

NANOGELES INTELIGENTES

Issa Katime y Juan A. Pérez Ortiz

Grupo de Nuevos Materiales y Espectroscopia Supramolecular. Facultad de Ciencia y Tecnología. Vizcaya. España. Correo electrónico: issa.katime@ehu.es

Recibido: Diciembre de 2021; Aceptado: Enero de 2022

RESUMEN

El cáncer es definido como una enfermedad neoplásica con transformación de las células, en donde las células anormales se reproducen sin control, causando un exceso de células malignas y tumoraciones. Esta enfermedad es actualmente una de las principales causas de muerte a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud reportó en su informe anual, que en el año 2011 a 2021 fallecieron 2 millones de personas a causa de carcinomas de pulmón, tráquea y bronquios. Mientras tanto, en España, el Instituto Nacional de Estadística, presentó el 2021, el informe sobre las causas de muerte en 2011. En ese año murieron un total de 387.911 personas. La principal causa de muerte en el país fue por enfermedades del sistema circulatorio con un 30,5% de los fallecimientos, mientras que las tumoraciones (diferentes tipos de cáncer) fueron la segunda causa, presentando un 28,2% del total de defunciones). En este mismo informe, se reporta que el cáncer mantuvo una tendencia ascendente, con un aumento del 4% respecto al informe anterior.

Con el objetivo de enfrentar esta enfermedad y de mejorar la calidad de vida de las personas que la padecen, se están buscando diversas alternativas para su tratamiento.

Palabras clave: Cáncer, *Organización Mundial de la Salud*, enfermedad neoplásica, muertes sistema circulatorio.

ABSTRACT

Cancer is defined as a neoplastic disease with cell transformation, where abnormal cells reproduce uncontrollably, causing an excess of malignant cells and tumors. This disease is currently one of the leading causes of death worldwide. The *World Health Organization* reported in its annual report that in the year 2011 to 2021 2 million people died from carcinomas of the lung, trachea and bronchi. Meanwhile, in Spain, the National Institute of Statistics, presented on 2021, the report on the causes of death in 2011 to 2021. In that year a total of 387,911 people died. The main cause of death in the country was due to diseases of the circulatory system with 30.5% of deaths, while tumors (different types of cancer) were the second cause, presenting 28.2% of total deaths). In this same report, it is reported that cancer maintained an upward trend, with an increase of 4% over the previous report.

In order to face this disease and improve the quality of life of people who suffer from it, various alternatives are being sought for its treatment.

Keywords: Cancer, *World Health Organization*, neoplastic disease, circulatory system deaths.

INTRODUCCIÓN

Richard Feynman, físico teórico estadounidense, fue el primero en hacer referencia a las posibilidades de la nanociencia y la nanotecnología en el célebre discurso que dio hace más de cinco décadas en el *Instituto Tecnológico de California (Caltech)*, el 29 de diciembre de 1959, titulado “*En el fondo hay espacio de sobra*” (“*There's Plenty of Room at the Bottom*”), entre otras muchas cosas dijo lo siguiente:

“Los principios de la Física, como yo los veo, no hablan sobre la posibilidad de maniobrar cosas átomo por átomo. Esto no es un intento de violar alguna ley; es algo que en principio se puede hacer; pero en la práctica, no se ha hecho porque somos demasiado grandes. Los problemas de la química y la biología podrían evitarse si desarrollamos nuestra habilidad para ver lo que estamos haciendo, y para hacer cosas al nivel atómico”.

Además, en esa conferencia propuso fabricar productos con base en un reordenamiento de átomos y moléculas.

Richard Phillips Feynman es conocido por sus trabajos sobre la formulación integral de la mecánica cuántica, la electrodinámica cuántica, la superfluidez del helio líquido, así como en la física de partículas. *Feynman* junto con *Schwinger* y *Tomonaga*, recibió el *Premio Nobel de Física* en 1965, por sus contribuciones al desarrollo de la electrodinámica cuántica. Durante su vida, *Feynman* se convirtió en uno de los científicos más peculiares y conocidos del mundo. En una encuesta realizada en 1999, de 130 físicos más importantes de todo el mundo por la revista británica *Physics World* fue clasificado como uno de los diez más grandes físicos de todos los tiempos.

El planteamiento de *Feynman* era el siguiente ¿Es posible colocar el contenido completo de 24 volúmenes de la *Enciclopedia Británica* en la cabeza de un alfiler? El afirmaba que había que aumentar 25.000 veces el alfiler para igualar el espacio de las páginas de la enciclopedia. Eso, según su conclusión, significaba que haciendo el procedimiento inverso (comprimiendo 25.000 veces el contenido de la enciclopedia) podría ponerlo en la cabeza del alfiler. Y como ejemplo a seguir utilizó a la propia naturaleza:

“...muchas de las células son muy pequeñas, pero muy activas; fabrican varias sustancias, se mueven, se agitan y hacen todo tipo de cosas maravillosas en una escala muy reducida. Pensemos en la posibilidad de construir algo diminuto que haga lo que nosotros queremos: ¡poder fabricar un objeto que maniobre en ese nivel!”

y afirmó:

“...los principios de la física, hasta donde podemos saber, no descartan la posibilidad de que se puedan manipular las cosas átomo a átomo...”

En 1959, declaraciones de este tipo resultaban cuanto menos sorprendentes. Antes de *Feynman* el enfoque estaba dirigido hacia lo macroscópico, hacia “dentro”. Sin embargo, la mentalidad de *Feynman* revolucionó el enfoque tecnológico. En esencia, *Feynman* asentó los

pilares de lo que hoy en día conocemos como nanotecnología. Esta conferencia es considerada, actualmente, un discurso–doctrina gracias al ingeniero *Eric Drexler* que la rescató del olvido con el fin de utilizarla como aval de sus propias ideas sobre la nanotecnología “*La nanotecnología curará el cáncer, limpiará la contaminación y aliviará el hambre del mundo*”.

Actualmente se conoce a la nanotecnología, que debe su nombre al nanómetro, como el área de la ciencia que nos permite mover los átomos y reordenarlos a nuestra voluntad, es la ingeniería a escala atómica y molecular. El nanómetro es la milmillonésima parte del metro. Si imaginamos una circunferencia, un meridiano de la Tierra que pase por *París* y por ambos polos y dividimos la longitud de esta circunferencia en diez millones, obtenemos la definición del metro. Pues bien, ahora, si dividimos el metro en mil millones de partes nos encontraríamos entonces con el nanómetro; el territorio donde se encuentran los átomos y las moléculas. Por lo tanto, para hacernos una idea de lo que realmente es un nanómetro, en la Figura 1 tenemos a nuestro alcance un diagrama que nos muestra gráficamente la escala de medidas de la naturaleza.

En sí, esta ciencia, abarca cualquier rama de la tecnología que nos permita controlar, modificar y manipular la materia en el ínfimo intervalo comprendido entre 1 y 1.000 nm. Podríamos pensar en trasladar la escala macroscópica a la nanométrica pero es en esta última cuando las leyes de la química y la física se manifiestan de una manera totalmente única e impredecible. La naturaleza ha sido y sigue siendo la nanotecnóloga por antonomasia. La nanotecnología ha sido muy utilizada en muchos y variados procesos de desarrollo en la humanidad, aun siendo el ser humano inconsciente de ello. No queda claro en qué momento los humanos comenzaron a aprovechar las ventajas de los materiales de dimensiones nanométricas. Se sabe que en el *siglo IV a.C.* los vidrieros romanos fabricaban cristales que contenían metales nanométricos. En el museo británico de *Londres* se puede ver un utensilio de ese período, llamado la copa de *Licurgo*. Esta copa, que representa la muerte del *Rey Licurgo*, está fabricada de vidrio de sosa y cal que contiene nanopartículas de oro y plata. El color de la copa varía de verde a rojo intenso cuando se le introduce una fuente luminosa en su interior. También la gran variedad de bellos colores de las vidrieras de catedrales medievales se deben a la presencia de nanopartículas metálicas en el vidrio. O pensemos en *Faraday*, cuando preparó oro coloidal en 1856 y se refirió a él como “metales divididos”. Efectivamente, el oro metálico, al dividirse en finas partículas con tamaños comprendidos entre 10 y 500 nm, puede permanecer suspendido en agua. Otro caso es el

del bacteriólogo alemán *Robert Koch* quien, en 1890, descubrió que algunos compuestos de oro inhibían el crecimiento de las bacterias. Ello le valió el *Premio Nobel de Medicina* de 1905.

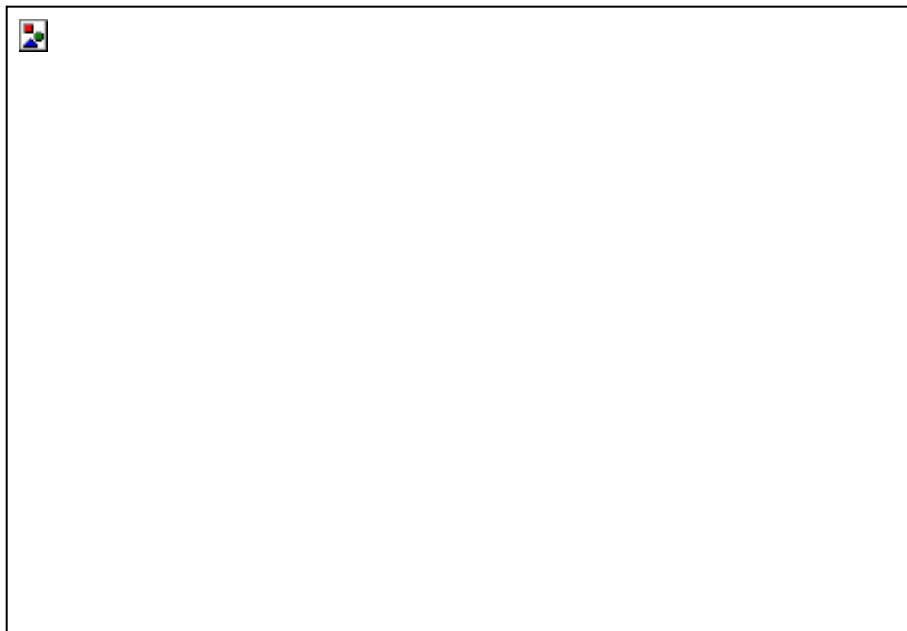


Figura 1. Escala microscópica desde el milímetro al nanómetro.

Uno de los campos de mayor interés en el uso y aplicación de las nanopartículas es el de la Nanomedicina, esto es, el uso de la nanotecnología con fines terapéuticos. Realmente, analizando el cuerpo humano llegamos a la conclusión que los problemas que ponen en peligro su buen funcionamiento están en la escala nanométrica: bacterias, virus, parásitos e incluso las células cancerígenas. Es lógico pensar en el estudio de nuevas estrategias médicas con nuevos dispositivos que surjan y actúen en la misma escala que el foco del peligro. Es aquí donde surge la Nanomedicina, la medicina que trabaja en la nanoescala. Podríamos comenzar diferenciando tres áreas de la nanomedicina: la nanodiagnóstica, la nanoterapia y la medicina regenerativa.

El cáncer es definido como una enfermedad neoplásica con transformación de las células, en donde las células anormales se reproducen sin control, causando un exceso de células malignas y tumoraciones. Es actualmente una de las principales causas de muerte a nivel mundial. La *Organización Mundial de la Salud* reportó en su informe anual del año 2013 que, en el periodo 2011 a 2012, fallecieron 1,5 millones de personas a causa de carcinomas de pulmón, tráquea y bronquios [1]. Mientras tanto, en España, el Instituto Nacional de Estadística presentó el 23 de febrero de 2013, el informe sobre las causas de muerte en 2011. En ese año murieron un total de 387.911 personas. La principal causa de

muerte fue por enfermedades del sistema circulatorio con un 30,5% de los fallecimientos, mientras que las tumoraciones (diferentes tipos de cáncer) fueron la segunda causa, presentando un 28,2% del total de defunciones [2]. En este mismo informe, se reporta que el cáncer mantuvo una tendencia ascendente, con un aumento del 2% respecto al informe anterior.

Con el objetivo de combatir esta enfermedad y de mejorar la calidad de vida de las personas que la padecen, se están buscando diversas alternativas para su tratamiento. En la actualidad, han surgido numerosos avances en ciencia y medicina, que han traído consigo un sinnúmero de agentes farmacéuticos altamente específicos para el tratamiento del cáncer, incluidas algunas proteínas (anticuerpos monoclonales, hormonas, enzimas y oligopéptidos sintéticos) y algunos ácidos nucleicos (ADN plasmídico, oligonucleótidos antisentido y ARN interferentes) [3, 4].

Aun cuando se ha descubierto la eficacia de diversos fármacos y macromoléculas como las mencionadas anteriormente, existen grandes obstáculos para que estas puedan ser utilizados adecuadamente en las terapéuticas actuales; tales como la falta de métodos eficaces para una administración efectiva [5]. Hasta ahora, el método más utilizado para el tratamiento contra el cáncer ha sido la quimioterapia. Esta consiste en la dosificación de medicamentos a través del torrente sanguíneo, encargándose de destruir a las células indiscriminadamente, sin distinguir entre células afectadas y células sanas; por lo tanto, éste es un método inespecífico causante de efectos secundarios adversos en los pacientes. Por esta razón, existe una necesidad imperiosa en el descubrimiento, mejoramiento y utilización de nuevas formas de terapéutica en la administración de fármacos para su tratamiento, ya que la quimioterapia convencional no tiene la capacidad de diferenciar las células tumorales de las sanas.

En las últimas décadas, se han desarrollado nuevas formas de liberación modificada (FLM), también llamadas de liberación controlada. Se trata de dispositivos que aportan mejores pautas posológicas, mejor perfil fármaco-cinético e incluso reducción de efectos adversos. De acuerdo con la *Real Farmacopea Española*, las FLM son aquellas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas son diferentes al de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía [6].

Recientemente, el uso de sistemas poliméricos tales como conjugados poliméricos, micelas poliméricas, policomplejos poliméricos e hidrogeles de tamaño nanométrico están siendo estudiados con el objetivo de mejorar la eficacia de diversos fármacos, proporcionando protección contra la eliminación rápida, y la digestión enzimática, así como ser capaces de ofrecer una liberación controlada eficaz [7, 8]. De particular interés son los sistemas llamados “inteligentes”, gracias a su capacidad de responder a las señales biológicas (estímulos externos) para la focalización específica de tejido o para la liberación controlada de fármacos. El diseño molecular de estos sistemas inteligentes debe tener en cuenta algunos factores para poder ser utilizados en la liberación de fármacos, tales como, la estabilidad, la administración, la absorción, el metabolismo y la biodisponibilidad en el sitio de destino [9]. Así, los denominados nanogeles de estímulo–respuesta o “inteligentes” han surgido como una nueva y prometedora clase de materiales con aplicaciones farmacéuticas. En estos sistemas, pequeños cambios en alguna variable del medio fisiológico como, por ejemplo, la temperatura, el pH o la fuerza iónica, dan lugar a una transición de fase reversible en la estructura del gel. A este respecto la poli(N–isopropilacrilamida) presenta una muy bien definida temperatura de punto crítico inferior (*Lower Critical Solution Temperature*) en agua cercana a 32°C, por encima de esta temperatura la estructura del gel colapsa produciéndose un brusco cambio de volumen (deshinchamiento), que resulta reversible si la temperatura del sistema vuelve a situarse por debajo de 32°C.

Por otro lado, la sensibilidad al pH de estos materiales puede conseguirse al utilizar durante la síntesis, monómeros de partida poseedores de grupos funcionales ionizables. El pH afecta a estos sistemas de manera similar a la temperatura, de forma que una determinada variación del pH del medio hace que el nanogel aumente su volumen, lo que conlleva un aumento del tamaño de los poros de la red polimérica, facilitando la migración de las moléculas que estaban en su interior hacia el exterior del nanogel. Este proceso es conocido con el nombre de “liberación” y es el principio que rige los actuales sistemas de dosificación de drogas. Diversas investigaciones, muestran que la mayoría de los endosomas en los que penetran los complejos folato–receptor tienen un pH que oscila entre 4,7 y 5,3; siendo el valor promedio de 5,0¹⁰. Estas diferencias en los valores de pH, que difieren del pH sanguíneo (7,4), son precisamente el punto crucial en el diseño de un sistema de liberación exclusiva para un fármaco antineoplásico en el tejido tumoral. Ya que esta exclusividad puede lograrse mediante un dispositivo de liberación controlada de fármaco que sea capaz de realizar una liberación dependiente del pH del medio

externo, de forma que al pH ácido del interior de estos endosomas si se produzca la liberación del medicamento, pero que no lo haga al pH fisiológico.

Además, se puede incrementar la selectividad de las nanopartículas frente a los tumores cancerígenos (liberación dirigida), funcionalizándolas con grupos químicos que se sobre-expresen en las células tumorales, tales como la transferrina y el ácido fólico [11]. Estos ligandos favorecen la endocitosis de las nanopartículas en las células cancerígenas y, en consecuencia, la liberación específica en el interior de las mismas de los fármacos que transportan.

Así pues, la obtención, estudio y perfeccionamiento de la liberación de diversos fármacos a través de nanopartículas sintetizadas a partir de diversos componentes (ya sean materiales derivados del petróleo o materiales naturales como el quitosano), ha adquirido un gran interés, ya que estos materiales son capaces de transportar al fármaco (principio activo específico) protegiéndolo de las condiciones químicas no deseadas del organismo, y después lo liberarán bajo cambios químicos definidos (principalmente el pH). Características tales como la funcionalidad potencial, la rápida respuesta frente a estímulos externos, así como su amplia área superficial, hacen de los nanogeles excelentes candidatos para su uso en diversas aplicaciones biomédicas.

Principales enfermedades causantes de muerte a nivel mundial y datos estadísticos.

La mortalidad es la unidad de muerte, la cual puede expresarse ya sea como el número de muertes ocurridas por la enfermedad o también puede expresarse como tasa de mortalidad, por ejemplo, el número de muertes por cada 100.000 personas al año. Los datos de mortalidad se encuentran comúnmente disponibles en las bases de datos nacionales de estadística, agrupados en diferentes grupos tales como muertes por año, muertes por grupos de edad (normalmente cada 5 años) y por último, grupos por sexo.

También existe una base de datos que se extiende a nivel mundial; esta es la base de datos de la *Organización Mundial de la Salud*, en la cual se encuentran registros para causas específicas de mortandad para 70 países, recabando datos desde la década de los cincuenta; también es posible encontrar tablas y figuras [12]. Dentro de esta base de datos también se encuentran tablas específicas por enfermedades, como por ejemplo la *Agencia Internacional para Estudio del Cáncer*.

Tanto en las bases de datos nacionales como en la de la *Organización Mundial de la*

Salud, así como en las bases de la comisión Europea, se han identificado las enfermedades causantes de un mayor número de muertes, también llamadas enfermedades crónicas. Una enfermedad crónica y/o de alta prevalencia, está definida, como aquella enfermedad que afecta al menos a 50 de cada 100.000 personas. Entre estas enfermedades figuran: Enfermedades cardiovasculares, Cáncer, Problemas de salud mental, Diabetes mellitus, Enfermedad crónica respiratoria y Afecciones musculo–esqueléticas

Según el boletín de salud pública de la comisión europea, dichas enfermedades en conjunto, son las responsables del 87% del total de las muertes en la *Unión Europea*, siendo el cáncer una de las enfermedades con mayor índice de mortandad [13].

La palabra cáncer se deriva de la palabra griega “*karkinos*”, que significa “cangrejo”. Se dice que Hipócrates (considerado por algunos autores como el padre de la medicina) fue quien le dio este nombre [14], al darse cuenta que algunas formas de cáncer avanzado adoptan una forma abigarrada (varios elementos amontonados y heterogéneos), con ramificaciones adheridas con obstinación a todo lo que agarran, y pensó que esta forma era muy similar a la de un cangrejo marino, y de ahí viene la derivación de su nombre [15].

La palabra neoplasia se aplica generalmente a los tumores malignos, los cuales son proliferaciones de células con comportamiento anormal; aunque puede emplearse de una manera genérica la palabra “tumor”. Por lo general se dice que hay tumores benignos y tumores malignos. Todos los tumores, benignos y malignos, tienen dos componentes básicos en su estructura: 1) Las células neoplásicas proliferantes y 2) Su estructura de sostén, constituido por tejido conectivo y vasos sanguíneos.

Por otro lado, cabe destacar que la característica que hace mortales a los cánceres malignos, comparativamente con los benignos (no mortales), es la mencionada capacidad de invasión de tejidos, en donde las células tumorales, generalmente cuando se alojan en el parénquima de un órgano, destruyen la arquitectura del mismo, siendo, a su vez, sus residuos metabólicos tóxicos para las células sanas adyacentes, causando la eliminación de este tipo celular. Una capacidad interesante propia de las células cancerosas invasivas es la producción de vasos sanguíneos (angiogénesis) para nutrirse, los cuales son los responsables de la densa red vascular que poseen los tumores¹⁶. Esta característica le permite al parénquima tumoral

tener un gran aporte de oxígeno y nutrientes, lo cual favorecerá su crecimiento y proliferación a mayor velocidad y distancia.

Clasificación de los tipos de cáncer. Los diferentes tipos de cáncer se pueden clasificar por el sitio donde se origina o por la histología del tejido afectado.

Clasificación por el sitio de origen: dependiendo del sitio de origen primario, los cánceres pueden ser de tipos específicos, como por ejemplo: cáncer de pecho, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer del riñón, cáncer oral, cáncer de cerebro etcétera.

Clasificación por los tipos de tejido: dependiendo del tipo de tejido afectado, podemos clasificar al cáncer en seis diferentes tipos [17]: Carcinoma: es aquel tipo de cáncer que se desarrolla en las células de tejido epitelial o glandular. Los cánceres más comunes de este tipo son el de piel, boca, pulmón, mama, tracto digestivo y útero, Sarcoma: es aquel tipo de cáncer que se desarrolla en algún tejido conjuntivo. Como por ejemplo, hueso, cartílago, grasa, músculos y vasos sanguíneos, Mieloma: es el tipo de cáncer que se origina en las células de plasma de la médula. Las células de plasma son capaces de producir los diversos anticuerpos en respuesta a infecciones. El Mieloma es un tipo de cáncer de sangre, Leucemia: se agrupa dentro de los cánceres de sangre; consiste en la proliferación incontrolada de una población anómala de células de la sangre. Estas células anómalas infiltran la médula ósea, impidiendo la producción de las restantes células normales, e invaden la sangre y otros órganos, y Linfoma: son un tipo de cáncer que afecta a los linfocitos (células que forman parte de nuestro sistema inmune). Pese a que otros tipos de cáncer como el cáncer de pulmón, mama o colon pueden afectar en su extensión a los ganglios linfáticos, la característica de los linfomas es que se originan en ellos.

Tratamientos convencionales contra el cáncer. Los tratamientos contra el cáncer se fundamentan en tres pilares: cirugía, quimioterapia y radioterapia. El tratamiento del cáncer es multidisciplinar, donde la cooperación entre los distintos profesionales que intervienen es de máxima importancia para la planificación del mismo. Dada la incapacidad actual de la medicina para curar los tipos de cáncer más agresivos en estados avanzados de evolución, es preferible el empleo de vehículos transportadores que resultan menos agresivos durante el tratamiento. La respuesta al tratamiento con vehículos activos puede ser: 1) Completa: si se ha producido la desaparición de todos los signos y síntomas de la enfermedad, 2) Parcial: si existe

una disminución mayor del 50% en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones mensurables, 3) Objetiva: es la respuesta completa o parcial, 4) Progresión: si aparece cualquier lesión nueva o existe un aumento mayor del 25% en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones mensurables, y 5) Estable: si existe crecimiento o reducción del tumor que no cumple ninguno de los criterios anteriores.

El término quimioterapia suele reservarse a los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas que tienen como función el impedir la reproducción de las células cancerosas. Dichos fármacos se denominan medicamento citotástico, citostáticos o citotóxicos. La terapia antineoplásica tiene una gran limitación, que es su escasa especificidad. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. La acción de los diferentes citostáticos varía según la dosis a la que se administre. La quimioterapia no suele ser el único tratamiento del cáncer, por lo que se suele combinar con cirugía y radioterapia, modalidad que se llama tratamiento combinado o multidisciplinar.

En la actualidad existen más de 100 fármacos antineoplásicos que se suelen usar en combinación: 1) Agentes alquilantes: su mecanismo de acción general, es el daño inducido al ADN celular (tanto neoplásico como sano) al incorporar grupos alquilo, y de esta manera alterar o evitar la duplicación celular, 2) Antimetabolitos: sustancias análogas o componentes naturales, 3) Análogo del ácido fólico: metotrexato, 4) Análogo de la purina: 6–mercaptapurina, 5) Análogos de la pirimidina: 5–fluoracilo, ara–c, 6) Alcaloides de la vinca, 7) Antibióticos antitumorales, y 8) *Cis*–platino y derivados.

La inmunoterapia del cáncer intenta estimular el sistema inmunológico para rechazar y destruir tumores. La inmunoterapia con BCG para la primera fase (no invasiva) del cáncer de vejiga utiliza la instilación de bacterias vivas atenuadas en la vejiga, y es eficaz en evitar la reaparición en hasta dos tercios de los casos.

El principal problema de estos fármacos es su elevada toxicidad debido a la incapacidad para diferenciar las células tumorales de las células sanas. Es muy frecuente administrar dos o tres citostáticos juntos. Estas asociaciones tienen la ventaja de que se puede reducir la resistencia de las células tumorales a los citostáticos y se puede ampliar la potencia al emplear fármacos con diferente mecanismo de acción. El inconveniente es que se pueden

sumar los efectos tóxicos. Para evitarlo se procura asociar citostáticos con distinta toxicidad.

La mayoría se administran por vía intravenosa y debido a que son muy tóxicos es necesario ajustar la dosis con la mayor precisión posible. Se ajusta por la superficie corporal que deriva del peso y talla. Se administran normalmente en ciclos con períodos de descanso. Con estos periodos de descanso se intenta que las células normales, por ejemplo las de la médula ósea, se recuperen del efecto tóxico del citostático mientras que las tumorales se recuperan en menor cuantía. De esta forma y repitiendo los ciclos se pretende reducir progresivamente el número de células tumorales hasta conseguir su erradicación completamente, mientras que las células normales se mantienen al recuperarse después de cada ciclo.

NUEVAS FORMAS TERAPÉUTICAS CONTRA EL CÁNCER

Liberación controlada de fármacos. La tecnología de la liberación controlada de fármacos surgió durante la década de los ochenta como una alternativa a los sistemas de liberación tradicionales para conseguir una respuesta óptima del fármaco, con efectos secundarios mínimos y una eficiencia prolongada en el organismo.

Dentro de la liberación controlada de fármacos, la terapia anticáncer es un área ampliamente estudiada. En los últimos años se han hecho grandes avances para que las nuevas terapéuticas sigan el camino de la liberación específica, mediante la utilización de moléculas receptoras frente a antígenos antitumorales y mediante la liberación selectiva del fármaco en la célula cancerígena.

Los geles poliméricos son candidatos idóneos como soportes para realizar una liberación controlada de fármacos, de forma específica en la zona deseada, dada su diversidad y facilidad de modificación y funcionalización. Para que un gel polimérico actúe como soporte en liberación controlada es necesario, en primer lugar, la incorporación de la sustancia biológicamente activa dentro del gel, que puede llevarse a cabo de forma física o química. En la incorporación por métodos físicos se puede considerar que el fármaco se encuentra embebido en la matriz que actúa como soporte de almacenamiento y dosificación. En la incorporación química el principio farmacológicamente activo está unido químicamente a la macromolécula, generalmente mediante enlaces tipo éster, anhídrido o amida.

Como ocurre en los mecanismos de incorporación de fármaco, entre los mecanismos de liberación también se puede distinguir entre mecanismos físicos, principalmente difusión e

hinchamiento, y químicos, que normalmente suelen estar basados en sistemas biodegradables.

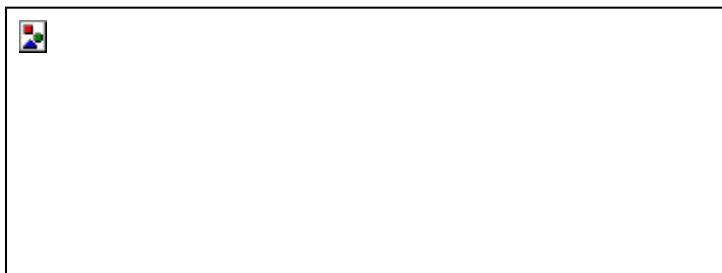


Figura 2a. Esquema del mecanismo de liberación del fármaco desde una matriz polimérica por hinchamiento a partir del gel polimérico en estado colapsado cargado con el fármaco.

La liberación controlada por hinchamiento, por su sencillez y versatilidad, ha sido la más ampliamente estudiada en las últimas décadas. En este tipo de mecanismo de liberación las matrices poliméricas al ponerse en contacto con los fluidos biológicos absorben el agua, aumentando su tamaño tridimensional, hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento sin disolverse (Figura 2a). Por un lado, el soporte polimérico absorbe el agua del medio aumentando su volumen, y por otro, simultáneamente se da una desorción del compuesto bioactivo albergado en el interior del soporte por un mecanismo de difusión controlado por el hinchamiento que sufre el polímero [18].

Algunos sistemas poliméricos entrecruzados, además pueden activar o modificar su hinchamiento en forma reversible ante un cambio en el ambiente que rodea al sistema de liberación, como pueden ser cambios en el pH, temperatura o fuerza iónica. De esta forma, un gel capaz de responder a estímulos externos cargado con principio activo, ante una determinada variación del medio varía su interacción con éste, favoreciendo su incorporación al interior de la red polimérica, de forma que se puede hinchar y tener lugar la salida a través del transporte difusional del fármaco cargado en su interior como se puede observar en la Figura 2b.

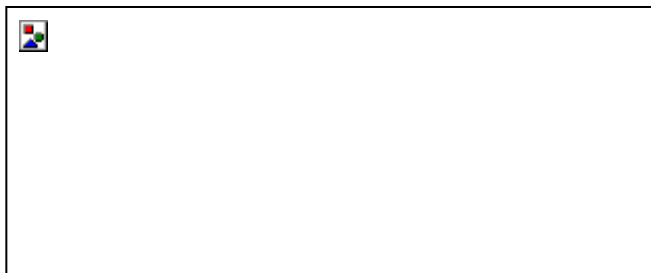


Figura 2b. Sistema de liberación por hinchamiento activado por sensibilidad al pH.

Muchos compuestos han sido utilizados como sistemas transportadores de principios activos para una liberación controlada, como, polímeros naturales o sintéticos, lípidos, tensioactivos y dendrímeros [19, 20].

Liberación vectorizada de fármacos anticancerígenos. Una forma de conseguir que los fármacos anticancerígenos ejerzan su acción sólo en las células tumorales es la vectorización de un soporte que transporte los principios activos, de tal forma que el transportador sea capaz de diferenciar las células enfermas de las sanas.

Se sabe que las células cancerosas a menudo sobre-expresan algunos antígenos específicos o receptores en sus superficies, que pueden ser utilizados como dianas en la nanomedicina moderna. En este sentido, en los últimos años, se estudia la posibilidad de sintetizar geles poliméricos que alberguen fármacos antitumorales en su interior, de tamaño nanométrico para viajar a lo largo del torrente sanguíneo, y químicamente modificados con moléculas directoras que les permitan reconocer e interactuar específicamente con los receptores en los tejidos tumorales [11, 21]. Estos sistemas compuestos por la molécula directora, fármaco y el soporte polimérico resultan ser muy interesantes por las siguientes razones: 1) Los fármacos físicamente atrapados mantienen su actividad, 2) Se pueden cargar en los núcleos de los transportadores una carga útil, relativamente alta de fármacos, y en el caso de fármacos no solubles puede ser superior a su solubilidad intrínseca en agua, y 3) Las moléculas directoras presentes en la superficie de los conductores aumentan la probabilidad de enlace a las células diana.

El ácido fólico (Figura 3), una vitamina de bajo peso molecular ($441 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), tiene gran afinidad con los receptores folato (FRs), que frecuentemente están sobre-expresados en las células de algunos tipos de cáncer humanos, en particular las que se encuentran en los tumores epiteliales de diferentes órganos como son el colon, próstata, ovarios y pulmón.

El ácido fólico, además de la elevada especificidad hacia el tejido tumoral, ofrece potenciales ventajas, entre las que se incluyen su pequeño tamaño, que conlleva favorables propiedades farmacocinéticas, una reducida inmunogenicidad que permite una administración repetida, gran disponibilidad e inocuidad [22]. Todo ello, unido a su relativamente sencilla conjugación química, ha hecho de él una interesante y prometedora molécula en las terapias específicas antitumorales [23].



Figura 3. Estructura molecular de una molécula de ácido fólico.

Existen diferentes métodos para vectorizar moléculas con ácido fólico. La vía de ataque covalente más sencilla para este ligando son sus grupos carboxílicos tanto α como γ . Sin embargo, se ha demostrado que los receptores folato de las células tumorales tienen mayor especificidad por el α -carboxilo que por el γ -carboxilo del ácido fólico [24, 25], por lo que, en principio, parece más conveniente la unión del ácido fólico a la molécula sustrato conjugada a través del γ -carboxilo para mantener así libre el α -carboxilo, y asegurar la vectorización hacia las células cancerígenas. De hecho, el γ -carboxilo es el punto de unión estéricamente más favorecido de la molécula de ácido fólico, por lo que la reacción de vectorización mayoritariamente se da en este grupo, asegurándose así una suficiente proporción en el sistema conjugado folato final de α -carboxilo libre y altamente reconocible por los receptores folato de las membranas tumorales [24, 26].



Figura 4. Esquema del mecanismo de incorporación de los conjugados folato mediante endocitosis mediada por receptor.

Estos sistemas conjugados de ácido fólico son interiorizados en las células tumorales

de un modo no destructivo a través de un proceso de endocitosis (Figura 4). La endocitosis es el proceso por el que la célula capta partículas del medio externo mediante una invaginación de la membrana en la que se engloba la partícula a ingerir. Se produce la estrangulación de la invaginación originándose una vesícula que encierra el material ingerido [24, 27]. Cuando los complejos receptor-ácido fólico se encuentran en estas vesículas, el contenido de éstas se acidifica por la secreción de protones debida a un proceso conocido como acidificación endosómica [27, 28], y las moléculas de ácido fólico se disocian de los receptores y alcanzan el citoplasma para su almacenamiento o su utilización metabólica [29].

Para caracterizar el cambio de pH que estos conjugados folato sufren al pasar al medio intracelular, diferentes estudios han medido indirectamente el valor de pH de endosomas individuales que contenían conjugados folato y han encontrado que aunque este valor puede variar considerablemente (4,7–5,3), el valor promedio resultó ser de $\text{pH} \approx 5,0$ [30]. Dicho pH es claramente diferente al pH fisiológico del torrente sanguíneo y de cualquier tejido sano ($\text{pH} = 7,4$). Esta variación de pH puede ser clave en el desarrollo de nuevos transportadores de antineoplásicos pH-sensibles que lleven a cabo una liberación del medicamento de forma exclusiva en las células dañadas.

En los últimos años, siguiendo la estrategia de vectorización con ácido fólico, se han sintetizado diferentes sistemas conjugados transportadores de fármacos anti-neoplásicos como liposomas, oligonucleótidos, copolímeros de bloque o nanogeles [22, 31–33].

Los hidrogeles poliméricos en la terapia contra el cáncer. Los hidrogeles son materiales poliméricos que comúnmente presentan cambios de volumen en respuesta a cambios en las condiciones externas. La red polimérica puede cambiar su volumen en respuesta a un cambio en el medio como la temperatura, el pH, la composición del disolvente, los estímulos eléctricos, la acción de campos eléctricos etc. Una característica particular de la mayoría de las investigaciones de la última década, se centra en los efectos producidos en las redes poliméricas debidos a las variaciones del pH y la temperatura, ya que estas variables son cruciales en sistemas fisiológicos, biológicos y químicos.

Como ha sido descrito anteriormente, tiene lugar un cambio de pH significativo entre el pH fisiológico (7,4) sano y el del interior de los endosomas en los que penetran los soportes poliméricos (hidrogeles) funcionalizados con ácido fólico en las células tumorales (5,5). Por

este motivo, sistemas poliméricos que presenten grupos ionizables con valores de pK_a próximo por debajo del pH fisiológico, pueden ser potencialmente interesantes para llevar a cabo una liberación selectiva en las células cancerígenas.

Hidrogeles. Los hidrogeles son materiales poliméricos que se hinchan en contacto con el agua formando materiales blandos y elásticos, y que retienen una fracción significativa de la misma en su estructura sin disolverse [34–36]. En estado deshidratado se denominan xerogeles y pueden llegar a ser cristalinos [37]. Las características principales que definen a un hidrogel son consecuencia de diversos factores: a) Su carácter hidrófilo es debido a la presencia de grupos solubles en el agua como [38]: $-OH$, $-CONH_2$, $-CONH$, $-SO_3H$, b) La insolubilidad es originada por la existencia de una malla o red tridimensional en su estructura, c) Su tacto suave y consistencia elástica se encuentra determinada por el monómero o monómeros hidrófilos de partida y por la baja densidad de entrecruzamiento del polímero, y d) Se hinchan en agua aumentando considerablemente su volumen hasta alcanzar un equilibrio fisicoquímico, pero sin perder su forma. El estado hinchado es el resultado del balance entre las fuerzas dispersivas y cohesivas intermoleculares que actúan en las cadenas hidratadas [39].

Clasificación de hidrogeles. Los hidrogeles pueden clasificarse de varias formas dependiendo de qué características y propiedades particulares se tomen como referencia [40]: según la naturaleza de los grupos laterales pueden clasificarse en neutros o iónicos (aniónicos, catiónicos, anfóliticos). Dependiendo del método de preparación: red homopolimérica, copolimérica, multipolimérica, o red polimérica interpenetrada [40,41]. Finalmente, pueden clasificarse como amorfos o semicristalinos dependiendo de la estructura física de la red [42,43]. Los hidrogeles también pueden presentar un comportamiento de hinchamiento dependiente del medio externo, se dice entonces que son hidrogeles fisiológicamente sensibles [44]. Algunos de los factores que afectan al hinchamiento de este tipo de hidrogeles incluyen a: el pH, la fuerza iónica y la temperatura.

Síntesis de los hidrogeles. Para llevar a cabo la síntesis de un hidrogel se necesitan los elementos habituales para realizar cualquier reacción de polimerización en solución, tales como el disolvente, el o los monómeros y el iniciador, pero debe agregarse un agente entrecruzante que será el responsable de la estructura reticulada del gel [35]. Al sintetizar un hidrogel se puede elegir entre un gran número y tipo de monómeros, entre los que podemos

mencionar los siguientes: 1) Monómeros con sustituyentes laterales no ionizables. Por ejemplo, N-vinil pirrolidona, metacrilato de 2-hidroxietilo, N-metilacrilamida, 2) Monómeros con grupos funcionales ionizables. Por ejemplo, ácido acrílico, acrilamida, ácido metacrílico, ácido itacónico, 2-vinil piridina, 4-vinil piridina, vinil amina. Los hidrogeles preparados a partir de estos monómeros captan gran cantidad de agua, y 3) Monómeros *zwiteriónicos*, tal como (N-(3-sulfopropil)-N-metacroiloxi etileno). Las cadenas poliméricas que se obtienen al polimerizar estos monómeros tienen sustituyentes laterales que contienen dos grupos con carga diferente, esta característica permite al hidrogel tener un hinchamiento mayor en soluciones salinas que en medio acuoso.

Existen varios métodos de preparar hidrogeles entrecruzados como son: 1) Entrecruzamiento por radiación: esta reacción utiliza la emisión de electrones, rayos gamma, rayos X o luz ultravioleta para excitar el polímero y producir la estructura entrecruzada, y 2) Reacción química: este método es una reacción de copolimerización y entrecruzamiento entre uno o más monómeros y un monómero multifuncional el cual está presente en muy pequeñas cantidades, este último se denomina agente entrecruzante.

En la síntesis de hidrogeles, la práctica más común consiste en copolimerizar distintos monómeros para obtener propiedades finales adecuadas a la aplicación deseada. Por lo general, a un monómero hidrófilo (que asegurará una mayor entrada de agua en la red molecular y por lo tanto, un mayor contenido de agua) se le añade uno hidrófobo (que mejora sensiblemente las propiedades mecánicas del hidrogel resultante) [45]. Por otro lado, se pueden obtener diferentes tipos de hidrogeles variando la estructura molecular o el grado de entrecruzamiento del material⁴⁶. Independientemente del tipo de polimerización, y de los monómeros que se utilicen, es necesario emplear un iniciador que desencadene la reacción. Los sistemas de iniciación que pueden emplearse, son los comunes en la síntesis de polímeros: radicales libres, temperatura, iniciadores iónicos, radiación gamma o par redox.

En general, el grado de entrecruzamiento determina la solubilidad, el grado de hinchamiento, el tamaño de poro del material, el área total superficial y la resistencia mecánica del hidrogel [47]. La elección del agente entrecruzante y de otros monómeros modificadores de propiedades, depende del tipo de monómero base elegido y es fundamental a la hora de optimizar las propiedades del hidrogel a sintetizar. Por lo tanto, la elección del agente entrecruzante es fundamental para optimizar las propiedades, estos compuestos tienen varios grupos reactivos en

su estructura, siendo frecuente la utilización de compuestos tetrafuncionales y hexafuncionales.

Factores que afectan al hinchamiento. El grado de entrecruzamiento es uno de los factores más importantes que afectan al hinchamiento de los hidrogeles. Los hidrogeles muy entrecruzados tienen una estructura más compacta y se hinchan mucho menos comparándolos con el mismo hidrogel con un entrecruzamiento menor. Existen redes poliméricas tridimensionales que pueden absorber una gran cantidad de agua. Durante el hinchamiento, las cadenas que conforman la red asumen una configuración alargada y esta dilatación va acompañada de la aparición de una fuerza retráctil en oposición al proceso de hinchamiento, que actúa como una presión que las cadenas de la malla ejercen sobre el disolvente contenido en ella. A medida que la malla se hincha con el disolvente, aumenta dicha presión elástica y el hinchamiento alcanza su valor máximo o de equilibrio cuando se obtiene un balance entre ambas fuerzas [48].

La estructura molecular del polímero también puede afectar al hinchamiento. Aquellos hidrogeles que contienen grupos hidrófilos en su estructura se hinchan en mayor grado que aquellos que contienen grupos hidrófobos, los cuales se colapsan en presencia de agua, minimizando su interacción con las moléculas de agua y dando como resultado hidrogeles mucho menos hinchados [48].

Otras propiedades de hidrogeles. Las propiedades de los hidrogeles cuando alcanzan el estado de hinchamiento en equilibrio son las siguientes:

Contenido de agua en el equilibrio: el contenido de agua en equilibrio de un hidrogel es una propiedad básica muy importante, dado que controla propiedades como la permeabilidad, propiedades mecánicas, propiedades superficiales y de biocompatibilidad. Varias aplicaciones útiles requieren una apropiada cantidad de agua. Los hidrogeles con alto contenido de agua son generalmente más ventajosos porque muestran una mayor permeabilidad y biocompatibilidad. Sin embargo, al aumentar el contenido de agua, la resistencia mecánica del hidrogel disminuye y la transparencia del gel puede reducirse como consecuencia de una separación de fase microscópica entre el agua y el polímero. Para sintetizar un hidrogel con alta resistencia mecánica, alta transparencia y alto contenido de agua, es necesaria una estructura molecular mixta. Esta estructura puede consistir en un componente hidrófilo que absorbe grandes cantidades de agua y un componente hidrófobo que mejore la resistencia mecánica [45].

El contenido de agua del hidrogel hinchado (W) se puede expresar como:


$$W = \frac{m - m_0}{m} \quad (1)$$


donde m y m_0 son los pesos del hidrogel y del xerogel, respectivamente. Para dar un valor porcentual del contenido de agua en peso, la ecuación (1) se multiplica por 100. El grado de hinchamiento (D_h) se expresa como:

$$D_h = \frac{m}{m_0} \quad (2)$$

donde $D_h \geq 1$.

En función del volumen, el grado de hinchamiento se multiplica por la densidad del hidrogel y se divide entre la densidad del xerogel, como se expresa a continuación:


$$\quad (3)$$

donde ρ es la densidad del hidrogel y  es la del xerogel.

Permeabilidad: la velocidad de transporte de compuestos de bajo peso molecular a través de hidrogeles es un importante parámetro para muchas aplicaciones. Así por ejemplo, la permeabilidad al oxígeno es de fundamental importancia en aplicaciones de lentes de contacto. Por otra parte, se ha observado que el transporte de iones a través de la membrana no solamente depende de su tamaño, sino del contenido de agua que es el factor que condiciona el tamaño del poro. Teniendo en cuenta que el contenido de agua depende de la estructura molecular, pueden diseñarse membranas de diferente tamaño de poro, y que por lo tanto, permitan el paso selectivo de diferentes iones [49].

Biocompatibilidad: en el campo de los polímeros, el término bio-compatibilidad se refiere a dos aspectos diferentes pero que se encuentran directamente relacionados: a) La elevada tolerancia que han de mostrar los tejidos ante ese agente extraño, fundamentalmente cuando el polímero va a ser implantado, y b) La estabilidad química y, especialmente, física del material polimérico durante todo el tiempo en el que se encuentre en contacto con el organismo.

Aplicaciones. Desde el inicio de la síntesis de los hidrogeles en la década de los 60's del siglo pasado [50], se han encontrado para estos materiales una gran cantidad de aplicaciones de suma importancia para el desarrollo científico y tecnológico. Algunas de las aplicaciones más

importantes son: lentes de contacto [51], superficies hemo-compatibles [52], sistemas de liberación controlada de principios activos [53,54], sensores de glucosa, aditamentos para la agricultura y para uso en productos de higiene personal, entre otros. En años recientes ha incrementado el estudio de una nueva aplicación para los hidrogeles, la cual consiste en utilizarlos como sistemas transportadores y liberadores de fármacos para aplicaciones biológicas. Una de las ventajas de los hidrogeles en la liberación de fármacos, es su capacidad de hinchamiento, ya que esto permite la entrada de la solución que contiene los fármacos disueltos.

Tamaño de partícula de un hidrogel. Carothers fue el primero en definir la gelación como el resultado de un proceso de unión de las moléculas de polímero originando una red tridimensional de tamaño infinitamente grande [55]. El término “infinitamente grande”, de acuerdo con Flory, se refiere a una molécula de dimensiones del orden de magnitud de las del recipiente que la contiene [56]. Por lo tanto, cada una de estas moléculas tiene en realidad un tamaño finito, el del recipiente, pero en comparación con las moléculas ordinarias, éste resulta ser infinitamente grande [57]. De lo que se deduce que para conseguir geles de tamaño pequeño, el método de síntesis deberá consistir en disminuir el tamaño del “recipiente”, es decir, el volumen de polimerización. Por lo tanto, un hidrogel puede obtenerse de diferentes tamaños de partícula, dependiendo del método de síntesis que se seleccione. Podemos encontrar macrogeles, microgeles e hidrogeles de tamaño nanométrico. En la Figura 5 se muestra una imagen de los diferentes tipos de hidrogeles que pueden obtenerse, dependiendo del diámetro de la partícula obtenida.



Figura 5. Distintos diámetros de partícula de los hidrogeles a) macro b) micro, y c) nano.

Para que un hidrogel pueda ser utilizado vía intravenosa como transportador de fármacos anticancerígenos, será necesario reducir el diámetro de partícula a la escala de los nanómetros, para así evitar efectos secundarios indeseables como trombosis.

Nanopartículas. Durante las últimas décadas, el campo de las nanopartículas (PNP) se ha expandido con mucha rapidez, jugando un rol muy importante en amplias áreas de estudio como por ejemplo desde el área electrónica, materiales conductores, medicina y biología, tecnología de control de contaminación ambiental [25, 58–60].

Las nanopartículas son frecuentemente definidas como partículas sólidas y coloidales que se encuentran en el intervalo de diámetro entre 10–1.000 nm [61,62]. El término polinanopartícula es un término colectivo dado para cualquier tipo de nanopartícula polimérica, que pueden clasificarse en dos: nanoesferas y nanocápsulas, que en términos generales todas tienen una forma esférica, sin embargo en la literatura también se han reportado “nanoesferas” que no tienen forma esférica [63].

Las nanoesferas se caracterizan por ser partículas en las cuales su masa es totalmente sólida, y pueden adsorber moléculas ya sea de manera superficial o encapsulándolas dentro de su estructura. Mientras que las nano-cápsulas son sistemas vesiculares que tienen la función de actuar como un tipo de depósito, en el cuál las sustancias atrapadas se encuentran limitadas a una cavidad de núcleo líquido (que puede ser de tipo acuoso u oleico) rodeada por una cubierta sólida. En la figura 6 se representa un esquema de los tipos de nanopartículas.



Figura 6. Ilustración de la clasificación de las nanopartículas poliméricas de forma (a) esférica, (b) nano-cápsulas con núcleo de aceite y (c) con núcleo de agua.

Las propiedades de las PNPs deberán ser optimizadas, dependiendo de la aplicación particular para la cual serán utilizadas. Para lograr obtener las propiedades deseadas, según el interés de la aplicación, la técnica de preparación de las PNPs jugará el papel más importante, por lo cual se describirán a continuación las técnicas más utilizadas.

Técnicas de preparación de nanopartículas. Las PNPs pueden obtenerse de dos maneras distintas, primero, ya sea a partir de un polímero pre-formado o pueden ser sintetizadas directamente a partir de reacciones de polimerización de los monómeros, utilizando técnicas convencionales de polimerización, como por ejemplo emulsión, mini-emulsión, microemulsión, emulsión libre de tensioactivos polimerización interfacial [64].

Las técnicas más utilizadas para la obtención de PNPs a partir de la dispersión de un polímero pre-formado son: (1) evaporación del disolvente, (2) nano-precipitación, (3) proceso *salting-out*, (4) diálisis y (5) tecnología de fluidos supercríticos (*supercritical fluid technology*). Por su parte, los procesos más utilizados en para la polimerización de monómeros son: (1) emulsión, (2) mini y microemulsiones, (3) Emulsiones libres de agentes tensioactivos, (4) polimerización interfacial, y (5) polimerización radical viva controlada. En la figura 9.7 se muestra una ilustración de las diferentes técnicas de preparación de nanopartículas.

La elección del método de preparación de las nanopartículas dependerá de varios factores, como por ejemplo, el tipo de sistema polimérico, área de aplicación, diámetro de partícula requerido entre otros.

Técnicas por reacciones de polimerización: para obtener las nanopartículas con las propiedades deseadas para una aplicación particular, el material debe ser pre-diseñado. Este diseño se logra durante el proceso de polimerización de los monómeros elegidos. Los tres procesos de polimerización utilizados más comúnmente para la síntesis de estos materiales son la polimerización en mini-, micro-, y emulsión; sin embargo, también se han reportado otros métodos heterogéneos para su síntesis, como son la polimerización interfacial y la radical viva controlada.



Figura 7. Representación esquemática e varias técnicas utilizadas para la preparación de polinopartículas (PNPs), A partir de la (a) la dispersión de un polímero pre-formado, (b) reacción de polimerización de monómeros.

Polimerización en emulsión: la polimerización en emulsión es un proceso muy utilizado a nivel industrial para producir polímeros debido a la facilidad de control de la reacción y, porque en contraste a las polimerizaciones en solución, masa y suspensión, se pueden obtener simultáneamente pesos moleculares grandes y velocidades de reacción rápidas. Al inicio de la polimerización en emulsión, el sistema consiste de micelas hinchadas con monómero, gotas de monómero, tensioactivo libre y monómero disueltos en agua. Al final de la reacción, el producto es un látex, esto es, una dispersión de partículas poliméricas de tamaño coloidal dispersas en agua. Estas partículas tienen diámetros del orden de 1.000 a 4.000 Å [65–67].

La polimerización en emulsión presenta comúnmente la gran ventaja de sustituir los disolventes costosos por agua como medio de dispersión. Como por lo general los monómeros son insolubles en agua, es necesario agregar agentes adecuados (tensioactivos) para emulsificar el monómero. En una emulsión directa la reacción de iniciación se desarrolla en el medio acuoso y no en el interior o en la superficie de las micelas hinchadas con monómero o en las gotículas emulsificadas de monómero. Las gotículas emulsificadas de monómero puro sólo sirven como depósito del monómero, el cual es cedido al medio acuoso o a las partículas que están polimerizando a medida que el monómero reacciona [56].

El proceso de polimerización se puede resumir en lo siguiente [68]:

i) Al inicio de la polimerización en emulsión, el sistema consiste de micelas hinchadas con monómero, gotas de monómero emulsificado, tensioactivo libre y monómero disuelto en agua (Figura 8a),

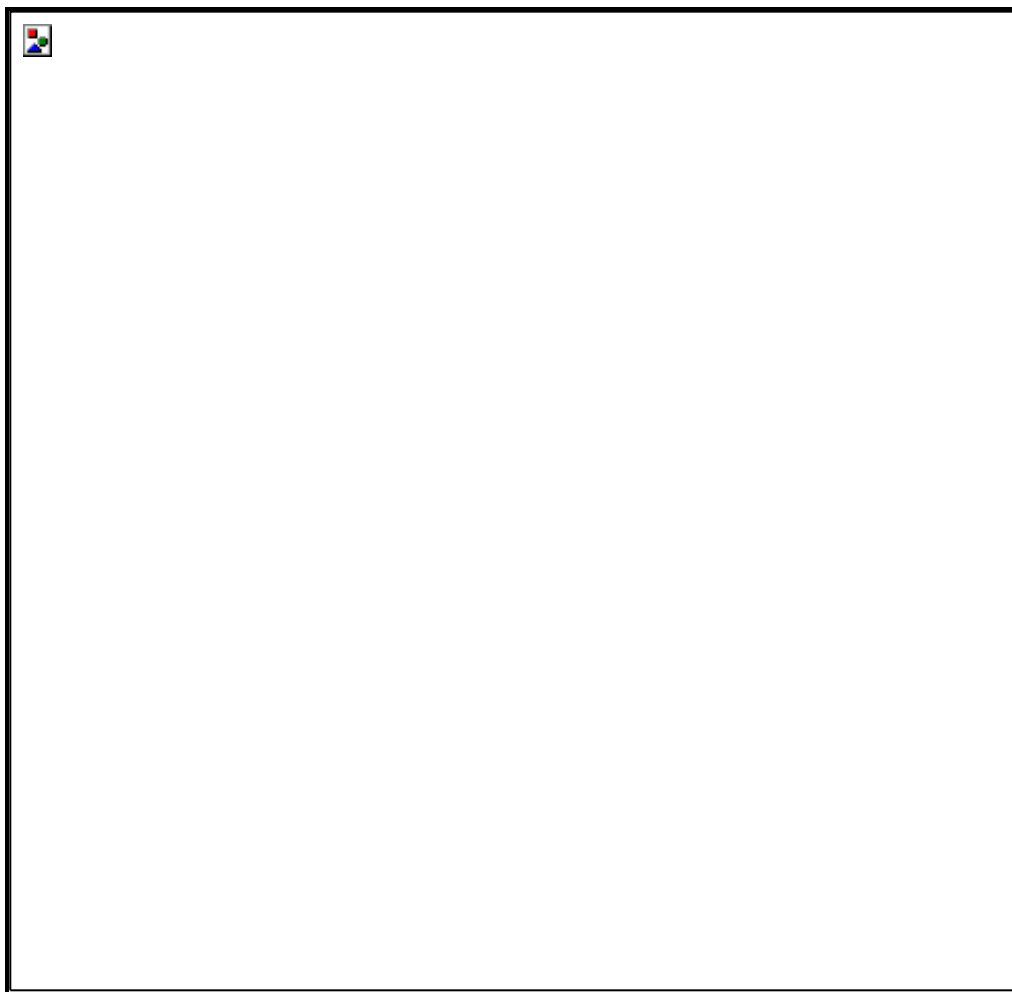


Figura 8. Representación de los diferentes pasos de polimerización en emulsión propuesta por *Harkins* [69].

ii) El iniciador se descompone en radicales libres en la fase acuosa, los cuales son capturados por las micelas para iniciar la polimerización del monómero solubilizado en ellas. Una vez que un radical entra en una micela, ésta se convierte en una partícula viva conteniendo polímero (Figura 8b),

iii) El monómero se difunde desde las gotas de monómero hacia el interior de las partículas de polímero a través de la fase acuosa, lo cual permite mantener la reacción. A medida que las partículas crecen, éstas son estabilizadas (contra la coagulación) mediante la adsorción de

tensioactivo de las micelas. Las partículas continúan creciendo hasta que un segundo radical entra y termina la reacción de polimerización. Un tercer radical puede reiniciar la polimerización; luego la entrada de otro radical puede terminar otra vez la reacción, y así sucesivamente hasta que todo el monómero se convierte en polímero,

iv) Las micelas hinchadas con monómero desaparecen ya sea por la absorción de radicales para convertirse en partículas, o por la migración de su surfactante hacia las partículas que crecen (Figura 8c),

v) Las gotas de monómero desaparecen y ahora el monómero presente en las partículas que no están reaccionando se transfiere a las partículas que sí lo están (Figura 8d), y

vi) El producto final de la polimerización en emulsión es un látex, esto es, una dispersión de partículas poliméricas de tamaño coloidal en agua (Figura 8e).

Polimerización en microemulsión. Cuando dos líquidos inmiscibles de diferente densidad (agua y aceite) son mezclados fuertemente mediante agitación y si no se agrega un agente estabilizante, las dos fases se separan en cuestión de segundos. Adicionando un agente tensioactivo se forman gotículas de un líquido dispersas en el otro y se logra la síntesis de una emulsión característica “estable” de apariencia lechosa. Continuando con la adición de dicho agente tensioactivo se puede notar cierto cambio en la apariencia de la emulsión; esta se vuelve transparente, formándose una dispersión coloidal de baja viscosidad llamada “microemulsión” [68].

Un sistema en microemulsión es una modificación de la emulsión, en la cual es posible controlar mejor el diámetro de partícula, llevándola a tamaños mucho más pequeños que en la polimerización en emulsión [70], aumentando con esto, la posibilidad de poder inyectarlos en el cuerpo humano sin ningún inconveniente. Este control del diámetro de partícula corre a cuenta de las estructuras micelares del sistema, que funcionan como micro/nano-reactores, delimitando el área de la formación del polímero y, por lo tanto, delimitando el tamaño de la partícula.

Se han propuesto varios tipos de estructuras un sistema en microemulsión. El caso usual es aquel en el que el componente en menor concentración (sea agua o aceite) se encuentra en forma de gotículas esféricas dispersas en el componente de mayor concentración, pero separadas por una película de tensioactivo (micelas hinchadas con monómero) [71]. A medida

que se incrementa la concentración del componente minoritario, la curvatura de la película interfacial de tensoactivo tiende a cero y las gotículas tienden a juntarse y fusionarse en tubos multiconectados para formar estructuras bicontinuas. En la figura 9.9 se muestra una imagen de los diferentes tipos de estructuras en una microemulsión.



A

B

C

Figura 9. Representación de los tipos de microemulsión a) directa, b) inversa y c) bicontinua.

a) Microemulsión directa (o/w): su estructura es de tipo globular, constituida por gotas de aceite dispersas en agua. Las partes polares están orientadas hacia el exterior de la micela, mientras que las cadenas hidrófobas están orientadas hacia el interior. Este tipo de microemulsión puede ser utilizada en el caso que los monómeros no sean solubles en agua,

b) Microemulsión inversa (w/o): su estructura es de tipo globular, constituida por gotas de fase acuosa dispersas en fase aceite. Las partes polares están orientadas hacia el interior de la micela y las cadenas hidrófobas están orientadas hacia el exterior. El medio continuo es el aceite. Este tipo de microemulsiones es una variable para cuando los monómeros son solubles en fase acuosa, y

c) Microemulsión bicontinua: consiste en dominios de ambas fases inter-conectados entre sí.

Polimerización en nanoprecipitación: la polimerización por nano-precipitación es un proceso de polimerización heterogéneo, en el cuál no se necesita de sustancias estabilizadoras tipo tensoactivos. Lo que supone una ventaja importante a nivel industrial, dado el elevado precio de los mismos en las formulaciones, y el coste adicional de purificación del polímero final, ya que los restos de estabilizantes son difíciles de eliminar [72–74]. Este hecho, unido a las elevadas velocidades de la polimerización por precipitación han incrementado su popularidad en las últimas cuatro décadas en el ámbito industrial [75], y en los últimos años entre los métodos de

síntesis de nanogeles, estableciéndose como un método ventajoso frente a la polimerización en emulsión.

La polimerización por precipitación (nano), se caracteriza por tener lugar en un medio que resulta ser buen disolvente de los monómeros, pero que sin embargo es un pobre o mal disolvente del polímero resultado de la polimerización [76,77]. Este sistema, parte de un sistema homogéneo de una sola fase en la que monómeros e iniciador se encuentran perfectamente disueltos en el medio de reacción. Esta mezcla homogénea inicial simplifica las formulaciones de las mezclas de reacción. A medida que se produce el crecimiento de las cadenas poliméricas éstas precipitan, ya que el polímero en formación es insoluble o muy poco soluble en el medio, lo que origina una separación en dos fases en el sistema, y por tanto, un sistema heterogéneo.

La baja solubilidad del polímero en formación conduce a una continua nucleación y precipitación de partículas a medida que el polímero se forma. Estas pequeñas partículas de polímero precipitado arrastran en su interior el contenido reactivo disuelto en el medio capaz de polimerizar dentro de este nuevo recipiente de tamaño coloidal, en cuyo interior cada cadena radical es aislada del resto [78].

Como el polímero insoluble precipita, y además se emplean bajas concentraciones de monómero en este tipo de polimerización, las partículas precursoras no tienden a agregarse, lo que permite que se formen partículas aisladas de tamaños submicrométricos. De este modo, no es necesario añadir ningún tipo de sustancia estabilizante para que proporcione una barrera estérica, o eléctrica, que impida la aglomeración entre las partículas en crecimiento que conduciría a la obtención de sistemas de dimensiones superiores a los microgeles, algo que es común en otros tipos de polimerizaciones. Precisamente esta falta de estabilización coloidal adicional en ciertos sistemas puede traducirse en una distribución ancha de tamaños de partícula de los geles formados [79].

Poersch y colaboradores desarrollaron a comienzos de la década de los noventa un modelo cinético para la polimerización por precipitación del ácido acrílico en tolueno, y llegaron a la conclusión de que era la fase heterogénea el único punto de polimerización, negando cualquier posibilidad de consumo de monómero en la fase homogénea [80]. Sin embargo, *Hunkeler* y *Bunyakan* algunos años más tarde, desarrollaron también para la

polimerización por precipitación del ácido acrílico en tolueno, un modelo mecanístico basado en el esquema elemental de polimerización radical (iniciación, propagación, transferencia y terminación) capaz de predecir la conversión y el peso molecular del polímero en formación, que implica que la polimerización tiene lugar tanto en la fase homogénea, como en la fase heterogénea, con una importante transferencia de monómero entre ambas [79].

Es importante mencionar que éste método de polimerización ha sido utilizado para la obtención de nanopartículas por medio de la síntesis de polímero a partir de monómero como también para la obtención de las mismas por medio de la dispersión de un polímero previamente formado.

Polimerización interfacial: la polimerización interfacial es uno de los métodos establecidos para la síntesis de PNPs [81–83]. Es un proceso de polimerización por pasos de dos agentes reactivos o monómeros, los cuales se disuelven respectivamente en dos fases (fase continua y fase dispersa), y la reacción se lleva a cabo en la interfase de ambos líquidos [84]. Este es un método que ha sido utilizado en polimerizaciones de poliadición y policondensación [85–87], así como también en polimerización radical [88].

Polimerización radical viva controlada: una polimerización “viviente” es aquella que tiene lugar sin reacciones de terminación, es decir, que una vez consumido todo el monómero en el reactor (monómero transformado en polímero), las cadenas poliméricas aún se encuentran activas. Esto quiere decir que si adicionáramos más monómero a nuestro reactor, éste continuaría polimerizando.

La polimerización radical viva tenía algunas limitaciones, principalmente la falta de control sobre el peso molecular, la distribución de pesos moleculares, la terminación de las moléculas reactivas y por lo tanto la estructura molecular del polímero. Estas limitaciones eran causadas por la inevitablemente rápida terminación radical–radical de las reacciones. Por medio de la polimerización radical viva controlada se han logrado controlar estos problemas, por lo que se ha abierto una nueva área de síntesis a partir de la modificación del método radical anterior [89–91]. La técnica de la polimerización radical viva controlada ha creado un amplio espectro de oportunidades para la síntesis de nanopartículas (PNPs) con gran potencial de aplicaciones.

Técnicas por dispersión de un polímero preformado: diferentes métodos para la preparación de nanopartículas (PNPs) por medio de la dispersión de un polímero pre–formado

han sido desarrollados y exitosamente utilizados.

Evaporación del disolvente: fue el primer método para dispersar un polímero a nanopartículas [92]. En este método, las soluciones poliméricas son preparadas en disolventes volátiles y posteriormente se forma una emulsión. Anteriormente, el diclorometano y el cloroformo eran los disolventes más comunes, pero ahora han sido reemplazados por el acetato de etilo (el cual tiene un mejor perfil toxicológico). La evaporación del disolvente da el paso a la conversión de emulsión a la suspensión de las nanopartículas. Por último, las nanopartículas sólidas se obtienen por ultracentrifugación y se lavan varias veces con agua destilada para eliminar los restos de aditivos como los tensioactivos [93–94].

Proceso salting-out: es una modificación del proceso de emulsión, en el cual no se utilizan tensioactivos ni disolventes clorados. Fue descrito por primera vez por Bindschaedler y colaboradores en 1990 [95]. La emulsión es formulada a partir de un solvente que es comúnmente miscible en agua, como por ejemplo acetona, y la emulsificación de la solución polimérica en la fase acuosa se logra por medio del efecto *Ouzo* [96] mediante la disolución de alta concentración de sal o sacarosa para lograr un fuerte efecto de desplazamiento salino en la fase acuosa. El cloruro de magnesio, el cloruro de calcio y el acetato de magnesio son los electrolitos más utilizados [93, 97–100].

Diálisis: en este método, el polímero es disuelto en un disolvente orgánico (A) y se coloca dentro de un tubo de diálisis que tenga un peso molecular adecuado. La diálisis se lleva a cabo cuando las concentraciones del disolvente (A) dentro de la membrana tratarán de equilibrarse contra la concentración de un no-disolvente (B) del polímero, que sea miscible con el anterior disolvente (A) y viceversa. El desplazamiento del disolvente dentro de la membrana es seguido por la agregación progresiva del polímero debido a una pérdida de la solubilidad y la formación de suspensiones homogéneas de las nanopartículas.

El mecanismo de formación de PNPs por medio del método de diálisis no está completamente descrito hasta el momento, sin embargo, se piensa que podría ser un mecanismo similar al de nanoprecipitación propuesta por Fessy y colaboradores en 1989, lográndose obtener una gran cantidad de nanopartículas por este método [101–104].

Tecnología de fluidos supercríticos: un fluido supercrítico es aquel que posee propiedades de un disolvente, que se parecen a las de un líquido, pero también exhibe

propiedades de transporte parecidas a las de un gas. Por lo tanto, se comporta como un híbrido entre líquido y gas cuando se encuentre a presiones y temperaturas por arriba de su punto triple. De esta manera, un fluido supercrítico no solo puede disolver solutos sino que también es miscible con los gases ordinarios y puede penetrar en los poros de los sólidos.

La necesidad de encontrar métodos ambientalmente más seguros en cuanto a la producción de PNPs, ha motivado a los investigadores a utilizar fluidos supercríticos para su utilización, ya que son disolventes “amigables” para el medio ambiente [105–106]. Se espera que esta tecnología pueda ofrecer una técnica interesante y eficaz para la producción de partículas, evitando la mayor parte de los inconvenientes de los métodos tradicionales; por ello se han publicado algunos trabajos interesantes en la formación, formulación y control de la obtención de PNPs con fluidos supercríticos [101,107–110].

Así las cosas, podemos concluir que actualmente dentro del campo de la nanotecnología, la investigación con nanogeles inteligentes se encuentra en los albores de futuras y prometedoras investigaciones en la liberación controlada y dirigida de fármacos en la lucha contra el cáncer.

Referencias

1. World Health Organization, sitio web oficial. <http://www.who.int>, (2013).
2. Instituto Nacional de Estadística de España, *sitio web oficial*. <http://www.ine.es>. 2013
3. Dincer S, Turk M, Piskin E, Intelligent polymers as non-viral vectors, *GeneTher.*, **12**, S139–S145 (2005)
4. Couvreur P, Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, **5(1)**, 1–20 (1998)
5. Langer R, Peppas NA, *Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionano-Technology. AIChE J.*, **49**, 2990–3006 (2003)
6. Lastres García JL, Nuevos sistemas orales de liberación modificada, *Schironia*, **1**, 63–71 (2002)
7. Guerrero-Ramírez LG, Katime I, Nano-engineering of Complex Systems: Smart nanocarriers for biomedical applications, en “Biomedical Engineering. From Theory to Applications”. Reza Fazel-Rezai (editor), 2011. Open Access publisher of Scientific Books and Journals. ISBN 978953307637–9
8. Duncan R, Polymer conjugates as anticancer nanomedicines, *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 688–701 (2006)
9. Blanco MD, Benito M, Olmo R, Teijón C, Pérez E, Katime I, Teijón JM, Synthesis and in vitro biological evaluation as antitumor drug carriers of folate-targeted N-isopropyl-acrylamide-based nanohydrogels, *Polymer Intern.*, **61**, 1202–1212 (2012)
10. Lee RJ, Wang S, Low PS, Measurement of endosome pH following folate receptor-mediated endocytosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1312(3)**, 237–242 (1996)
11. Katime I, Mendizábal E, Hernández SL “Síntesis de nanotransportadores poliméricos inteligentes. Propiedades químico-físicas y diversas aplicaciones tecnológicas y biomédicas”, Editorial Académica Española, 2012. ISBN: 978–3–659–02000–1
12. Hjartaker A, Weiderpass E, Bray FI, “Cancer mortality” In: Quah S, Heggenhougen K, Editors. *International Encyclopedia of Public Health*. Academic Press. 452–464 (2008)
13. European Commission. Boletín de Salud Pública (Enfermedades crónicas y de alta

- prevalencia). Sitio web oficial ec.europa.eu/(2013).
14. Grammaticos PC, Diamantis A, *Hell J Nucl Med.*, **11(1)**, 2–4 (2008)
 15. Calvo P, Remunan-López M, Vila-Jato JL, Alonso M, *J. Pharm. Res.*, **10**, 1431–1436 (1997)
 16. Mu L, Feng SS, A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS, *J. Controlled Release*, **86**, 33–48 (2003)
 17. ICD–O–3. International Classification of Diseases for Oncology 3th Edition. Clasificación de la World Health Organization, 2013
 18. Katime I, Katime O, Katime D, “Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares, síntesis, propiedades y aplicaciones”. País Vasco, Editor: Universidad del País Vasco, Bilbao (2003)
 19. Duncan R, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 347–360 (2003)
 20. Sampathkumar SG, Yarema KJ, *Chem. Biol.*, **12**, 5–6 (2005)
 21. TH Kim, HL Jiang, JW Nah, MH Cho, T Akaike, CS Cho. Receptor-mediated gene delivery using chemically modified chitosan, *Biomed. Mater.*, **2**, 95–100 (2007)
 22. Sudimack J, Lee RJ, Targeted drug delivery via the folate receptor, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **41**, 147–162 (2000)
 23. JA Reddy, PS Low. Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **15(6)**, 587–627 (1998)
 24. CP Leamon, PS Low. Cytotoxicity of momordin-folate conjugates in cultured human cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24966–24971 (1992)
 25. Wang X, Summers CJ, Wang ZL, Large-scale hexagonal-patterned growth of aligned ZnO nanorods for nano-optoelectronics and nanosensor arrays, *Nano Lett.*, **4**, 423–426 (2004)
 26. Leamon CP, Low PS, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*; **88**, 5572–5576 (2001)
 27. Leamon CP, Low PS, *Biochem. J.*, **291**, 855–860 (1993)
 28. Y Lu, PS Low. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **54**, 675–693 (2002)
 29. Anthony AC, The biological chemistry of folate receptors, *Blood*, **79**, 2807–2820 (1992)
 30. Lee RJ, Wang S, Low PS, Measurement of endosome pH following folate receptor-mediated endocytosis, *Biochim. Bioph. Acta*, **1312**, 237–242 (1996)
 31. Oyewumi MO, Yokel RA, Jay M, Coakley T, Mumper RJ, *J. Control. Release*, **95**, 613–626 (2004)
 32. Poon Z, Lee JA, Huang S, Prevost RJ, Hammond PT, Highly Stable, Ligand-Clustered “Patchy” Micelle Nanocarriers for Systemic Tumor Targeting. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **7**, 201–209 (2011)
 33. Z Shen, Y Li, K Kohama, B Oneill, J Bi. Improved drug targeting of cancer cells by utilizing actively targetable folic acid-conjugated albumin nanospheres, *Pharmacol. Res.*, **63(1)**, 51–58 (2011).
 34. O Wichterle. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. In: Mark HF, Gaylord NG, Bikales N, editors. Interscience. Volumen 15. New York, NY. pp. 273–291 (1971).
 35. Ratner BD, Hoffman A, Hydrogels for Medical and Related Applications. In: Meterer JD, editor. ACS Symposium Series. Vol. 31. Washington D.C. pp. 1–36 (1976).
 36. G Pedley, PJ Skelly, BJ Tighe. Hydrogels in Biomedical Applications, *Br. Polym. J.*, **12**, 99–110 (1980)
 37. PI Lee. Kinetics of drug release from hydrogel matrices, *J. Controlled Release*, **2**, 277–285 (1985)
 38. Moreno MD. “Toxicología ambiental, evaluación de riesgo para la salud humana”. Primera edición. McGraw-Hill. Madrid, España (2003).
 39. Andrade JD. Hydrogels for Medical and Related Applications, *ACS Symp. Ser.*, **31**, Am. Chem. Soc., (1976)
 40. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichijawa H, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, 27–46 (2000)
 41. CL Bell, NA Peppas. Biomedical membranes from hydrogels and interpolymer complexes. *Adv. Polym. Sci.*, **122**, 125–175 (1995)
 42. NA Peppas, AG Mikos. Preparation methods and structure of hydrogels. En: Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Vol. 1, NA Peppas, Ed., CRC Press, Boca Raton, 1986, pp. 1–27.
 43. Hickey AS, Peppas NA, *J. Membr. Sci.*, **107**, 229–237 (1995)
 44. Peppas NA, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **6**:241–246 (1991)
 45. Katime I “Hidrogeles inteligentes del libro “Terminología básica en polímeros”. Editorial:

- Escuela Internacional de Polímeros. ISBN: 980-11-0807-X. Mérida, Venezuela.
46. Wood JM, Attwood D, Collett JH, The influence of gel formulation on the diffusion of salicylic acid in polyHEMA hydrogels, *J. Pharm. Pharmacol.*, **34(1)**, 1-4 (1982)
 47. A Akelah, A Moet (Eds.). "Functionalized Polymers and Their Applications". Editorial Chapman and Hall, Londres (1990).
 48. Karlsson JO, Gatenholm P, *Macromolecules*, **32**, 7594-7598 (1999)
 49. Tighe BJ. The Role of Permeability and Related Properties in the Design of Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications. *Br. Polym. J.*, **18**, 8-13 (1986)
 50. Wichterle O, Lim D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*, **185**, 117-118 (1960)
 51. Franklin VJ, Bright AM, Tighe BJ, Hydrogel polymers and ocular spolation processes, *Trends in Polymer Science*, **1**, 9-16 (1993)
 52. Cohn D, Aronhime M, Abdo B, Poly(urethane)-Crosslinked Poly(HEMA) Hydrogels, *J. Macromol. Sci. Part A: Pure Appl. Chem.*, **29(10)**, 841-851 (1992)
 53. Schott H, Kinetics of swelling of polymers and their gels, *J Pharm Science*, **81**, 467-472 (1992)
 54. Welz M, Ofner CM. Examination of self-crosslinked gelatin as a hydrogel for controlled release, *Pharm. Science*, **81**, 85-90 (1992)
 55. Carothers WH, *Chem. Rev.*, **8**, 402-412 (1931)
 56. Flory PJ. "Principles of Polymer Chemistry". Cornell University Press, Ithaca, New York (1953)
 57. Flory PJ, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 3086-3096 (1941)
 58. Schmid G. "Nanoparticles: from theory to applications". Weinheim, Germany: Wiley-VCH Publishers (2004)
 59. S Brahim, D Narinesingh, GA Elie. Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a Polypyrrole-hydrogel membrane, *Anal. Chim. Acta*, **448**, 27-36 (2001)
 60. Zhang Q, Chuang KT, Adsorption of organic pollutants from effluents of a Kraft pulp mill on activated carbon and polymer resin, *Adv. Environ. Res.*, **5**, 251-258 (2001)
 61. Kreuter J. "Nanoparticles". In: Kreuter J, Editor. Colloidal drug delivery systems, volumen 66. New York: Marcel Dekker; p. 219-342 (1994)
 62. Couvreur P, Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers., *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, **5**, 1-20 (1998)
 63. Vauthier C, Couvreur P "Development of nanoparticles made of polysaccharides as novel drug carrier systems" In: Wise DL, Editor. Handbook of pharmaceutical controlled release technology. New York. Marcel Dekker; p. 13-429 (2000)
 64. Geckeler KE, Stirm J, Polyreaktionen-Mechanismen, Systematik, Relevanz. *Naturwissenschaften*, **80**, 487-500 (1993)
 65. Odian G. Principles of Polymerization, 4^a edition, J. Wiley, New York (2004)
 66. F Rodríguez. Principios de sistemas de polímeros. Editorial El Manual Moderno S.A de C.V. México D.F (1984)
 67. RG Gilbert. Emulsion Polymerization, a Mechanistic Approach. Editorial Academic Press, London (1995).
 68. Harkins WD "A General Theory of Emulsion Polymerisation", *J. Am. Chem. Soc.*, **69(6)**, 428-444 (1947)
 69. Hiemenz PL. Principles of Colloids and Surface Chemistry. Marcell of Kerr Inc. (1977).
 70. Chow P, Gan L, *Adv. Polym. Sci.*, **175**, 257-298 (2005)
 71. Biesenberger JA. "Principles of Polymerization Engineering". Willey and Sons, New York (1983)
 72. Bamford CH, Ledwith A, Sen Gupta PK, Particulate Precipitation Polymerization: A Convenient Procedure for the Synthesis of Crosslinked Polymers Useful as Polymeric Supports, *J. Appl. Polym. Sci.*, **25**, 2259-2566 (1980)
 73. Li K, Stover HDH, Synthesis of monodisperse Poly(divinylbenzene) microspheres, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **31**, 3257-3263 (1993)
 74. Romack TJ, Maury EE, DeSimone JM, *Macromolecules*, **28**, 912 (1995)
 75. Juba MR. "A Review of Mechanistic Considerations and Process Design Parameters for Precipitation Polymerization". En: Polymerization Reactors and Processes, Editor(s): J Neil Henderson I, Thomas C. Bouton. ACS Symposium Series, **104**, 267-279 (1979)
 76. Frank RS, Downey JS, Stover HDH. Synthesis of divinylbenzene-maleic anhydride microspheres using precipitation polymerization, *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.*, **36**, 2223-2227 (1998)
 77. Bunyakan C, Hunkeler D, Precipitation polymerization of acrylic acid in toluene I: synthesis,

- characterization and kinetics, *Polymer*, **40**(23), 6213–6224 (1999)
78. Pérez L, Sáez V, Hernáz E, Katime I. Novel pH and Temperature Responsive Methacrylamide Microgels, *Macromolecular Chemistry & Physics*, **210** (13–14), 1120–1126 (2009)
79. Downey JS, Frank RS, McIsaac G, Stove HDH, *Polymer Preprints* (Amer. Chem. Soc., Polym. Chem.). **40**12, 950 (1999)
80. Poersch HG, Avela A, Reichert KH. Precipitation polymerization of acrylic acid: Kinetics, viscosity and heat transfer, *Die Ang. Makromol. Chem.*, **206**, 157–169 (1993)
81. Landfester K, Musyanovych A, Mailander VJ. From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process, *Polym. Sci.; Part A, Polym. Chem.*, **48**, 493–515 (2010)
82. Gaudin F, Zydowicz NS. Core-shell biocompatible polyurethane nanocapsules obtained by interfacial step polymerisation in miniemulsion, *Colloid Surf.*, **A331**(1–2), 133–142 (2008)
83. Wu M, Dellacherie E, Durand A, Marie E, Poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization. 2. PEG-based surfactants, *Colloid Surf.*, **B69**(1), 147–151 (2009)
84. Karode SK, Kulkarni SS, Suresh AK, Mashelkar RA, New insights into kinetics and thermodynamics of interfacial polymerization, *Chem. Eng. Sci.*, **53**(15), 2649–2663 (1998)
85. Crespy D, Stark M, Hoffmann-Richter C, Ziener U, Landfester K, Polymeric Nanoreactors for Hydrophilic Reagents Synthesized by Interfacial Polycondensation on Miniemulsion Droplets, *Macromolecules*, **40**, 3122–3135 (2007).
86. Danicher L, Frere Y, Calve AL, Synthesis by interfacial polycondensation of polyamide capsules with various sizes. Characteristics and properties, *Macromol. Symp.*, **151**(1), 387–392 (2000)
87. Torini L, Argillier JF, Zydowicz N. Interfacial polycondensation encapsulation in miniemulsion. *Macromolecules*, **38**(8), 3225–3236 (2005)
88. TF Scott; AD Schneider; WD Cook; CN Bowman, *Science*, **308**, 1615–1617 (2005)
89. Matyjaszewski K, Xia J, Atom transfer radical polymerization, *Chem. Rev.*, **101**(9), 2921–2990 (2001)
90. Zetterlund PB, Nakamura T, Okubo M., Mechanistic investigation of particle size effects in TEMPO-mediated radical polymerization of styrene in aqueous miniemulsion, *Macromolecules*, **40**, 8663–8672 (2007)
91. Zetterlund PB, Kagawa Y, Okubo M, Controlled/living radical polymerization in dispersed systems, *Chem. Rev.*, **108**(9), 3747–3794 (2008)
92. Vanderhoff JW, El Aasser MS, Ugelstad J. “Polymer emulsification process”. US patent 4,177,177 (1979)
93. Allemann E, Gurny R, Doelker E, Drug-loaded Nanoparticles – Preparation methods and drug targeting issues, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**, 173–191 (1993)
94. Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates. A review, *J. Control Release*, **128**, 185–199 (2008)
95. Bindschadler C, Gurny R, Doelker E. Process of preparing a powder of water-insoluble polymer which can be re-dispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof. US Patent. 4,968,350 (1990)
96. Ganachaud F, Katz JL, Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices, *Chem. Phys. Chem.*, **6**(2), 209–216 (2005)
97. De Jaeghere F, Allemann E, Leroux JC, Stevels W, Feijen J, Doelker E, Gurny R. Formulation and lyoprotection of Poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake, *Pharm. Res.*, **16**, 859–866 (1999)
98. Nguyen CA, Allemann E, Schwach G, Doelker E, Gurny R, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **20**, 217–220 (2003)
99. Zweers MLT, Engbers, GHM, Grijpma DW, Feijen J. In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and Poly(ethylene oxide), *J. Control. Release*, **100**(3), 347–356 (2004).
100. Galindo-Rodríguez SA, Puel F, Briançon S, Allemann E, Doelker E, Fessi H, Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **25**, 357–367 (2005)
100. Jung J, Perrut M, Particle design using supercritical fluids: Literature and patent review, *J. Supercrit. Fluids*, **20**, 179–219 (2001)
101. Liu JD, Wang YJ, Chen CH, Yu CF, Chen LC, Lin JK, Molecular mechanisms of G0/G1 cell-cycle arrest and apoptosis induced by terfenadine in human cancer cells, *Mol. Carcinog.*, **37**, 39–50

(2003)

102. Faheem AS, Nasser AMB, Muzafar AK, Santosh A, Myung SK, Kim HK, Novel self-assembled amphiphilic poly(ϵ -caprolactone)-grafted-poly(vinyl alcohol) nanoparticles: hydrophobic and hydrophilic drugs carrier nanoparticles, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **20**, 821–831 (2009)
103. Errico C, Bartoli B, Chiellini F, Chiellini E, Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery, *J Biomed Biotechnol.*, **20**, 821–831 (2009)
104. York P, Strategies for particle design using supercritical fluid technologies, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **2**, 430–440 (1999)
105. Kawashima Y, Nanoparticulate systems for improved drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 1–2 (2001)
106. Reverchon E, Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nanoparticles, *J. Supercritic Fluids*, **15**, 1–21 (1999)
107. Shariati A, Peters CJ, Recent developments in particle design using supercritical fluids, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **7**, 371–383 (2003)
109. C Vemavarapu, MJ Mollan, M Lodaya, TE Needham. Design and process aspects of laboratory scale SCF particle formation systems, *Int. J. Pharm.*, **292**, 1–16 (2005)
110. Mishima K, Adv. Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas, *Drug Deliv. Rev.*, **60**, 411–432 (2008)