15(10):2121-4.



***CAPÍTULO 3: ENCAPSULACIÓN DE DOXORUBICINA EN
LIPOSOMAS FUNCIONALIZADOS CON NANOPARTÍCULAS
DE ORO MEDIANTE GRADIENTE DE pH
TRANSMEMBRANA***

ÍNDICE CAPÍTULO 3

1. INTRODUCCIÓN	113
1.1. Doxorubicina y liposomas	113
1.2. Doxorubicina y liposomas termosensibles.....	118
1.3. Doxorubicina, liposomas termosensibles y nanopartículas de oro	119
1.4. Hipótesis y objetivos	120
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	121
2.1. Productos y reactivos	121
2.2. Estudios de solubilidad de DXR	122
2.3. Cuantificación de DXR por HPLC mediante detección de fluorescencia.....	122
2.4. Caracterización morfológica de los cristales de DXR mediante microscopía electrónica de barrido.....	123
2.5. Preparación de liposomas	123
2.5.1. Formación de liposomas unilaminares por evaporación en capa fina.....	123
2.5.2. Generación del gradiente iónico transmembrana	124
2.5.3. Encapsulación de DXR	125
2.6. Purificación mediante separación en fase sólida	126
2.7. Funcionalización de los liposomas de DXR con las AuNPs	127
2.8. Estudios de caracterización.....	128
2.8.1. Caracterización fisicoquímica.....	128
2.8.2. Determinación de la eficacia de encapsulación	128
2.8.3. Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	129
2.9. Estudios de liberación <i>in vitro</i>	129
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	130
3.1. Estudios de solubilidad de DXR	130
3.1.1. Morfología de los precipitados de DXR.....	131
3.2. Características de los liposomas	132
3.3. Estudios de liberación <i>in vitro</i> de DXR	135
3.4. Modelo cinético de la liberación de DXR	137
4. CONCLUSIONES	140
5. BIBLIOGRAFÍA	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de doxorubicina (http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.29400.html).....	114
Figura 2. Intercalación de DXR en el ADN A) TOP2b facilita la replicación y la síntesis de ADN (ADN normal). B) DXR forma un complejo a través de las bases G en ambas cadenas del ADN, evitando así la actividad de TOP2b y la síntesis de ADN. TOP2b: topoisomerasa 2b, G: guanina, C: citosina (Adaptado de Mobaraki et al., 2017a).....	115
Figura 3. Efectos de DXR sobre la muerte celular. DXR conduce a la formación de ROS, peroxidación lipídica, daño en el ADN y en las mitocondrias, alteración en el control del calcio, inducción de P53 y vías apoptóticas. La permeabilidad del canal de calcio aumenta tras la entrada de DXR, lo que hace que aumente el nivel de calcio en el sarcómero y, por tanto, la concentración de calcio citoplasmático y mitocondrial, lo que conduce a la inflamación celular. Tras la activación de la vía P53, se incrementa la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bcl-2 / Bax, Puma, Noxa), que desencadenan el flujo de Cyt C desde las mitocondrias al citoplasma. Cyt C desencadena la activación de la caspasa 9 y después la caspasa 3, induciendo así la apoptosis. Además, las ROS generadas activan estas caspasas, induciendo la apoptosis a través de la interacción con FADD. Además, DXR bloquea la síntesis de ADN mediante la supresión de TOP2b por intercalación en el ADN. ROS: especies reactivas de oxígeno, Cyt C: citocromo C, FADD: proteína asociada a Fas (Adaptado de Mobaraki et al., 2017).	115
Figura 4. Estructura química de dipalmitoilfosfatidilcolina (Franceschia y Pereira, 2016).....	119
Figura 5. Mecanismo de carga remota de DXR por gradiente iónico transmembrana usando sales de sulfato de amonio (Adaptado de Hwang et al., 2016).	126
Figura 6. Equipo de vacío manual WSPE (https://www.medicaexpo.es/prod/labtech/product-112335-742706.html).	126
Figura 7. Los liposomas unilaminares se prepararon por la técnica de evaporación en capa fina, seguido de extrusión, se cargan con DXR por el método de gradiente transmembrana de amonio y se recubren con las AuNPs (Adaptada de http://www.ntno.org/v02p0295.htm).....	127
Figura 8. Solubilidad de la DXR en diferentes soluciones salinas en función del pH.....	130
Figura 9. Imágenes SEM de (A) sal de sulfato pH 4, (B) sal de citrato pH 7, (C) sal de sulfato pH 7, (D) sal de fosfato pH 7.....	132
Figura 10. Imágenes FESEM de A) L1, B) L2, C) AuNPs-L1, D) AuNPs-L2, E) L1-D, F) L2-D, G) AuNPs-L1-D, H) AuNPs-L2-D, y I) AuNPs (escala: 200 nm).....	135
Figura 11. Perfiles de liberación de DXR a partir de L1-D, L2-D y AuNPs-L1-D y AuNPs-L2-D que fueron incubados a una temperatura de 37 °C o 42 °C (n=2).....	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Liposomas de DXR aprobados para tratamientos clínicos o bajo evaluación clínica. FDA: Food and Drug Administration. EMA: Agencia Europea del Medicamento. EGFR-IL: Epidermal Growth Factor Receptor-Interleucín. TLD: Top-Level Domain.....116

Tabla 2. Denominación y características de los lotes elaborados. DXR: doxorubicina. Ch(2.5) y Ch(40): colesterol a concentraciones de 2.5 mol% y 40 mol% respectivamente. AuNPs: nanopartículas de oro.....128

Tabla 3. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los liposomas en términos de tamaño de partícula, potencial zeta, índice de polidispersión (IP) y porcentaje de encapsulación (PdE).....133

Tabla 4. Datos cinéticos obtenidos de la liberación de DXR hacia el tampón Hepes pH 7.4 a dos temperaturas diferentes, utilizando ecuaciones de orden cero, Higuchi y Peppas.....139

CAPÍTULO 3

1. INTRODUCCIÓN

Genéricamente, se denomina cáncer al conjunto de enfermedades con diferente etiología, pronóstico y tratamiento, caracterizadas por el excesivo y descontrolado crecimiento celular, que invade y daña los tejidos. La falta de control de la proliferación celular es el resultado de múltiples alteraciones en el ADN de las células, las cuales resultan en mutaciones en los genes que codifican para proteínas reguladoras de este proceso (Weinberg, 2007).

El diseño de novedosos agentes antitumorales que permitan la destrucción de células malignas sin afectar a los tejidos sanos se ha convertido en uno de los mayores desafíos en la biomedicina. Por lo tanto, la acumulación selectiva de los fármacos en las células diana constituye un objetivo central de los sistemas de administración de éstos (Luo et al., 2015). Con este propósito se han utilizado ampliamente los liposomas, los cuales han revolucionado la terapia contra el cáncer por sus amplias aplicaciones clínicas debido a que superan las limitaciones de quimioterapia convencional al mejorar la biodisponibilidad y estabilidad del fármaco (Torchilin, 2005).

Los liposomas fueron los primeros sistemas de administración de fármacos basados en nanotecnología aprobados para su aplicación clínica en terapia anticancerígena debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Algunas de estas formulaciones ya están en el mercado y muchas más están siendo sometidas a investigación y ensayos clínicos (Pandey et al., 2016).

1.1. Doxorubicina y liposomas

Doxorubicina (DXR), hidroxildaunorubicina o adriamicina pertenece a la familia de las antraciclina (Figura 1) y se aísla a partir de un pigmento producido por *Streptomyces peucetius*, si bien actualmente tiene un origen semisintético a partir de daunorubicina (Minotti et al., 2004). Esta molécula fue aprobada para su uso médico en los Estados Unidos en 1974 (Cagel et al., 2017). En la actualidad se trata de uno de los fármacos anticancerígenos más eficientes, utilizado para tratar tumores sólidos y neoplasias hematológicas (Hrelia et al., 2002). Sin embargo, a pesar de su efectividad, la presencia

CAPÍTULO 3

de importantes efectos adversos en los pacientes, particularmente su cardiotoxicidad, limita su uso (Rahman et al., 2007).

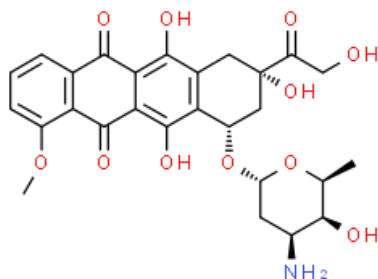


Figura 1. Estructura química de doxorubicina (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.29400.html>).

Los mecanismos implicados en la citotoxicidad y en la cardiotoxicidad son diferentes. Como se recoge en la Figura 2, el mecanismo antineoplásico de DXR se ha atribuido a la intercalación del anillo plano de la antraciclina en la hélice de ADN y/o la unión covalente a proteínas involucradas en la replicación y transcripción de ADN (Sardão et al., 2009).

Por otro lado, también se ha propuesto que la generación de especies reactivas de oxígeno puede ser responsable de la cardiotoxicidad de DXR (Alyane et al., 2008). En la Figura 3 se muestra el mecanismo de muerte celular inducido por la DXR, a la cual contribuye el estrés oxidativo generado por este fármaco.

CAPÍTULO 3

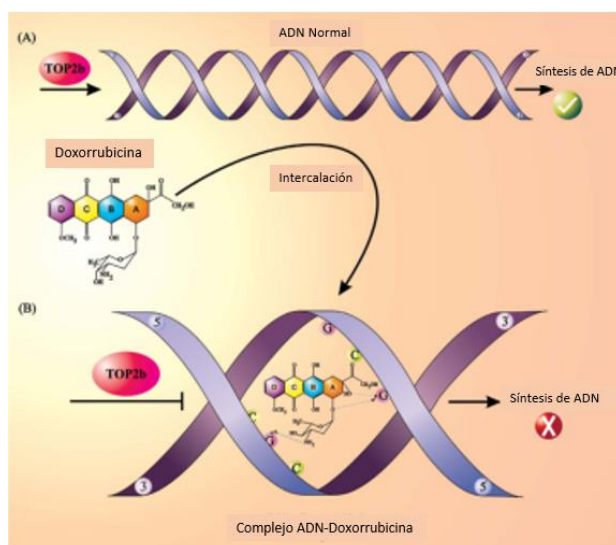


Figura 2. Intercalación de DXR en el ADN A) TOP2b facilita la replicación y la síntesis de ADN (ADN normal). B) DXR forma un complejo a través de las bases G en ambas cadenas del ADN, evitando así la actividad de TOP2b y la síntesis de ADN. TOP2b: topoisomerasa 2b, G: guanina, C: citosina (Adaptado de Mobaraki et al., 2017a).

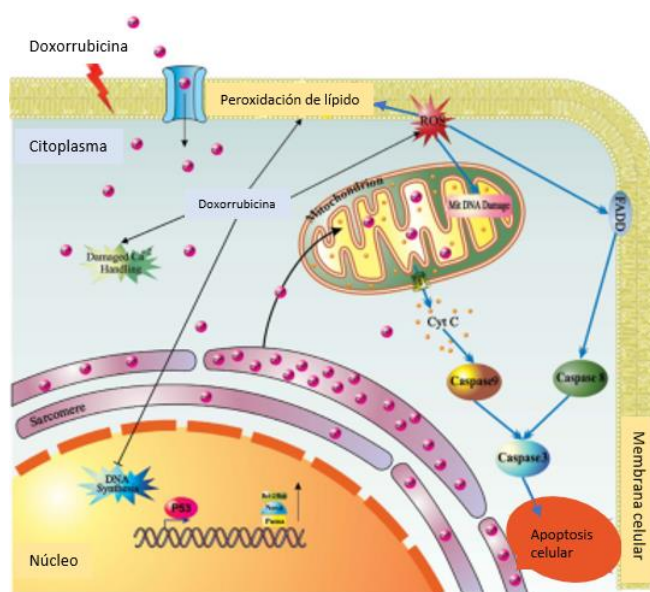


Figura 3. Efectos de DXR sobre la muerte celular. DXR conduce a la formación de ROS, peroxidación lipídica, daño en el ADN y en las mitocondrias, alteración en el control del calcio, inducción de P53 y vías apoptóticas. La permeabilidad del canal de calcio aumenta tras la entrada de DXR, lo que hace que aumente el nivel de calcio en el sarcómero y, por tanto, la concentración de calcio citoplasmático y mitocondrial, lo que conduce a la inflamación celular. Tras la activación de la vía P53, se incrementa la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bcl-2 / Bax, Puma, Noxa), que desencadenan el flujo de Cyt C desde las mitocondrias al citoplasma. Cyt C desencadena la activación de la caspasa 9 y después la caspasa 3, induciendo así la apoptosis. Además, las ROS generadas activan estas caspasas, induciendo la apoptosis a través de la interacción con FADD. Además, DXR bloquea la síntesis de ADN mediante la supresión de TOP2b por intercalación en el ADN. ROS: especies reactivas de oxígeno, Cyt C: citocromo C, FADD: proteína asociada a Fas (Adaptado de Mobaraki et al., 2017).

CAPÍTULO 3

La presencia de estos mecanismos tan diferentes sugiere que las toxicidades agudas y crónicas asociadas a DXR podrían reducirse y podrían usarse dosis más bajas si el fármaco pudiera dirigirse de manera más eficaz a las células cancerosas mediante el uso de sistemas nanotransportadores. En la Tabla 1 se muestra una recopilación de este tipo de formulaciones en los que se ha conseguido dirigir la DXR a nivel celular.

Tabla 1. Liposomas de DXR aprobados para tratamientos clínicos o bajo evaluación clínica. FDA: *Food and Drug Administration*. EMA: Agencia Europea del Medicamento. EGFR-IL: *Epidermal Growth Factor Receptor-Interleucin*. TLD: *Top-Level Domain*.

Nombre/Año de aprobación	Tipo de nanotransportador	Aplicación/Indicación	Referencias
Doxil®/ FDA (1995) Caelyx®/ EMA (1996)	Liposomas pegilados	Cáncer de ovario Sarcoma de Kaposi Mieloma múltiple	Bhowmik et al., 2018
Myocet®/ EMA (2000)	Liposomas no pegilados	Cáncer de mama metastásico	Collier et al., 2017
ThermoDox®/ Ensayos clínicos (2016)	Liposomas termosensibles	Cáncer de mama recurrente Carcinoma hepatocelular Cáncer de riñón Tumores sólidos	Anselmo y Mitragotri, 2019(a)
MM-302®/ Ensayos clínicos (2016)	Liposomas pegilados dirigidos a HER2	Cáncer de mama	Miller et al., 2016
Anti-EGFR-IL-dox®/ Ensayos clínicos	Anti-EGFR inmunoliposomas	Cáncer de mama avanzado (EGFR triple negativo) Gliomas de alto grado	Menon et al., 2017
TLD-1/Talidox®/ Ensayos clínicos	Formulación nueva de liposomas	Tumores sólidos avanzados	Anselmo y Mitragotri, 2019(b)

Diversos estudios han demostrado que los sistemas de administración de DXR asociada a liposomas mejoran el índice terapéutico contra las células tumorales (Bing et al., 2019), exhibiendo en general, eficiencias comparables a las antraciclinas convencionales, pero con menos efectos secundarios, especialmente en lo que respecta a la cardiotoxicidad (Harrington et al., 2002).

CAPÍTULO 3

Asimismo, se ha demostrado que la toxicidad *in vivo* de DXR disminuye con el aumento de la relación fármaco-lípidos (Mayer et al., 1989). Por lo tanto, es deseable lograr una alta eficacia de encapsulación de DXR en los liposomas adecuadamente formulados en dicha relación.

Hasta el momento, se han descrito en la literatura cuatro estrategias diferentes de encapsular DXR en liposomas, todas ellas por carga remota, mediante la cual la carga es impulsada por la presencia de un gradiente de pH, de manganeso, de sulfato o de citrato. Este concepto de carga sigue un principio y es que la base libre de DXR difunda a través de la bicapa lipídica del liposoma hacia el compartimento acuoso interno, en el cual tiene lugar una modificación en el estado fisicoquímico del fármaco. Dicho cambio hace que se inhiba la repermearción del mismo a través de la membrana, resultando en su acumulación dentro de los liposomas. Así, en el caso del gradiente de pH transmembrana, la fase acuosa del interior del liposoma es ácida, mientras que el valor de pH exterior se ajusta a las condiciones fisiológicas. La fracción de DXR no ionizada difunde a través de la bicapa y, una vez en contacto con el medio ácido, se convierte en DXR protonada en el interior de la vesícula, la cual queda atrapada hasta que se vaya produciendo su salida a una velocidad que dependerá de factores como son: la composición de la bicapa lipídica del liposoma, la formación de nanoprecipitados, la temperatura y el pH del medio exterior (Maurer et al., 2001). Esta liberación localizada activada de DXR a partir de formulaciones liposomales cumple aún más su función si la concentración del fármaco es elevada en la zona tumoral, lo que incrementaría el valor de su biodisponibilidad (Jiang et al., 2016).

Por tanto, basándonos en que los efectos terapéuticos máximos solo se pueden lograr cuando las células tumorales están sujetas a una exposición masiva del fármaco, es importante retener dos atributos claves a la hora de optimizar las formulaciones liposomales de fármacos anticancerígenos, incluyendo:

- 1) Prolongación del tiempo de circulación de los liposomas hasta su acumulación pasiva en los tumores.
- 2) Retención del fármaco encapsulado hasta su liberación en las células dianas del tumor.

La tecnología actual nos permite diseñar liposomas que exhiban una buena estabilidad y características de acumulación tumoral *in vivo*. Sin embargo, ello no se traduce necesariamente en una mejora en la actividad terapéutica del fármaco encapsulado (Zamboni et al., 2004). La razón estriba en que la mayoría las formulaciones de liposomas estables pueden retener excesivamente el fármaco encapsulado en su interior, de manera que posteriormente no se libera para ejercer sus efectos citotóxicos en las células tumorales. Por lo tanto, es necesario incorporar al diseño del nanotransportador, alguna estrategia que permita una activación que desencadene la liberación del contenido encapsulado.

1.2. Doxorubicina y liposomas termosensibles

Existen diferentes mecanismos de activación de los liposomas descritos en la literatura, incluyendo aquellos que se basan en cambios existentes en el microambiente local, como la disminución del pH hasta valores ligeramente ácidos, y la presencia de enzimas específicas (Vermehren et al., 1998), así como el uso de factores externos desencadenantes como la luz (Shum et al., 2001), los ultrasonidos (Unger et al., 1998) y el calor (Needham y Dewhirst, 2001).

Entre los diversos estímulos desencadenantes de la liberación del contenido liposomal, el uso de calor o hipertermia ha sido estudiado ampliamente por las numerosas ventajas que ofrece. En primer lugar, la hipertermia puede aumentar el flujo sanguíneo tumoral y la permeabilidad microvascular; además, se ha demostrado que aumenta la extravasación y la acumulación de liposomas como respuesta al calentamiento local del tumor (Kong et al., 2001). Por lo tanto, la hipertermia puede favorecer el acceso de los liposomas al tumor y aumentar la exposición de las células tumorales al fármaco liberado de los liposomas. En segundo lugar, la hipertermia se ha utilizado como terapia adyuvante para cirugía, radiación y quimioterapia, y recientemente, se ha demostrado que es directamente citotóxica para las células tumorales (Mai et al., 2016). En tercer lugar, se pueden lograr efectos citotóxicos mayores cuando se usa la hipertermia en combinación con varios agentes quimioterápicos que pueden administrarse mediante la encapsulación en liposomas (Deda y Araki, 2015). A la luz de estos beneficios terapéuticos, la combinación de hipertermia y administración de agentes

quimioterápicos en liposomas para tratar tumores sólidos constituye un campo de aplicación muy interesante en investigación.

En el diseño de liposomas termosensibles, es necesario elegir un fosfolípido que tenga una temperatura de transición de fase (T_c) en el rango de temperatura de la hipertermia local clínicamente alcanzable (41 – 42 °C) para permitir una liberación dirigida del fármaco. En este sentido, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), cuya estructura química se muestra en la Figura 4 y que tiene una T_c de 41.5 °C, ha sido el lípido de elección como constituyente primario de liposomas termosensibles.

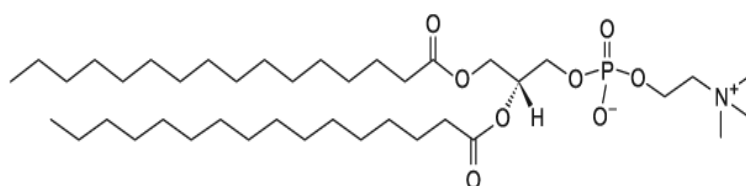


Figura 4. Estructura química de dipalmitoilfosfatidilcolina (Franceschia y Pereira, 2016).

En el intervalo de temperaturas de T_c mencionados anteriormente, coexisten los estados de gel y de líquido cristalino de las membranas lipídicas, aumentando su permeabilidad a pequeñas moléculas como iones, y fármacos como DXR (Forbes et al., 2014).

1.3. Doxorubicina, liposomas termosensibles y nanopartículas de oro

Se ha descrito en varios estudios el uso de las AuNPs para la administración de fármacos contra un determinado tipo de tumor, así como para superar las resistencias múltiples a fármacos anticancerígenos (Dreaden et al., 2012; Lee et al., 2014). Asimismo, se han propuesto varios métodos de funcionalización de las AuNPs para la liberación selectiva de DXR, siendo el más destacado entre ellos la pegilación de las AuNPs creando grupos funcionales para la incorporación de la DXR (Gu et al., 2012).

Se han llevado a cabo también investigaciones, con un enfoque fototérmico, que utilizan nanosistemas de oro, como nanopartículas (Gautier et al., 2013), *nanorods* (Dickerson et al., 2008) y *nanoboxes* (Chen et al., 2007) para lograr eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer. Esta propuesta se basa en que estas AuNPs absorben la luz en la región del infrarrojo cercano (NIR) (700–900 nm) y, por lo tanto, pueden presentar

efectos fototérmicos inducidos por radiación NIR (Huang et al., 2008). Sin embargo, se ha conseguido una baja acumulación de los fármacos anticancerígenos en los nanotransportadores constituidos por las AuNPs, lo cual se traduce en un bajo rendimiento *in vivo* de la terapia fototérmica (PTT).

Para superar estas limitaciones, muchos estudios se han centrado en combinar los liposomas termosensibles con el efecto fototérmico provocado por las AuNPs y la radiación NIR para lograr un posible efecto sinérgico de liberación del fármaco en el sitio diana (Yan et al., 2011). En este sentido, la membrana de los liposomas termosensibles con las AuNPs ancladas a su superficie puede desestabilizarse al alcanzar la temperatura de transición de fase de la composición lipídica cuando se aplica la radiación IR, desencadenando la liberación de los fármacos que contienen este tipo de liposomas (Troutman et al., 2009). También Kwon et al. (2015) lograron una liberación efectiva de DXR desde los nanotransportadores constituidos por liposomas termosensibles con AuNPs ancladas a su superficie en el microambiente tumoral cuando se aplicó radiación NIR, hecho que ha podido utilizarse para una amplia gama de aplicaciones terapéuticas para diversas enfermedades.

1.4. Hipótesis y objetivos

Mediante el empleo de la tecnología de los liposomas termosensibles, se ha conseguido liberar DXR encapsulada en respuesta a un aumento local de temperatura mediado por ultrasonidos de alta intensidad (Grull y Langereis, 2012) o por inmersión en baño de agua termostático (López-Noriega et al., 2014).

Por otro lado, aunque el colesterol puede mejorar la estabilidad *in vivo* de los liposomas, también amplía y disminuye la T_c , que es la propiedad que fundamentalmente dicta la termosensibilidad de los liposomas (Merlin, 1991).

Además, se hace patente el beneficio que podría obtenerse en la mejora del comportamiento termosensible de los sistemas elaborados tras la incorporación de las AuNPs en la superficie de los liposomas. La capacidad de estas nanopartículas para transmitir calor a las estructuras fosfolipídicas de los liposomas, además de aprovechar

la interacción del Au con la DXR, redundaría en un incremento de la liberación del fármaco en la zona deseada.

Así, el **OBJETIVO GENERAL** del presente capítulo se centra en desarrollar una formulación de liposomas cargados con DXR y funcionalizados con AuNPs en superficie, con las propiedades adecuadas para un posible uso en terapia anticancerígena.

Para ello, se llevaron a cabo los siguientes **objetivos parciales**:

1. Poner a punto la técnica de elaboración de los liposomas por carga remota en gradiente de pH-transmembrana de la DXR, que supuso llevar a cabo un estudio de solubilidad de la DXR en distintas sales de amonio y analizar las propiedades de tamaño y estructura de los precipitados con el fin de seleccionar la mejor composición.
2. Analizar las propiedades de dos formulaciones de liposomas conteniendo dos proporciones de colesterol diferentes que contenían DXR, mediante el mismo método de preparación.
3. Estudiar el efecto de la temperatura y de la composición de la bicapa lipídica de las formulaciones de liposomas sobre la liberación de la DXR.
4. Analizar la cinética de liberación de DXR desde las formulaciones elaboradas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Productos y reactivos

Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (Ch) y Sephadex® G-50 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Barcelona, España). Bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) fue proporcionado por Sigma-Aldrich (Italia). La solución de nanopartículas de oro (AuNPs) se obtuvo de Nanovex Biotechnologies (Asturias, España). Se utilizó agua desionizada purificada mediante un sistema Milli-Q® (Millipore). Las membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 800, 200 y 100 nm se adquirieron en Millipore (Condado de Cork, Irlanda).

Los reactivos Na_3PO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl, NaOH, Hepes para soluciones tampón (grado para análisis, Panreac AppliChem®), cloroformo estabilizado con amileno (EPR

grade, LabKem), solución de Tritón X-100 (Sigma Aldrich®, Italia), doxorubicina (DXR, Sigma Aldrich®), se utilizaron sin necesidad de purificación adicional. El tampón fosfato ajustado a pH 7.4 (para representar las condiciones plasmáticas) se preparó de acuerdo con las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), utilizando reactivos de grado analítico.

2.2. Estudios de solubilidad de DXR

A la hora de diseñar una formulación de liposomas con idea de encapsular el fármaco por el método activo de gradiente transmembrana, es de suma importancia conocer el comportamiento del fármaco en distintos medios de disolución y determinar el intervalo de pH de mínima solubilidad de esta molécula con el fin de predecir el estado en que se encontrará en el interior de los liposomas una vez encapsulada. Para ello, se planificó la realización de un ensayo de solubilidad de DXR en diferentes sales de amonio, a dos pH: 4 y 7, con el fin de simular el medio ácido del interior de las vesículas y el entorno fisiológico, respectivamente.

El ensayo se llevó a cabo utilizando placas *MultiScreen® Solvinert 0.45 µm* (Millipore) de 96 pocillos. Se prepararon soluciones acuosas de diferentes sales de amonio: sulfato, fosfato y citrato, ajustadas a pH 4 y 7. Los valores de pH se ajustaron con amoníaco o ácido clorhídrico. Se añadieron 400 µL de las soluciones de la sal a 100 µL de disolución de DXR en HEPES (3.45 mM). A continuación, la placa cerrada se mantuvo a 50 rpm durante 2 horas en un baño agitador oscilante (*Baño 320 OR Unitronic OR, Selecta P®*) a 25 °C. Finalmente, se filtraron las muestras a vacío empleando un sistema de filtración (*Millipore, MultiScreen® HTS Manifold*) y el contenido de DXR se cuantificó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

2.3. Cuantificación de DXR por HPLC mediante detección de fluorescencia

La cuantificación de DXR se llevó a cabo mediante HPLC. Para la recopilación y cálculo de datos, se utilizó el software EZChromElite Data System Manager, equipado con un detector de fluorescencia L-2485 a una longitud de onda de excitación de 475 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm. Las condiciones cromatográficas utilizadas han sido ya descritas por Wei et al. (2008), con ligeras modificaciones: separaciones

isocráticas, columna Zorbax SB C18 (4.6 x 150 mm 3.5 m), fase móvil (solución de amonio 0.1% ajustada a pH 3.0 con ácido fórmico: metanol, en proporción 30:70 v/v), volumen de inyección de 20 µL y flujo de 1 mL/min. Se utilizaron tiempos de retención de 3.5 min típicos de la DXR y áreas de pico de los estándares (1.2 – 6.0 mg/mL DXR) en fase móvil para generar las respuestas.

2.4. Caracterización morfológica de los cristales de DXR mediante microscopía electrónica de barrido

La caracterización morfológica de los cristales de DXR obtenidos del anterior estudio de solubilidad y su posterior análisis se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, *Philips XL30*) con filamento de tungsteno. Se trata de una de las técnicas más versátiles para el estudio de superficies de distintos materiales gracias a la combinación de elevada resolución y gran profundidad de campo. Mediante este tipo de microscopios se pueden observar distintos objetos de tamaños que van desde aproximadamente milímetros hasta unos cuantos nanómetros.

Para nuestro estudio, se fijaron las muestras sobre soportes y fueron recubiertas con oro-paladio bajo una atmósfera de argón usando un módulo de pulverización en condiciones de vacío. Se observaron en el equipo utilizando imágenes con sistema de detección de electrones secundarios a 20 kV para examinar la morfología y estructura de la superficie de los cristales.

2.5. Preparación de liposomas

2.5.1. Formación de liposomas unilaminares por evaporación en capa fina

Como continuación a la optimización de las formulaciones en el Capítulo 1 de la presente Memoria, se llevó a cabo la elaboración de liposomas conteniendo DXR como fármaco antineoplásico. Respecto a la formulación optimizada en el capítulo anterior, se aplicaron varias modificaciones: sustituir la fosfatidilcolina por DPPC, ya que se trata de un fosfolípido puro del cual se extrae más información a la hora de los estudios termodinámicos. Por otra parte, se introdujo una modificación en cuanto a la concentración de colesterol. Partiendo de la concentración empleada en el anterior trabajo, se llevó a cabo un estudio comparativo de cómo afecta el nivel de colesterol en

la formulación de los liposomas. En concreto, se evaluó cómo afectaban estos parámetros al anclaje de las AuNPs a la superficie de las vesículas y a la eficacia de encapsulación de DXR. Para ello, se prepararon dos formulaciones de liposomas: L1 y L2, en las que se modificó el porcentaje de colesterol. Los porcentajes de la formulación L1 se basan en los estudios de optimización mostrados en el capítulo 1, empleando ~2.5% mol (Naitlho et al., 2019), mientras que la otra formulación, L2, con una proporción de colesterol elevada (~40% mol), fue determinada como la más estable desde el punto de vista termodinámico, mediante estudios llevados a cabo en la balanza de Langmuir mostrados en el capítulo 2 (Prieto et al., 2018).

Para elaborar los liposomas, se usó el método de evaporación en capa fina. Brevemente, esta técnica consiste en disolver los lípidos previamente pesados: DPPC, colesterol y DDAB (en proporciones de L1: 75.25:3.63:21.12 mol % y L2: 45:40:15 mol %) en cloroformo y secar posteriormente bajo rotaevaporación. La película lipídica seca se hidrató con 3 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 mM en un baño termostatizado a 42 °C y se dispersó formando vesículas multilaminares tras mantener las muestras 5 min en el baño de agua alternando con 1 min de vórtex. El proceso se repitió cinco veces y los liposomas obtenidos se extruyeron a través de una membrana de policarbonato (800 y 200 nm) tres veces con ayuda de un extrusor (*Avanti, Alabaster, AL*) para conseguir liposomas unilaminares con un tamaño vesicular aproximado de 250 nm.

2.5.2. Generación del gradiente iónico transmembrana

Los liposomas unilaminares preparados anteriormente en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 mM se separaron de la solución ácida externa mediante el método de diálisis. Para ello, se hidrató una membrana de diálisis MW 12-14000 de unos 5 cm de longitud en tampón Hepes pH 7.4 durante 30 min. En su interior se introdujeron los liposomas formulados previamente y la membrana se depositó en una solución de tampón Hepes 7.4, manteniéndose en agitación magnética a 22-24 °C durante unas 6 h, sin necesidad de recambiar el medio de diálisis. Con este proceso de diálisis, lo que se consigue es que se cree un gradiente iónico entre el interior del liposoma y el medio externo para proceder a continuación a la carga de DXR.

2.5.3. Encapsulación de DXR

DXR se encapsuló en los liposomas preformados a través del método transmembrana, que consiste en un mecanismo de carga activa gracias a un gradiente iónico. Es considerado como uno de los mejores métodos para lograr altas concentraciones de fármaco dentro de los liposomas, siempre que su estructura permita una fácil penetración y difusión a través de la bicapa lipídica.

Por otra parte, la afinidad de DXR por el compartimento acuoso interno de los liposomas no permite la penetración y difusión del fármaco desde los mismos, facilitando su acumulación en el núcleo del liposoma (Cern et al., 2012). DXR, como base débil anfipática, por su log P a pH 7 que es de 1.27, es considerada como candidata adecuada para llevar a cabo la encapsulación por el gradiente transmembrana, teniendo en consideración que esta base débil posee tres constantes de ionización ($pK_{a1}=7.34$, $pK_{a2}=8.46$, $pK_{a3}=9.46$) (Barenholz, 2003);

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin#section=Decomposition>).

En el presente trabajo, la encapsulación de DXR por gradiente transmembrana se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Gilbert et al. (2004) con algunas modificaciones. Para ello, en primer lugar, los liposomas se incubaron a 42 °C en un baño termostatzado durante 5 min. A continuación, se añadió poco a poco la disolución de DXR, agitando a intervalos regulares de tiempo. Finalmente, los liposomas se dejaron en reposo durante toda la noche en refrigeración para su posterior purificación mediante la separación en fase sólida. En la Figura 5 se recoge un esquema representativo del proceso de carga de DXR en los liposomas con $(NH_4)_2SO_4$ como sal donadora de NH_4^+ .

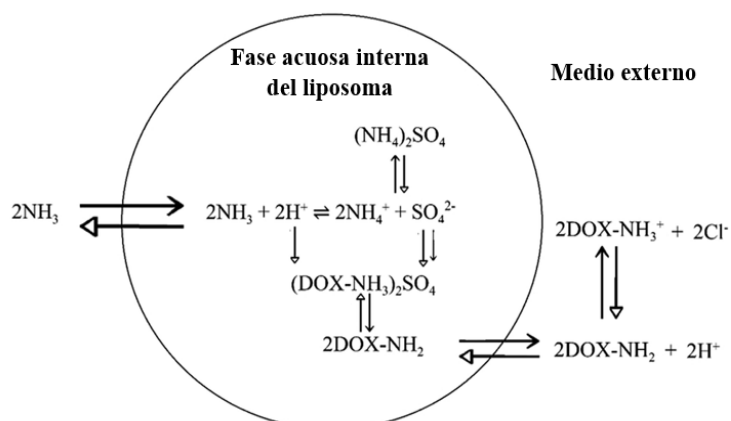


Figura 5. Mecanismo de carga remota de DXR por gradiente iónico transmembrana usando sales de sulfato de amonio (Adaptado de Hwang et al., 2016).

2.6. Purificación mediante separación en fase sólida

Una vez finalizado el proceso de atrapamiento de DXR en el interior de las vesículas, la siguiente etapa consistió en separar la fracción no encapsulada de la fracción que se mantiene en el interior de los liposomas. Para ello, se emplearon columnas rellenas de una fase estacionaria de Sephadex® G-50, para separación en fase sólida. El montaje fue similar al recogido en la Figura 6.



Figura 6. Equipo de vacío manual WSPE (<https://www.medicaexpo.es/prod/labtech/product-112335-742706.html>).

En primer lugar, se procedió a la hidratación del Sephadex® en el tampón externo utilizado para la elaboración de los liposomas (Hepes 7.4). Las columnas se fabricaron a

partir de jeringas de 2 mL sin agujas, colocando en la base una pequeña porción de lana de vidrio, que se insertó firmemente en la jeringa vacía utilizando el émbolo de plástico como ayuda, creando así un tapón para la columna con el fin de evitar la elución del material formador de la fase estacionaria. Las columnas se colocaron en un aparato de vacío manual (WSPE), y cada jeringa se llenó con el Sephadex®, asegurándose de que no hubiera burbujas de aire en su interior. Las columnas se agitaron suavemente para compactar la solución, añadiendo más Sephadex® hasta alcanzar una altura uniforme en todas ellas. Con el fin de compactarlas, el exceso de tampón se eliminó aplicando vacío.

Previamente a añadir la muestra de liposomas, las columnas fueron pre-hidratadas con 100 – 200 μ L de tampón externo, e inmediatamente se añadieron 300 μ L de la muestra, recogiendo los liposomas con la DXR encapsulada en los primeros 1.5 mL, seguido de la DXR libre en unos 3 mL de Hepes 7.4.

2.7. Funcionalización de los liposomas de DXR con las AuNPs

Los complejos AuNPs-DXR-liposomas se prepararon añadiendo la suspensión de AuNPs (de un diámetro aproximado de 10 nm) a la dispersión de liposomas en una relación de 8/3 (v/v), la cual fue previamente optimizada en el capítulo anterior, manteniendo la agitación durante un 1 min.

En la Figura 7 se recoge un esquema de las etapas que se siguieron.

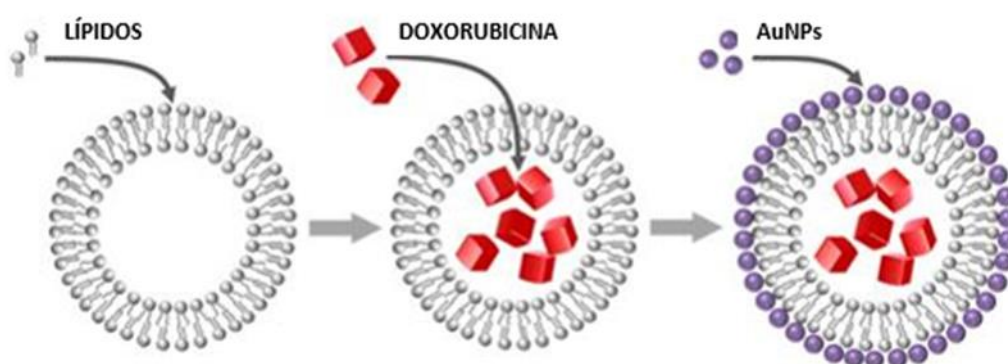


Figura 7. Los liposomas unilaminares se prepararon por la técnica de evaporación en capa fina, seguido de extrusión, se cargan con DXR por el método de gradiente transmembrana de amonio y se recubren con las AuNPs (Adaptada de <http://www.ntno.org/v02p0295.htm>).

En la Tabla 2 se recoge un cuadro resumen de la denominación y características de las formulaciones elaboradas en el presente capítulo.

Tabla 2. Denominación y características de los lotes elaborados. DXR: doxorubicina. Ch(2.5) y Ch(40): colesterol a concentraciones de 2.5 mol% y 40 mol% respectivamente. AuNPs: nanopartículas de oro.

Nomenclatura	DXR	Ch (2.5)	Ch (40)	AuNPs
L1				
L2				
AuNPs-L1				
AuNPs-L2				
L1-D				
L2-D				
AuNPs-L1-D				
AuNPs-L2-D				

2.8. Estudios de caracterización

2.8.1. Caracterización fisicoquímica

Los parámetros dimensionales de tamaño e índice de polidispersión (IP) se determinaron mediante DLS, cuya metodología fue anteriormente detallada en el capítulo 1. Igualmente ocurre para la determinación de la carga superficial de las vesículas.

2.8.2. Determinación de la eficacia de encapsulación

La cantidad de DXR encapsulada en los liposomas se determinó tanto por espectrofotometría UV-visible (*Sistema Agilent 8453*), como por HPLC. Para ello, se destruyeron los liposomas de DXR con Triton X-100 (concentración final 0.5% v/v). La eficacia de encapsulación o porcentaje de encapsulación (PdE) fue estimado a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de encapsulación (PdE, \%)} = \frac{\text{Cantidad de DXR encapsulada}}{\text{Cantidad total de DXR añadida en la preparación}} \times 100\%$$

2.8.3. Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) es un equipo que es capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra, pero con mayor resolución y con un rango de energía mucho mayor que el microscopio electrónico de barrido (SEM). El funcionamiento es similar: a partir de un barrido de un haz de electrones sobre la superficie de la muestra se produce la visualización de la información que nos interesa en un monitor, en función de los detectores disponibles.

La mayor diferencia entre un FESEM y un SEM reside en el sistema de generación de electrones. El FESEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados, lo que mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales, (0.02 - 5 kV); esto ayuda a minimizar el efecto de carga en muestras no conductoras y a evitar daños en muestras sensibles al haz electrónico. Otra característica muy destacable del FESEM es la utilización de detectores dentro de la lente (*in lens*). Estos detectores están optimizados para trabajar a alta resolución y muy bajo potencial de aceleración, por lo que son fundamentales para obtener el máximo rendimiento al equipo. El equipo instalado en el Servicio de Microscopía de la Universidad de Sevilla es el modelo FESEM Hitachi S5200.

Para la preparación de las muestras, se colocaron 40 μL de las formulaciones previamente diluidas en un soporte de silicio para posteriormente ser recubiertas con platino.

2.9. Estudios de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación de DXR a partir de los sistemas de liposomas se llevaron a cabo mediante el método de diálisis. Para ello, se colocó 1 mL de dispersión de liposomas en una bolsa de diálisis (*Membrana Spectra/por MWCO: 12—14000, Spectrum Laboratories, EEUU*), previamente hidratada, sellando ambos extremos con un clip de diálisis. El dispositivo se incubó en 50 mL de medio de disolución (Hepes, pH 7.4),

manteniendo la velocidad de agitación a 100 rpm y 37 °C o 42 °C según el experimento (*IKA® RT10*) y protegiendo los vasos de los experimentos de la luz. A intervalos de tiempo predeterminados, se recogieron alícuotas del medio de disolución, transfiriéndolas a los viales de HPLC para su posterior cuantificación.

A continuación, se representó gráficamente el porcentaje liberado de la DXR frente al tiempo. Posteriormente, se realizó el ajuste cinético de los resultados aplicando los modelos matemáticos de orden cero, Higuchi y Peppas-Korsmeyer.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estudios de solubilidad de DXR

Los resultados del estudio de solubilidad del fármaco (Figura 8) mostraron que en las soluciones de sulfato de amonio la solubilidad de DXR era independiente del pH (a los valores de pH estudiados), mientras que, en el caso del fosfato y el tampón de citrato, la solubilidad de DXR dependía de este parámetro, de forma que la solubilidad disminuye al aumentar el valor del pH.

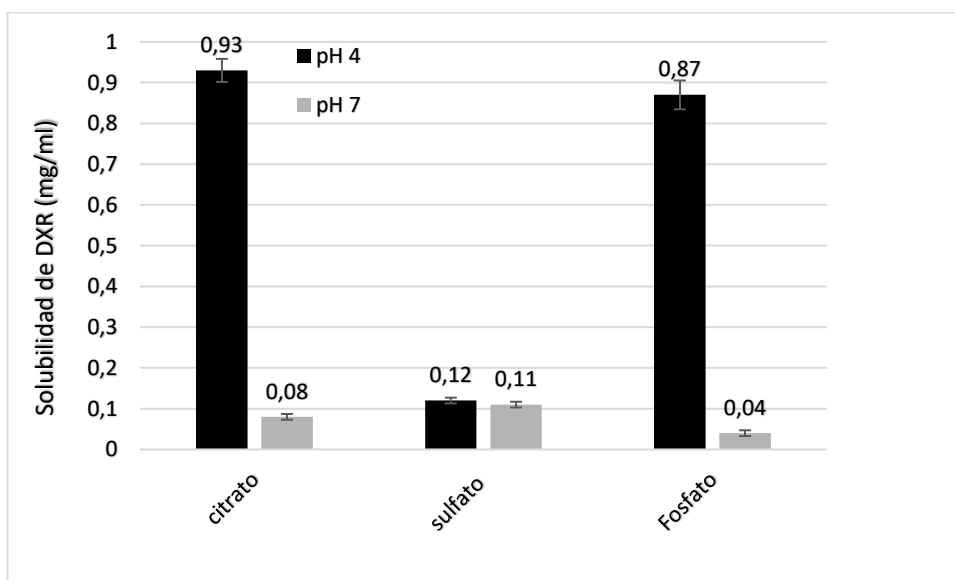


Figura 8. Solubilidad de la DXR en diferentes soluciones salinas en función del pH.

Por lo tanto, a pH 4 no se formaron precipitados, mientras que a pH 7, la solubilidad era menor y se formaron unos precipitados importantes. Estos resultados están en concordancia con los resultados de otros autores (Fritze et al., 2006). Lo que ocurre es

que tras la desprotonación de DXR, el compuesto no cargado es casi insoluble en la solución salina. La interacción catión-anión en nuestro estudio mostró baja solubilidad de DXR en una solución de sulfato de 300 mM en los valores de pH investigados, cerca del pKa del grupo amino $pK_a \approx 8.1$ (Haran et al., 1993).

3.1.1. Morfología de los precipitados de DXR

Las imágenes SEM revelaron las diferentes características morfológicas de los precipitados, así como la influencia del pH y del medio en el tamaño y forma de las partículas (Figura 9).

Los tamaños de cristal podrían predecir las propiedades de disolución de estas partículas; en el caso de sulfato a pH 4 (Figura 9A), los precipitados fueron irregulares; algunos son muy alargados con una superficie lisa y de pequeño tamaño relativo; sin embargo, a pH 7 (Figura 9C), la morfología es diferente, siendo las partículas de mayor tamaño, con forma irregular y superficie no lisa. Este resultado de que las sales sulfato a pH 7 dan lugar a tamaños más grandes podría predecir el hecho de que la tasa de disolución va a ser más baja. Para el citrato a pH 7 (Figura 9B), los precipitados fueron más pequeños, mientras que para el fosfato a pH 7 (Figura 9D), los precipitados fueron muy grandes, con partículas pequeñas que se adhieren a su superficie.

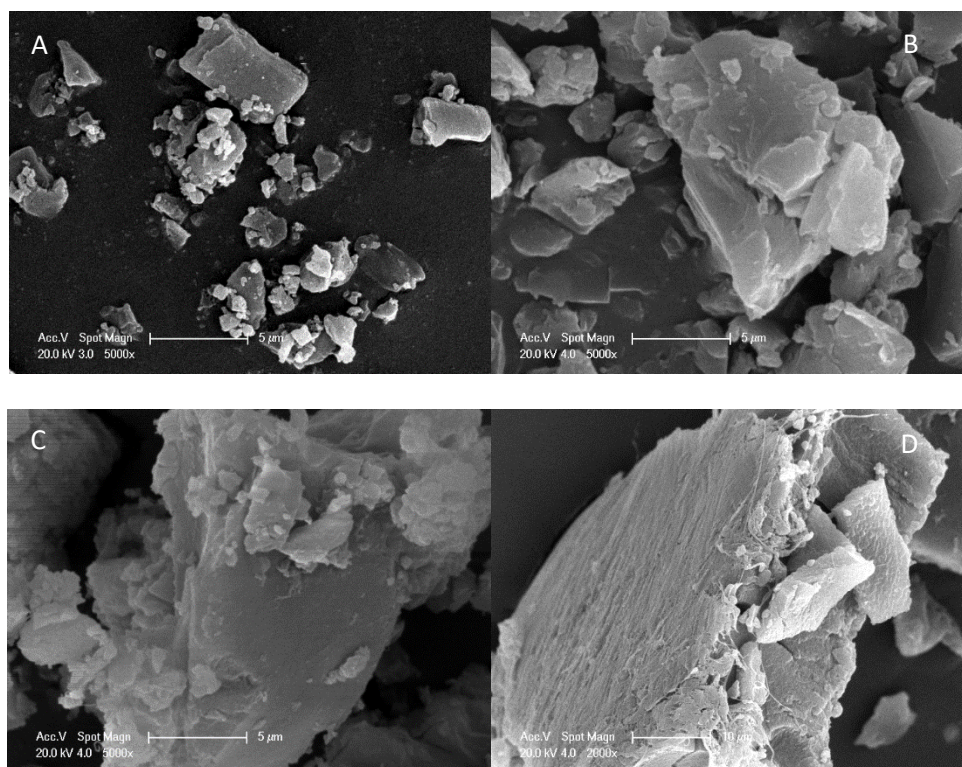


Figura 9. Imágenes SEM de (A) sal de sulfato pH 4, (B) sal de citrato pH 7, (C) sal de sulfato pH 7, (D) sal de fosfato pH 7.

3.2. Características de los liposomas

El concepto del método por gradiente transmembrana se basa en incluir sales para crear un gradiente protón/transmembrana dentro de los liposomas, favoreciendo el atrapamiento del fármaco dentro de las vesículas mientras en el exterior de las mismas se mantiene un pH fisiológico de 7.4. Por otro lado, el pH más bajo del medio acuoso interno permite la ionización del fármaco, y una vez que la molécula se protona, no puede atravesar la bicapa lipídica de los liposomas, favoreciendo su acumulación en el interior. Sin embargo, un requisito previo para conseguir una elevada encapsulación incluye la capacidad del fármaco para transformarse de especies no cargadas (difusión libre a través de la capa de lipídica) a especies cargadas. Nichols y Deamer (1976) fueron los pioneros en encapsular aminas anfipáticas mediante un gradiente de pH. Posteriormente, diferentes grupos de investigación han utilizado sales de bases débiles como el amoníaco o de ácidos débiles, como acetato, para crear un gradiente de pH y de iones (Haran et al., 1993; Clerc y Barenholz, 1995). También el gradiente de sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ ha sido ampliamente usado para lograr la carga activa de bases débiles anfipáticas en los liposomas con una eficacia de encapsulación muy alta (> 90%).

CAPÍTULO 3

En nuestro estudio, tras ser encapsulada DXR por este método, se procedió a la caracterización de las formulaciones elaboradas.

En primer lugar, se analizaron las propiedades fisicoquímicas de los liposomas blancos (L1 y L2), los liposomas con DXR encapsulada (L1-D y L2-D) y los liposomas con DXR encapsulada con las AuNPs ancladas a su superficie (AuNPs-L1-D e AuNPs-L2-D) (Tabla 3).

Respecto al tamaño de las vesículas, los L1 y L2 obtuvieron tamaños de 245 ± 2 y 149 ± 2 nm respectivamente, observando un valor menor para la formulación que contiene alta proporción de colesterol, hecho que pudiera deberse a la reorganización de la película lipídica con consecuente reducción en el tamaño del liposoma (Coderch et al., 2000). Por otro lado, se observó que a mayor complejidad del sistema (presencia de las AuNPs o de la DXR), el tamaño se veía incrementado en comparación con los liposomas blancos L1 y L2 (Abraham et al., 2005); se obtuvieron tamaños de 320 ± 4 , 293 ± 4 , 347 ± 6 nm para los AuNPs-L1, L1-D, AuNPs-L1-D y 293 ± 8 , 240 ± 4 , 304 ± 5 nm para los AuNPs-L2, L2-D y AuNPs-L2-D, respectivamente.

Tabla 3. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los liposomas en términos de tamaño de partícula, potencial zeta (PZ), índice de polidispersión (IP) y porcentaje de encapsulación (PdE).

Muestra	PdE	Tamaño (nm)	IP	PZ (mV)
L1	–	245 ± 2	0.27 ± 0.01	18.8 ± 0.5
AuNPs-L1	–	320 ± 4	0.22 ± 0.02	15.7 ± 0.9
L1-D	84 ± 1	293 ± 4	0.24 ± 0.04	20.8 ± 0.7
AuNPs-L1-D	78 ± 2	347 ± 6	0.22 ± 0.03	1.6 ± 0.6
L2	–	149 ± 2	0.16 ± 0.02	14.7 ± 0.9
AuNPs-L2	–	293 ± 8	0.30 ± 0.02	7.4 ± 0.8
L2-D	94 ± 2	240 ± 4	0.25 ± 0.02	14 ± 1
AuNPs-L2-D	78 ± 3	304 ± 5	0.22 ± 0.03	-1.9 ± 0.9

En cuanto a las cargas superficiales de los liposomas, tanto L1 y L2 como los L1-D y L2-D presentaron los valores de PZ más elevados (15-20 mV). La presencia de las AuNPs

CAPÍTULO 3

redujo el valor de PZ de los liposomas blancos (7-15 mV). Sin embargo, la encapsulación de la DXR y el anclaje de las AuNPs provocaron una reducción significativa del valor de este parámetro en las dispersiones de los liposomas, los cuales alcanzaron valores de 1.6 y -1.9 mV para los AuNPs-L1-D y AuNPs-L2-D, respectivamente. Como puede observarse, en el caso de los sistemas con alta proporción de colesterol, el efecto fue aún más notorio, ya que incluso se produjo una reversión del signo del PZ, resultados que coinciden con los observados en estudios previos (Mady et al., 2012). Los IP fueron aceptables en todos los casos ($\leq 0,3$).

En lo que respecta al PdE del fármaco para ambas formulaciones, se observó una menor encapsulación de la DXR en los sistemas conteniendo AuNPs ($\approx 78\%$), lo que puede explicarse por la desestabilización que estas nanopartículas pueden producir en la bicapa lipídica (Ghosh et al., 2008) favoreciendo, de alguna manera, la liberación del fármaco desde el compartimento acuoso. En cuanto a los L1-D y L2-D, se cuantificó mayor cantidad de fármaco encapsulado en los sistemas con alta proporción de colesterol (84 y 94, respectivamente). Esto podría explicarse considerando la mayor estructuración que este componente confiere a la bicapa, lo que a su vez podría incrementar el tamaño del compartimento acuoso y, por lo tanto, facilitar una mayor encapsulación del principio activo en el interior de los liposomas (Farzaneh et al., 2018).

La morfología de los liposomas, así como la presencia de las AuNPs en su superficie se analizó mediante microfotografías FESEM (Figura 10), por medio de las cuales se corroboró la forma aproximadamente esférica de las nanoestructuras, su tamaño nanométrico y la presencia de las AuNPs alrededor de los liposomas en los sistemas que contenían las AuNPs ancladas. No se observaron diferencias en el aspecto de los liposomas blancos y los liposomas que contenían la DXR encapsulada.

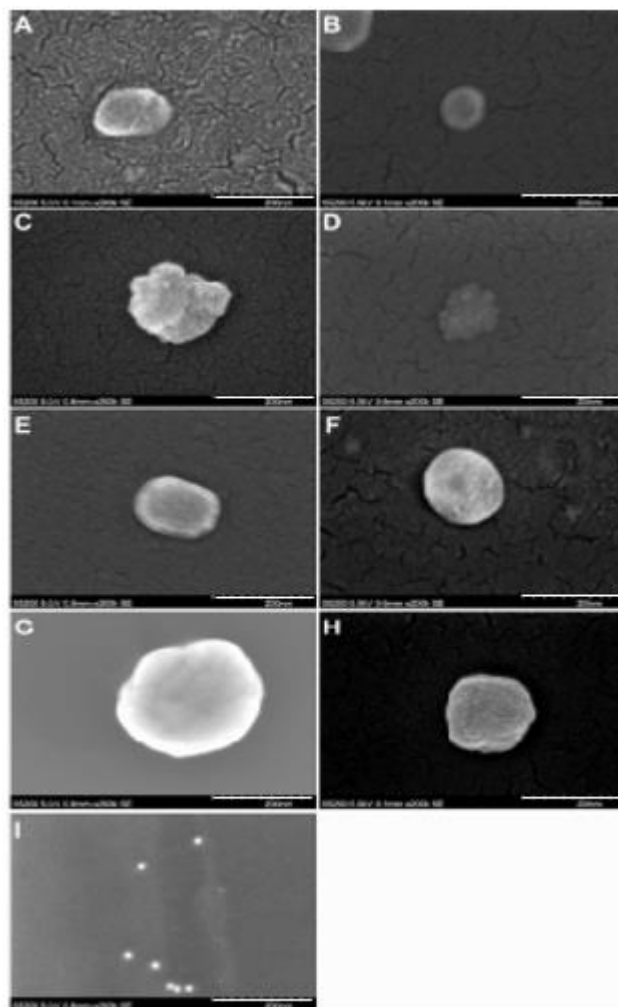


Figura 10. Imágenes FESEM de A) L1, B) L2, C) AuNPs-L1, D) AuNPs-L2, E) L1-D, F) L2-D, G) AuNPs-L1-D, H) AuNPs-L2-D, y I) AuNPs (escala: 200 nm).

3.3. Estudios de liberación *in vitro* de DXR

La Figura 11 presenta los perfiles de liberación *in vitro* de DXR a partir de los lotes L1-D, L2-D, AuNPs-L1-D y AuNPs-L2-D a 37 y 42 °C. Los perfiles de liberación de DXR en el tiempo se obtuvieron midiendo los aumentos en las intensidades de fluorescencia de las dispersiones en el tampón Hepes 7.4.

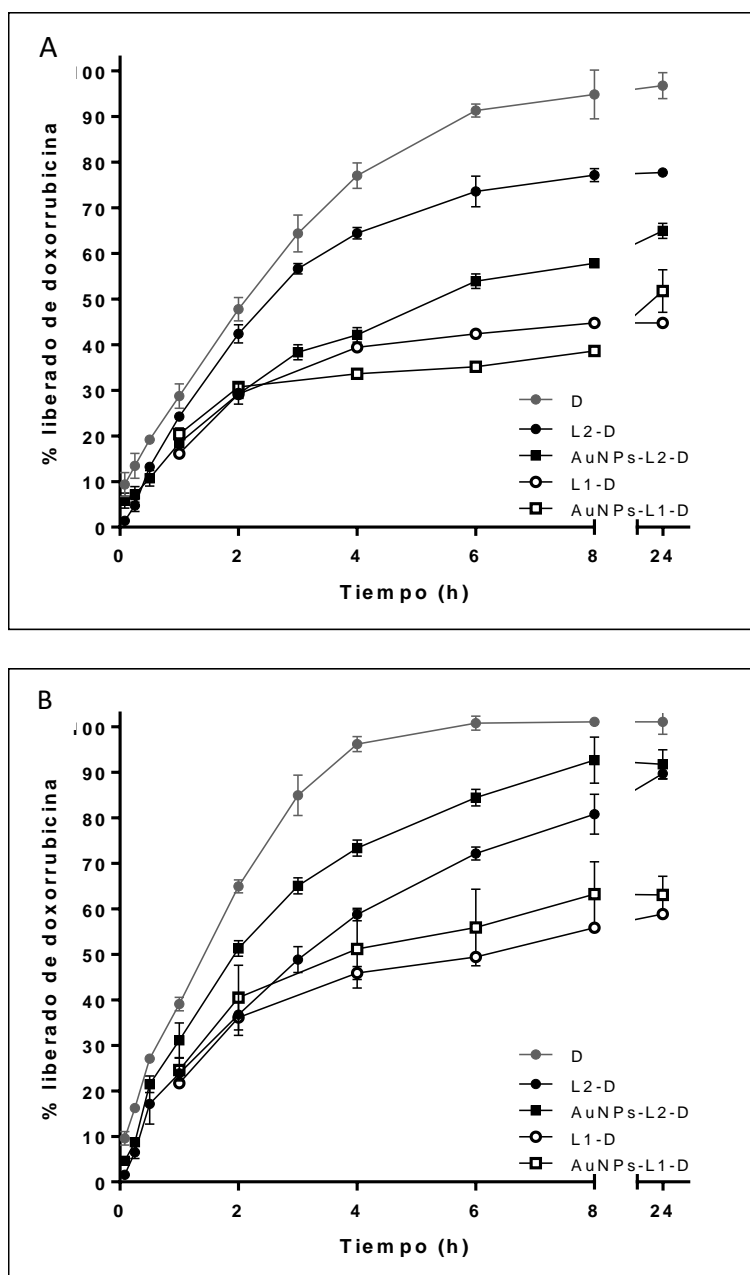


Figura 11. Perfiles de liberación de DXR a partir de L1-D, L2-D y AuNPs-L1-D y AuNPs-L2-D que fueron incubados a una temperatura de 37 °C (A) o 42 °C (B). Se empleó como control la curva de disolución de DXR (D). Los experimentos se realizaron por duplicado (n=2).

Para el caso de los sistemas con baja proporción de colesterol, no se observaron diferencias significativas entre los perfiles de liberación de la DXR desde los L1-D y los AuNPs-L1-D hacia la solución tampón Hepes pH 7.4 a 37 °C (30-40% al cabo de 8 h del ensayo). Sin embargo, sí se observó un efecto promotor de la liberación de DXR desde ambos sistemas frente al tampón con temperatura mayor (42 °C). Por su parte, en los sistemas con alta proporción de colesterol, L2-D y AuNPs-L2-D, se observa un aumento significativo en la cantidad de DXR liberada, al comparar con los sistemas con menor

proporción de colesterol. Además, se observaron diferencias significativas en los perfiles de liberación de DXR desde los sistemas conteniendo las AuNPs a 37 °C, en los cuales fue mayor la cantidad de DXR liberada (≈60% de la DXR encapsulada en las primeras 8 h del ensayo de liberación) en comparación con los sistemas L2-D.

Además, a 42 °C, el porcentaje de fármaco liberado fue aún mayor (efecto similar al observado en los sistemas con baja proporción de colesterol), lo que podría explicarse por la presencia de las AuNPs y su respuesta térmica, su influencia en la estabilidad de la bicapa y en su afinidad para interactuar con la DXR (Kwon et al., 2015). Estos resultados también sugirieron que el mecanismo desencadenante de la liberación observada podría deberse a la formación de poros transitorios en la bicapa lipídica de los liposomas o a otras formas de ruptura mecánica llevadas a cabo por las AuNPs incorporadas a la superficie (Al-Ahmady et al., 2016). Por otro lado, y tal y como se demostró en estudios anteriores, la permeabilidad de la bicapa lipídica aumenta con el aumento de la temperatura (Jiang et al., 2011). Además, otros estudios realizados por Russell et al. (2018) han demostrado que a medida que aumenta la temperatura, aumenta la disolución de los precipitados de la DXR.

3.4. Modelo cinético de la liberación de DXR

Entre los modelos matemáticos más utilizados para analizar y describir el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación de los fármacos se encuentran los propuestos por Higuchi en 1963 y Korsmeyer y Peppas en 1983, y el modelo de orden cero que implica una velocidad constante de liberación.

Higuchi propuso un modelo matemático ampliamente utilizado para describir el proceso empírico de liberación de fármacos mediante difusión a través de las paredes del sistema portador, siguiendo conforme a la Ley de Fick y se representa de la siguiente forma:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^{\frac{1}{2}}$$

donde M_t/M_∞ es la fracción del fármaco liberada en un tiempo t y k es la constante de velocidad de liberación.

CAPÍTULO 3

Por otro lado, Korsmeyer y Peppas propusieron un modelo matemático que es generalmente lineal para valores de $M_t/M_\infty < 0.6$. Este modelo intenta explicar mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz, de manera que se produce difusión tanto a través de los poros/defectos y a través de las paredes, con distintas velocidades. La ecuación correspondiente es una forma generalizada de la ecuación de Higuchi que se expresa como:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$$

Donde k es la constante de velocidad de liberación que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación y n (exponente de difusión de liberación) es el exponente que indica el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación del fármaco. El valor del exponente n brinda información sobre la cinética de liberación del fármaco, por lo que, si n es igual a 0.5, la liberación del fármaco tiene lugar a través de un fenómeno de difusión de tipo fickiano (modelo matemático de Higuchi), si n toma valores entre 0.5 y 1 indica que la liberación del fármaco es debida a un mecanismo de difusión no fickiano o anómalo (Dash et al., 2010).

Para predecir el mecanismo de liberación de DXR de los liposomas, se emplearon los siguientes modelos cinéticos: orden cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, a los que se ajustaron los datos obtenidos de la liberación *in vitro* de DXR.

Según se refleja en la Tabla 4, un valor de r^2 cercano a 1 indica que el modelo de Peppas es el mejor. El valor de n menor que 0.5 para los L1-D y AuNPs-L1-D a 37 °C y 42 °C indicaría un mecanismo de difusión fickiano. En el caso de los L2-D y AuNPs-L2-D a 37 °C y 42 °C, el valor de n es mayor que 0.5 indicando un mecanismo de difusión no fickiano, sugiriendo que la proporción de 40% de colesterol en las formulaciones L2-D y AuNPs-L2-D origina un cambio en el modelo de difusión. Este hecho podría estar relacionado con la mayor fluidez de la membrana lipídica de los liposomas a altas temperaturas debido a que aumenta su permeabilidad a través de canales mayores de la superficie del liposoma dando lugar a mayor difusión de la DXR. Eso se corrobora con la mayor altura de las curvas de liberación de las muestras con mayor proporción de colesterol (Figura 11), que son las únicas que alcanzan aproximadamente el 100% al cabo de 24 horas (Sulkowski et al., 2005).

CAPÍTULO 3

El patrón bifásico de liberación de la DXR, es decir, la liberación inicial seguida del modo sostenido de liberación es característico del modelo de Peppas. Los resultados demostraron que los datos experimentales fueron ajustados adecuadamente al modelo matemático cinético de Peppas en función de la temperatura, de acuerdo con lo obtenido por Haghirsadat et al. (2018).

El perfil de liberación *in vitro* de la DXR sola se ajustó a una cinética de orden cero alcanzando el 100% de fármaco liberado al cabo de 6 horas, con un rango R^2 de 0.996–0.998 para ambas temperaturas de liberación. Esto supone una velocidad constante de difusión de DXR a través de la membrana de diálisis, lo que sugiere que la concentración de la DXR se mantiene constante en la superficie interna de la membrana de diálisis, en el rango de tiempo analizado.

Tabla 4. Datos cinéticos obtenidos de la liberación de DXR hacia el tampón Hepes pH 7.4 a dos temperaturas diferentes, utilizando ecuaciones de orden cero, Higuchi y Peppas.

Temp. (°C)	Muestra	Orden zero		Higuchi		Peppas		
		Kz (%·h ⁻¹)	R ²	K _H (%·h ^{-0.5})	R ²	K _p (%·h ⁻ⁿ)	n	R ²
37	D	18.8	0.998	38.5	0.978	30.8	0.65	0.996
	L1-D	3.7	0.823	15.1	0.910	20.4	0.40	0.922
	AuNPs-L1-D	2.2	0.787	8.7	0.863	23.1	0.25	0.960
	L2-D	16.5	0.979	39.1	0.994	23.6	0.76	0.983
	AuNPs-L2-D	6.9	0.930	22.3	0.991	19.4	0.55	0.998
42	D	28.3	0.990	39.3	0.988	41.0	0.65	0.996
	L1-D	4.4	0.881	17.4	0.944	25.4	0.39	0.956
	AuNPs-L1-D	5.0	0.894	19.8	0.954	28.4	0.39	0.963
	L2-D	13.2	0.976	33.2	0.996	23.1	0.68	0.992
	AuNPs-L2-D	20.6	0.971	43.1	0.994	31.0	0.69	0.993

4. CONCLUSIONES

- La caracterización de los nanosistemas obtenidos mediante FESEM y el estudio de DLS mostraron que se obtuvieron liposomas esféricos con las AuNPs ancladas a su superficie.
- Tras la puesta a punto de la metodología de encapsulación de DXR por gradiente transmembrana se obtuvieron eficacias de encapsulación muy elevadas para este fármaco, sobre todo empleando sulfato amónico como sal de amonio creadora del gradiente.
- Los ensayos de liberación *in vitro* demostraron que las formulaciones que contienen mayor cantidad de colesterol tuvieron mejores perfiles de liberación de la DXR. Estos perfiles de liberación se vieron mejorados aún más al realizar los ensayos a 42 °C.
- Los perfiles de liberación de los sistemas desarrollados se ajustaron al modelo cinético de Peppas indicando que la liberación tuvo lugar por difusión, hecho que se pudo atribuir al efecto sinérgico de la presencia de las AuNPs en la superficie de los liposomas y a la temperatura.

Por lo tanto, se puede concluir que los nanosistemas desarrollados en este estudio constituyen una plataforma prometedora que podría mejorar la eficacia terapéutica de la DXR.

5. BIBLIOGRAFÍA

Abraham SA, Waterhouse DN, Mayer LD, Cullis PR, Madden TD, Bally MB. The liposomal formulation of doxorubicin. In *Methods in enzymology*, Vol. 391, Academic Press. 2005, pp. 71-97.

Al-Ahmady Z, Lozano N, Mei KC, Kostarelos K. Engineering thermosensitive liposome-nanoparticle hybrids loaded with doxorubicin for heat-triggered drug release. *Int J Pharm*. 2016;514(1):133-41.

Alyane M, Kbsa LBW, Bousenane HN, Rouibah H, Lahouel M. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak J Pharm Sci*. 2008;21(3):201-8.

Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: an update. *Bioeng Transl Med*. 2019; e10143.

Barenholz Y. Relevancy of drug loading to liposomal formulation therapeutic efficacy. *J Liposome Res*. 2003;13(1):1-8.

Bhowmik S, Bhowmick S, Maiti K, Chakra A, Shahi P, Jain D, Rajamannar T. Two multicenter Phase I randomized trials to compare the bioequivalence and safety of a generic doxorubicin hydrochloride liposome injection with Doxil® or Caelyx® in advanced ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;82(3):521-32.

Bing C, Patel P, Staruch RM, Shaikh S, Nofiele J, Wodzack-Staruch M, Chopra R. Longer heating duration increases localized doxorubicin deposition and therapeutic index in Vx2 tumors using MR-HIFU mild hyperthermia and thermosensitive liposomal doxorubicin. *Int J Hyperthermia*. 2019;36(1):196-203.

Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton MA, Chiappetta DA. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today*. 2017;22:270-81.

Cern A, Golbraikh A, Sedykh A, Tropsha A, Barenholz Y, Goldblum A. Quantitative structure-property relationship modeling of remote liposome loading of drugs. *J Control Release*. 2012;160(2):147-57.

Chen J, Wang D, Xi J, Au L, Siekkinen A, Warsen A, Li ZY, Zhang H, Xia Y, Li X. Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells. *Nano Lett*. 2007;7(5):1318-22.

Clerc S, Barenholz Y. Loading of amphipathic weak acids into liposomes in response to transmembrane calcium acetate gradients. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*. 1995;1240(2):257-65.

Coderch L, Fonollosa J, De Pera M, Estelrich J, De La Maza A, Parra JL. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR: relationship with percutaneous absorption. *J Control Release*. 2000;68(1):85-95.

Collier MA, Bachelder EM, Ainslie KM. Electrospayed myocet-like liposomes: an alternative to traditional liposome production. *Pharm Res*. 2017;34(2):419-26.

Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*. 2010;67(3):217-23.

CAPÍTULO 3

Deda DK, Araki K. Nanotechnology, light and chemical action: An effective combination to kill cancer cells. *J Braz Chem Soc.* 2015;26(12):2448-70.

Dickerson EB, Dreaden EC, Huang X, El-Sayed IH, Chu H, Pushpanketh S, McDonald JF, El-Sayed MA. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice, *Cancer Lett.* 2008;269(1):57-66.

Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2740-79

Farzaneh H, Nik ME, Mashreghi M, Saberi Z, Jaafari MR, Teymouri M. A study on the role of cholesterol and phosphatidylcholine in various features of liposomal doxorubicin: from liposomal preparation to therapy. *Int J Pharm.* 2018;551(1-2):300-8.

Forbes N, Pallaoro A, Reich NO, Zasadzinski JA. Rapid, reversible release from thermosensitive liposomes triggered by near-infra-red light. *Part Syst Charact.* 2014;31:1158-67.

Franceschia K, Pereira JC. Pulmonary Surfactant. State of the art and fundamental aspects. *Revista Ingeniería UC.* 2016;23(3):341-50.

Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Süss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes.* 2006;1758(10):1633-40.

Gautier J, Allard-Vannier E, Munnier E, Soucé M, Chourpa I. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. *J Control Release.* 2013;169(1-2):48-61.

Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11):1307-15.

Gilbert GJ, Barenholz Y, Bolotin EM, Bansinath M, Turndorf H, Piskoun B. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology.* 2004; 101(1): 133-137.

Grull H, Langereis S. Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound. *J Control Release.* 2012;161:317-27.

Gu YJ, Cheng J, Man, CWY, Wong, WT, Cheng, SH. Gold-doxorubicin nanoconjugates for overcoming multidrug resistance. *Nanomedicine: NBM.* 2012;8(2):204-11.

Haghirsadat F, Amoabediny G, Helder MN, Naderinezhad S, Sheikhha MH, Forouzanfar T, Zandieh-Doulabi B. A comprehensive mathematical model of drug release kinetics from nano-liposomes, derived from optimization studies of cationic PEGylated liposomal doxorubicin formulations for drug-gene delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(1):169-77.

Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes.* 1993;1151(2):201-15.

Harrington KJ, Syrigos KN, Vile RG. Liposomally targeted cytotoxic drugs for the treatment of cancer. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:1573-1600.

CAPÍTULO 3

Hrelia S, Fiorentini D, Maraldi T, Angeloni C, Bordoni A, Biagi PL, Hakim G. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*. 2002;1567:150-6.

<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.29400.html> (Fecha de consulta: septiembre 2019)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin#section=Decomposition> (fecha de consulta: julio 2019)

<https://www.medicalexpo.es/prod/labtech/product-112335-742706.html> (Fecha de consulta: octubre 2019)

<http://www.ntno.org/v02p0295.htm> (Fecha de consulta: septiembre 2019)

Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci*. 2008;23(3):217.

Hwang JY, Li Z, Loh XJ. Small molecule therapeutic-loaded liposomes as therapeutic carriers: from development to clinical applications. *RSC Advances*. 2016;6(74):70592-70615.

Jiang W, Lionberger R, Yu LX. In vitro and in vivo characterizations of PEGylated liposomal doxorubicin. *Bioanalysis*. 2011;3(3):333-44.

Jiang W, Wang X, Guo D, Luo J, Nangia S. Drug-specific design of telodendrimer architecture for effective doxorubicin encapsulation. *J Phys Chem B*. 2016;120(36):9766-77.

Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Res*. 2001;61(7):3027-32.

Kwon HJ, Byeon Y, Jeon HN, Cho SH, Han HD, Shin BC. Gold cluster-labeled thermosensitive liposomes enhance triggered drug release in the tumor microenvironment by a photothermal effect. *J Control Release*. 2015;216:132-9.

Lee SM, Kim HJ, Kim SY, Kwon MK, Kim S, Cho A, et al. Drug-loaded gold plasmonic nanoparticles for treatment of multidrug resistance in cancer. *Biomaterials* 2014;35(7):2272-82

López-Noriega A, Hastings CL, Ozbakir B, O'Donnell KE, O'Brien FJ, Storm G, Hennink GE, Duffy GP, Ruiz-Hernández E. Hyperthermia-induced drug delivery from thermosensitive liposomes encapsulated in an injectable hydrogel for local chemotherapy. *Adv Healthcare Mater* 2014;3: 854-9.

Luo D, Carter KA, Lovell JF. Nanomedical engineering: shaping future nanomedicines. *Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2015;7:169-88.

Mady MM, Fathy MM, Youssef T, Khalil WM. Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. *Phys Medica: Eur J Med Phys*. 2012;28(4):288-95.

Mayer LD, Tai LC, Ko DS, Masin D, Ginsberg RS, Cullis PR, Bally MB. Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice. *Cancer Res*. 1989;49:5922-30.

Mai Y, Yu JJ, Bartholdy B, Xu-Monette ZY, Knapp EE, Yuan F, Zou Y. An oxidative stress-based mechanism of doxorubicin cytotoxicity suggests new therapeutic strategies in ABC- DLBCL. *Blood*. 2016;128(24):2797-2807.

CAPÍTULO 3

Maurer N, Fenske DB, Cullis PR. Developments in liposomal drug delivery systems, *Expert Opin Biol Ther.* 2001;1:923–47.

Menon JU, Song L, Falzone N, Vallis, KA. Nanomaterial-antibody hybrids. In: *Hybrid Nanomaterials.* CRC Press. 2017;83-109.

Merlin JL. Encapsulation of doxorubicin in thermosensitive small unilamellar vesicle liposomes. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1991;27(8):1026-30.

Miller K, Cortes J, Hurvitz SA, Krop IE, Tripathy D, Verma S, Yardley DA. HERMIONE: a randomized Phase 2 trial of MM-302 plus trastuzumab versus chemotherapy of physician's choice plus trastuzumab in patients with previously treated, anthracycline-naïve, HER2-positive, locally advanced/metastatic breast cancer. *BMC Cancer.* 2016;16(1):352.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004;56: 185-229.

Mobaraki M, Faraji A, Zare M, Dolati P, Ataei M, Manshadi HD. Molecular mechanisms of cardiotoxicity: a review on major side-effect of doxorubicin. *Indian J Pharm Sci.* 2017;79(3):335-44.

Naitlho N, Prieto-Dapena F, Rabasco AM, Rueda M, González-Rodríguez ML. Didodecyldimethylammonium bromide role in anchoring gold nanoparticles onto liposome surface for triggering the drug release. *AAPS PharmSciTech.* 2019;20(7):294.

Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;53(3):285-305.

Nichols JW, Deamer DW. Catecholamine uptake and concentration by liposomes maintaining pH gradients. *Bioch Biophys Acta-Biomembranes.* 1976;455(1):269-71.

Pandey H, Rani R, Agarwal V. Liposome and their applications in cancer therapy. *Braz Arch Biol Technol.* 2016;59. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150477>.

Prieto F, Rueda M, Naitlho N, Vázquez-González M, González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Electrochemical characterization of a mixed lipid monolayer supported on Au (111) electrodes with implications for doxorubicin delivery. *J Electroanal Chem.* 2018;815:246-54.

Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(4):567-72.

Russell LM, Hultz M, Searson PC. Leakage kinetics of the liposomal chemotherapeutic agent Doxil: The role of dissolution, protonation, and passive transport, and implications for mechanism of action. *J Control Release.* 2018;269:171-6.

Sardão VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB. Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(3):227-43.

Shum P, Kim JM, Thompson DH. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;53(3):273-84.

CAPÍTULO 3

Sułkowski WW, Pentak D, Nowak K, Sułkowska A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*. 2005; 744:737-747.

Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:145.

Troutman TS, Leung SJ, Romanowski M. Light-induced content release from plasmon resonant liposomes, *Adv Mater*. 2009;21(22):2334–8.

Unger EC, McCreery TP, Sweitzer RH, Caldwell VE, Wu Y. Acoustically active lipospheres containing paclitaxel: a new therapeutic ultrasound contrast agent. *Invest Radiol*. 1998;33(12):886-92.

Vermehren C, Kiebler T, Hylander I, Callisen TH, Jørgensen K. Increase in phospholipase A2 activity towards lipopolymer-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*. 1998;1373(1):27-36.

Wei G, Xiao S, Si D, Liu C. Improved HPLC method for doxorubicin quantification in rat plasma to study the pharmacokinetics of micelle-encapsulated and liposome-encapsulated doxorubicin formulations. *Biomed Chromatography*. 2008;22(11):1252-8.

Weinberg RA. The nature of cancer. *Biol Cancer*. 2007;11(5):25-56.

Yan B, Boyer JC, Branda NR, Zhao Y. Near-infrared light-triggered dissociation of block copolymer micelles using upconverting nanoparticles, *J Am Chem Soc*. 2011;133(49):19714–7.

Zamboni WC, Gervais AC, Egorin MJ, Schellens JH, Zuhowski EG, Pluim D, Tonda ME. Systemic and tumor disposition of platinum after administration of cisplatin or STEALTH liposomal-cisplatin formulations (SPI-077 and SPI-077 B103) in a preclinical tumor model of melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;53(4):329-36.

CAPÍTULO 3



***CAPÍTULO 4: REDUCCIÓN DE DOXORUBICINA EN
PELÍCULAS LIPÍDICAS SOBRE ELECTRODOS DE Au (111)
CON APLICACIONES EN SU LIBERACIÓN***

ÍNDICE CAPÍTULO 4

1. INTRODUCCIÓN	153
1.1. Antecedentes	153
1.2. Metodología	156
1.2.1. Transferencia de las películas a sustratos sólidos	156
1.2.2. Voltametría cíclica	157
1.2.3. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> - EIS)	163
1.3. Objetivos	168
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	169
2.1. Materiales	169
2.2. Medidas electroquímicas	170
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	172
3.1. Formación de películas lipídicas en la interfase líquido/gas de la balanza de Langmuir en presencia de doxorubicina	172
3.2. Caracterización electroquímica de los electrodos de oro recubiertos con monocapas lipídicas basadas en DMPC en ausencia de doxorubicina	173
3.2.1. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111)/DMPC.....	173
3.2.2. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111)/DMPC-colesterol.....	175
3.2.3. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111)/DMPC:DDAB-colesterol	176
3.3. Caracterización electroquímica de los electrodos de oro recubiertos con monocapas de la mezcla de lípidos mediante el procedimiento <i>punto a punto</i> en ausencia de DXR.....	177
3.4. Caracterización electroquímica de los electrodos recubiertos de mezcla de lípidos mediante el procedimiento punto a punto, en presencia de doxorubicina	179
3.5. Reducción electroquímica de doxorubicina en los electrodos de oro modificados con la mezcla de lípidos en la célula electroquímica.....	180
3.6. Reducción de doxorubicina en electrodos de oro modificados en la balanza de Langmuir.....	183
4. CONCLUSIONES	190
5. BIBLIOGRAFÍA	192

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de 1,2-dimiristoilo sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), doxorubicina (DXR), Colesterol, y bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB).	155
Figura 2. Técnica de transferencia Langmuir-blodgett (LB). Depósito de monocapa flotante en sustrato sólido.....	156
Figura 3. Técnica de transferencia Langmuir-shaefer (LS).....	157
Figura 4. Ejemplo de barrido triangular de potencial empleado en voltametría cíclica.....	158
Figura 5. Esquema global de una reacción de transferencia electrónica simple (reducción), donde se aprecia además la difusión de reactivo y producto.....	159
Figura 6. Voltagrama cíclico característico de una reacción de transferencia electrónica reversible.....	160
Figura 7. Voltagrama característico de una reacción electroquímica reversible de especies adsorbidas.....	162
Figura 8. Representación gráfica de la respuesta de corriente alterna $I(t)$ a la perturbación de potencial de corriente alterna $E(t)$	163
Figura 9. Circuito RC en serie.....	165
Figura 10. Circuito de Randles.....	166
Figura 11. Circuito equivalente correspondiente a una reacción electroquímica sobre especies adsorbidas.....	167
Figura 12. Diagramas de Nyquist correspondientes a un sistema sin transferencia electrónica (circuito RC), a un sistema con transferencia electrónica elemental sobre especies en disolución (circuito de Randles) y sobre especies adsorbidas (modelo de Lavirón).	168
Figura 13. Esquema de la perturbación aplicada a los electrodos de Au (111) para registrar los espectros de impedancia en la región de reducción de DXR.....	171
Figura 14. Isotermas de la mezcla DMPC, DDAB y Ch en presencia y en ausencia de DXR en la subfase.....	172
Figura 15. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111) / DMPC en KClO_4 0.1 M como electrolito soporte con los potenciales iniciales (E_i) y finales (E_f) indicados en la figura a una frecuencia de 25 Hz. Las líneas continuas corresponden a barridos de potencial en sentido creciente y las líneas discontinuas en sentido decreciente.	174
Figura 16. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111) / DMPC-Ch ($X_{\text{col}} = 0.1$) en KClO_4 0.1 M como electrolito soporte con los potenciales iniciales y finales indicados en la figura a una frecuencia de 25 Hz. Las líneas continuas corresponden a barridos en el sentido catódico mientras que las líneas discontinuas del mismo color representan los sucesivos barridos de vuelta en el sentido anódico. El límite catódico se ha ido incrementando en los barridos sucesivos.	175
Figura 17. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111) / DMPC-DDAB-colesterol ($X_{\text{col}} = 0.10$) en KClO_4 0.1 M como electrolito soporte con los potenciales iniciales y finales indicados en la figura a una frecuencia de 25 Hz. Las líneas continuas corresponden a barridos catódicos mientras que las líneas discontinuas del mismo color representan los barridos anódicos de vuelta. El límite catódico se ha ido extendiendo en cada ciclo.....	176
Figura 18. Curvas C_{ps} vs E medidos con el procedimiento paso a paso a 1 kHz con electrodos de Au (111) modificados con monocapas formadas en la celda electroquímica con mezclas de DMPC-colesterol (líneas azules) y DMPC-DDAB (3:1)-Colesterol (líneas rojas). Los gráficos de C_{ps} vs E en presencia de DXR en la celda electroquímica: sin DDAB (triángulos azules) y con DDAB (triángulos rojos). Gráficos C_{ps} vs E obtenidos con electrodos Au (111) cubiertos por el método	

CAPÍTULO 4

Langmuir - Shaefer sin DDAB (círculos azules) y con DDAB (círculos rojos) en la presencia de 10 μM DXR en la subfase de la balanza de Langmuir. 178

Figura 19. Voltammogramas cíclicos obtenidos a 1 V/s para la reducción de DXR en electrodos de Au (111) modificados en la celda electroquímica con una monocapa que contiene DMPC-colesterol (línea continua azul) y DMPC-DDAB (3:1)-colesterol (línea continua roja). La línea negra de puntos y rayas representa el voltamograma obtenido con el electrodo Au (111) sin recubrir. Las líneas discontinuas representan los voltamogramas obtenidos con el electrodo (111) modificado por el método Langmuir - Shaefer con películas que contienen DMPC-colesterol (azul) y DMPC-DDAB (3:1)-colesterol (rojo). 181

Figura 20. Las gráficas de I_p vs v (a) y de gráficas I_p vs $v^{1/2}$ (b) obtenidas: i) con el electrodo Au (111) modificado en la celda electroquímica con DMPC-colesterol (círculos huecos azules) o DMPC-DDAB (3:1)-Colesterol (diamantes huecos rojos). ii) con el electrodo Au (111) modificado por el método Langmuir - Shaefer con DMPC-colesterol (cuadrados rellenos azules) o DMPC-DDAB (3:1)-colesterol (triángulos rellenos rojos). Las líneas representan las regresiones lineales con símbolos sólidos. 182

Figura 21. Gráficos de Nyquist obtenidos para soluciones de DXR 10 μM a pH 4.5 con un electrodo Au (111) modificado por una monocapa de DMPC:DDAB (3:1)-colesterol formados en la célula electroquímica a $E = -0.48$ V (diamantes azules) y a $E = -0.150$ V (cruces azules). La línea negra sólida representa el diagrama teórico de Nyquist para un circuito en serie R-CPE con $\alpha = 0,95$. Los gráficos de Nyquist obtenidos con el electrodo modificado por el método de Langmuir - Shaefer con películas de DMPC:DDAB (3:1)-colesterol (triángulos rojos). La línea roja discontinua es la curva teórica obtenida del ajuste al modelo de impedancia para una reacción confinada en la superficie con $C_a = 73 \mu\text{F cm}^{-2}$, $R_{ct} = 8.1 \Omega \text{ cm}^2$ y $n_{CPE} = 0.95$ 183

Figura 22. Gráficos $1/Y'_{el}$ vs $1/\omega^2$ obtenidos a -0.48 V, i) con el electrodo de Au (111) modificado en la célula electroquímica con DMPC-colesterol (círculos azules huecos) o DMPC:DDAB (3:1)-colesterol (diamantes rojos huecos) y ii) con el electrodo de Au (111) modificado por el método Langmuir - Schaefer con DMPC-colesterol (cuadrados rellenos azules) o DMPC:DDAB (3:1)-colesterol (triángulos rellenos rojos). Las líneas representan las regresiones lineales de cada gráfico..... 185

Figura 23. Gráficos de a) R_{ct} vs E y b) C_a vs E obtenidos del análisis los datos de frecuencia de EIS para una reacción en ausencia de difusión con: DMPC-Colesterol. Primera serie de potenciales negativos (cuadrados azules) y segunda serie negativa (diamantes azules). DMPC:DDAB (3:1) - Primera serie negativa de colesterol (triángulos rojos) y segunda serie negativa (círculos rojos). 187

Figura 24. Curvas de $\ln(k_f)$ vs- E calculadas a partir de los valores de C_a y R_{ct} en la Figura 10 con: DMPC:colesterol (cuadrados rellenos azules) o DMPC:DDAB (3:1)-colesterol (triángulos rellenos rojos). Las líneas representan el ajuste a la ecuación 29. 188

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos del análisis de $\ln(k_f)$ vs E en la Figura 22 según la ecuación 29.....189

CAPÍTULO 4

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Una de las múltiples estrategias existentes en el campo de la liberación selectiva de fármacos implica el uso de plataformas complejas formadas por liposomas funcionalizados como portadores de fármacos. Los liposomas con nanopartículas de oro (AuNPs) ancladas constituyen unos portadores de fármacos que no son tóxicos ni inmunogénicos, que están siendo investigados especialmente para fármacos contra el cáncer, los cuales, como es bien sabido, muestran efectos secundarios importantes. La adecuada vectorización y captación celular de estos nanotransportadores ayuda así a reducir la dosis necesaria (Wijaya et al., 2008; Dhar et al., 2009; Gobin et al., 2010; Conde et al., 2012; Shenoi et al., 2013).

La estabilidad de los liposomas y las interacciones con las nanopartículas del metal dependen de la composición de la capa lipídica de los liposomas. Las monocapas de fosfolípidos han sido usadas frecuentemente como sistemas biomiméticos de las membranas biológicas y sus caracterizaciones en la interfase aire / líquido de la balanza de Langmuir han sido útiles en la interpretación de las interacciones de los fármacos con las membranas de las células tumorales y con los liposomas (Dupou-Cézanne et al., 1989; Escriba et al., 1990; Speelmans et al., 1994; Brezesinski y Mohwald, 2003).

Se sabe que los liposomas compuestos de fosfolípidos constituyen unos excelentes sistemas de liberación de fármacos, pero el anclaje de las AuNPs a su superficie, si éstas presentan carga superficial negativa, requiere la inclusión de surfactantes cargados positivamente en su formulación. Con ese propósito, se ha investigado el bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) en diferentes formulaciones (Jin et al., 2015). Por otro lado, se sabe que la inclusión del colesterol en la capa fosfolipídica afecta la estabilidad y fluidez de los liposomas (Lipkowski, 2010a).

La composición de los liposomas no solo afecta a las interacciones con las AuNPs, sino también a las interacciones con el fármaco y, por lo tanto, sus propiedades de liberación desde la capa lipídica. Por ello, es interesante analizar la inclusión del fármaco en la capa lipídica y estudiar las interacciones con el oro.

CAPÍTULO 4

La transferencia de monocapas formadas en la interfase aire/líquido a electrodos metálicos permite la aplicación de técnicas electroquímicas para caracterizar el comportamiento de las estructuras de los lípidos sometidas a campos eléctricos del mismo orden que los alcanzados en las membranas biológicas (10^7 a 10^8 Vm^{-1}) (Ringstad et al., 2008; Lipkowski, 2010b; Nascimento et al., 2012; Mohamadi et al., 2014). Entre estas técnicas, la espectroscopía electroquímica de impedancias (EIS) es particularmente interesante ya que proporciona una visión simultánea sobre las propiedades dieléctricas de la capa lipídica soportada sobre el electrodo y sobre la cinética de las posibles transferencias de electrones que tiene lugar en la interfase electródica (Rueda et al., 2010). Esta información puede ser útil para seleccionar adecuadamente las películas lipídicas de los liposomas y para determinar la inclusión del fármaco.

Como se ha detallado en el **Capítulo 3** de la presente Memoria, la doxorubicina (DXR) es una antraciclina con acción anticancerígena ampliamente usada en varios tipos severos de cáncer, si bien presenta alta toxicidad y bajo tiempo de retención en sangre. Por lo tanto, se están investigando nuevas estrategias para solventar estos dos inconvenientes, incluyendo AuNPs bioconjugadas como sistemas portadores de DXR (Ma y Mumper, 2013).

Desde el punto de vista químico, DXR presenta actividad redox, debida a los grupos quinona e hidroquinona de su estructura (Figura 1), que pueden ser reducidos u oxidados, respectivamente. Las interacciones de este fármaco con estructuras lipídicas y sus propiedades redox han sido ya previamente estudiadas por numerosos autores (Brzozowska y Kryszinski, 2009; Matyszewska y Bilewicz, 2009a; Nieciecka y Kryszinski, 2011a; Wieckowska et al., 2011a; Nieciecka et al., 2013a; Nazaruk et al., 2014; Matyszewska y Bilewicz, 2015a). DXR experimenta una reducción de $2e^-/2H^+$ sobre los electrodos de oro modificados con monocapas lipídicas, al penetrar en la monocapa o en los sitios defectuosos de las monocapas. Sin embargo, en el caso de electrodos recubiertos con bicapas lipídicas, éstas parecen tener un efecto de bloqueo a los procesos redox de la DXR, que se interpretan en base a las bajas interacciones hidrofílicas de DXR con los grupos principales de la cabeza polar de los lípidos (Nazaruk et al., 2015).

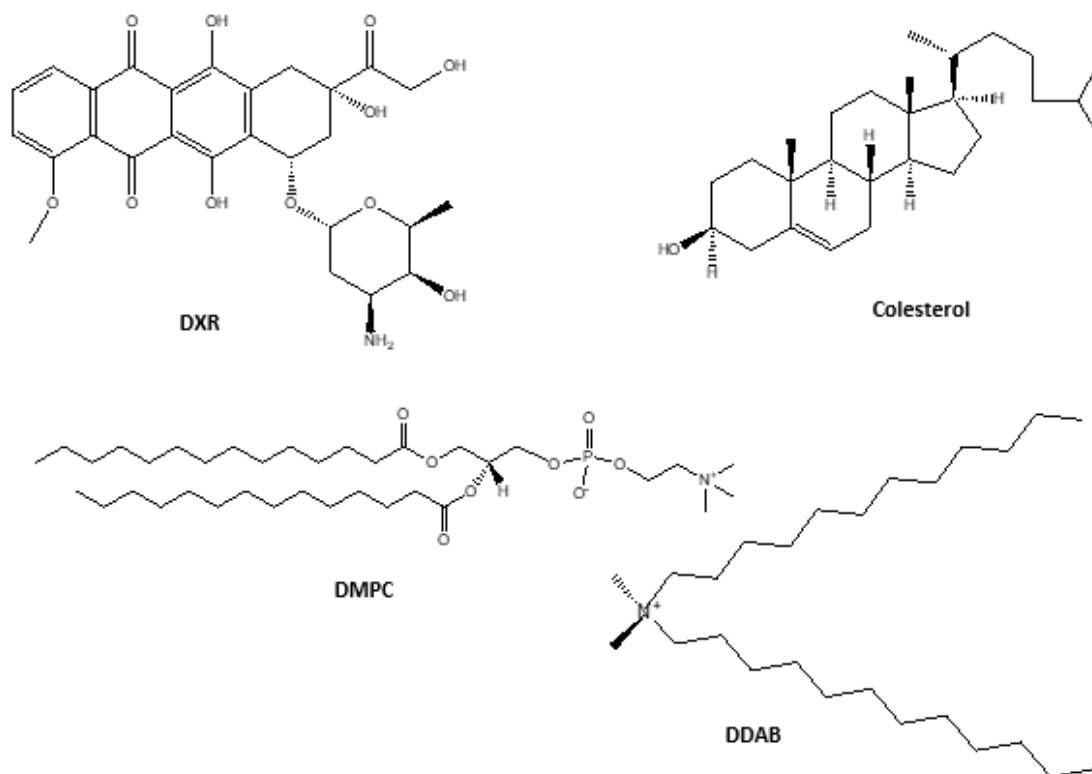


Figura 1. Estructura química de 1,2-dimiristoil sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), doxorubicina (DXR), colesterol, y bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB).

En el **Capítulo 2** se optimizó termodinámicamente la formulación de una mezcla lipídica que incluía DMPC, DDAB y colesterol, mediante el estudio termodinámico en la balanza de Langmuir. Estas monocapas formadas en la interfase aire / agua fueron transferidas, mediante la técnica de Langmuir-Schaefer, a electrodos monocristalinos de oro de orientación (111), Au (111), para analizar su estabilidad en presencia de campos eléctricos. Estos electrodos modificados suponen una plataforma ideal para estudiar las interacciones que un fármaco presenta con los distintos componentes de la formulación liposomal empleada para su administración.

En este capítulo se presenta el estudio del comportamiento de DXR sobre electrodos de Au (111) modificados con monocapas lipídicas cuya formulación fue previamente optimizada. Se ha considerado tanto la adsorción de la DXR a potenciales más elevados, como la cinética de reducción a potenciales más bajos. Para ello, se han empleado las técnicas de voltametría cíclica (CV) y espectroscopía electroquímica de impedancias (EIS). La reducción de DXR sobre electrodos de oro puede, en principio, tener lugar sobre

la DXR adsorbida en la superficie del electrodo y sobre la DXR que eventualmente llegue hasta la superficie por difusión desde el seno de la disolución de electrolito. Con objeto de simplificar el análisis de los resultados de cinética electródica, las condiciones experimentales seleccionadas han buscado minimizar la contribución de la difusión de DXR al proceso electródico, para que el modelo cinético empleado sólo considere la reducción de la DXR adsorbida.

1.2. Metodología

1.2.1. Transferencia de las películas a sustratos sólidos

Tanto para poder desarrollar aplicaciones tecnológicas como para poder estudiar estas películas mediante métodos microscópicos y espectroscópicos, es frecuente su transferencia a soportes sólidos.

- **Técnica de Langmuir-Blodgett (LB)**

Es el método más utilizado. Se basa en disponer un soporte sólido perpendicular a la interfase aire / agua cubierta por la monocapa que se va a transferir, y por medio de inmersión y / o emersión de dicho soporte, las moléculas se depositan en el sustrato sólido. Durante la transferencia se hace avanzar la barrera móvil para compensar la pérdida de moléculas y mantener constante la presión superficial (Figura 2).

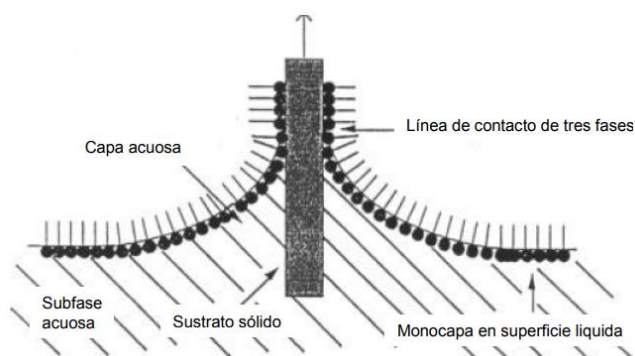


Figura 2. Técnica de transferencia Langmuir-Blodgett (LB). Depósito de monocapa flotante en un sustrato sólido.

La posibilidad de uso de distintos soportes, así como el tipo de película que se desee formar (monocapa, bicapa, multicapa), hace de esta técnica una herramienta muy versátil para el estudio y comparativa de distintos sistemas. Se conocen tres tipos de transferencias de películas:

- Tipo Y: depósito de ordenamiento centro simétrico dándose un orden de configuración cabeza-cabeza cola-cola. Se realiza por etapas alternas de emersión / inmersión desde la fase agua hacia la fase aire y viceversa pasando por la monocapa y repitiéndose consecutivamente hasta obtener el número de capas deseadas.
- Tipo X: esta transferencia se efectúa exclusivamente mientras se produce la inmersión del sustrato con las colas pegadas al sustrato y las cabezas hacia afuera. Se da más favorable en sustratos hidrofóbicos.
- Tipo Z: se efectúa exclusivamente a la vez que se emerge el sustrato sólido de la subfase acuosa al aire.
- Tipo XY: depósito parcial de ambos tipos X e Y. Se produce con la inmersión del sustrato y al emergerlo se produce otra transferencia parcial.

Además, se pueden repetir las distintas transferencias sobre el sustrato sólido para obtener diferentes películas (monocapa, bicapas, multicapas).

- **Método de Langmuir – Schaefer**

En esta técnica, el soporte hidrofóbico se hace contactar con la superficie de la monocapa en posición horizontal, de manera paralela a la interfase aire / agua. Así, la monocapa se transfiere con la parte apolar sobre el soporte y la parte polar queda en contacto con el aire, como se muestra en la Figura 3.

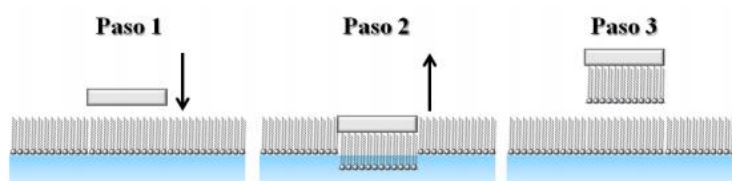


Figura 3. Técnica de transferencia Langmuir - Schaefer (LS)

1.2.2. Voltametría cíclica

La voltametría cíclica es una técnica electroquímica ampliamente empleada, especialmente para estudiar procesos redox. Consiste en aplicar una perturbación de potencial eléctrico que varía linealmente con el tiempo, entre un valor inicial (E_1) y un

valor final (E_2), y una vez alcanzado el valor final, se invierte el sentido del cambio de potencial. Esta perturbación, que se representa gráficamente en la Figura 4, se denomina onda triangular. La pendiente de la variación de potencial con el tiempo es la velocidad de barrido. Cabe destacar que el barrido se puede iniciar en el sentido anódico o catódico. Simultáneamente, se registra la intensidad de corriente que circula por el electrodo de trabajo, y se representa frente al potencial, lo que constituye un voltagrama o voltamperograma (Kissinger y Heineman, 1983).

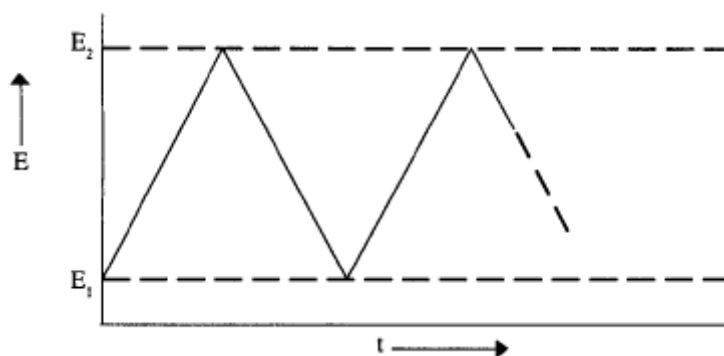
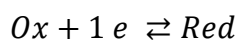


Figura 4. Ejemplo de barrido triangular de potencial empleado en voltametría cíclica.

La intensidad de corriente que se registra incluye la suma de las contribuciones de varios tipos de procesos: carga de la doble capa eléctrica que se forma entre la superficie del metal y la disolución, posible adsorción específica de especies y reacciones faradaicas (reacciones redox).

Las reacciones electródicas son reacciones heterogéneas, que tienen lugar exclusivamente en una parte concreta del sistema: la superficie del electrodo. Como consecuencia, cuando tiene lugar la reducción electródica de una especie oxidada (Ox) que se encuentra en disolución para dar una especie reducida (Red) es necesario considerar las etapas de transporte de Ox desde la disolución hacia la superficie del electrodo y de Red desde el electrodo hacia el seno de la disolución, tal y como se representa en el esquema de la Figura 5.



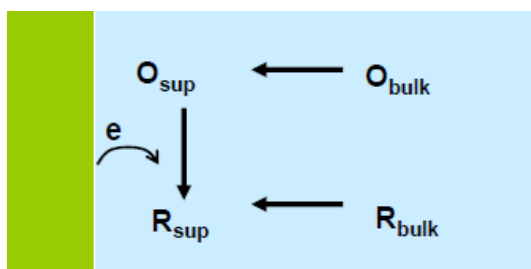


Figura 5. Esquema global de una reacción de transferencia electrónica simple (reducción), donde se aprecia además la difusión de reactivo y producto.

La intensidad de corriente (I) es proporcional a la velocidad del proceso de transferencia electrónica (v) en la superficie del electrodo. Así, para una reducción de n electrones:

$$I = n F v = n F (k_f c_{Ox,sup} - k_b c_{Red,sup}) \quad (1)$$

donde F es la constante de Faraday, k_f y k_b son las constantes de velocidad de la reacción en sentido directo y en sentido inverso, y $c_{Ox,sup}$ y $c_{Red,sup}$ son las concentraciones en la superficie del electrodo de las especies oxidadas y reducidas, respectivamente.

El voltograma registrado contiene información sobre la cinética de la reacción electroquímica. Las constantes de velocidad directa e inversa en una reacción electroquímica elemental, siguen el modelo de Butler-Volmer en su dependencia con el potencial:

$$k_f = k^0 \exp \left[\frac{-\alpha n F}{RT} (E - E^0) \right] \quad (2)$$

$$k_b = k^0 \exp \left[\frac{(1 - \alpha) n F}{RT} (E - E^0) \right]$$

donde k^0 y E^0 son la constante de velocidad estándar y el potencial estándar de la reacción redox, respectivamente, y α es el coeficiente de transferencia de carga del modelo de Butler-Volmer.

Si la reacción electroquímica es lo suficientemente rápida como para que se alcance el equilibrio en la superficie del electrodo (es decir, que las concentraciones $c_{Ox,sup}$ y $c_{Red,sup}$ cumplan la ecuación de Nernst), se dice que el proceso es reversible y

el voltograma que se obtiene es del tipo del representado en la Figura 6 (Bard y Faulkner, 2001).

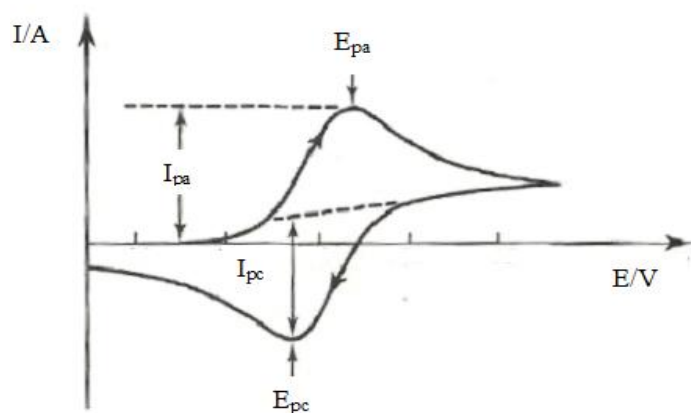


Figura 6. Voltograma cíclico característico de una reacción de transferencia electrónica reversible.

Para un sistema reversible, si el barrido se inicia en el sentido anódico, cuando se alcanza el potencial necesario para que ocurra la oxidación, la corriente aumenta hasta que se alcanza un valor máximo, I_{pa} . Debido a que la especie electroactiva se consume en la superficie del electrodo, la corriente disminuye al aumentar el tiempo, aunque ello implique aumentar el potencial. Cuando se invierte el barrido de potenciales pueden observarse corrientes catódicas debidas a la reacción de reducción. Dos parámetros que se deben tener en cuenta para el análisis posterior son las intensidades de corriente y potenciales de los máximos catódico y anódico, conocidas como corriente de pico catódico (I_{pc}), potencial de pico catódico (E_{pc}), corriente de pico anódico (I_{pa}) y potencial de pico anódico (E_{pa}), como se muestra en la Figura 6.

Para un proceso reversible, la separación entre los potenciales de los picos catódico y anódico es constante, independiente de la velocidad de barrido en voltametría:

$$\Delta E_{rev} = [E_{pa} - E_{pc}] = 2,303 \frac{RT}{nF} \quad (3)$$

El potencial estándar formal del proceso reversible viene dado por la siguiente expresión, ecuación (4):

$$E^0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (4)$$

CAPÍTULO 4

La relación entre la velocidad de barrido, la concentración de la especie que reacciona y la intensidad de pico para un proceso reversible es la siguiente ecuación:

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot A \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot c \cdot v^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

siendo I_p la intensidad de pico, A el área del electrodo (cm^2), D el coeficiente de difusión, c la concentración en el seno de la disolución de la especie electroactiva y v la velocidad de barrido (V/s).

Mediante una representación gráfica de la intensidad de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido se puede estudiar el carácter difusivo de un determinado sistema electroquímico, ya que la obtención de una línea recta indicaría que el proceso tiene lugar exclusivamente sobre las especies que llegan al electrodo por difusión.

En el caso de que tanto las especies Ox como Red se encuentren en estado adsorbido sobre la superficie del electrodo, y la posible contribución de la difusión hacia/desde la disolución sea despreciable, la intensidad de corriente y la velocidad de la reacción se expresarían:

$$I = n F v A = n F A (k_f \Gamma_{Ox} - k_b \Gamma_{Red}) \quad (6)$$

donde Γ_{Ox} y Γ_{Red} son las concentraciones superficiales de Ox y Red, respectivamente, en moles cm^{-2} .

El voltagrama tipo correspondiente a estos procesos electroquímicos sobre especies adsorbidas (Laviron, 1979b), en el caso de reacción electroquímica reversible, y suponiendo que la adsorción obedece a un modelo de Langmuir, en el que entre otras aproximaciones se considera que no existe interacción entre moléculas adsorbidas y que todos los sitios de adsorción son equivalentes, es como el que aparece en la Figura 7.

En la figura se observa, como características de este tipo de procesos, que los potenciales de pico anódico y catódico son coincidentes, en el denominado *potencial de*

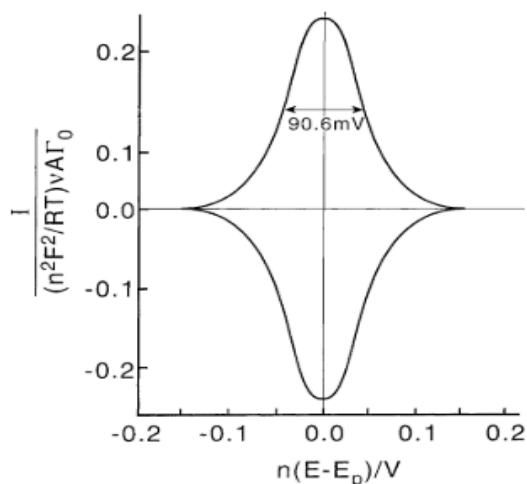


Figura 7. Voltagrama característico de una reacción electroquímica reversible de especies adsorbidas.

equilibrio superficial (E_j), relacionado con el potencial estándar formal mediante la expresión:

$$E_j = E^{0'} - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{b_{Ox}}{b_{Red}} \right) \quad (7)$$

donde b_{Ox} y b_{Red} son las energías libres de adsorción de las especies Ox y Red, respectivamente.

Además, para reacciones reversibles, la semi-anchura del voltagrama (anchura a mitad de altura de pico) es $90.6/n$ mV, independientemente de la velocidad de barrido.

Por otro lado, la intensidad de pico tanto catódico como anódico, varía linealmente con la velocidad de barrido del voltagrama:

$$I_{pc} = -I_{pa} = \frac{-n^2 F^2 v A \Gamma_{Ox+Red}}{4RT} \quad (8)$$

donde Γ_{Ox+Red} representa la concentración superficial total, de especies Ox y Red.

Si la velocidad de barrido es lo suficientemente alta, el comportamiento cinético del proceso puede dejar de ser reversible y, aunque la expresión anterior para la intensidad de pico se mantiene, los picos anódico y catódico se desplazan a potenciales mayores y menores respectivamente con la velocidad. Si la separación entre los potenciales de pico anódico y catódico supera el valor de $200/n$ mV, los potenciales de pico anódico y catódico varían linealmente con el logaritmo de la velocidad de barrido. Los valores para

$E = E_j$ de las abscisas en esas representaciones, proporcionan las denominadas velocidad crítica anódica y velocidad crítica catódica, $v_{crítica\ an}$ y $v_{crítica\ cat}$, que permiten calcular los valores de la constante de velocidad anódica y catódica al potencial de equilibrio superficial, $k_j = k_f(E_j) = k_b(E_j)$ y el coeficiente de transferencia de carga de Butler-Volmer, α .

$$k_j^0 = \frac{\alpha n F v_{crítica\ cat}}{RT} = \frac{(1 - \alpha) n F v_{crítica\ an}}{RT} \quad (9)$$

1.2.3. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (*Electrochemical Impedance Spectroscopy - EIS*)

La técnica de impedancia electroquímica consiste en aplicar una perturbación de potencial de corriente alterna, $E(t)$, sobre un sistema electroódico y registrar la respuesta de intensidad de corriente que proporciona el sistema, $I(t)$, con la misma frecuencia que la perturbación, pero desplazada un ángulo de desfase, φ (Figura 8):

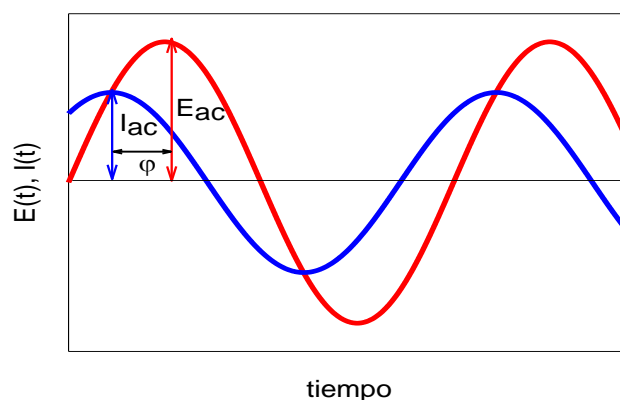


Figura 8. Representación gráfica de la respuesta de corriente alterna $I(t)$ a la perturbación de potencial de corriente alterna $E(t)$.

$$E(t) = E_{ac} \text{sen}(\omega t) \quad (10)$$

$$I(t) = I_{ac} \text{sen}(\omega t + \varphi) \quad (11)$$

donde E_{ac} y I_{ac} son las amplitudes de potencial e intensidad de corriente alterna, respectivamente, y ω es la frecuencia angular. La impedancia (Z) es la relación entre el potencial y la intensidad $E(t)/I(t)$, y depende de la relación de amplitudes y del ángulo de

desfase. Se trata de una magnitud compleja, que conforme a la fórmula de Euler queda definida:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_{ac}}{I_{ac}} e^{i\varphi} = Z_{abs} \cos(\varphi) + i Z_{abs} \text{Sen}(\varphi) \quad (12)$$

siendo Z_{abs} el módulo de la impedancia y $i = (-1)^{1/2}$ la unidad compleja. Las componentes imaginaria y real de la impedancia quedan definidas de la siguiente forma, ecuaciones (13) y (14):

$$Z_I = Z_{abs} \text{Sen}(\varphi) \quad (13)$$

$$Z_R = Z_{abs} \cos(\varphi) \quad (14)$$

La dependencia que presenta la impedancia de un sistema electroquímico con la frecuencia de la perturbación proporciona información valiosa acerca de las etapas elementales que componen el proceso global. Cada tipo de proceso elemental lleva asociada una impedancia con una dependencia con la frecuencia característica, equivalente a la dependencia con la frecuencia que presentan elementos de circuito eléctrico:

- La conducción eléctrica que ocurre en la disolución electrolítica se comporta como una resistencia, denominándose la impedancia asociada resistencia óhmica, R_Ω .
- La carga que ocurre en la doble capa formada en la interfase electródica, es un proceso que equivale a la carga que de un condensador de capacidad C , cuya impedancia sólo tiene componente imaginaria y es inversamente proporcional a la frecuencia:

$$Z = i/\omega C \quad (15)$$

- La transferencia elemental de carga, en una oxidación o reducción en la interfase, posee una impedancia que presenta el mismo comportamiento con la frecuencia de una resistencia, denominándose resistencia de transferencia de carga (R_{ct}).

- La impedancia de los procesos de transporte de materia por difusión queda asociada a la de un elemento de Warburg (σ), cuya expresión para la impedancia es la siguiente:

$$Z = \sigma (1 - i) / \omega^{1/2} \quad (16)$$

En el caso de que no exista ninguna reacción redox y el sistema se encuentre en situación de equilibrio, la impedancia de la célula electroquímica es equivalente a la correspondiente a un circuito RC en serie, que representa la resistencia óhmica de la disolución de electrolito y la capacidad correspondiente a la carga de la doble capa, como se muestra en la Figura 9.

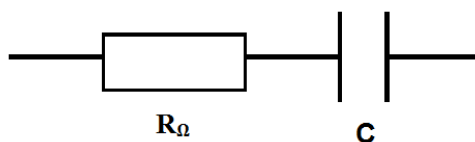


Figura 9. Circuito RC en serie.

La medida de la impedancia electroquímica en este tipo de sistemas permite obtener la capacidad de la interfase a partir de la componente imaginaria impedancia y la ecuación (17).

La impedancia de la célula contiene información cinética y termodinámica sobre los procesos que pueden tener lugar en la interfase electródica, además de la carga de la doble capa, adsorción, difusión o transferencia electrónica, que modifica la dependencia de la impedancia con la frecuencia.

En el caso de que tenga lugar una reacción de transferencia electrónica elemental sobre especies en disolución, la impedancia de la célula electroquímica incluye la denominada *impedancia faradaica*, cuya dependencia con la frecuencia viene dada por:

$$Z = R_{ct} + \sigma (1 - i) / \omega^{1/2} \quad (17)$$

donde, como ya se ha indicado, R_{ct} es la denominada resistencia de transferencia de carga, que contiene información cinética sobre el proceso faradaico, que aparece combinada con la impedancia de Warburg, característica del transporte por difusión.

Este proceso (transporte más reacción) ocurre en paralelo con la carga de la doble capa, por lo que las impedancias correspondientes se combinan en paralelo, dando lugar a la *impedancia electródica o interfacial*, que no contiene las contribuciones de la resistencia eléctrica de la disolución, la cual se combinaría en serie con la impedancia electródica para dar lugar a la impedancia total, cuya dependencia con la frecuencia viene expresada por la *ecuación de Randles*:

$$Z = R_{\Omega} + \left[\left(i/\omega C_{HF} \right)^{-1} + \left(R_{ct} + \sigma (1 - i)/\omega^{1/2} \right)^{-1} \right]^{-1} \quad (18)$$

cuya dependencia con la frecuencia es la misma que corresponde a la impedancia del circuito equivalente de la Figura 10, denominado *circuito de Randles*.

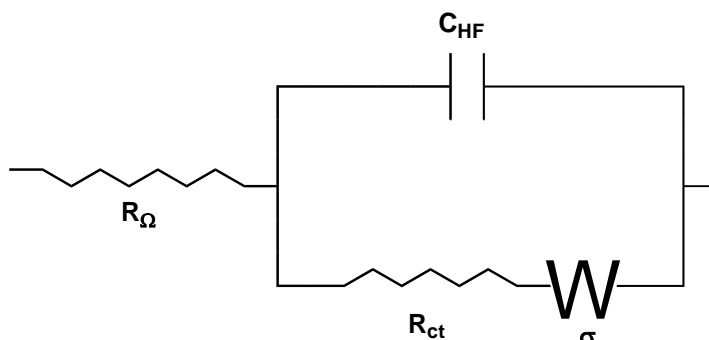


Figura 10. Circuito de Randles.

Para una reacción electródica sobre especies adsorbidas (sin difusión), la expresión para la impedancia de la célula electroquímica deducida a partir de principios físicos (Laviron, 1979a), viene dada por la ecuación (19), y se corresponde con el circuito equivalente representado en la Figura 11:

$$Z = R_{\Omega} + \left[\left(i/\omega C_{HF} \right)^{-1} + \left(R_{ct} + 1/i\omega C_a \right)^{-1} \right]^{-1} \quad (19)$$

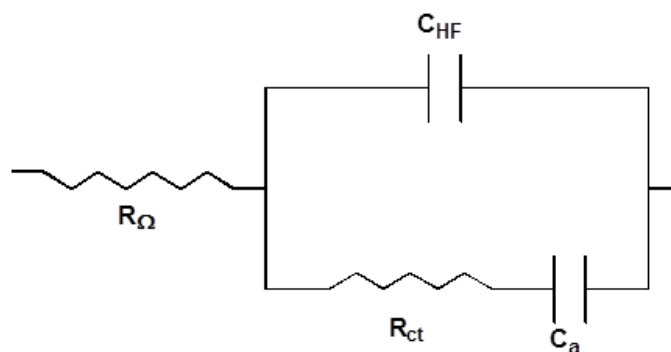


Figura 11. Circuito equivalente correspondiente a una reacción electroquímica sobre especies adsorbidas.

donde R_{Ω} , C_{HF} , R_{ct} y C_a son parámetros independientes de la frecuencia, a los que les corresponden impedancias equivalentes a elementos de circuito eléctrico (en este caso resistencias y condensadores) y en cuyas definiciones se encuentra la información cinética y termodinámica del proceso:

R_{ct} es la denominada resistencia de transferencia de carga, definida por:

$$R_{ct} = \frac{RT}{n^2 F^2 k_f} \frac{1}{[\alpha \Gamma_{Ox} + (1 - \alpha) \Gamma_{red} e^{\varphi}]} \quad (20)$$

C_a es la denominada capacidad de adsorción:

$$C_a = \frac{n^2 F^2}{RT} \frac{1 \alpha \Gamma_{Ox} + (1 - \alpha) \Gamma_{red} e^{\varphi}}{1 + e^{\varphi}} \quad (21)$$

R_{Ω} y C_{HF} son la resistencia óhmica de la disolución de electrolito y la capacidad de carga de la doble capa eléctrica de la interfase electroquímica.

En este caso, dado que el transporte de materia no está presente en el proceso global, no aparece el término de Warburg en la impedancia. Sí aparece un término capacitivo, en serie con la resistencia de transferencia de carga, como consecuencia de la adsorción de las especies electroactivas.

La dependencia con la frecuencia de la impedancia de la célula se puede representar gráficamente de diferentes formas. Una de ellas es mediante los denominados *diagramas de Nyquist*, en los que se representa la componente imaginaria de la impedancia frente a la componente real. En la Figura 12 se muestran los diagramas de Nyquist representativos de las dependencias con la frecuencia correspondientes a un

circuito RC, en ausencia de reacciones de transferencia electrónica, a un circuito de Randles para una transferencia electrónica elemental con transporte por difusión y al circuito de la Figura 11 correspondiente al modelo de Laviron para reacciones de transferencia electrónica entre especies adsorbidas.

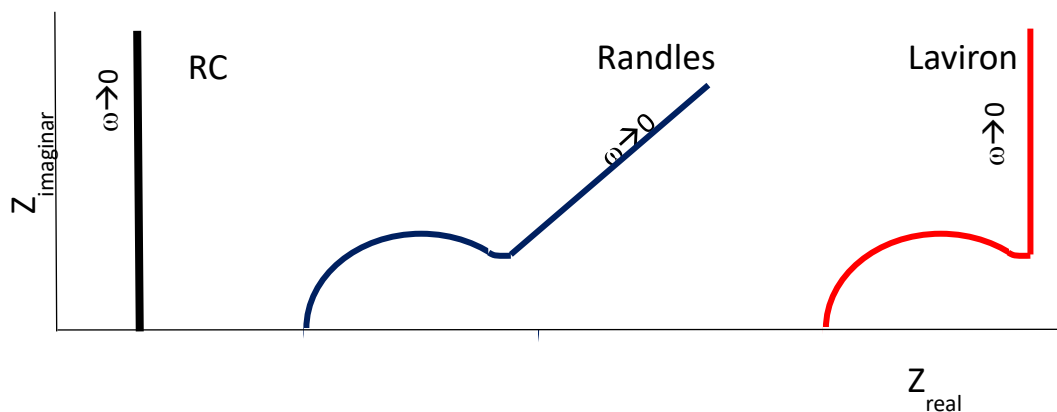


Figura 12. Diagramas de Nyquist correspondientes a un sistema sin transferencia electrónica (circuito RC), a un sistema con transferencia electrónica elemental sobre especies en disolución (circuito de Randles) y sobre especies adsorbidas (modelo de Laviron).

Como se puede comprobar en la Figura 12, en el caso de que sólo esté presente la carga de la doble capa eléctrica, el diagrama de Nyquist da lugar a una línea vertical. Por el contrario, cuando existe una transferencia electrónica elemental, aparece un arco circular en las representaciones de Nyquist, y a frecuencias bajas una línea recta con inclinación de 45° , para el circuito de Randles, o vertical, para el modelo de Laviron. Por tanto, la dependencia con la frecuencia de la impedancia de la célula electroquímica permite distinguir las reacciones de transferencia electrónica regidas por difusión o regidas por adsorción.

1.3. Objetivos

Los objetivos planteados en el presente capítulo se pueden dividir en dos principales.

En primer lugar, se plantea estudiar la estabilidad de las películas lipídicas basadas en DMPC, optimizadas en el capítulo 2, una vez transferidas sobre electrodos de oro monocristalinos de orientación (111), estableciendo el rango de potenciales en los que la película es estable y / o se puede regenerar, y determinar la influencia que la presencia de colesterol y DDAB ejerce sobre las características de estas películas adsorbidas sobre

Au (111). Esto se llevará a cabo estudiando las curvas de capacidad frente al potencial, a una sola frecuencia, y se analizará la homogeneidad de las películas soportadas mediante los espectros de impedancia.

En segundo lugar, se pretende estudiar las interacciones que el fármaco anticancerígeno DXR tiene con los componentes de estos electrodos modificados por lípidos, mediante el estudio de su inclusión en la película lipídica y su posterior reducción sobre el oro. El análisis cinético se llevará a cabo mediante espectroscopía de impedancias, aplicando un modelo para reacciones electródicas entre especies adsorbidas, sin contribución de la difusión. Para garantizar esas condiciones, se llevarán a cabo experimentos en los que la película lipídica con DXR insertada se transferirá al electrodo, mediante la técnica de Schaefer, en la balanza de Langmuir, para posteriormente trasladar dicho electrodo a la célula electroquímica que no contiene DXR.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Todas las disoluciones lipídicas han sido preparadas utilizando como disolvente cloroformo (Sigma-Aldrich), de grado analítico. Las disoluciones stock de los componentes puros fueron las siguientes: DMPC 0.8 mg/mL, DDAB 0.77 mg/mL y colesterol 0.43 mg/mL. Su almacenamiento fue en un congelador a -20 °C. Así mismo, las mezclas de lípidos se prepararon mezclando los volúmenes necesarios de cada disolución de lípido puro para obtener la fracción molar deseada, preparándose en la misma jornada en la que iban a ser utilizadas.

Como electrolito soporte se utilizó una disolución de KClO_4 0.1 M (Merck p.a.). En las experiencias en las que se empleó DXR, se prepararon dos disoluciones de electrolito soporte de KClO_4 0.1 M con tampón acético / acetato de concentración 0.01 M de ácido acético y 0.01 M de acetato de potasio (pH 4.7).

Se preparó una disolución stock de DXR (Sigma-Aldrich) en agua, de concentración 1.4 mg/mL ($2.41 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), que se almacenó refrigerada y protegida de la luz mediante papel de aluminio, pues es fotosensible. Tras dos semanas, se renueva la disolución stock, para garantizar su estabilidad.

2.2. Medidas electroquímicas

Las medidas electroquímicas se han llevado a cabo en una célula de tres electrodos. Como electrodo de trabajo se ha empleado un electrodo monocristalino de oro (111), tratado a la llama según el método de Clavilier (Clavilier, 1999), modificado con monocapas lipídicas de formulación optimizada. Como electrodo auxiliar se empleó un hilo de oro, también limpio mediante tratamiento a la llama, y como electrodo auxiliar se usó un electrodo de $\text{Hg}_{(l)}/\text{Hg}_2\text{SO}_{4(s)}/\text{K}_2\text{SO}_{4(ac,sat)}$ conectado a la célula mediante un puente salino que contenía la misma disolución de electrolito soporte que ésta. Todos los potenciales en este capítulo se han referenciado al del electrodo de calomelanos saturado, que es 0.4 V mayor que el del electrodo de referencia de $\text{Hg}_{(l)}/\text{Hg}_2\text{SO}_{4(s)}/\text{K}_2\text{SO}_{4(ac,sat)}$. Los experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron con el sistema electroquímico IviumStat (Ivium Technologies). La velocidad de exploración ha variado en el rango de 10 mV/s a 20 V/s. Antes de cada exploración, el electrodo se mantuvo a -0.100 V durante al menos 1 min para obtener la reorganización de la monocapa. Para las mediciones de impedancia se utilizó un sistema electroquímico multifuncional Autolab (PGSTAT30) equipado con un módulo analizador de respuesta de frecuencia (FRA).

Se han realizado dos tipos de medidas; por una parte, se han llevado a cabo medidas de capacidad a una sola frecuencia en los que el potencial se ha modificado secuencialmente de manera acumulada entre los límites inicial y final, alternando los sentidos de modificación para analizar la posible histéresis entre curvas sucesivas. La estabilidad del electrodo modificado se comprobó barriendo el potencial en un rango pequeño alrededor del potencial de capacidad mínima, mientras se registra la impedancia. Se considera un electrodo bien revestido y estable cuando se obtienen curvas capacidad frente al potencial casi planas, que no cambian en exploraciones sucesivas.

Por otro lado, se han realizado medidas de espectros de impedancias a distintos potenciales de la región de estabilidad de las películas. Para recopilar los datos en un amplio espectro de frecuencias, se usó el modo de 'multi-sine' en el que se aplican pulsos de 15 frecuencias simultáneas y la respuesta en función del tiempo se analiza

mediante transformación de Fourier. A cada potencial de medida, se aplicaron dos pulsos de 15 frecuencias cada uno, cubriendo en total el rango de 10 Hz a 10 kHz.

Para el análisis de impedancia se aplicó un procedimiento de perturbación de potencial denominado *punto a punto* en el que antes de cada potencial de muestra (E_{sample}) y pulso de frecuencias, se permitió la reorganización de la monocapa que recubría el electrodo a -0.100 V vs SCE durante 60 s. Posteriormente, el potencial de medida se aplicó durante 2 s, periodo al final del cual se registra el espectro de impedancias (Figura 13). Para comprobar la integridad del electrodo modificado con la película lipídica, los experimentos se programaron en varias series de potenciales intercalados, cada serie con intervalos de paso (ΔE) de ± 20 mV o -40 mV.

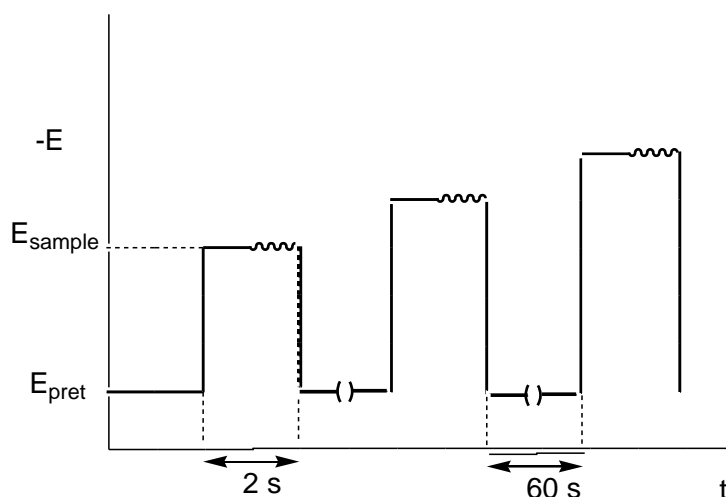


Figura 13. Esquema de la perturbación aplicada a los electrodos de Au (111) para registrar los espectros de impedancia en la región de reducción de DXR.

La modificación del electrodo de Au (111) con la película lipídica y el contacto con la disolución de DXR se llevó a cabo de dos maneras diferentes. Por una parte, se preparó la película en la interfase gas inerte / electrolito en la misma célula electroquímica, extendiendo el volumen necesario de disolución lipídica sobre la superficie de la disolución de electrolito, que ya incluía la DXR, y esperando a la evaporación del disolvente. Posteriormente, se contactaba por el método del menisco el electrodo de Au (111), que había permanecido en la atmósfera inerte de la célula electroquímica. Por otro lado, se prepararon las películas lipídicas en la interfase aire / agua de la balanza de

Langmuir, cuya subfase contenía la disolución de DXR, para a continuación transferir la monocapa al electrodo de Au (111), permitir que se estabilizara durante 30 min sobre la superficie de la balanza de Langmuir, transferirlo a la célula electroquímica y ponerlo en contacto con la disolución del electrolito por el método del menisco colgante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Formación de películas lipídicas en la interfase gas/líquido de la balanza de Langmuir en presencia de DXR

Se han registrado las isothermas de Langmuir para mezclas de DMPC, DDAB y colesterol, en las proporciones descritas anteriormente, en presencia y en ausencia de DXR en la subfase. Los resultados se muestran en la Figura 14.

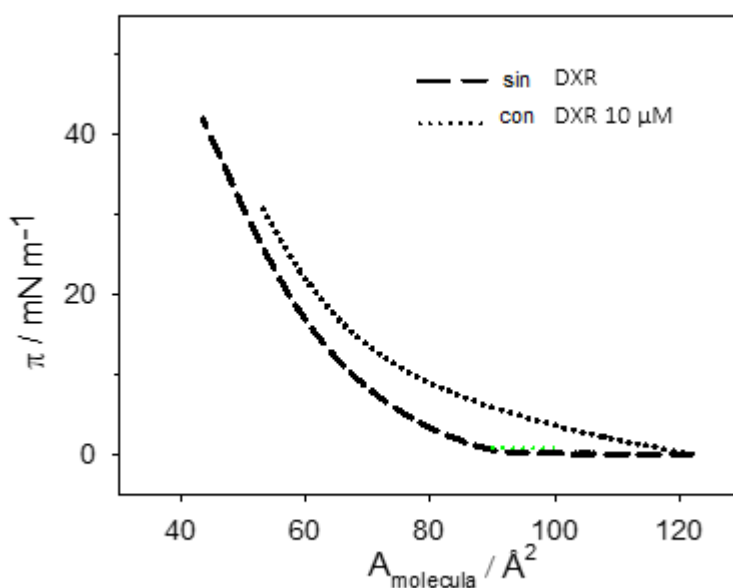


Figura 14. Isothermas de la mezcla DMPC, DDAB y colesterol en presencia y en ausencia de DXR en la subfase.

Cuando la concentración de DXR añadida en la subfase acuosa es 1 μM , la isoterma que se registra es coincidente con la obtenida en ausencia de DXR. Este hecho indica que, en esas condiciones, prácticamente toda la DXR presente se encuentra disuelta, sin formar parte de la película superficial.

Sin embargo, cuando la concentración de DXR presente en la subfase es superior a 5 μM , la correspondiente isoterma presenta claras diferencias respecto de la que se obtiene en ausencia de fármaco: mayor área por molécula de lípido a cualquier presión y una menor pendiente de la isoterma a elevadas presiones. Ambas diferencias indican que, al menos a partir de esta concentración de DXR en la subfase acuosa, parte de la misma pasa a integrarse en la monocapa lipídica.

Esta conclusión podría extrapolarse a los liposomas empleados como transportadores del fármaco: aunque la DXR se encontraría mayoritariamente presente en el interior acuoso del liposoma, también estaría presente en la bicapa de éste.

3.2. Caracterización electroquímica de los electrodos de oro recubiertos con monocapas lipídicas basadas en DMPC en ausencia de DXR

Para proceder al posible desarrollo de biosensores electroquímicos basados en películas lipídicas, es necesario conocer la influencia que el campo eléctrico tiene sobre este tipo de películas. En este apartado se describen una serie de medidas de capacidad diferencial destinadas a establecer el rango de potenciales en los que la película lipídica soportada sobre un electrodo de oro monocristalino está bien organizada, además de determinar los límites aproximados de potencial eléctrico que no se deben superar para desorganizar de forma irreversible la película.

El potencial al que se establece el contacto entre el electrodo y la película lipídica formada en la interfase aire/disolución de electrolito, fue previamente tanteado para que correspondiera a la región en la que la película se encuentra bien organizada sobre el electrodo. Para ello se realizaron barridos de capacidad diferencial en función del potencial, hacia los potenciales más bajos y hacia los potenciales más altos consecutivamente, modificando los límites de dichos barridos.

3.2.1. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111)/DMPC

En la Figura 15 se muestran las curvas de capacidad obtenidas con electrodo Au (111) recubiertos de monocapas de DMPC en contacto con disoluciones de KClO_4 0.1 M. Se observa cómo al potencial de contacto (0.0 V vs ECS) la capacidad diferencial obtenida con el electrodo recubierto de la película es mucho menor (aprox. 8 $\mu\text{F cm}^{-2}$) que la

CAPÍTULO 4

obtenida sólo con el electrolito soporte (aprox. $22 \mu\text{F cm}^{-2}$). La interfase tiene el carácter de un condensador de placas paralelas (Julia y Coso, 2004), cuya capacidad por unidad de área viene determinada por la ecuación (22). La monocapa origina un descenso en la permitividad dieléctrica de la interfase electrodo/disolución, por la baja constante dieléctrica relativa de los compuestos orgánicos.

$$C = \frac{\epsilon\epsilon_r}{d} \quad (22)$$

donde ϵ es la permitividad en el vacío ($8.85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 / \text{Nm}^2$), ϵ_r es la permitividad relativa de la interfase y d es el espesor de la interfase.

Es necesario destacar que el valor de capacidad mínima obtenido para el electrodo modificado con DMPC es superior al descrito en la bibliografía para monocapas lipídicas de espesor similar (Julia y Coso, 2004), de aproximadamente $2 \mu\text{F}$. Esto indica que la monocapa formada por DMPC puro sobre Au (111) presenta defectos, y no recubre completamente la superficie del metal.

Por otro lado, parece que se puede alcanzar el límite de potencial positivo de 0.6 V sin que se altere apreciablemente la organización de la monocapa, pues en sucesivos barridos se obtienen curvas de capacidad similares.

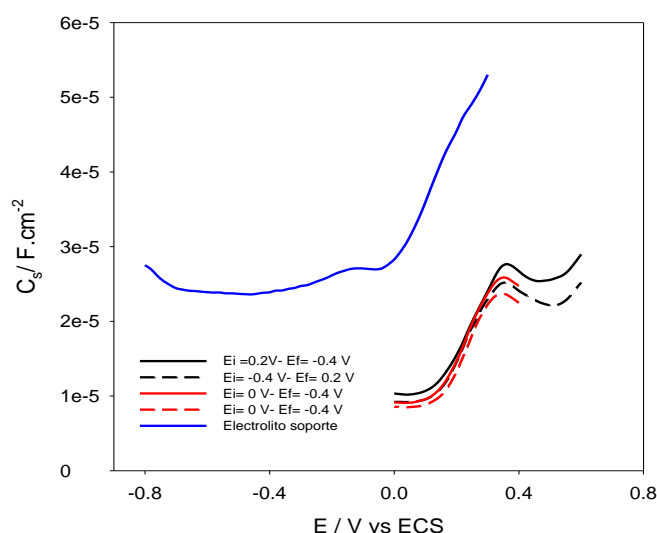


Figura 15. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111) / DMPC en KClO_4 0.1 M como electrolito soporte con los potenciales iniciales (E_i) y finales (E_f) indicados en la figura a una frecuencia de 25 Hz. Las líneas continuas corresponden a barridos de potencial en sentido creciente y las líneas discontinuas en sentido decreciente.

3.2.2. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111)/DMPC-colesterol

En la Figura 16 se muestran las curvas de capacidad registradas con electrodos de Au (111) recubiertos de películas mixtas DMPC-colesterol. Se observa cómo la presencia de colesterol origina un descenso de la capacidad mínima, lo que sugiere un menor número de defectos en estas películas que en el caso de las formadas por DMPC puro, aproximándose al valor teórico para una monocapa compacta.

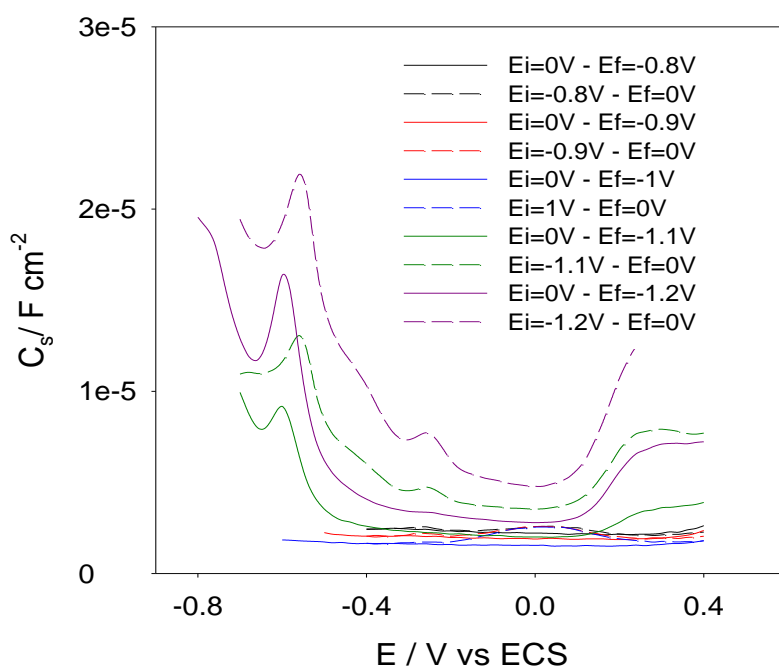


Figura 16. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111) / DMPC-Ch ($X_{\text{col}} = 0.1$) en KClO_4 0.1 M como electrolito soporte con los potenciales iniciales y finales indicados en la figura a una frecuencia de 25 Hz. Las líneas continuas corresponden a barridos en el sentido catódico mientras que las líneas discontinuas del mismo color representan los sucesivos barridos de vuelta en el sentido anódico. El límite catódico se ha ido incrementando en los barridos sucesivos.

Por otra parte, la realización de ciclos de barrido de potencial sucesivos en los que se va extendiendo el límite de potenciales bajos permite concluir que esta película está bien organizada en un rango de potenciales aproximado de 0.4 a -0.4 V, pues en el barrido catódico hasta -0.4 V la capacidad no aumenta significativamente y en el siguiente barrido anódico desde -0.4 hasta 0.4 V la curva de capacidad no muestra histéresis. En torno a -0.6 V aparece una señal, probablemente debida a la reorganización de la película lipídica. Si el límite más bajo de potencial supera ese valor, en los siguientes

barridos tanto anódicos como catódicos no se alcanza la capacidad mínima obtenida anteriormente, indicando un cambio irreversible en la organización de la película.

3.2.3. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111)/DMPC:DDAB-colesterol

Las curvas de capacidad obtenidas para electrodos de Au (111) modificados con monocapas ternarias DMPC-DDAB-colesterol se muestran en la Figura 17.

Se han realizado barridos de capacidad sucesivos, en sentidos catódico y anódico, en un rango de potencial desde 0.3 V hasta -0.2 V, ampliándose posteriormente el rango desde 0.5 V hasta -0.6 V, siendo el potencial de contacto 0.3 V.

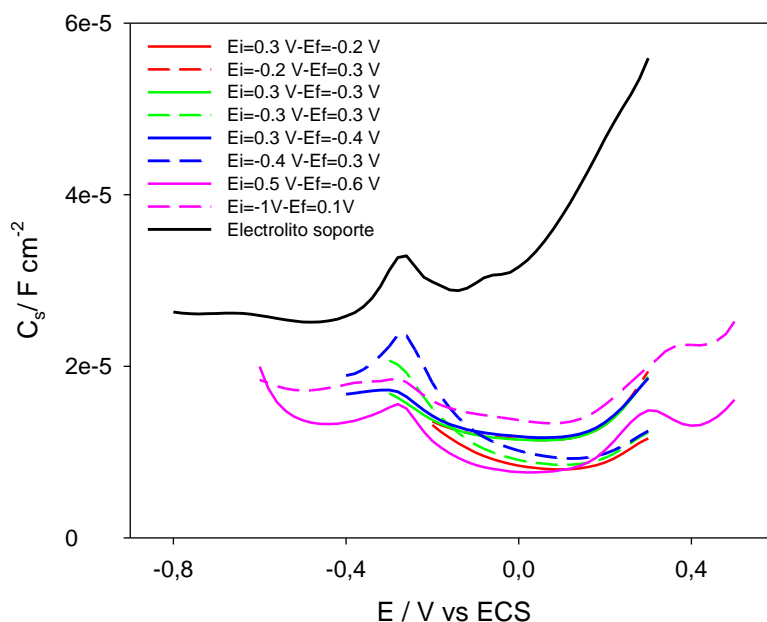


Figura 17. Curvas de capacidad obtenidas con Au (111) / DMPC-DDAB-colesterol ($X_{col} = 0.10$) en $KClO_4$ 0.1 M como electrolito soporte con los potenciales iniciales y finales indicados en la figura a una frecuencia de 25 Hz. Las líneas continuas corresponden a barridos catódicos mientras que las líneas discontinuas del mismo color representan los barridos anódicos de vuelta. El límite catódico se ha ido extendiendo en cada ciclo.

En este caso, al realizar ciclos de barrido de potencial sucesivos en los que se va extendiendo el límite catódico, se obtiene que la película se encuentra bien organizada en un rango de potenciales que abarca desde 0.3 hasta -0.1 V. Si se realiza un barrido cuyo límite alto de potencial sea superior a -0.2 V, se observa que no se alcanzan los valores de capacidad mínimos obtenidos a menores límites altos de potencial, lo que indica un cambio irreversible en la organización de la película lipídica. El hecho de que

el rango de potencial en el que la película está bien organizada sea menor que en el caso de la película lipídica en ausencia de DDAB, en la Figura 17, se debe a que la presencia de este catión puede aportar una ligera inestabilidad a la película en presencia de campos eléctricos elevados, provocando que, tras alcanzar ciertos límites catódicos, la película no se recupere del todo, aunque su presencia no llega a provocar grandes cambios en los valores de capacidad.

El procedimiento de medida empleado, en el que el potencial se modifica de forma secuencial en un sentido, origina la polarización de la interfase durante largos periodos, sin permitir la recuperación de las alteraciones que origine dicha perturbación. Por ello, dado que para estudiar la interacción del fármaco DXR con los componentes de estos electrodos modificados y analizar la cinética de su reducción, es necesario explorar potenciales inferiores a -0.4 V, se han realizado medidas empleando el procedimiento *punto a punto*, descrito anteriormente, que permite la recuperación de las condiciones en la interfase entre cada dos espectros de impedancias consecutivos.

3.3. Caracterización electroquímica de los electrodos de oro recubiertos con monocapas de la mezcla de lípidos mediante el procedimiento *punto a punto* en ausencia de DXR

La interacción de la DXR con las películas superficiales mostrada en el apartado anterior sugiere la posibilidad de que electrodos modificados con películas de este tipo pudieran ser empleados como sensores de DXR, especie electroactiva, por los grupos quinona e hidroquinona presentes en su estructura. Por otra parte, el estudio electroquímico de las películas de fosfolípidos modificadas con DXR puede ser de gran interés para comprender la liberación de dicho fármaco a partir de los preparados de liposomas que lo contienen.

Los electrodos de Au (111) recubiertos por el método Langmuir - Schaefer en la celda electroquímica a sus respectivas presiones de equilibrio superficial se caracterizaron por la técnica de impedancia. Se analizaron las presiones de equilibrio superficial, medidas en la balanza de Langmuir, que salieron un poco más altas en presencia de DXR en la subfase (45 y 44 mN/m para las películas formadas por los tres y dos componentes respectivamente) que en ausencia de DXR (40 y 38 mN/m para las películas tres

componentes y dos componentes, respectivamente. Los valores de pseudo-capacidad a 1 kHz se representan en función del potencial aplicado en la Figura 18 para los electrodos recubiertos con las monocapas de tres y dos componentes, en presencia y en ausencia de DXR en la disolución de electrolito soporte. Los datos, obtenidos por el procedimiento *punto a punto*, no muestran prácticamente histéresis en los escaneos sucesivos en sentidos negativos y positivos de potencial, incluso después de que el electrodo haya alcanzado el potencial límite más negativo (-0.600 V). Las curvas mostraron una región de capacitancia mínima alrededor de -0.150 V para el electrodo recubierto con DMPC-DDAB-Ch. El valor del mínimo es menor y está desplazado a potenciales algo más positivos, -0.050 V, para el electrodo recubierto con DMPC-Ch. Parece, por tanto, que la presencia de DDAB en la formulación tiene dos efectos sobre ella: por una parte, el potencial del mínimo de capacidad está relacionado con el potencial de carga cero del electrodo, por lo que el desplazamiento del mínimo de capacidad hacia potenciales mayores en presencia de DDAB indica un aumento de la carga, como consecuencia del carácter catiónico del DDAB. Por otro lado, la capacidad mínima en presencia de DDAB es ligeramente superior que, en su ausencia, lo que indica una película menos organizada.

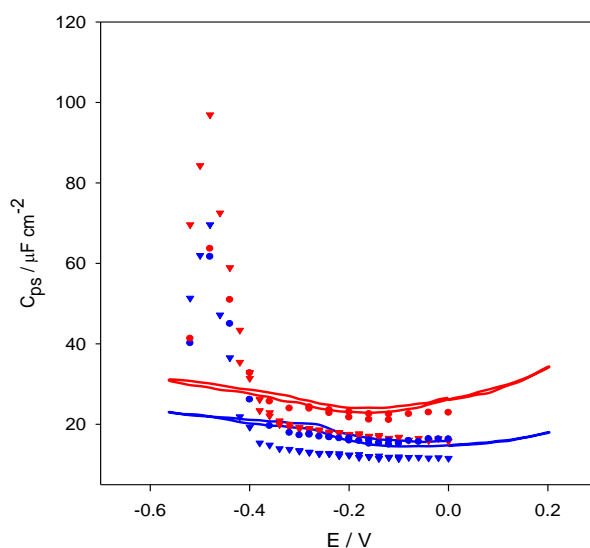


Figura 18. Curvas C_{ps} vs E medidos con el procedimiento paso a paso a 1 kHz con electrodos de Au (111) modificados con monocapas formadas en la celda electroquímica con mezclas de DMPC-colesterol (líneas azules) y DMPC-DDAB (3:1)-Colesterol (líneas rojas). Los gráficos de C_{ps} vs E en presencia de DXR en la celda electroquímica: sin DDAB (triángulos azules) y con DDAB (triángulos rojos). Gráficos C_{ps} vs E obtenidos con electrodos Au (111) cubiertos por el método Langmuir - Schaefer sin DDAB (círculos azules) y con DDAB (círculos rojos) en la presencia de 10 μM DXR en la subfase de la balanza de Langmuir.

Los datos de impedancia a cada potencial se analizaron en función de frecuencia siguiendo el modelo de la combinación en serie de una resistencia (representativo de la caída óhmica en la celda) y una constante de fase (CPE) (representativo de la carga del electrodo de interfase). La impedancia de este elemento se describe como $Z_{CPE} = (Q \omega i)^{n_{CPE}}$, donde Q es un parámetro independiente de frecuencia y n_{CPE} es un coeficiente que varía de 0 a 1. Para $n_{CPE} = 1$ el elemento se convierte en un condensador puro, por lo que la impedancia de la celda se puede modelar como un circuito RC. Los valores de n_{CPE} inferiores a 1 generalmente se interpretan, en ausencia de procesos faradaicos o de adsorción específica limitada cinéticamente, como debidos a una superficie con rugosidad o heterogeneidades (Pajkossy, 1997). Los electrodos recubiertos con las películas de tres componentes o con las películas de dos componentes proporcionaron valores de n_{CPE} entre 0.96 y 0.91, en una amplia región potencial que varía de 0.200 a -0.500 V. Estos valores indican que los recubrimientos son uniformes en toda la superficie y que, por tanto, no hay separación de dominios recubiertos y sin recubrir. La dispersión de frecuencia de los datos de impedancia es la misma en el caso de los dos tipos de películas lipídicas mixtas. Sin embargo, esto no significa que las películas de lípidos estén bien organizadas; por el contrario, los valores de pseudocapacitancia son más altos de lo esperado para unas películas lipídicas organizadas de forma compacta, con una constante dieléctrica ϵ típica de compuestos orgánicos, y con el espesor teórico de dicha película (McGillivray et al., 2007). Las monocapas lipídicas estudiadas en este trabajo, formadas por la técnica Langmuir - Schaefer, tienen un comportamiento muy fluido, ya que están adsorbidas físicamente y la temperatura de las medidas es superior a la temperatura de transición del componente mayoritario.

3.4. Caracterización electroquímica de los electrodos recubiertos de mezcla de lípidos mediante el procedimiento *punto a punto*, en presencia de DXR

Cuando las películas se forman en presencia de DXR en la subfase de la balanza de Langmuir, las curvas de pseudo-capacidad muestran también una región plana con valores ligeramente más bajos que en el caso de los electrodos recubiertos con las películas en ausencia de DXR. Esta observación indica que DXR está incorporada en las películas, interactuando con las colas o con la cabeza polar de los fosfolípidos, pero

induciendo una organización más estrecha de la película. Este efecto es opuesto al efecto observado de la DXR en las películas de lípidos en la interfase de la balanza de Langmuir, por lo que debe ser causado por la interacción de DXR con el oro, que de alguna manera afecta a la organización de la monocapa adsorbida. La disminución fue más significativa en el caso de los electrodos recubiertos por las películas de DMPC-Ch (aproximadamente $8 \mu\text{F cm}^{-2}$) que en el caso de las películas lipídicas que contiene también el DDAB (disminución de $3 \mu\text{F cm}^{-2}$ aproximadamente). Por otro lado, la inclusión de DXR en las películas se ve claramente en el gran aumento de la pseudocapacitancia a potenciales coincidentes con la reducción de DXR. El inicio de la reducción se detecta a -0.350 V , aproximadamente, y los valores máximos de pseudocapacitancia se encuentran a -0.480 V , en los dos tipos de electrodos recubiertos. Esto confirma la inclusión de DXR en la estructura de la película. Por otra parte, previamente se ha demostrado (Nieciecka y Krysinski, 2011; Nieciecka et al., 2013; Matyszewska y Bilewicz, 2015) que la incorporación de la DXR y la de la análoga antraciclina daunorubicina en las películas lipídicas, está determinada principalmente por las interacciones hidrofóbicas. Ello ha permitido a otros autores detectar la reducción de ambos fármacos en las monocapas de Langmuir - Blodgett soportadas sobre oro, mientras que en el caso de bicapas lipídicas ancladas sobre oro, éstas bloquean la reducción de la DXR (Nieciecka y Krysinski, 2011; Nieciecka et al., 2013a; Nieciecka et al., 2013b). El análisis de los datos de impedancia en función de la frecuencia a potenciales de la región de pseudocapacitancia plana (fuera de la región de potencial faradaico) mostró un buen acuerdo con la combinación de una resistencia y un modelo de CPE con valores de n_{cpe} entre 0.96 y 0.94, indicando la uniformidad de las películas.

3.5. Reducción electroquímica de DXR en los electrodos de oro modificados con la mezcla de lípidos en la célula electroquímica

La reducción de DXR en los electrodos modificados en las células electroquímicas, con los dos tipos de mezclas de películas lipídicas, fue estudiada por voltametría cíclica (CV) y por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). En la Figura 19 se pueden observar algunos voltamogramas obtenidos a 1 V/s con electrodos de Au (111), comparados con el voltograma obtenido en el electrodo de oro sin cubrir en las mismas

condiciones. Todos los voltagramas se registraron después de la preconcentración de DXR en un potencial de -0.100 V, en el que DXR se adsorbe sobre el oro. Curiosamente, los picos voltamétricos aparecen prácticamente a los mismos potenciales tanto los electrodos modificados con la monocapa lipídica como para los electrodos de oro sin recubrir.

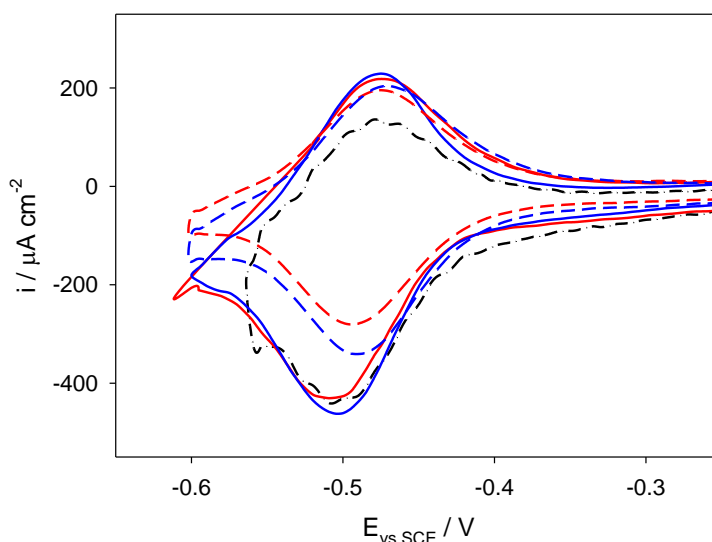


Figura 19. Voltammogramas cíclicos obtenidos a 1 V/s para la reducción de DXR en electrodos de Au (111) modificados en la celda electroquímica con una monocapa que contiene DMPC-colesterol (línea continua azul) y DMPC-DDAB (3:1)-colesterol (línea continua roja). La línea negra de puntos y rayas representa el voltamograma obtenido con el electrodo Au (111) sin recubrir. Las líneas discontinuas representan los voltamogramas obtenidos con el electrodo (111) modificado por el método Langmuir - Schaefer con películas que contienen DMPC-colesterol (azul) y DMPC-DDAB (3:1)-colesterol (rojo).

Parece que las interacciones en las monocapas lipídicas no afectan la reducción, por lo que la orientación de DXR adsorbida debe ser la misma que en el electrodo desnudo. Las películas de los fosfolípidos no parecen ejercer un efecto de bloqueo significativo ya que las intensidades máximas son del mismo orden de magnitud en todos los casos, lo que sugiere que la inclusión de DXR en las películas está controlada por el potencial.

El análisis de la influencia de la velocidad de barrido en las intensidades máximas de la reducción (I_{pc}) y posterior oxidación en el barrido inverso (I_{pa}), en la Figura 20, muestra un mejor comportamiento lineal cuando se representan las intensidades máximas frente a la velocidad de barrido, v , que cuando se representan frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, $v^{1/2}$, de acuerdo con los procesos redox de especies confinadas en la superficie del electrodo. En cualquier caso, la dependencia lineal de las

intensidades máximas con la velocidad de barrido no es completa, lo que indica que existe cierta contribución de transporte de materia.

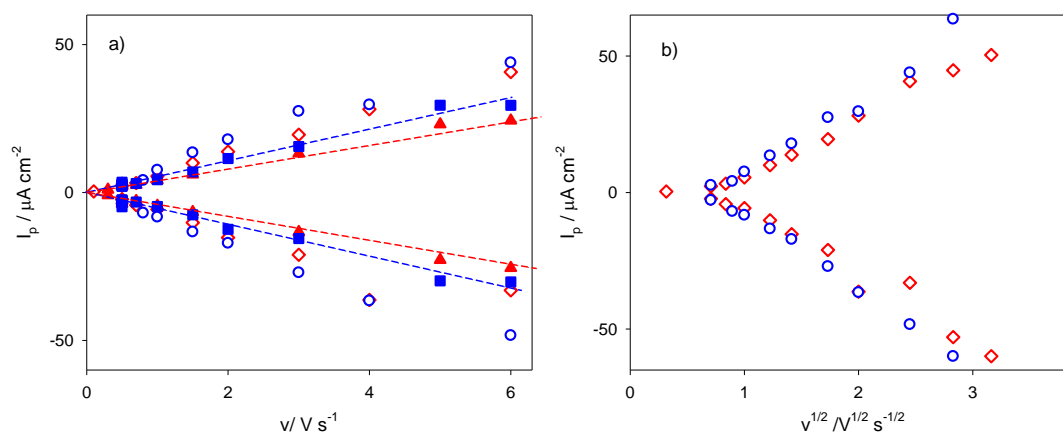


Figura 20. Las gráficas de I_p vs v (a) y de gráficas I_p vs $v^{1/2}$ (b) obtenidas: i) con el electrodo Au (111) modificado en la celda electroquímica con DMPC-colesterol (círculos huecos azules) o DMPC-DDAB (3:1)-colesterol (diamantes huecos rojos). ii) con el electrodo Au (111) modificado por el método Langmuir - Schaefer con DMPC-colesterol (cuadrados rellenos azules) o DMPC-DDAB (3:1)-colesterol (triángulos rellenos rojos). Las líneas representan las regresiones lineales con símbolos sólidos.

Los datos de EIS pueden ayudar a aclarar si el proceso de reducción de DXR en estos electrodos modificados con lípidos es una reacción en ausencia de difusión, siguiendo el modelo originalmente deducido por Laviron y descrito al inicio del presente capítulo (Laviron, 1979). Según este modelo, las gráficas de impedancia de Nyquist deben exhibir un arco circular característico de un proceso faradaico y una línea vertical a frecuencias más bajas, correspondiente a un comportamiento capacitativo puro. En la Figura 21 se muestran los gráficos de Nyquist para la impedancia a un potencial de la región faradaica (-0.480 V), obtenidos con el electrodo recubierto por la película lipídica que contiene DDAB, en comparación con la impedancia a un potencial fuera de la región faradaica (-0.150 V). No se observa la línea vertical a bajas frecuencias, correspondiente a una capacitancia pura, sino líneas rectas con un ligero ángulo de inclinación de aproximadamente 10 grados con respecto a la línea vertical, muy diferente de los 45 grados esperados para el proceso faradaico controlado por difusión. Además, el ángulo es prácticamente el mismo para las curvas obtenidas para los dos valores de potenciales. Por lo tanto, la desviación desde la línea vertical parece estar relacionada con heterogeneidades superficiales de estos electrodos modificados con películas lipídicas.

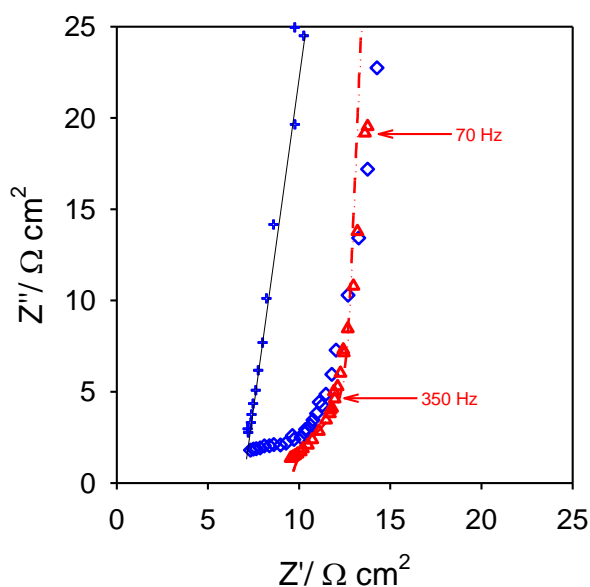


Figura 21. Gráficos de Nyquist obtenidos para soluciones de DXR 10 μM a pH 4.5 con un electrodo Au (111) modificado por una monocapa de DMPC:DDAB (3:1)-colesterol formados en la célula electroquímica a $E = -0.48\text{ V}$ (diamantes azules) y a $E = -0.150\text{ V}$ (cruces azules). La línea negra sólida representa el diagrama teórico de Nyquist para un circuito en serie R-CPE con $\alpha = 0.95$. Los gráficos de Nyquist obtenidos con el electrodo modificado por el método de Langmuir-Schaefer con películas de DMPC:DDAB (3:1)-colesterol (triángulos rojos). La línea roja discontinua es la curva teórica obtenida del ajuste al modelo de impedancia para una reacción confinada en la superficie con $C_a = 73\ \mu\text{F cm}^{-2}$, $R_{ct} = 8.1\ \Omega\ \text{cm}^2$ y $n_{CPE} = 0.95$.

3.6. Reducción de DXR en electrodos de oro modificados en la balanza de Langmuir

Para evitar la difusión de DXR y analizar solo la DXR adsorbida en los electrodos, los electrodos fueron recubiertos a 30 mN/m por el método Langmuir - Schaefer en la interfase de la balanza de Langmuir, que contenía DXR 10 μM en el electrolito de la subfase. Posteriormente, los electrodos recubiertos se transfirieron a la célula electroquímica, rellena solamente con el electrolito soporte.

En la Figura 19 se incluyen CVs obtenidos por este método, donde se muestran valores de I_{pc} menores que en las curvas CV obtenidas con electrodos recubiertos en la célula electroquímica, desplazándose a potenciales algo más altos. Las intensidades máximas muestran una buena relación lineal con la velocidad de barrido, como se puede observar en la Figura 20a, para la reducción de DXR en los electrodos recubiertos de esta manera, ya sea con las mezclas de tres componentes o con las mezclas de dos componentes, lo que indica la ausencia de difusión.

CAPÍTULO 4

Por lo tanto, la velocidad de la reacción redox puede formularse conforme a la ecuación (6), y el valor de la concentración superficial inicial del reactivo en la preconcentración potencial, $\Gamma = \Gamma_{Ox} + \Gamma_{Red}$, se puede obtener a partir de las pendientes de la I_{PC} vs v según la ecuación (8).

Los valores obtenidos para los electrodos recubiertos por películas conteniendo DDAB y por la película de DMPC-colesterol, son 3.3×10^{-11} mol cm^{-2} y 4.2×10^{-11} mol cm^{-2} , respectivamente. Los mismos valores se obtuvieron de la integración de los picos de reducción, que proporciona la carga total transferida (Q), que se relaciona con la concentración superficial de acuerdo con ley de Faraday:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (23)$$

La concentración superficial alcanzada es del mismo orden de magnitud que los valores referidos en la bibliografía para DXR y su análogo antraciclínico, daunorubicina, en electrodos modificados con monocapas de fosfolípidos y tiolípidos y bicapas autoensambladas o transferidas por el método Langmuir - Blodgett, dependiendo de la composición lipídica (Matyszewska y Bilewicz, 2009; Nieciecka y Krysinski, 2011; Wieckowska et al., 2011b; Nieciecka et al., 2013; Matyszewska y Bilewicz, 2015). El valor algo más bajo obtenido para el electrodo recubierto con la monocapa que contiene DDAB está de acuerdo con lo observado previamente, y es que la adsorción de DXR es menos favorable en películas lipídicas bien ordenadas, como las autoensambladas o las películas de fosfolípidos que contienen colesterol (Matyszewska y Bilewicz, 2015c). Además, la carga positiva aportada por el DDAB puede dificultar la adsorción de la DXR, que al pH de los experimentos se encuentra protonada.

El análisis con la frecuencia de los datos de impedancia obtenidos a cada potencial, conforme a la ecuación 15, puede proporcionar los valores de los parámetros R_{ct} y C_a , que contienen la información cinética del proceso. Este análisis se puede hacer de forma más directa empleando las componentes real e imaginaria de la admitancia eléctrica, Y'_{el} y Y''_{el} , definida como la inversa de la impedancia una vez corregida la resistencia óhmica:

$$Y_{el} = Y'_{el} + i Y''_{el} = (Z - R_{\Omega})^{-1} \quad (24)$$

La dependencia de las componentes real e imaginaria de la admitancia electródica con la frecuencia viene dada por las ecuaciones (25) y (26). Se puede observar que la componente real sólo incluye los valores de R_{ct} y C_a :

$$Y'_{el} = \frac{R_{ct} C_a^2 \omega^2}{1 + R_{ct}^2 C_a^2 \omega^2} \quad (25)$$

$$Y''_{el} = \frac{C_a \omega}{1 + R_{ct}^2 C_a^2 \omega^2} + C_{HF} \omega \quad (26)$$

De acuerdo con la ecuación (25) las representaciones de $1/Y'_{el}$ frente $1/\omega^2$ deben ser líneas rectas, con pendiente $(R_{ct} C_a^2)^{-1}$ y ordenada en el origen R_{ct} , por lo que los dos parámetros representativos del proceso faradaico en cada potencial, R_{ct} y C_a , se pueden obtener simplemente por regresión lineal. En la Figura 22 se muestran algunas de estas representaciones, a un potencial de -0.480 V para la reducción de DXR en los electrodos recubiertos en la balanza de Langmuir y en la célula electroquímica.

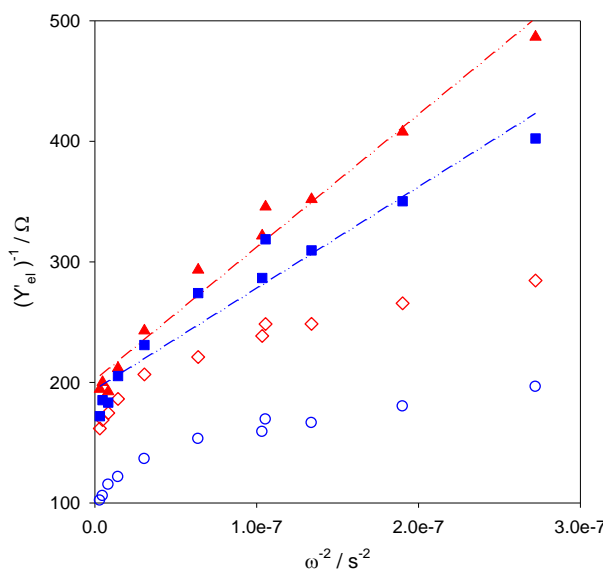


Figura 22. Gráficos $1/Y'_{el}$ vs $1/\omega^2$ obtenidos a -0.48 V, i) con el electrodo de Au (111) modificado en la célula electroquímica con DMPC-colesterol (círculos azules huecos) o DMPC:DDAB (3:1)-colesterol (diamantes rojos huecos) y ii) con el electrodo de Au (111) modificado por el método Langmuir - Schaefer con DMPC-colesterol (cuadrados rellenos azules) o DMPC:DDAB (3:1)-colesterol (triángulos rellenos rojos). Las líneas representan las regresiones lineales de cada gráfico.

A bajas frecuencias, el CPE, que representa la carga de la doble capa, tiene una mayor contribución a la admitancia del electrodo, por lo que las gráficas se desvían de la linealidad. Las representaciones correspondientes a la reducción de la DXR, al mismo potencial de -0.480 V, sobre los electrodos recubiertos en la célula electroquímica también se han incluido en la Figura 22. Se puede observar que se desvían claramente de la linealidad en todo el rango de frecuencias, confirmando que el modelo de reducción en ausencia de difusión no es aplicable en estos casos.

Los parámetros independientes de frecuencia, R_{ct} y C_a , se obtuvieron ajustando los datos de impedancia en todo el rango de frecuencia experimental al modelo que incluye un CPE que representa la carga de la doble capa, por lo que se obtuvieron los valores de n_{CPE} , que también se encontraron en el rango de 0.96 a 0.90. En las Figuras 23a y 23b, los valores de R_{ct} y C_a se representan, respectivamente, en función del potencial. Las curvas $R_{ct} - E$, muestran un mínimo y la curvas $C_a - E$ un máximo a un potencial cerca al de la reducción. Se observó que la cantidad de DXR que se adsorbe en el electrodo disminuye después de explorar potenciales más negativos, por lo que los valores de los parámetros R_{ct} y C_a obtenidos en series sucesivas de potenciales aumentan y disminuyen respectivamente, ya que sus dependencias con el exceso de superficie del reactivo son inversas. Sin embargo, la constante de la reacción redox, k_f , podría obtenerse a cada potencial del producto ($R_{ct}C_a$) que, de acuerdo con las definiciones de ambos parámetros en las ecuaciones 20 y 21, es independiente de la concentración superficial de reactivo (Prieto et al., 2011):

$$k_f = \frac{1}{R_{ct}C_a[1 + \exp(\varphi)]} \quad (27)$$

donde φ se define como $\varphi = nF/RT(E - E_j)$, siendo E_j el potencial de equilibrio superficial que se obtuvo de la extrapolación de los potenciales de pico a velocidad de barrido cero, donde el comportamiento es reversible, y que era -0.480 V.

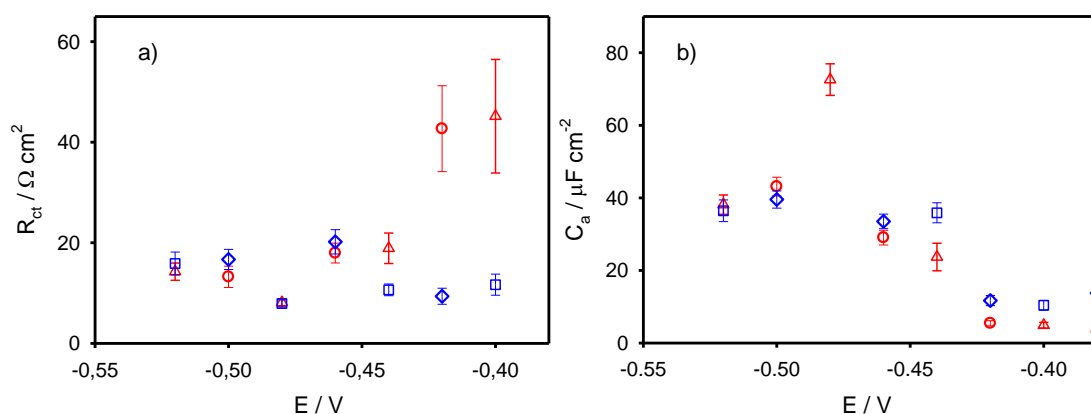


Figura 23. Gráficos de a) R_{ct} vs E y b) C_a vs E obtenidos del análisis los datos de frecuencia de EIS para una reacción en ausencia de difusión con: DMPC-Colesterol. Primera serie de potenciales negativos (cuadrados azules) y segunda serie negativa (diamantes azules). DMPC:DDAB (3:1) - Primera serie negativa de colesterol (triángulos rojos) y segunda serie negativa (círculos rojos).

En la Figura 24 se muestran las gráficas $\ln k_f$ vs E para la reducción en dos tipos de electrodos recubiertos en la balanza Langmuir. El comportamiento observado se desvía de la variación lineal que se esperaría para un comportamiento del tipo Butler Volmer, obteniéndose líneas curvas con pendientes decrecientes hacia los potenciales más negativos. Este comportamiento sugiere que el proceso electroquímico no es un proceso simple desde el punto de vista cinético, algo lógico si se tiene en cuenta que el proceso global implica la transferencia de 2 electrones y 2 protones.

Para una reacción redox que implica el intercambio de dos electrones y dos protones, el número total de etapas secuenciales y/o paralelos a considerar son altos. Sin embargo, si solo se tienen en cuenta los mecanismos con etapas secuenciales, cualquier mecanismo particular que incluya dos transferencias electrónicas estaría incluido en un mecanismo genérico del tipo CECEC, con etapas químicas alternadas con las dos etapas de transferencia electrónica.

La constante de velocidad global, k_f , para un mecanismo de este tipo puede deducirse aplicando la hipótesis de estado estacionario sobre las especies intermedias, y considerando una dependencia del potencial del tipo Butler - Volmer para las etapas de transferencia electrónica, con un coeficiente de transferencia 0.5 (Rueda et al., 1994):

$$\frac{1}{k_f} = \frac{1}{B_0} + \frac{\exp\left(\frac{1}{4}\varphi\right)}{A_1} + \frac{\exp\left(\frac{1}{2}\varphi\right)}{B_1} + \frac{\exp\left(\frac{3}{4}\varphi\right)}{A_2} + \frac{\exp(\varphi)}{B_2} \quad (28)$$

Los coeficientes cinéticos, B_i y A_i , de las etapas químicas y de transferencia de electrones, respectivamente, incluyen en su definición el producto de la constante de velocidad de la etapa correspondiente y las constantes de equilibrio de todas las etapas anteriores.

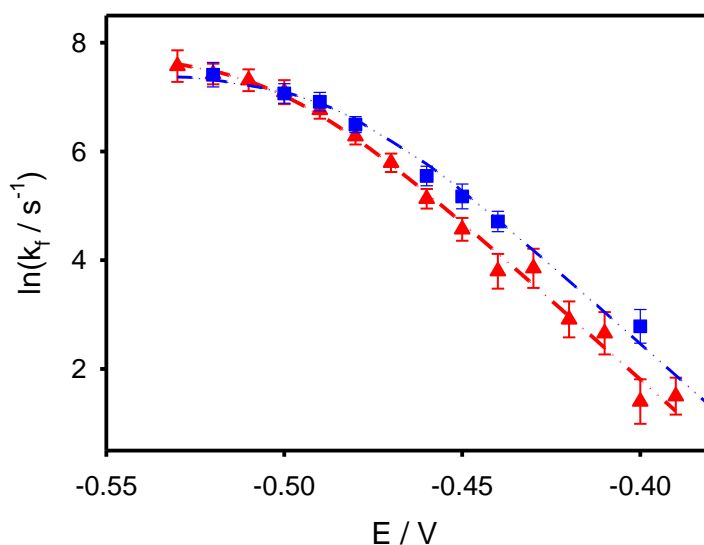


Figura 24. Curvas de $\ln(k_f)$ vs- E calculadas a partir de los valores de C_a y R_{ct} en la Figura 23 con: DMPC:colesterol (cuadrados rellenos azules) o DMPC:DDAB (3:1)-colesterol (triángulos rellenos rojos). Las líneas representan el ajuste a la ecuación (29).

En una reacción particular no todos los sumandos de la ecuación (28) estarán presentes: si una etapa concreta no existe, el correspondiente sumando tampoco. Por otro lado, si una etapa concreta es rápida, no controlante de la velocidad del proceso global, su parámetro cinético será elevado y el correspondiente sumando en la ecuación (28) será despreciable.

El ajuste de los datos experimentales $\ln(k_f)$ vs E a la ecuación (28) sólo requiere la inclusión de los sumandos 1 y 4, por lo que se puede escribir que:

$$\frac{1}{k_f} = \frac{1}{B_0} + \frac{\exp\left(\frac{3}{4}\varphi\right)}{A_2} \quad (29)$$

CAPÍTULO 4

El primer sumando representa la contribución de un paso químico previo a la primera transferencia de electrones, que en principio puede identificarse como un paso de protonación, por lo que B_0 contiene la constante de velocidad para este paso de protonación. Por otro lado, A_2 contiene el producto de la constante de equilibrio de este paso de protonación inicial y cualquier otro paso que pueda preceder la segunda transferencia de electrones y la constante de velocidad para este paso. Los valores de B_0 y A_2 obtenidos con los electrodos recubiertos con los dos tipos de las películas de lípidos se dan en la Tabla 1, mientras que las curvas teóricas $\ln(k_f)$ vs E , generadas con estos valores y la ecuación (29) se pueden observar en la Figura 24, comprobando la concordancia con los valores experimentales.

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos del análisis de $\ln(k_f)$ vs E en la Figura 24 según la ecuación 29.

Monocapa	B_0 / s^{-1}	A_2 / s^{-1}
DMPC:DDAB (3:1)-col	2400 ± 370	655 ± 50
DMPC:col	1700 ± 190	1260 ± 90

Las diferencias en los valores de B_0 obtenidos para la reducción de DXR en los electrodos recubiertos con tres o dos componentes se encuentran dentro de los errores experimentales. Sin embargo, el valor A_2 es significativamente menor para la reducción en los electrodos recubiertos por la mezcla de lípidos que contiene DDAB, por lo que parece que el DDAB ejerce algún tipo de efecto inhibitorio en la segunda transferencia de electrones o en las constantes de equilibrio de los pasos anteriores en el mecanismo.

4. CONCLUSIONES

- La combinación de la balanza de Langmuir y la metodología electroquímica ha permitido llegar a conclusiones interesantes sobre la combinación de componentes para la preparación y caracterización de liposomas para la administración de compuestos activos. Además, el estudio ha proporcionado también una imagen detallada de la inclusión del fármaco DXR en las películas lipídicas, su interacción con el oro y su mecanismo de reducción electroquímica.
- Las monocapas de DMPC, de DMPC / colesterol y DMPC / DDAB / colesterol transferidas sobre electrodos de Au (111) son estables en una región de amplio potencial, aproximadamente desde 0.4 V vs ECS hasta -0.2 V vs ECS. Por debajo de esos límites, la reorganización de la monocapa implica ciertos cambios irreversibles.
- La presencia de colesterol en las películas con soporte de Au (111) origina valores más bajos del mínimo de pseudo-capacidad, lo que indica una mejor organización de la película soportada sobre Au (111) en presencia de colesterol. En cualquier caso, los valores obtenidos para la pseudo-capacidad son mayores que los esperados para una monocapa compacta y perfectamente organizada.
- El estudio de la reducción de DXR en electrodos recubiertos en la celda electroquímica en presencia de DXR a una concentración de 10^{-5} M, por voltamperometría y espectroscopía de impedancias, indica la contribución tanto de la adsorción de DXR en el electrodo como de la difusión del reactivo en solución.
- La preparación de electrodos recubiertos en la balanza de Langmuir en presencia de DXR y su transferencia a células electroquímicas que no contienen DXR ha permitido concluir que la cantidad de DXR que se adsorbe es algo menor en los electrodos recubiertos con mezclas de lípidos que contienen DDAB que en los electrodos recubiertos solo con DMPC:colesterol.
- El mecanismo de reducción de DXR en los electrodos de oro recubiertos en la balanza de Langmuir se dedujo de los datos de impedancia en función de la

CAPÍTULO 4

frecuencia y del potencial, dentro del rango de potencial faradaico. Se concluyó que la reducción obedece al modelo de una reacción electroquímica sobre especies confinadas en la superficie, sin difusión, con una constante de velocidad de reducción con contribuciones de dos etapas: una reacción química, presumiblemente una reacción de protonación, que precede a la primera transferencia de electrones y una segunda transferencia de electrones. La presencia de DDAB en la película origina una disminución en el parámetro cinético de esta segunda transferencia electrónica.

5. BIBLIOGRAFÍA

Bard AJ, Faulkner LR. Controlled potential microelectrode techniques-potential sweep methods. In: *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. 2nd ed. Nueva York: John Wiley & Sons. 2001;718.

Brezesinski G, Möhwald H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Adv Colloid Interface Sci*. 2003;100:563-84.

Brzozowska M, Krysinski P. Synthesis and functionalization of magnetic nanoparticles with covalently bound electroactive compound doxorubicin. *Electrochim Acta*. 2009;54(22):5065-70.

Conde J, Ambrosone A, Sanz V, Hernández Y, Marchesano V, Tian F, Tortiglione C. Design of multifunctional gold nanoparticles for in vitro and in vivo gene silencing. *ACS Nano*. 2012;6(9):8316-24.

Clavilier J. Flame-annealing and cleaning technique. In: Wieckowski A (ed.) *Interfacial electrochemistry: theory: experiment, and applications*. CRC. 1999;231-48.

Dhar S, Daniel WL, Giljohann DA, Mirkin CA, Lippard SJ. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum (IV) warheads. *J Amer Chem Soc*. 2009;131(41):14652-3.

Dupou-Cézanne L, Saufereau AM, Tocanne JF. Localization of adriamycin in model and natural membranes: influence of lipid molecular packing. *Eur J Biochem*. 1989;181(3):695-702.

Escriba PV, Ferrer-Montiel AV, Ferragut JA, González-Ros JM. Role of membrane lipids in the interaction of daunomycin with plasma membranes from tumor cells: implications in drug-resistance phenomena. *Biochemistry*. 1990;29(31):7275-82.

Gobin AM, Watkins EM, Quevedo E, Colvin VL, West JL. Near-infrared-resonant gold/gold sulfide nanoparticles as a photothermal cancer therapeutic agent. *Small*. 2010;6(6):745-52.

Jin Y, Wang S, Tong L, Du L. Rational design of didodecyldimethylammonium bromide-based nanoassemblies for gene delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;126:257-64.

Julia PLC, Coso EB. Homenatge professor Josep M. Costa (eBook) 1a part. Trends in electrochemistry and corrosion at the beginning of the 21st century. Edicions Universitat Barcelona, 2004.

Kissinger PT, Heineman WR. Cyclic voltammetry. *J Chem Education*. 1983;60(9):702.

Laviron E. AC polarography and faradaic impedance of strongly adsorbed electroactive species: Part I. Theoretical and experimental study of a quasi-reversible reaction in the case of a Langmuir isotherm. *J Electroanal Chem Interf Electrochem*. 1979;97(2):135-49.

Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J Electroanal Chem*. 1979;101(1):19-28.

Lipkowski J. Building biomimetic membrane at a gold electrode surface. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12(42):13874-87.

CAPÍTULO 4

- Ma P, Mumper RJ. Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: a comprehensive review. *Nano today*. 2013;8(3):313-31.
- Matyszewska D, Bilewicz R. Voltammetric study of gold-supported lipid membranes in the presence of perfluorooctanesulphonic acid. *Bioelectrochemistry*. 2009;76(1-2):148-52.
- Matyszewska D, Bilewicz R. Interactions of daunorubicin with Langmuir–Blodgett thiolipid monolayers. *Electrochimica Acta*. 2015;162:45-52.
- McGillivray DJ, Valincius G, Vanderah DJ, Febo-Ayala W, Woodward JT, Heinrich F, Lösche M. Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes. *Biointerphases*. 2007;2(1):21-33.
- Mohamadi S, Tate DJ, Vakurov A, Nelson A. Electrochemical screening of biomembrane-active compounds in water. *Anal Chim Acta*. 2014;813:83-9.
- Nascimento JM, Franco OL, Oliveira MD, Andrade CA. Evaluation of magainin I interactions with lipid membranes: an optical and electrochemical study. *Chem Phys Lipids*. 2012;165(5):537-44.
- Nazaruk E, Szlęzak M, Górecka E, Bilewicz R, Osornio YM, Uebelhart P, Landau EM. Design and assembly of pH-sensitive lipidic cubic phase matrices for drug release. *Langmuir*. 2014;30(5):1383-90.
- Nazaruk E, Miszta P, Filipek S, Górecka E, Landau EM, Bilewicz R. Lyotropic cubic phases for drug delivery: Diffusion and sustained release from the mesophase evaluated by electrochemical methods. *Langmuir*. 2015;31(46):12753-61.
- Nieciecka D, Krysinski P. Interactions of doxorubicin with self-assembled monolayer-modified electrodes: electrochemical, surface plasmon resonance (SPR), and gravimetric studies. *Langmuir*. 2011;27(3):1100-07.
- Nieciecka D, Joniec A, Blanchard GJ, Krysinski P. Interactions of doxorubicin with organized interfacial assemblies. 1. electrochemical characterization. *Langmuir*. 2013;29(47):14560-9.
- Pajkossy T. Capacitance dispersion on solid electrodes: anion adsorption studies on gold single crystal electrodes. *Solid State Ion*. 1997;94(1-4):123-9.
- Prieto F, Rueda M, Hidalgo J, Martínez E, Navarro I. Electrochemical impedance spectroscopy study of a surface confined redox reaction: The reduction of azobenzene on mercury in the absence of diffusion. *Electrochim Acta*. 2011;56(23):7916-22.
- Ringstad L, Protopapa E, Lindholm-Sethson B, Schmidtchen A, Nelson A, Malmsten M. An electrochemical study into the interaction between complement-derived peptides and DOPC mono- and bilayers. *Langmuir*. 2008;24(1):208-16.
- Rueda M, Navarro I, Prieto F, Sluyters-Rehbach M, Sluyters JH. Impedance analysis of the reduction of pyrimidine at the dropping mercury electrode: Part 2. Parallel mechanisms. *J Electroanal Chem*. 1994;371(1-2):179-89.
- Rueda M, Prieto F, Navarro I, Romero R. Phospholipid and gramicidin–phospholipid-coated mercury electrodes as model systems of partially blocked electrodes. *J Electroanal Chem*. 2010;649(1-2):42-7.

CAPÍTULO 4

Shenoi MM, Iltis I, Choi J, Koonce NA, Metzger GJ, Griffin RJ, Bischof JC. Nanoparticle delivered vascular disrupting agents (VDAs): use of TNF-alpha conjugated gold nanoparticles for multimodal cancer therapy. *Mol Pharm.* 2013;10(5):1683-94.

Speelmans G, Staffhorst RW, de Kruijff B, de Wolf FA. Transport studies of doxorubicin in model membranes indicate a difference in passive diffusion across and binding at the outer and inner leaflet of the plasma membrane. *Biochemistry.* 1994;33(46):13761-8.

Więckowska A, Jabłonowska E, Rogalska E, Bilewicz R. Structuring of supported hybrid phospholipid bilayers on electrodes with phospholipase A 2 *Phys Chem Chem Phys.* 2011;13(20):9716-24.

Wijaya A, Schaffer SB, Pallares IG, Hamad-Schifferli K. Selective release of multiple DNA oligonucleotides from gold nanorods. *ACS nano.* 2008;3(1):80-6.



CONCLUSIONES GENERALES

1. En este trabajo de investigación, se ha conseguido obtener una formulación de liposomas óptima para anclar las AuNPs, enfatizando el papel del DDAB en la obtención de liposomas catiónicos.
2. Los estudios de liberación revelaron una mejora en la liberación de calceína en los liposomas con AuNPs, en general a 42 °C. Este hecho se vuelve interesante para el uso de estos portadores nanoestructurados en estudios futuros con medicamentos contra el cáncer. Por lo tanto, podemos concluir que las AuNPs proporcionan una plataforma eficaz para el diseño de liposomas térmicamente sensibles, y la combinación con biomateriales funcionales en este sistema podría ser una herramienta útil como sistema de administración de fármacos.
3. Las películas de mezclas ternarias DMPC / DDAB / colesterol presentan áreas de exceso por molécula y energías libres de exceso negativas, en comparación con la mezcla ideal formada con DMPC / DDAB (en una proporción 3:1) y colesterol. La presencia de colesterol en la monocapa proporciona estabilidad al sistema. Existen dos composiciones óptimas en términos de estabilidad: $X_{col} = 0.5$ y $X_{col} = 0.1$. Esta última puede usarse para aumentar la estabilidad de los liposomas utilizados como portadores de fármacos.
4. Las monocapas de Langmuir formadas con la mezcla ternaria DPPC / DDAB / colesterol tienen valores del área por molécula más bajos que los correspondientes a una mezcla ideal. Esto origina valores de área de exceso y de energía libre de exceso negativos, tomando como referencia las películas formadas por una mezcla binaria de DPPC / DDAB y las formadas por colesterol. Según el análisis termodinámico, las composiciones más estables implican fracciones molares de colesterol entre $X_{col} = 0.3$ y $X_{col} = 0.5$. Estas mezclas pueden usarse en el desarrollo de plataformas complejas formadas por liposomas funcionalizados como portadores de fármacos.
5. Tras la puesta a punto de la metodología de encapsulación de DXR por gradiente transmembrana se obtuvieron eficacias de encapsulación muy elevadas para este fármaco, sobre todo empleando sulfato amónico como sal de amonio creadora del gradiente.
6. Los ensayos de liberación *in vitro* demostraron que las formulaciones que contienen mayor cantidad de colesterol tuvieron mejores perfiles de liberación

de la DXR. Estos perfiles de liberación se vieron mejorados aún más al realizar los ensayos a 42 °C. Los perfiles de liberación de los sistemas desarrollados se ajustaron al modelo cinético de Peppas indicando que la liberación tuvo lugar por difusión, hecho que se pudo atribuir al efecto sinérgico de la presencia de las AuNPs en la superficie de los liposomas y a la temperatura.

7. La combinación de la balanza de Langmuir y la metodología electroquímica ha permitido llegar a conclusiones interesantes sobre la combinación de componentes para la preparación y caracterización de liposomas para la administración de fármacos. Además, el estudio ha proporcionado también una imagen detallada de la inclusión del fármaco DXR en las películas lipídicas, su interacción con el oro y su mecanismo de reducción electroquímica. Las monocapas de DMPC, de DMPC/colesterol y DMPC/DDAB/colesterol transferidas sobre electrodos de Au (111) son estables en una región de amplio potencial, aproximadamente desde 0.4 V vs ECS hasta -0.6 V vs ECS. Por debajo de esos límites, la reorganización de la monocapa implica ciertos cambios irreversibles.
8. La preparación de electrodos recubiertos en la balanza de Langmuir en presencia de DXR y su transferencia a células electroquímicas que no contienen DXR ha permitido concluir que la cantidad de DXR que se adsorbe es algo menor en los electrodos recubiertos con mezclas de lípidos que contienen DDAB que en los electrodos recubiertos solo con DMPC:colesterol.
9. El mecanismo de reducción de DXR en los electrodos de oro recubiertos en la balanza de Langmuir se dedujo de los datos de impedancia en función de la frecuencia y del potencial, dentro del rango de potencial faradaico. Se concluyó que la reducción obedece al modelo de una reacción electródica sobre especies confinadas en la superficie, sin difusión, con una constante de velocidad de reducción con contribuciones de dos etapas: una reacción química, presumiblemente una reacción de protonación, que precede a la primera transferencia de electrones y una segunda transferencia de electrones.



ABREVIATURAS

Abreviaturas

ACN: acetonitrilo

ANOM: análisis de medias

ANOVA: análisis de varianza

AUCDP: área bajo la curva de los perfiles de disolución

AuE: nanopartículas de oro ancladas a liposomas extruidos

AuNE: nanopartículas de oro ancladas a liposomas no extruidos

AuNPs: nanopartículas de oro

CH: colesterol

CHEMS: colesterol hemisuccinato.

DDAB: bromuro de didecil dimetil amonio

DMPC: 1,2-dimirisocilo sn-glicero-3-fosfocolina

DPPC: 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DE: desviación estándar

DLS: Dynamic Light Scattering

DSC: calorimetría diferencial de barrido

DXR: doxorrubicina

E: extruido

EA: Estearilamina

EIS: espectroscopía de impedancia electroquímica

EPC: L- α Fosfatidilcolina de huevo

EE: eficacia de encapsulación

FAT: método de congelación-descongelación

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IP: índice de polidispersión

IR: Espectroscopía infrarroja

LSS: lauril sulfato sódico

LUV: vesículas unilaminares grandes

MLV: vesículas multilaminares

NaCl: cloruro de sodio

NE: no extruido

NP: nanopartícula

PBS: tampón fosfato salino

PC: L- α fosfatidilcolina

PDB: diseño de Plackett-Burman

PdE: porcentaje de encapsulación

PEG: polietilenglicol

PZ: potencial Zeta

SD: Desviación estándar

SE: Sin extraer

SUV: vesículas unilaminares pequeñas

TC: temperatura de transición de fase

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TLE: técnica de evaporación en capa fina



PUBLICACIONES



Electrochemical characterization of a mixed lipid monolayer supported on Au(111) electrodes with implications for doxorubicin delivery[☆]



Francisco Prieto^a, Manuela Rueda^{a,*}, Nabila Naitlho^b, Marcos Vázquez-González^a,
María L. González-Rodríguez^b, Antonio M. Rabasco^b

^a Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry and Faculty of Pharmacy, University of Seville, C/ Profesor García González n° 1, 41012 Seville, Spain

^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, c/ Profesor García González n° 2, 41012 Seville, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Lipid monolayers
DMPC
DDAB
Cholesterol
Au(111) electrodes
Voltammetry
Impedance spectroscopy

ABSTRACT

The cationic lipid didodecyltrimethylammonium bromide (DDAB) is one of the agent that is included in formulations for liposomes with anchored gold nanoparticles as drugs carriers because its positive charge facilitates the anchoring of the negatively charged stabilized gold nanoparticles to the lipid components of the liposomes. In this paper a thermodynamic analysis of Langmuir isotherms was performed, as a first step in the preparation of liposomes including DDAB, the phospholipid 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), and cholesterol (Ch), to decide about the most stable combination. Monolayers of DMPC:Ch:DDAB with the most energetically favourable composition, were transferred to Au(111) electrodes by the Langmuir-Schaefer technique in the electrochemical cell and characterized by impedance spectroscopy. The results were compared with those obtained with electrodes coated with DMPC:Ch films that did not contain DDAB. In both cases the frequency dispersion of impedance data indicates high homogeneity of the films in a wide potential range around the capacitance minimum.

The inclusion of the anticancer drug doxorubicin (DOX) into the mixed lipid monolayers and its electrochemical reduction at pH 4.5 were studied by voltammetry and by impedance spectroscopy. At potentials out of the faradaic region the inclusion of DOX does not affect significantly the frequency dispersion of the impedance but decreases the capacitance. However, at negative potentials the analysis of the high frequency dispersion of the impedance and the influence of the scan rate on the voltammograms indicate a reduction process with contribution of adsorption and diffusion of DOX.

Diffusion was avoided by transferring the electrodes coated in the Langmuir trough to the electrochemical cells that do not contain the drug. Under these conditions the reduction of the adsorbed DOX was found to obey the model of a surface confined electrode and the charge transfer resistance, R_a , and adsorption capacitance, C_a , were obtained at potentials of the faradaic region. The combination of both parameters provides the rate constant for the reduction in a wide potential range that allows us to propose a sequential mechanism with two determining steps.

1. Introduction

New strategies in drug delivery involve the use of complex platforms formed by functionalized liposomes as drug carriers. Liposomes with anchored gold nanoparticles are nontoxic and non-immunogenic drugs vehicles that are being investigated, especially for anticancer drugs that show strong side effects, because of their easy targeting and cell uptake of the drug that reduce the necessary dosage [1–5].

The stability of the liposome and the interactions with the metal nanoparticle strongly depend on the layer components. Phospholipid

monolayers have been frequently used as model biomembranes and their characterizations at the gas/aqueous interphase of the Langmuir trough have been useful in the interpretation of drug interactions with tumor cell membranes and with drug delivery liposomes [6–9]. Phospholipid liposomes are known to be excellent drugs carrier but the anchor of gold nanoparticles to their surface requires the inclusion of positively charged surfactants in their formulation. With this purpose, the amphiphilic didodecyl-dimethylammonium bromide (DDAB) (see Fig. 1) has been assayed in pharmaceutical formulations [10]. On the other hand, the inclusion of cholesterol (Fig. 1) in phospholipid layers is

[☆] Dedicated to Professor Renata Bilewicz for her 65th birthday and in recognition of her contribution to electrochemistry.

* Corresponding author.

E-mail address: marueda@us.es (M. Rueda).



Research Article

Didodecyldimethylammonium Bromide Role in Anchoring Gold Nanoparticles onto Liposome Surface for Triggering the Drug Release

N. Naitlho,¹ F. Prieto-Dapena,² A. M. Rabasco,¹ M. Rueda,² and María Luisa González-Rodríguez^{1,3}

Received 25 March 2019; accepted 24 July 2019

Abstract. Liposomes with their capacity to anchor gold nanoparticles (AuNPs) onto their surface are used in the treatment of several pathologies such as cancer. The objective of this work was the optimization of the vesicle composition by using cationic agents in order to reinforce the anchoring process of AuNPs, and for the study of the influence of local temperature and vesicle size on drug release. A Plackett–Burman design was conducted to determine the optimal composition for the anchoring of AuNPs. A comprehensive study of the influence of lipid bilayer composition on the surface charge, size, and polydispersity index (PDI) of liposomes was carried out. Afterwards, *in vitro* release studies by dialysis were performed and several release parameters were evaluated as a function of temperature. Cholesterol was fixed as the rigid agent and Didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) was selected as the cationic lipid into the liposome bilayer. Photomicrographs revealed that DDAB facilitated the anchoring of AuNPs onto the liposomal surface. The anchoring of AuNPs also enhanced the amount and rate of calcein released, especially in extruded samples, at several incubating temperatures. In addition, it was observed that both the anchoring of AuNPs and the calcein release were improved by increasing the surface of the vesicles. The contributions of liposome composition (DDAB inclusion, incubation temperature, anchoring of AuNPs) and size and surface availability of the vesicles on calcein release could be used to design improved lipid nanostructures for the controlled release of anticancer drugs.

KEY WORDS: cationic liposomes; didodecyldimethylammonium bromide; gold nanoparticles; drug delivery system.

INTRODUCTION

Targeted drug delivery constitutes an interesting alternative in order to overcome current limitations of drugs in different therapies. There is an interest in developing highly localized and specific drug delivery systems. Among them, nanocarriers with enhanced functionality and smart responsiveness are especially attractive (1).

In cancer research, the particular physiological characteristics of the area surrounding the tumor have been exploited to promote the accumulation of the drug carrier in this region, in order to reduce the unfavorable side effects in the healthy tissue (2). The well-known enhanced permeability and retention (EPR) effect promotes this by diffusion and

convection processes (3). However, it is widely accepted that this phenomenon is not enough to control the side effects of cytotoxic drugs (4). Therefore, the development of composite nanosystems which are triggered by stimuli (*i.e.*, pH, enzyme, temperature, and light) is being studied (5).

Among these systems, thermal sensitive liposomes constitute a potential method to produce triggered systems for controlled drug delivery (6). Liposomes are attractive nanocarriers due to their high biocompatibility and non-toxic profile. Some strategies for a triggering purpose include adjusting the lipid composition of liposomes, in order to modify the temperature required for gel-to-liquid crystalline phase transition, or to use thermosensitive polymers, acoustically active liposomes, and laser light sensitive liposomes (7).

In recent years, metal nanoparticles are being exploited by virtue of their physical properties. Among them, gold nanoparticles (AuNPs) are well known for their capacity to exhibit surface plasmon resonance when irradiated with infrared electromagnetic radiation, converting the absorbed energy into heat (8). This property makes AuNPs good candidates for various

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, C/ Prof. García González, 2, 41012, Seville, Spain.

² Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de Sevilla, C/ Prof. García González, 1, 41012, Seville, Spain.

³ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: malugoro@us.es)