

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
23 de mayo de 2013 (23.05.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/072545 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
B82Y 5/00 (2011.01) *A61K 9/51* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070799

(22) Fecha de presentación internacional:
16 de noviembre de 2012 (16.11.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201101256
18 de noviembre de 2011 (18.11.2011)

ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES];
Hospital Real, C/ Hospicio s/n, E-18.071 Granada (ES).

(72) Inventores: **ARIAS MEDIANO, José Luis**; Universidad de Granada, Hospital Real, C/ Hospicio s/n, E-18.071 Granada (ES). **GALLARDO LARA, Visitación**; Universidad de Granada, Hospital Real, C/ Hospicio s/n, E-18.071 Granada (ES). **RUIZ MARTÍNEZ, M^a Adolfiná**; Universidad de Granada, Hospital Real, C/ Hospicio s/n, E-18.071 Granada (ES). **SÁEZ FERNÁNDEZ, Eva Antonia**; Universidad de Granada, Hospital Real, C/ Hospicio s/n, E-18.071 Granada (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: MIXED NANOPARTICLES FOR CONTROLLED RELEASE OF ACTIVE PRINCIPLES

(54) Título : NANOPARTICULAS MIXTAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRINCIPIOS ACTIVOS

(57) Abstract: The present invention relates to mixed nanoparticles for delayed release of active principles, the use of said nanoparticles for treating diseases linked with inflammation and as antitumor agents, and to the method for the synthesis of said nanoparticles.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a nanopartículas mixtas de liberación prolongada de principios activos, el uso de dichas nanopartículas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación y para como antitumorales y al método de síntesis de dichas nanopartículas.



WO 2013/072545 A1

NANOPARTICULAS MIXTAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRINCIPIOS ACTIVOS

Campo de la invención

- 5 La presente invención se encuadra en el campo general de la nanomedicina y en particular se refiere a nanopartículas mixtas de liberación controlada de principios activos.

Estado de la técnica

- 10 La necesidad de encontrar tratamientos eficaces contra el cáncer, ha hecho que se incrementen las líneas de investigación en esta materia. Esto ha permitido un mayor conocimiento de sus orígenes moleculares, con la consiguiente identificación de novedosas líneas terapéuticas y el desarrollo de un amplio arsenal de agentes terapéuticos. Aún así, estas nuevas moléculas suelen presentar las siguientes
- 15 limitaciones: *i)* no llegar en cantidad suficiente al lugar donde se localiza el tumor; y, *ii)* no son suficientemente eficaces en el micro-entorno tumoral. Por estos motivos, el fracaso del tratamiento es muy frecuente incluso en los tipos de cáncer teóricamente más sensibles a los agentes quimioterapéuticos. Un claro ejemplo lo constituye el uso del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo en el tratamiento del cáncer colorrectal
- 20 avanzado, el cuál sólo induce una respuesta global entorno al 10 %. Además, se ha descrito que la combinación de este agente con otros antitumorales sólo ha logrado mejorar la eficacia antitumoral entorno al 45 % de los casos [Zhang y cols., 2008].

- Entre las principales razones que justifican el fracaso del tratamiento antitumoral destacan: *i)* la farmacocinética desfavorable de los agentes antitumorales
- 25 (caracterizada por un rápido aclaramiento y una rápida biodegradación, que dan lugar a una corta vida plasmática) determina el uso de dosis altamente tóxicas y una rigurosa pauta de tratamiento para conseguir el efecto terapéutico deseado; *ii)* la extensa biodistribución y extravasación de la molécula antitumoral en zonas no deseadas determina su elevada toxicidad; *iii)* la selectividad de estos fármacos por el
- 30 tejido tumoral generalmente es muy pobre; *iv)* la susceptibilidad de desarrollar resistencia a los anticancerosos por parte de las células tumorales; y, *v)* las propiedades fisicoquímicas desfavorables de los agentes antitumorales, por ejemplo,

su hidrofobia, inducen una escasa acumulación en el lugar de acción [Arias, 2008; Durán y cols., 2008].

Con el objetivo de solucionar estos problemas se han asociado antitumorales con sistemas coloidales en el tratamiento del cáncer [Reddy, 2005; Arias, 2008]. Esta asociación pretende aumentar la acumulación específica del fármaco en la zona tumoral, e incrementar el tiempo de exposición de las células cancerosas a estos agentes activos. Otros beneficios de la localización exclusiva de los agentes quimioterápicos en la región diana son la mejora de su perfil farmacocinético y la disminución de la toxicidad asociada a la extensa biodistribución de estas moléculas.

Además, los sistemas coloidales pueden lograr una protección adecuada de estos principios activos *in vitro* (durante el almacenamiento) e *in vivo* (frente a fenómenos de biodegradación relacionados principalmente con sistemas enzimáticos), lo que reducirá la formación de productos de degradación potencialmente tóxicos [Arias, 2008; Durán y cols., 2008; Davis y cols., 2008]. Es por ello que numerosos esfuerzos se están concentrando en la formulación de coloides, basados principalmente en sistemas vesiculares (liposomas y niosomas) o poliméricos, para conseguir el transporte eficaz de cualquier antitumoral a la zona diana [Arias, 2008; Cho y cols., 2008]. Sin embargo, recientes investigaciones han probado que esta simple asociación no siempre resulta suficiente para lograr dirigir específicamente un fármaco a cualquier zona del organismo, más allá de los órganos pertenecientes al sistema retículo endotelial [Reddy, 2005; Couvreur y Vauthier, 2006]. Es por todo esto que actualmente se están desarrollando importantes investigaciones (con resultados muy prometedores) encaminadas al diseño de sistemas transportadores pasivos de fármacos [basados en el efecto de permeación y retención incrementada] y sistemas transportadores activos de fármacos al lugar de acción (fundamentados en las interacciones ligando-receptor, y en el diseño de nanopartículas sensibles a estímulos externos) [Reddy, 2005; Arias, 2008].

Gang J, Park SB, Hyung W, Choi EH, Wen J, Kim HS, Shul YG, Haam S, Song SY. Magnetic poly epsilon-caprolactone nanoparticles containing Fe₃O₄ and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model. J Drug Target. 2007 Jul;15(6):445-53 y Arias JL, López-Viota M, Sáez-Fernández E, Ruiz MA. Formulation and physicochemical characterization of poly(ε-caprolactone)nanoparticles loaded with ftorafur and diclofenac sodium. Colloids Surf. B: Biointerfaces 2010; 75: 204-208, describen nanopartículas magnéticas de poli-épsilon caprolactona que

contienen un fármaco para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el gran tamaño que presentan dichas partículas hace que su acumulación en la región diana sea pobre, de tal forma que la eficacia del tratamiento se ve mermada.

- 5 Existe pues la necesidad de proporcionar unas nanopartículas que sean de un tamaño mínimo que permita una mayor mayor acumulación de las mismas en la región diana, que minimicen los fenómenos de reconocimiento y retirada de las mismas por el sistema inmune y mejore por tanto la eficacia del tratamiento.

Descripción de la invención

- 10 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a nanopartículas mixtas de liberación prolongada de principios activos caracterizadas porque la nanopartículas tienen un diámetro medio de entre 74-98 nm y comprende un núcleo de óxido de hierro, un recubrimiento biodegradable de poli (ϵ -caprolactona) y al menos un principio activo. De ahora en adelante nanopartículas de la presente invención.

- 15 En la presente invención principio activo y fármacos son equivalentes y se refiere a cualquier sustancia química utilizada en la prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación y cura de una enfermedad; para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado; o para modificar condiciones fisiológicas con fines específicos.

- En una realización particular las nanopartículas de la presente invención tienen un
20 diámetro medio de 86 nm.

En una realización particular el núcleo de óxido de hierro de las nanopartículas de la presente invención tiene un diámetro medio de entre 10-14 nm

En una realización particular el principio activo de las nanopartículas de la presente invención es un AINE. Más en particular el AINE es diclofenaco sódico.

- 25 En una realización particular el principio activo de las nanopartículas de la presente invención es un antitumoral. Más en particular el antitumoral es seleccionado de entre la doxorrubicina o 5'-fluorouracilo.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de las nanopartículas mixtas de la presente invención como medicamento.

En un tercer aspecto, las nanopartículas de la presente invención son para el tratamiento del cáncer.

En un cuarto aspecto, las nanopartículas de la presente invención son para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación, principalmente en el
5 tratamiento de artritis y artrosis. También se pueden utilizar para el tratamiento de otros procesos inflamatorios como faringitis, laringitis, colitis, conjuntivitis, etc.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de las nanopartículas de la presente invención que comprende los siguientes pasos:

- a) síntesis del núcleo de magnetita mediante co-precipitación en solución acuosa,
- 10 b) disposición interfacial de la poli (ϵ -caprolactona) en diclorometano junto con la nanopartícula de magnetita del paso a) en solución acuosa,
- c) purificación de la partícula obtenida en el paso b)
- d) adición del principio activo

En una realización preferente, el paso d) de adición del fármaco se realiza mediante
15 adsorción superficial sobre las nanopartículas obtenidas tras el paso c)

En otra realización preferente, el paso d) de adición del fármaco se realiza mediante absorción en la matriz de las nanopartículas en el paso b)

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas de la presente invención y al menos un excipiente
20 farmacéuticamente aceptable. De ahora en adelante composición farmacéutica de la presente invención.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la presente invención como medicamento.

En un octavo aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención es para
25 el tratamiento del cáncer.

En un noveno aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención es para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación.

En un décimo aspecto, la presente invención se refiere al uso de las nanopartículas de la presente invención y/o de la composición farmacéutica de la presente invención en
30 terapia de hipertermia.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra las imágenes de HRTEM de las nanopartículas de magnetita (a), poli(ϵ -caprolactona) (b), y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) (c). Longitud de barra: 100 nm (a y b), y 20 nm (c).

La figura 2 muestra imágenes de FeSEM de las nanopartículas de magnetita (a), poli(ϵ -caprolactona) (b), y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) (c). (Figura insertada: detalle de la muestra). Longitud de barra: 20 nm (a), y 100 nm (b y c).

La figura 3 muestra una microfotografía HRTEM de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ obtenida partiendo de una relación de masas inicial $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ de 4:1 (a), 2:4 (b) y 1:4 (c).

La figura 4 muestra difractogramas de rayos X de las partículas de magnetita (Fe_3O_4 , línea negra), poli(ϵ -caprolactona) (PCL, línea azul) y de magnetita /poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, línea magenta). Figura insertada: patrón de difracción de rayos X de la Fe_3O_4 . La intensidad está expresada en unidades normalizadas.

La figura 5 muestra el espectro de infrarrojos de las partículas de magnetita (Fe_3O_4 , $\circ$ -), de poli(ϵ -caprolactona) (PCL, —) y de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, —). Figura insertada: estructura química de la PCL.

La figura 6 muestra el ciclo de histéresis de las partículas de magnetita (Fe_3O_4 , $\square$) y compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{poli}(\epsilon\text{-caprolactona})$ ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, $\blacksquare$)

La figura 7 muestra visualmente la decantación magnética de las partículas de magnetita (Fe_3O_4) y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$) bajo la influencia de un imán permanente de 400 mT, localizado en el lateral (a) o debajo (b) de las muestras.

La figura 8 muestra una microfotografía óptica (magnificación: 40X) de una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) en ausencia (a) o bajo la influencia (b, c, d, e, f) de un gradiente magnético externo, $B = 400$ mT, en la dirección de la flecha.

La figura 9 muestra el potencial zeta (ζ) de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4 , $\bullet$), poli(ϵ -caprolactona) (PCL, $\blacksquare$), y compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, $\blacktriangle$) en función del pH, en presencia de 10^{-3} M KNO_3 .

La figura 10 muestra el potencial zeta (ζ) (b) de las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4 , ●), poli(ϵ -caprolactona) (PCL, ■), y compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, ▲) en función de la concentración de KNO_3 a $\text{pH} = 6$.

La figura 11 muestra el histograma de las movilidades electroforéticas (u_e) de las nanopartículas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$) en una solución acuosa 10^{-3} M KNO_3 , para diferentes relaciones de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$. También se incluyen los valores de u_e de Fe_3O_4 y de PCL.

La figura 12 muestra la movilidad electroforética (u_e) de las nanopartículas de Fe_3O_4 (USPIO, ■) y de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (USPIO/PCL, □) en función del tiempo, a $\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$, y a 37.0 ± 0.5 °C.

La figura 13 muestra los ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones con magnetita (Fe_3O_4), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y nanopartículas de magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$).

La figura 14 muestra componentes de la energía libre superficial (mJ/m^2) de magnetita (Fe_3O_4), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y nanopartículas magnéticas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$). γ_s^{LW} es la componente de Lifshitz-van der Waals; γ_s^+ (γ_s^-) es la componente electrón-aceptor (electrón-donante).

La figura 15 muestra los valores de ΔG_{121} (mJ/m^2) y carácter hidrófilo/hidrófobo de los tres tipos de nanomateriales: magnetita (Fe_3O_4), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y nanopartículas magnéticas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$).

La figura 16 muestra la liberación de doxorrubicina (%) adsorbida (a), y (b) absorbida desde las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ en función del tiempo de incubación en una solución tampón $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$) a 37.0 ± 0.5 °C.

La figura 17 muestra la liberación de 5-fluorouracilo (%) adsorbido (a), y (b) absorbido desde las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ en función del tiempo de incubación en una solución tampón $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$) a 37.0 ± 0.5 °C.

La figura 18 muestra la liberación de diclofenaco sódico (%) adsorbido (a), y (b) absorbido desde las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ en función del tiempo de incubación en una solución tampón $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$) a 37.0 ± 0.5 °C.

La figura 19 muestra la curva de calentamiento de una suspensión acuosa de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ (10 mg/mL) bajo la exposición a un gradiente electromagnético alterno de alta frecuencia (frecuencia e intensidad: 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente).

5

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1: Formulación de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona)

El método de síntesis se basa en el método de disposición interfacial de la poli(ϵ -caprolactona), utilizado en la síntesis de nanopartículas de este polímero. Para ello se provocó la precipitación del polímero en un medio de polimerización en el que se encontraban los núcleos del óxido de hierro (magnetita). De esta manera, la poli(ϵ -caprolactona) recubrió los núcleos de magnetita que se encontraban presentes en el medio acuoso donde se produjo su precipitación.

En primer lugar, la síntesis de las nanopartículas de magnetita se realizó mediante el método de co-precipitación en solución [Massart, 1981]. En concreto, la metodología de síntesis seguida consistió en la adición, a temperatura ambiente y gota a gota, a una solución acuosa de amoníaco (500 mL, 0.7 M) de una solución acuosa de cloruro férrico (40 mL, 1 M) y otra solución acuosa de cloruro ferroso (10 mL, 2M) que además contenía una concentración 2 M de HCl. En estas condiciones, se produjo la formación espontánea de las nanopartículas de magnetita, las cuáles fueron aisladas mediante sedimentación magnética. La última fase de esta síntesis consistió en la estabilización termodinámica de las nanopartículas de magnetita en una disolución acuosa de ácido perclórico 2 M durante 12 horas. De esta manera, aseguramos que las partículas de este óxido de hierro se mantuvieran aisladas en el medio de dispersión, no formándose agregados de mayor tamaño. Las partículas de magnetita fueron preparadas en el momento de su utilización para la síntesis de los nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona).

Por el contrario, si las nanopartículas de este óxido de hierro no eran utilizadas en el momento, se desecaban en una estufa de desecación [P-Selecta, España] a 40.0 ± 0.5 °C, y se conservaron en estado seco hasta su utilización.

El proceso de síntesis de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) comenzó con la adición de 10 mL de una solución al 0.3 % (p/v) de polímero en diclorometano

sobre 50 mL de una suspensión acuosa de nanopartículas de magnetita (0.3 %, p/v) que contenía una concentración de pluronic® F-68 del 2 % (p/v). La adición de la fase orgánica sobre la fase acuosa se realizó bajo agitación mecánica (1200 rpm), la cual se mantuvo durante 1 hora más. Finalmente, la limpieza de las nanopartículas magnéticas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) se realizó mediante sedimentación magnética. Para ello, la suspensión fue sometida a ciclos consecutivos de exposición a un imán de 400 mT durante 5 minutos, procediendo a la eliminación del sobrenadante tras este tiempo, y redispersión en agua bidestilada. Esta rutina se mantuvo hasta que el sobrenadante obtenido era transparente y presentaba una conductividad inferior a 10 μ S/cm.

Finalmente, con el objetivo de establecer comparaciones durante la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona), realizamos también la síntesis de nanopartículas puras de poli(ϵ -caprolactona) según la metodología indicada en el párrafo anterior, pero sin la utilización de los núcleos de óxido de hierro.

A continuación se realizó una caracterización física, química y fisicoquímica de las nanopartículas.

La geometría (forma y tamaño) de las partículas de magnetita y magnetita/poli(ϵ -caprolactona) fue estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) [STEM PHILIPS CM20, Holanda] y mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución (FeSEM) [Zeiss DSM 950, Alemania]. La determinación del tamaño de partícula medio ($\pm$ desviación estándar) se obtuvo mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS) [Malvern 4700 analyzer, Malvern Instruments, Inglaterra].

El tamaño medio de las partículas de magnetita fue de 12 ± 2 nm (figura 1a y 2a), lo que nos hizo pensar que las nanopartículas debían ser superparamagnéticas.

El tamaño medio de las nanopartículas puras de polímero fue de 97 ± 7 nm.

En cuanto a las nanopartículas magnetita/poli(ϵ -caprolactona), tal y como puede apreciarse en la figura 1c, el recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos fue completo.

Como muestra la figura 2b, los núcleos de magnetita quedaron recubiertos por un halo blanco/grisáceo que coincidió con el aspecto de las nanopartículas puras de polímero. Es más, las microfotografías de FeSEM (figura 2) muestran cómo externamente las

partículas puras de poli(ϵ -caprolactona) y las partículas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) son indistinguibles. Este hecho confirmó la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos por el polímero biodegradable.

Finalmente, el análisis PCS de la nanopartículas magnéticas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) permitió confirmar el pequeño tamaño de éstas (86 ± 12 nm), muy adecuado para la vía de administración parenteral.

Las condiciones de síntesis descritas en el ejemplo anterior son las que posibilitan un mayor rendimiento en la obtención de nanopartículas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) (tabla 1). Sin embargo, para llegar a esta conclusión fue necesario el análisis del efecto que tienen las diferentes proporciones de masa magnetita:poli(ϵ -caprolactona) (Fe_3O_4 :PCL) en el rendimiento de la síntesis. En concreto, variamos las proporciones de Fe_3O_4 :PCL desde 1:4 a 4:1.

La figura 3 recoge las microfotografías de HRTEM de las nanopartículas compuestas obtenidas según todas estas variantes del procedimiento de síntesis. Observamos cómo las diferencias más significativas se dieron entre las nanopartículas obtenidas utilizando una relación Fe_3O_4 :PCL 1:4 y 4:1, en comparación con las otras posibilidades investigadas. Si la relación inicial entre las masas era 4:1, el recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos era prácticamente inexistente. Como mucho llegó a apreciarse ocasionalmente en las zonas de contacto entre los núcleos magnéticos (figura 3a). En el caso contrario, cuando la relación era 1:4, las partículas de Fe_3O_4 quedaban totalmente englobadas por una enorme matriz de polímero. Incluso se apreció la formación de una excesiva cantidad de partículas de polímero puro (figura 3c).

El análisis de la influencia de esta relación de masas iniciales Fe_3O_4 :PCL sobre el rendimiento de la síntesis en la obtención de nanopartículas magnéticas compuestas Fe_3O_4 /PCL, permitió comprobar que éste era máximo para una proporción 2:4 (≈ 90 %), seguido de la proporción 4:3 (≈ 84 %) (tabla 1). El rendimiento de la reacción de síntesis fue calculado mediante la ecuación:

$$\frac{\text{masa total obtenida de nanopartículas compuestas } \text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL (mg)}}{\text{masa total utilizada de material (mg)}} \times 100$$

Proporcion de masas iniciales magnetita:polímero	Rendimiento (%)	Apariencia del sobrenadante no magnético
4 : 1	2	anaranjado oscuro
4 : 2	12	anaranjado claro
4 : 3	84	amarillento
4 : 4	42	blanquecino/amarillento
3 : 4	51	banquecino/amarillento claro
2 : 4	90	transparente
1 : 4	40	blanco

Tabla 1. Rendimiento (%) de la reacción de síntesis de las partículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ para cada una de las proporciones de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$.

Desde 1:4, hasta 4:1.

Como muestran los datos, si existe un exceso en la cantidad de núcleos magnéticos sobre la cantidad de polímero mucha Fe_3O_4 quedó sin recubrir (no formando parte de las partículas compuestas) y, por su particular superparamagnetismo, quedó en el sobrenadante de la suspensión en lugar de formar parte del sedimento magnético atraído por el imán. En estas condiciones, el sobrenadante no magnético presentó un característico color anaranjado (indicativo de la presencia de estos núcleos superparamagnéticos de óxido de hierro). Por el contrario, si la relación era de 1:4 el sobrenadante no magnético obtenido era totalmente blanco, consecuencia de la formación de nanopartículas de polímero puro en exceso. Además, al incrementar la cantidad de PCL con respecto a Fe_3O_4 el grosor del recubrimiento polimérico de las nanopartículas de magnetita tendía a ser algo mayor.

El hecho de que el sobrenadante de las nanopartículas compuestas obtenidas con la relación $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ 2:4 fuera totalmente transparente, significa que toda la cantidad de los materiales utilizados en la formulación de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ se transformó en estas nanopartículas magnéticas compuestas. De hecho, como hemos comentado el rendimiento es $\approx 90\%$ (tabla 1).

Por último, cuando hay un exceso de Fe_3O_4 sobre PCL (en concreto, en la relación 4:3) todo el polímero utilizado pasó a formar parte de los recubrimientos poliméricos biodegradables de las partículas compuestas. Este exceso en Fe_3O_4 hizo que hubiera núcleos magnéticos no recubiertos que permanecieron aislados en el sobrenadante del medio de dispersión, haciendo que el rendimiento de la reacción de síntesis fuera el menor, en comparación con la relación 2:4 como hemos señalado.

La metodología de síntesis implicó la utilización de una relación de masas iniciales Fe_3O_4 :PCL 2:4. Así (figuras 1c y 2c), el rendimiento de la reacción fue el máximo posible ($\approx 90\%$) y se obtuvieron nanopartículas compuestas de tamaño muy pequeño (86 ± 12 nm) y adecuado para la vía de administración parenteral.

- 5 Este tamaño fue sensiblemente inferior al obtenido en trabajos previos. En concreto, y en función de las condiciones de formulación, se obtuvieron nanopartículas Fe_3O_4 :PCL con un tamaño de 20 a 3 μm , cuando la velocidad de agitación variaba entre 500 y 2000 rpm, respectivamente [Hamoudeh y Fessi, 2006], de 160 ± 5 nm [Yang y cols., 2006], y de 164 ± 3 nm [Gang y cols., 2007].
- 10 El menor tamaño de las nanopartículas Fe_3O_4 :PCL que hemos sintetizado es realmente interesante en el transporte de fármacos al lugar de acción (masa tumoral, tejido inflamado, etc.), ya que permite estimar una mayor acumulación de las nanopartículas en la región diana al minimizarse los fenómenos de reconocimiento y retirada por el sistema inmune [Decuzzi y cols., 2009].
- 15 Posteriormente realizamos una caracterización muy exhaustiva de las nanopartículas, en comparación con los trabajos previamente publicados [Hamoudeh y Fessi, 2006; Yang y cols., 2006; Gang y cols., 2007]. En concreto, difracción de rayos X, espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier, propiedades magnéticas (ciclo de histéresis), propiedades eléctricas superficiales (electroforesis: dependencia
20 del potencial zeta con el pH y con la fuerza iónica) y termodinámica superficial (análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba del nanomaterial).

1.- Difracción de rayos X

- Realizamos un difractograma de rayos X de los tres tipos de materiales (Fe_3O_4 , PCL y Fe_3O_4 /PCL), empleando el método de Debye-Scherrer. El dispositivo empleado fue un
25 difractómetro Philips PW1710 (Holanda), utilizando una longitud de onda de $1.5405 \text{ \AA}$ ($\text{Cu-K}\alpha$). La masa utilizada en el análisis fue la misma para todos los materiales (≈ 0.5 g). En la figura 4 se recogen los difractogramas obtenidos para la magnetita, el polímero y las partículas compuestas. Al comparar los difractogramas de la magnetita y de las partículas compuestas con el patrón de la “American Society for Testing and
30 Materials” de la magnetita (figura 4), comprobamos la perfecta coincidencia de las líneas del difractograma con las del patrón, lo que permitió identificar la muestra como magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta (tamaño de gramo $\approx 300 \text{ \AA}$), incluso tras ser recubierta por el polímero. Las características semicristalinas de la

PCL también quedaron reflejadas en los difractogramas. Destacamos cómo los picos característicos de la PCL se encontraron presentes en el difractograma de rayos X de las partículas magnéticas compuestas, aunque con una menor intensidad. A igualdad de masa utilizada en el análisis, la cantidad de polímero presente en la muestra de partículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ era menor. Demostrando de nuevo la eficacia de la formación de partículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ mediante la metodología de síntesis de la presente invención.

2.- Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

Para la preparación de las muestras a analizar tomamos 1.0 mg de material sólido y se mezclaron con 100 mg de bromuro potásico pulverizado y seco. A continuación, prensamos el material a 15000 kPa para obtener un disco transparente. Como consecuencia de esta manipulación, aparecieron bandas en el espectro de infrarrojos a 3448 cm^{-1} y 1639 cm^{-1} debido a la humedad. La obtención del interferograma se realizó utilizando un espectrofotómetro de infrarrojos (Nicolet 20 SXB, EE.UU.), con una resolución de 2 cm^{-1} .

En la figura 5 se recoge el espectro de infrarrojos de nuestros tres tipos de partículas (Fe_3O_4 , PCL y $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$). El análisis permitió la identificación de los grupos funcionales del polímero en las partículas compuestas. Sin embargo, las bandas fueron menos intensas debido a la menor cantidad de polímero presente en las partículas compuestas para el mismo peso de muestra. En concreto, las bandas observadas fueron:

- A: banda debida a la humedad que adquieren las muestras como consecuencia de su proceso de manipulación. Se localiza a 3388 cm^{-1} .
- B: grupo de dos bandas que corresponden a la vibración de estiramiento del enlace C-H de la molécula. En el polímero, a 2937 cm^{-1} se localiza la banda característica de la vibración de elongación asimétrica del grupo CH_2 ($\nu_{\text{AS}}\text{ CH}_2$) y a 2888 cm^{-1} observamos la perteneciente a la vibración de elongación simétrica del CH_2 ($\nu_{\text{AS}}\text{ CH}_2$).
- C: banda que corresponde a la vibración molecular del enlace $\text{C}=\text{O}$ del polímero, aparece a 1727 cm^{-1} .
- D: banda que corresponde a la vibración de flexión asimétrica del CH_2 ($\nu_{\text{AS}}\text{ CH}_2$). En las partículas poliméricas aparece a 1469 cm^{-1} .

- E: grupo de dos bandas correspondientes a la vibración de flexión del enlace O-H (1345 cm^{-1}) y a la vibración de elongación del enlace C-O (1281 cm^{-1}) del ácido carboxílico de la molécula.
- F: banda perteneciente a la vibración de elongación del enlace C-O del alcohol primario del polímero (1242 cm^{-1}).
- G: grupo de tres bandas que aparecen a 1150 cm^{-1} , 1111 cm^{-1} y 1061 cm^{-1} , corresponden a la vibración de elongación y flexión del grupo C-CO-C, y que resulta de la vibración de elongación y flexión de la cadena C-C-C presente en este grupo.
- H: en las muestras que contienen polímero, a 961 cm^{-1} aparece una banda media característica de un alcano.
- I: banda permanente a la vibración de oscilación del CH_2 (ρCH_2), se observa a 840 cm^{-1} y es propia de una cadena larga de CH_2 .
- J: única banda ausente en el espectro de las partículas de polímero. Aparece a 581 cm^{-1} y es una banda ancha e intensa, característica de la absorción en la magnetita [Lyon, 1967], correspondiente a la frecuencia *Restrahl* (o rayo residual), de máxima absorbancia de cristales iónicos (o parcialmente iónicos) en el infrarrojo [Gartstein y cols., 1986].

3.- Propiedades magnéticas

- Se caracterizaron las propiedades magnéticas de los núcleos de Fe_3O_4 y el efecto que el recubrimiento polimérico podía tener sobre éstas. Además, y con el fin de clarificar las condiciones óptimas para la formulación de nanopartículas magnéticas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, se investigaron las características magnéticas de las partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ obtenidas para cada una de las relaciones de masa inicial $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ (desde 1:4 hasta 4:1). Las propiedades magnéticas de la magnetita y de las partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ quedaron perfectamente definidas mediante el ciclo de histéresis. Esta caracterización macroscópica del comportamiento magnético de las partículas coloidales se realizó con la ayuda de un magnetómetro-susceptibilímetro Manics DSM-8 (Francia). Todas las medidas se realizaron a $25.0 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$, ya que a esta temperatura se realizó la preparación y el almacenamiento de las suspensiones.

La figura 6 recoge el ciclo de histéresis de las nanopartículas de Fe_3O_4 y de las compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. En el caso de los núcleos puros de magnetita, no se observó

histéresis por el carácter superparamagnético de éstos. Este superparamagnetismo fue consecuencia del pequeño tamaño de la Fe_3O_4 ($< 20 \text{ nm}$).

De la región lineal del ciclo de histéresis (zona de campo magnético bajo) se estimó la susceptibilidad magnética inicial (χ_i) de las partículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$: 3.13 ± 0.17 ; y, el valor de la magnetización de saturación $258 \pm 7 \text{ emu/g}$. Las partículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ obtenidas en las mejores condiciones posibles (relación 2:4 de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$) tuvieron unas propiedades magnéticas muy superiores a las de coloides de igual composición ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$), p. ej., valores de magnetización de saturación: $\approx 8 \text{ emu/g}$ [Hamoudeh y Fessi, 2006], $\approx 17.6 \text{ emu/g}$ [Yang y cols., 2006], y $\approx 10.2 \text{ emu/g}$ [Gang y cols., 2007].

Estas propiedades magnéticas de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ del sistema coloidal diseñado demuestra que dichas nanopartículas tenían las características adecuadas para su utilización en el transporte de fármacos a un órgano o tejido diana: un recubrimiento polimérico que permitirá el transporte de cantidades suficientes de fármaco y su liberación a una velocidad controlable, y una más que adecuada capacidad para responder a gradientes magnéticos aplicados. Esta respuesta a gradientes magnéticos aplicados debe mejorar notablemente la concentración en el lugar de acción de la dosis de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ administradas y, de esta manera, la total acumulación de la dosis de fármaco en la región diana (potenciación del efecto farmacológico y reducción de la toxicidad asociada a una extensa biodistribución).

De forma adicional, la capacidad de respuesta a campos magnéticos aplicados de las partículas de Fe_3O_4 y de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ fue analizada cualitativamente mediante visualización del efecto que ejerce un imán permanente sobre una suspensión acuosa de estas nanopartículas. En concreto, se prepararon sendas suspensiones acuosas coloidales con una concentración $< 0.5 \%$ (p/v). A una temperatura de $25.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, se puso en contacto la suspensión de Fe_3O_4 y la de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ con un campo magnético de 400 mT , y se observó el comportamiento de las nanopartículas en función del tiempo. Como puede apreciarse en la figura 7, las nanopartículas compuestas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ fueron atraídas muy rápidamente por el imán, confirmando las grandes propiedades magnéticas del sistema diseñado. El sobrenadante quedó completamente transparente, en menos de 1 minuto. Por el contrario, la suspensión de nanopartículas de Fe_3O_4 mantuvo su aspecto homogéneo incluso tras 24 horas de

exposición al gradiente magnético aplicado. El carácter superparamagnético de las nanopartículas de Fe_3O_4 justificó la ausencia de respuesta al gradiente magnético de 400 mT.

Con el fin de analizar el comportamiento microscópico de las suspensiones acuosas de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, realizamos un seguimiento mediante microscopía óptica de éstas. Las suspensiones acuosas tenían una concentración del 0.1 % (p/v) de nanopartículas y la exposición a un gradiente magnético de 400 mT se realizó a 25.0 ± 0.5 °C. En concreto, una gota de suspensión acuosa de las nanopartículas magnéticas se colocó en un portaobjetos y fue sometida a un imán localizado en diferentes posiciones con respecto a la suspensión magnética. La visualización del efecto que el gradiente magnético aplicado ejerció sobre la suspensión de nanopartículas se realizó utilizando un microscopio óptico (magnificación: 40X).

Como puede apreciarse en la figura 8a, la suspensión acuosa de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ fue muy homogénea en ausencia de un gradiente magnético aplicado. Sin embargo, cuando la gota de suspensión quedaba bajo la influencia del imán permanente de 400 mT, las partículas formaban agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección del gradiente magnético (figura 8b en adelante).

El proceso de análisis de las condiciones óptimas de formulación de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ se completó con el estudio de las propiedades magnéticas de las partículas obtenidas según cada una de las relaciones de masa iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ (desde 1:4, hasta 4:1). La susceptibilidad inicial y la magnetización de saturación de cada uno de los tipos de partículas magnéticas compuestas quedan recogidas en la tabla 2. Estos parámetros magnéticos fueron calculados a partir del ciclo de histéresis de cada una de las muestras.

PROPORCIÓN DE MASAS INICIALES $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$	SUSCEPTIBILIDAD INICIAL (χ)	MAGNETIZACIÓN DE SATURACIÓN (emu/g)
4:01	0.62 ± 0.14	52 ± 8
4:02	2.38 ± 0.13	196 ± 7
4:03	2.78 ± 0.11	229 ± 6
4:04	3.07 ± 0.12	253 ± 6
3:04	3.04 ± 0.14	249 ± 8
2:04	3.13 ± 0.17	258 ± 7
1:04	2.44 ± 0.23	201 ± 9

Tabla 2. Propiedades magnéticas de las partículas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) (Fe_3O_4 /PCL) obtenidas a partir de diferentes proporciones de masa inicial magnetita:polímero.

Como puede observarse en la tabla 2, las nanopartículas con mejores propiedades magnéticas fueron aquellas obtenidas a partir de una relación de masas inicial Fe_3O_4 :PCL entre 4:4 y 2:4, debido principalmente a que las partículas así obtenidas albergaban un gran número de núcleos superparamagnéticos en su interior y, por lo tanto, presentaban una mayor capacidad para responder a gradientes magnéticos. Cuando la síntesis de las partículas compuestas se realizó con las proporciones 4:3 a 4:1, el recubrimiento polimérico obtenido fue mucho más delgado y en su interior hubo un menor número de partículas de magnetita (figura 3a). Este efecto fue cada vez más patente conforme se incrementaba el exceso en núcleos superparamagnéticos utilizado en la síntesis. Así, las propiedades magnéticas fueron cada vez menores. Finalmente, cuando el exceso de polímero utilizado en la síntesis de las partículas compuestas era muy grande (relación de pesos iniciales 1:4), las partículas superparamagnéticas quedaban embebidas por una cubierta de polímero tan grande que lograba reducir significativamente la magnetización de la muestra (figura 3c).

Estos resultados demostraron que con la relación de masas inicial Fe_3O_4 :PCL de 2:4, se conseguían los mejores resultados para obtener unas nanopartículas magnéticas compuestas con las mejores características para su uso en el transporte magnético de fármacos hasta el órgano o tejido diana.

4.- Propiedades eléctricas superficiales

La determinación de las movilidades electroforéticas (u_e) de las distintas suspensiones acuosas se llevó a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra). La medida estaba basada en el análisis de la autocorrelación de la luz láser dispersada por las nanopartículas en movimiento. El aparato utilizado permitió determinar u_e con errores $\leq 5\%$. La temperatura de medida ($25\text{ }^\circ\text{C}$) se mantuvo constante (hasta $\pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$) utilizando un módulo Peltier. Las suspensiones estudiadas tenían una concentración de nanopartículas $\approx 0.1\%$ (p/v). Antes de preparar la suspensión se fijaba la concentración del electrolito (KNO_3) deseada y se ajustaba, en su caso, el pH con HNO_3 o KOH . Las medidas se realizaron tras 24 horas de contacto de las nanopartículas con el medio de dispersión a $25.0 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ y bajo agitación mecánica (50 rpm). Los datos presentados fueron el promedio de 12

determinaciones, cambiando la muestra cada tres. La teoría de O'Brien y White [O'Brien y White, 1978] se utilizó para convertir los valores de u_e en potencial zeta (ζ).

En el caso del estudio de la estabilidad de las propiedades eléctricas superficiales de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, las medidas se realizaron de igual forma.

- 5 La única diferencia introducida fue la composición del medio de dispersión de las nanopartículas: tampón $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$).

Debido a que las propiedades de los óxidos de hierro son extremadamente sensibles a las variaciones del pH, lo cual no es predecible en el caso de la poli(ϵ -caprolactona) debido a la naturaleza de los grupos responsables de su carga (los ácidos carboxílicos
10 libres) , centramos en primer lugar nuestro estudio en el efecto del pH sobre el potencial zeta (ζ) de las nanopartículas. La figura 9 muestra la evolución del ζ de las nanopartículas en función del pH (con una fuerza iónica moderada constante: KNO_3 10^{-3} M). Como puede observarse, las nanopartículas de magnetita presentaron un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta zero bien definido en torno a pH 7. En el caso
15 del polímero, el punto isoeléctrico se encontraba en las proximidades del pH 5.5. A partir de estos valores la carga eléctrica superficial fue negativa. Esta diferencia entre el comportamiento electrocinético de las nanopartículas de Fe_3O_4 y de PCL convirtieron a la electroforesis en una herramienta muy útil para comprobar cualitativamente la eficacia del recubrimiento y, de esta manera la obtención de
20 partículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. La figura 9 muestra cómo las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ presentaban un comportamiento casi idéntico a las de polímero puro. Por lo tanto, podemos concluir que el recubrimiento polimérico oculta muy eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de las partículas compuestas sea indistinguible de la de las nanopartículas puras de polímero.

- 25 Para confirmar estos resultados determinamos el ζ de los tres tipos de nanopartículas en función de la concentración de KNO_3 a $\text{pH} = 6$ constante, siguiendo la misma metodología. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 10. De nuevo se observa la similitud entre la electrocinética del polímero y de las partículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, y las diferencias con respecto a la magnetita.

- 30 Con toda la información expuesta sobre las características superficiales de los materiales estudiados, demostramos el mecanismo por el que una matriz de poli(ϵ -caprolactona) se deposita sobre los núcleos de magnetita y los engloba. En concreto, predecimos una interacción electrostática netamente atractiva entre las nanopartículas

de magnetita con carga eléctrica positiva y el polímero con carga eléctrica negativa. Las condiciones ligeramente ácidas en las que se formulan las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ ($\text{pH} = 6.0$) determinaron estas cargas eléctricas superficiales (figura 9). Gracias a esta interacción electrostática de tipo netamente atractivo, fue posible la concentración del polímero en la superficie de la matriz polimérica de la magnetita. Hecho que favoreció la inclusión de los núcleos superparamagnéticos en el interior de la matriz polimérica y, por lo tanto, la formación de las partículas magnéticas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$.

La técnica de electroforesis también fue utilizada, siguiendo la misma metodología y rutina, para analizar las características y la eficacia del recubrimiento cuando cambia la relación de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$ utilizada en la formulación de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. La figura 11 muestra los valores de u_e de las nanopartículas compuestas en un medio de dispersión acuoso, en presencia de una fuerza iónica moderada constante (KNO_3 10^{-3} M).

De forma muy patente, puede apreciarse cómo los valores de u_e característicos de los núcleos magnéticos condujeron hacia los de las partículas de polímero puro al aumentar la cantidad de polímero utilizada en la relación de masas iniciales $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{PCL}$, principalmente por encima de 3:4. Por lo tanto, desde un punto de vista electroforético justificamos la utilización de una relación de masas iniciales 2:4 para la formulación de las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. Sólo así los valores de u_e de las nanopartículas compuestas son indistinguibles de los de la PCL y, por lo tanto, el recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos fue óptimo y eficaz.

Las medidas electroforéticas de las suspensiones acuosas (concentración ≈ 0.1 %, m/v) de magnetita y de nanocompuestos magnéticos se realizaron reproduciendo las condiciones fisiológicas ($\text{pH} 7.4 \pm 0.1$, y 37.0 ± 0.5 °C). El experimento se consideró finalizado cuando los valores de movilidad electroforética (u_e) de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ coincidían con los de las nanopartículas puras de Fe_3O_4 , señal inequívoca de la pérdida del recubrimiento polimérico.

En la figura 12 se aprecia cómo los valores de u_e de la magnetita permanecen constantes durante todo el período del estudio ($u_e \approx -3.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$). Este valor negativo de u_e tan elevado fue debido a la formación en la superficie de la magnetita de una fina capa de oxidación (maghemita, un estado más oxidado de ésta). De hecho, los valores de u_e de nanopartículas de maghemita de igual tamaño a la Fe_3O_4

(bajo las mismas condiciones experimentales) fueron muy similares ($u_e \approx -3.6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$).

En la figura 12 se ve como los valores de u_e de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ se aproximan progresivamente a los característicos de los núcleos magnéticos. En concreto, se hacen iguales tras 15 días. A partir de entonces, no se observaron diferencias significativas entre la u_e de ambos materiales. Por tanto, la superficie de los núcleos de Fe_3O_4 de los nanocompuestos quedó cada vez más expuesta al medio de dispersión (de ahí los valores cada vez más negativos de u_e), por la degradación progresiva del recubrimiento. Así, cuando la cubierta de polímero se perdía completamente, ambos valores de u_e se hacían indistinguibles. Esta evolución tan progresiva de u_e hacia los valores típicos de la Fe_3O_4 , puso de manifiesto cualitativamente que la velocidad de degradación del polímero fue lenta, lo que ha sido asociado al alto grado de cristalinidad y a la gran hidrofobia de este polímero.

5.- Termodinámica superficial

El análisis termodinámico superficial de los núcleos de magnetita (Fe_3O_4), el recubrimiento polimérico [poli(ϵ -caprolactona), PCL] y las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, se realizó utilizando agua filtrada y desionizada (sistema Milli-Q Academia, Millipore, Francia), formamida (Carlo Erba, Italia) y α -bromonaftaleno (Merck, Alemania). En la aplicación del modelo de van Oss se utilizaron los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba utilizados (tabla 3) [van Oss, 2006].

Líquido	γ^{LW}	γ^+	γ^-
Agua	21.8	25.5	25.5
Formamida	39.0	2.28	39.6
α -Bromonaftaleno	43.6	0.0	0.0

Tabla 3. Componentes de la tensión superficial (mJ/m^2) de los líquidos utilizados en el experimento de medida del ángulo de contacto a 25.0 ± 0.5 °C.

La medida de los ángulos de contacto se realizó con un goniómetro Ramé-Hart 100-0.7-00 (EE.UU.), que permite observar las gotas de líquido depositadas sobre un sólido. Este aparato dispone de un conjunto de tornillos micrométricos que permiten los desplazamientos verticales y horizontales del sustrato, así como de un limbo graduado para la medida del ángulo con una precisión de $\pm 1^\circ$. El uso de una microjeringa Gimont (EE.UU.) permitió controlar el volumen de la gota depositada entre 2 y 4 μL . Las medidas se realizaron a 25.0 ± 0.5 °C, utilizando una cámara

termostática. La captura de las imágenes de las gotas de los líquidos depositados sobre la superficie de los materiales se realizó utilizando una cámara digital que tiene un dispositivo de carga acoplada ("charge-coupled device", CCD) y un sistema de análisis digital de imágenes.

- 5 Los ángulos de contacto de los líquidos seleccionados se determinaron sobre finas capas de los tres tipos de nanopartículas depositadas sobre unos portaobjetos de microscopio (placa de vidrio). Estas superficies lisas se obtuvieron tras la adicción de manera uniforme de una suspensión acuosa de cada tipo de nanomaterial ($\approx 10 \%$, p/v) sobre la superficie limpia y seca de una placa de vidrio. En la preparación de la
- 10 muestra comprobamos que con la adición de 10 mL de suspensión acuosa de nanopartículas se obtenía una capa de material suficientemente gruesa. La desecación de los portaobjetos con cada una de las muestras se realizó a 35.0 ± 0.5 °C, utilizando un horno de desecación durante 24 horas. De esta manera, se obtuvo una capa de material muy uniforme a nivel macroscópico, la cual permitió que la
- 15 medida de los ángulos de contacto se realizara en gotas muy estables.

En la figura 13, se recogen los valores promedio de los ángulos de contacto obtenidos tras realizar 16 determinaciones midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de importantes diferencias entre los núcleos de óxido de hierro y las nanopartículas magnéticas

20 compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$.

Para aportar una información física veraz sobre la termodinámica de los tres tipos de superficies fue necesaria la evaluación de las componentes γ_s . Los datos representados en la figura 14 confirman en gran medida nuestras estimaciones sobre la eficacia del recubrimiento de los núcleos magnéticos basadas en las propiedades

25 electrocinéticas anteriormente analizadas. En particular, para cualquier componente de la energía libre superficial considerado, sus valores para las partículas magnéticas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ coinciden casi totalmente con los correspondientes al polímero puro. Además, a pesar de que la componente Lifshitz-van der Waals (γ_s^{LW}) fue la menos afectada por el tratamiento superficial, su valor para las nanopartículas

30 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ fue casi el mismo que para el polímero. A pesar de que la componente electrón-aceptor (γ_s^+) era muy pequeña para los tres tipos de materiales, su magnitud para las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ fue virtualmente cero e idéntico al correspondiente a la PCL, adquiriendo valores finitos para la magnetita. La contribución electrón-

donante (γ_s^-) mostró una diferencia mucho más notable entre los núcleos de óxido de hierro y las partículas magnéticas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$. El elevado valor de esta última componente en el caso de la magnetita confirma su carácter monopolar electrón-donante.

- 5 Los resultados mostraron que el recubrimiento de los núcleos magnéticos fue completo bajo las condiciones óptimas de la síntesis.

Las interacciones implicadas en la determinación de la energía libre superficial de los nanomateriales se manifiestan en fenómenos como la agregación de las nanopartículas en suspensión o su adhesión a diferentes sustratos.

- 10 La idea que subyace en nuestro estudio es que las metodologías empleadas, junto con su base teórica, permiten: *i)* especificar completamente la componente LW de la energía de interacción entre las partículas dispersas (contemplada, junto con la repulsión electrostática entre dobles capas eléctricas, en la teoría clásica DLVO); y *ii)* cuantificar igualmente las contribuciones no-DVLO a la energía total del sistema, las
15 cuáles se relacionan con la componente AB de la teoría superficial tanto del sólido en suspensión como del líquido.

Consideramos aquí la importancia de los términos LW y AB de la energía de interacción entre los materiales descritos (*fase 1*) en un medio acuoso (*fase 2*):

$$\Delta G_{121} = \Delta G_{121}^{LW} + \Delta G_{121}^{AB} \quad (2)$$

- 20 Los valores obtenidos de ΔG_{121}^{LW} y ΔG_{121}^{AB} se muestran en la tabla 4, donde puede apreciarse que para la magnetita, el intercambio energético debido a la componente LW es bastante menor que el asociado a la componente AB , siendo además negativo. Por tanto, la variación de la energía libre de interacción total es debida, principalmente, a la componente AB [Plaza y cols., 1998]. El hecho de que sea positiva la contribución
25 AB en la magnetita, indica que su naturaleza fuertemente monopolar provoca una significativa repulsión entre las nanopartículas. La interacción LW debida a la contribución apolar, siempre atractiva en estos casos, es mucho menos intensa, provocando por ello un valor neto positivo para ΔG_{121} . Por el contrario, tanto las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ como el polímero tienen valores negativos de
30 ΔG_{121} (atracción hidrófoba), que se añaden a la atracción de van der Waals.

Sólido	ΔG_{121}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{121}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{121} (mJ/m ²)
Fe ₃ O ₄	-2.9 ± 0.4	14.9 ± 2.1	12.1 ± 1.5
PCL	-7.1 ± 1.3	-1.3 ± 0.4	-8.3 ± 2.1
Fe ₃ O ₄ /PCL	-6.5 ± 1.1	-0.7 ± 0.2	-7.2 ± 1.5

5 **Tabla 4. Energía libre de interacción entre las partículas y sus componentes *AB* y *LW* en medio acuoso.**

Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en el carácter hidrófobo/hidrófilo de los diferentes nanomateriales estudiados. Podemos utilizar el siguiente criterio para determinar cuándo un material puede considerarse hidrófilo o

- 10 hidrófobo [van Oss, 2006]: Si ΔG_{121} resulta ser negativo, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las nanopartículas, y se consideran hidrófobas. Por el contrario, la hidrofilia se corresponde con valores positivos de ΔG_{121} .

La figura 15 muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de nanomateriales. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde al ser
15 recubierta por el polímero hidrófobo, lo que puede considerarse como un indicio muy claro de que dicho recubrimiento es eficaz.

Ejemplo 2: Evaluación de la capacidad de vehiculización de fármacos

Evaluamos la vehiculización de dos fármacos antitumorales (doxorrubicina y 5-fluorouracilo) y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE, diclofenaco sódico)
20 en las nanopartículas compuestas. Se siguieron dos metodologías para la incorporación de estos principios activos. En concreto, la adsorción superficial tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de principio activo (método de adsorción), y la adición en el momento en el que se generaban las nanopartículas, de forma que quedaba atrapado el principio activo principalmente en la
25 matriz de éstas (método de absorción). Utilizamos la técnica de espectrofotometría UV-Vis como metodología de cuantificación de la cantidad de fármaco incorporada en las nanopartículas. Los experimentos se repitieron por triplicado para cada una de las concentraciones molares de fármaco.

La cantidad de fármaco incorporado se expresó en términos de eficacia de
30 atrapamiento (*entrapment efficiency, EE*) (%) [(fármaco vehiculizado (mg) / cantidad

total de fármaco utilizado (mg)) x 100] y de carga de fármaco (*drug loading, DL*) (%) [(fármaco vehiculizado (mg) / masa total utilizada de nanopartículas (mg)) x 100].

La determinación de la adsorción superficial de fármaco sobre las nanopartículas de compuestas Fe₃O₄/PCL se realizó partiendo de una serie de disoluciones acuosas (10 mL) con diferente concentración molar de principio activo (10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ y 10⁻²), salvo en el caso de la doxorrubicina donde la concentración máxima utilizada fue de 10⁻³ M. En todos estos medios de dispersión se fijó una concentración de nanopartículas del 1 % (p/v). Tras 24 horas de contacto de las nanopartículas con el fármaco a 25 °C ± 0.1 °C y bajo agitación mecánica (50 rpm), se obtuvieron los sobrenadantes mediante doble centrifugación a 11000 rpm durante 40 minutos y la cantidad de fármaco vehiculizada se evaluó mediante espectrofotometría UV-Vis. La tabla 5 recoge la cantidad vehiculizada en las nanopartículas de cada uno de los principios activos en función de la concentración de éstos fijada en la solución acuosa. Puede apreciarse cómo la concentración utilizada de fármaco influye positivamente en la vehiculización.

Doxorrubicina (M)	EE (%)	DL (%)
10 ⁻⁵	8.93 ± 0.37	0.05 ± 0.01
10 ⁻⁴	22.62 ± 0.21	0.13 ± 0.02
10 ⁻³	29.36 ± 0.41	1.62 ± 0.11
5-fluorouracilo (M)	EE (%)	DL (%)
10 ⁻⁵	6.421 ± 0.348	0.004 ± 0.001
10 ⁻⁴	10.496 ± 0.216	0.012 ± 0.004
10 ⁻³	12.422 ± 0.118	0.016 ± 0.003
10 ⁻²	18.151 ± 0.119	0.024 ± 0.003
Diclofenaco sódico (M)	EE (%)	DL (%)
10 ⁻⁵	3.967 ± 0.047	0.008 ± 0.002
10 ⁻⁴	5.989 ± 0.108	0.014 ± 0.005
10 ⁻³	7.729 ± 0.281	0.024 ± 0.008
10 ⁻²	11.473 ± 0.326	0.032 ± 0.011

Tabla 5. Eficacia de atrapamiento (%) y carga del fármaco de los fármacos en la superficie de las nanopartículas de Fe₃O₄/PCL, en función de la concentración de fármaco.

Una vez caracterizada la escasa incorporación de los tres fármacos en la superficie de las nanopartículas compuestas Fe₃O₄/PCL, estudiamos la contribución del método de vectorización de fármacos en sistemas transportadores: la incorporación del principio activo en el momento en que se produce la formación de las nanopartículas. Para ello, analizamos el efecto del principal factor condicionante de la captación de principio activo en la matriz de las nanopartículas: la propia concentración de fármaco. De esta

manera, definimos las condiciones de vehiculización óptimas de estos principios activos en las nanopartículas compuestas magnéticas.

El análisis de la influencia de la concentración de estos principios activos sobre su incorporación en la matriz de las nanopartículas fue realizado siguiendo la rutina de síntesis y el procedimiento espectrofotométrico UV-Vis ya señalados. Las concentraciones molares utilizadas en el caso de la doxorrubicina fueron: 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} . Sin embargo, en el caso del 5-fluorouracilo y del diclofenaco sódico, además de las concentraciones citadas, también se utilizó una concentración 10^{-2} M. Los experimentos se repitieron por triplicado para cada una de las concentraciones molares de fármaco.

La tabla 6 recoge la cantidad vehiculizada en las nanopartículas de cada uno de los principios activos en función de la concentración de éstos fijada en la solución acuosa. Como puede apreciarse, la absorción de estos fármacos en la matriz de las nanopartículas aumenta con la concentración de éstos presente en el medio de síntesis. Los valores obtenidos de incorporación de cada uno de estos fármacos son superiores a los correspondientes mediante el procedimiento de adsorción superficial (a iguales concentraciones de principio activo), lo que justifica la selección del método de vehiculización mediante absorción en matriz como el más adecuado para la síntesis de las partículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ cargadas con estos fármacos.

Doxorrubicina (M)	EE (%)	DL (%)
10^{-5}	9.24 ± 0.83	0.07 ± 0.01
10^{-4}	56.12 ± 1.08	0.52 ± 0.06
10^{-3}	62.34 ± 1.26	0.57 ± 0.08
5-fluorouracilo (M)	EE (%)	DL (%)
10^{-5}	6.29 ± 0.88	0.12 ± 0.03
10^{-4}	32.94 ± 1.74	0.61 ± 0.06
10^{-3}	43.13 ± 1.52	0.83 ± 0.09
10^{-2}	49.52 ± 1.86	0.95 ± 0.11
Diclofenaco sódico (M)	EE (%)	DL (%)
10^{-5}	33.18 ± 1.24	1.91 ± 0.53
10^{-4}	36.52 ± 1.71	2.11 ± 0.48
10^{-3}	40.26 ± 2.08	2.32 ± 0.62
10^{-2}	48.13 ± 2.79	2.77 ± 0.62

Tabla 6. Eficacia de atrapamiento (%) y carga del fármaco de los fármacos en la matriz de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$, en función de la concentración de fármaco.

Las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ formuladas bajo las condiciones óptimas de vehiculización de cada uno de los tres fármacos se utilizaron en los ensayos *in vitro* de liberación. Tales condiciones fueron: adsorción superficial 10^{-3} M de doxorrubicina, y, 10^{-2} M para 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico. Concentraciones similares se utilizaron en el caso de la absorción en matriz, procedimiento con el que se obtiene una mayor vehiculización de fármaco (tablas 5 y 6). El ensayo de liberación *in vitro* de cada uno de los fármacos desde las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ se realizó por triplicado a 37.0 ± 0.5 °C. Para ello, se utilizó el método de diálisis y un tampón NaOH- KH_2PO_4 ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$) como medio de liberación. Las bolsas de diálisis se dejaron sumergidas en agua bidestilada durante 12 horas antes de comenzar el ensayo. La bolsa de diálisis utilizada (Spectrum® Spectra/Por® 6, EE.UU.) se caracteriza por un tamaño de poro de 2000 Da, que permite retener las nanopartículas en su interior, dejando sólo el fármaco liberado hasta el medio de liberación.

Las muestras del medio de liberación (1 mL) se recogieron según el siguiente intervalo de tiempos: 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 12 horas, y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 días. Las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría UV-Vis a las longitudes de onda de máxima absorbancia de cada uno de los principios activos (doxorrubicina: 481 nm, 5-fluorouracilo: 266 nm, y diclofenaco sódico: 276 nm). Un volumen igual de la solución tampón, mantenido a la misma temperatura, fue añadido al medio de liberación tras cada toma de muestra con el objetivo de mantener las condiciones *sink*.

En el caso del antitumoral doxorrubicina (figura 16), cuando se incorporaba esta molécula exclusivamente en la superficie de las nanopartículas mediante adsorción, la liberación de la dosis vehiculizada ocurría en sólo 4 horas. Por el contrario, si la incorporación de doxorrubicina se realizaba mediante el método de absorción en matriz, el 17 % de la dosis vehiculizada se liberaba durante la primera hora, mientras que el 83 % restante lo hacía mucho más progresivamente durante 11 días.

En cuanto al agente antineoplásico 5-fluorouracilo (figura 17), si era incorporado en la superficie de las nanopartículas mediante adsorción, su liberación ocurría en tan sólo 3 horas. Por el contrario, si la incorporación del fármaco se realizaba mediante el método de absorción en matriz, el 30 % de la dosis vehiculizada se liberaba durante la primera hora y el 70 % restante se liberaba en un total de 10 días.

Finalmente en referencia al AINE diclofenaco sódico (figura 18), cuando se incorporaba esta molécula exclusivamente en la superficie de las nanopartículas mediante adsorción, la liberación de la dosis vehiculizada ocurría en sólo 2 horas. Por el contrario, si la incorporación se realizaba mediante el método de absorción en matriz, el 33 % de la dosis vehiculizada se liberaba durante la primera hora y el 67 % restante se liberaba en un total de 7 días.

En el caso de los 3 fármacos, el proceso de liberación fue claramente bifásico cuando la dosis de principio activo se incorporaba en las nanopartículas compuestas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ mediante el procedimiento de absorción en matriz. En estos casos, la liberación constaba de una fase rápida que significaba la pérdida del principio activo asociado a la superficie o débilmente atrapado (adsorbido en los poros superficiales). La liberación de fármaco más sostenida en el tiempo que se producía durante la segunda fase, fue debido a un proceso de difusión del fármaco a través de la matriz polimérica.

Estos resultados demuestran la gran capacidad de las nanopartículas magnéticas de la presente invención para el transporte de una amplia variedad de fármacos y, por lo tanto, su versatilidad como sistema magnético transportador de principios activos.

Ejemplo 3: capacidad hipotérmica de las nanopartículas de la presente invención

La capacidad de generar calor de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ bajo la acción de un gradiente electromagnético alterno fue ensayada *in vitro* a 25.0 ± 0.5 °C, por triplicado. Para ello, se prepararon 5 mL de una suspensión acuosa de estas nanopartículas (10 mg/mL). La frecuencia y la intensidad del gradiente magnético utilizado fueron 250 kHz y 4 kA/m, respectivamente.

La figura 19 muestra el calentamiento *in vitro* de la suspensión acuosa de nanopartículas en función del tiempo. Bajo la exposición a un gradiente electromagnético alterno de alta frecuencia, la oscilación de los momentos magnéticos de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCL}$ provocó que éstas generaran calor, alcanzándose la temperatura mínima de hipertermia (≈ 41 °C) tras 25 minutos. La suspensión alcanzó una temperatura máxima de 45 °C tras 35 minutos. Como puede apreciarse en la figura, esta temperatura fue mantenida de forma estable durante toda la duración del experimento. Esta circunstancia fue especialmente interesante, ya que numerosas investigaciones han puesto de manifiesto que el calentamiento a esta temperatura de

una masa de células tumorales durante unos 30 minutos, provoca daños irreversibles en éstas e induce su muerte [Huber, 2005]. Además, la estabilización de la temperatura a 45 °C, demostró el buen control sobre la temperatura y el flujo de calor que ofrecían las nanopartículas, un requisito básico para su aplicación en hipertermia.

- 5 Esto es especialmente importante si tenemos en cuenta que si la temperatura siguiera creciendo sin control (> 48 °C), los tejidos sanos que rodean la masa tumoral se quemarían y morirían.

- Los resultados de los ejemplos descritos en la presente invención confirmaron que las nanopartículas compuestas magnetita/poli(ϵ -caprolactona) constituyeron una
- 10 nanoplataforma ideal para el transporte de fármacos hasta el lugar de acción, proceso facilitado enormemente por su óptima capacidad de respuesta a gradientes magnéticos aplicados. Su versatilidad en el transporte de moléculas activas supuso una mejora de la terapia antitumoral y del tratamiento de enfermedades inflamatorias de diverso origen. Finalmente, y en el caso del cáncer, su capacidad para la
- 15 hipertermia, permite la terapia combinada (quimioterapia optimizada + hipertermia) mucho más eficaz contra el tumor.

- Los resultados además demostraron que la técnica de formulación desarrollada en la presente invención simplificó considerablemente otras metodologías propuestas previamente [Hamoudeh y Fessi, 2006; Yang y cols., 2006; Gang y cols., 2007]. Ya
- 20 que como muestra el ejemplo 1 se evita un paso intermedio que conduce a la obtención de partículas de magnetita hidrófoba, la cuál complica las etapas siguientes del proceso (muy difícil manipulación de estas partículas hidrófobas por extremada tendencia a formar agregados) y encarece la obtención de la nanoformulación final.

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula mixta de liberación prolongada de principios activos caracterizada porque la nanopartícula tiene un diámetro medio de entre 74-98 nm y comprende un núcleo de óxido de hierro, un recubrimiento biodegradable de poli (ϵ -caprolactona) y al menos un principio activo.
5
2. Nanopartícula mixta según la reivindicación 1, caracterizada porque tiene un diámetro medio de 86 nm.
3. Nanopartícula mixta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el núcleo de óxido de hierro tiene un diámetro medio de entre 10-14 nm
10
4. Nanopartícula mixta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el principio activo es un AINE.
5. Nanopartícula mixta según la reivindicación 4, donde el AINE es diclofenaco sódico.
6. Nanopartícula mixta según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el principio activo es un antitumoral.
15
7. Nanopartícula mixta según la reivindicación 6 donde el antitumoral es seleccionado de entre la doxorrubicina o 5'-fluorouracilo.
8. Nanopartícula mixta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como medicamento.
9. Nanopartícula mixta según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para el tratamiento del cáncer.
20
10. Nanopartícula mixta según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación.
11. Método para la preparación de una nanopartícula mixta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
25
 - a) síntesis del núcleo de magnetita mediante co-precipitación en solución acuosa,

- b) disposición interfacial de la poli (ϵ -caprolactona) en diclorometano junto con la nanopartícula de magnetita del paso a) en solución acuosa,
 - c) purificación de la partícula obtenida en el paso b)
 - d) adición del principio activo
- 5 12. Método según la reivindicación 11, donde el paso d) de adición del fármaco se realiza mediante adsorción superficial sobre las nanopartículas obtenidas tras el paso c)
13. Método según la reivindicación 11, donde el paso d) de adición del fármaco se realiza mediante absorción en la matriz de las nanopartículas en el paso b)
- 10 14. Composición farmacéutica que comprende una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14 para su uso como medicamento.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 14 para el tratamiento del
- 15 cáncer.
17. Composición farmacéutica según la reivindicación 14 para el tratamiento de los procesos inflamatorios.
18. Uso de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica según reivindicación 14 para la fabricación de un
- 20 medicamento.
19. Uso de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica según reivindicación 14 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.
20. Uso de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la
- 25 composición farmacéutica según reivindicación 14 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de los procesos inflamatorios.
21. Uso de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica según reivindicación 14 para la fabricación de un medicamento que se aplica en terapias realizadas mediante hipertermia
- 30 electromagnética.

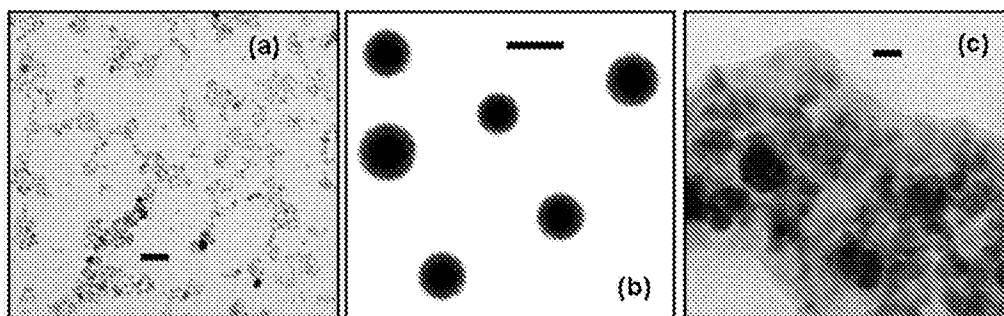


Figura 1

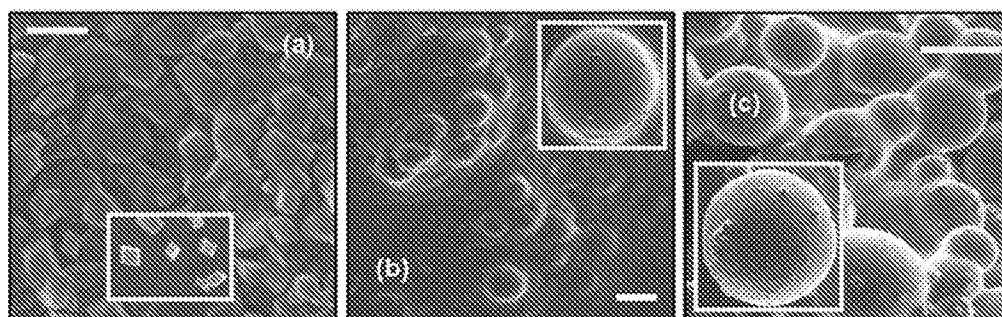


Figura 2

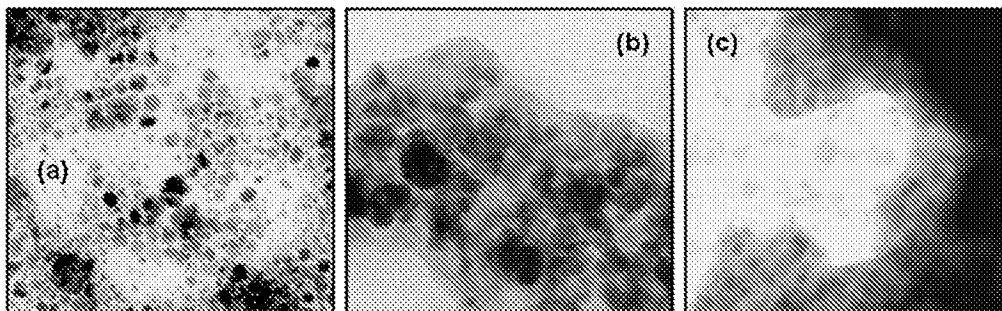


Figura 3

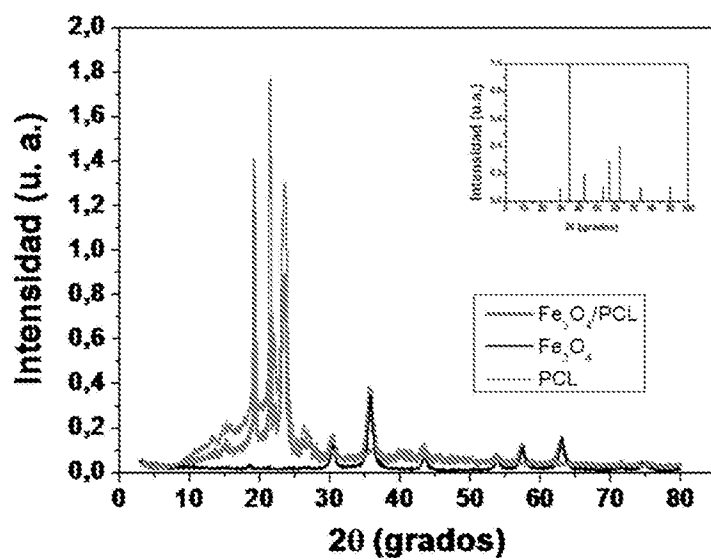


Figura 4

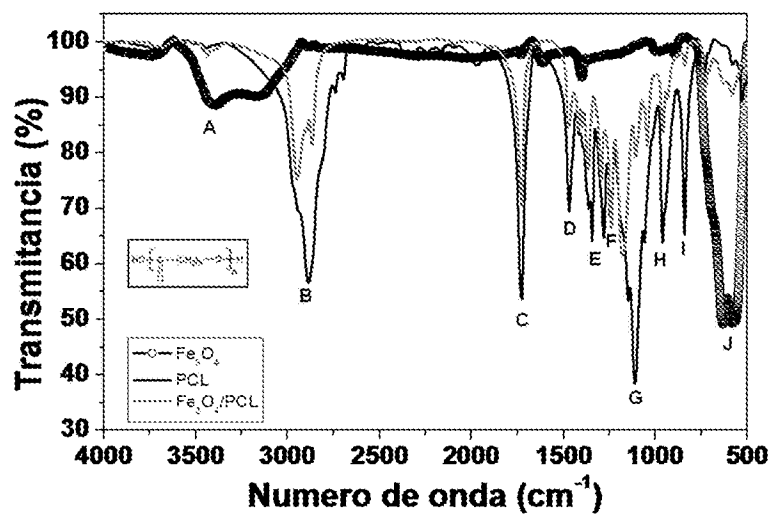


Figura 5

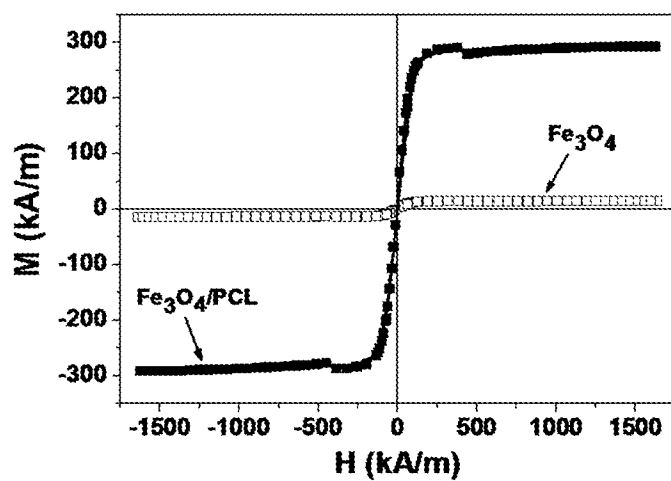


Figura 6

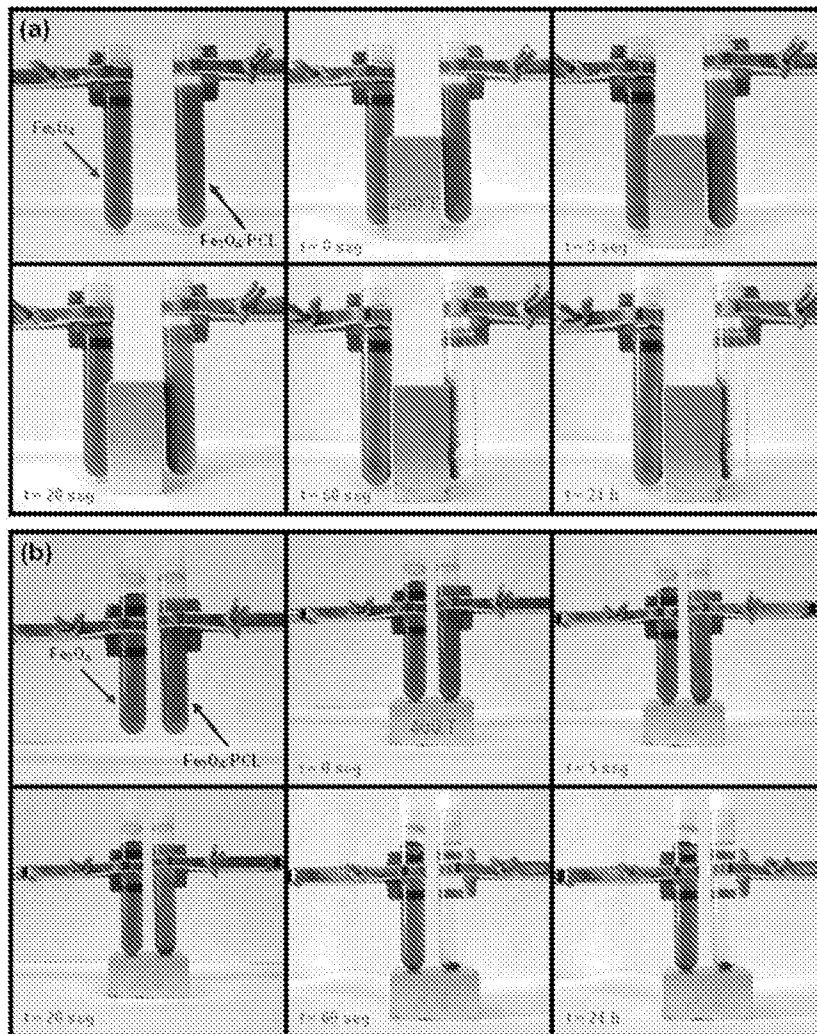


Figura 7

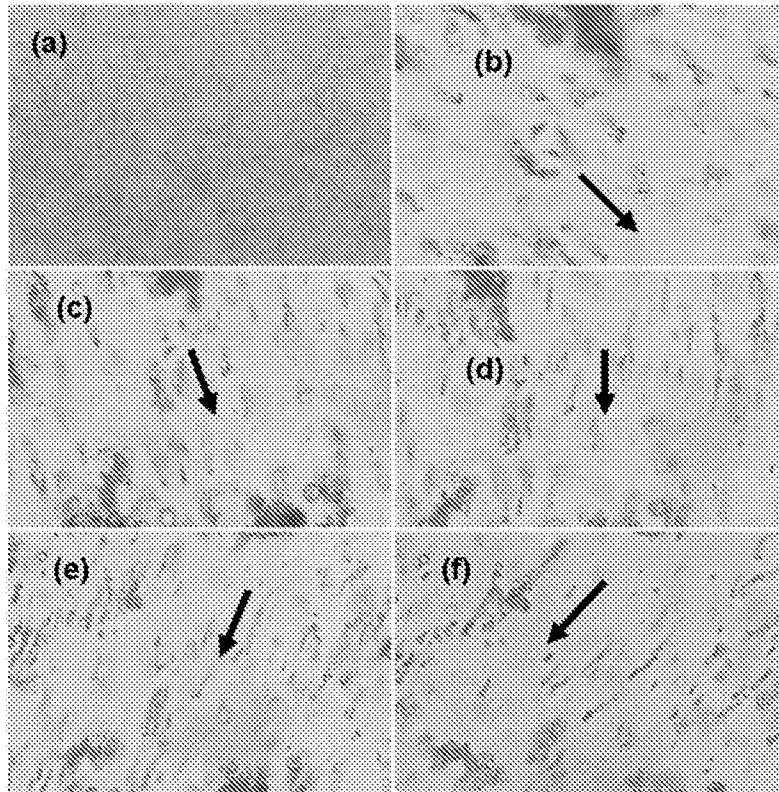


Figura 8

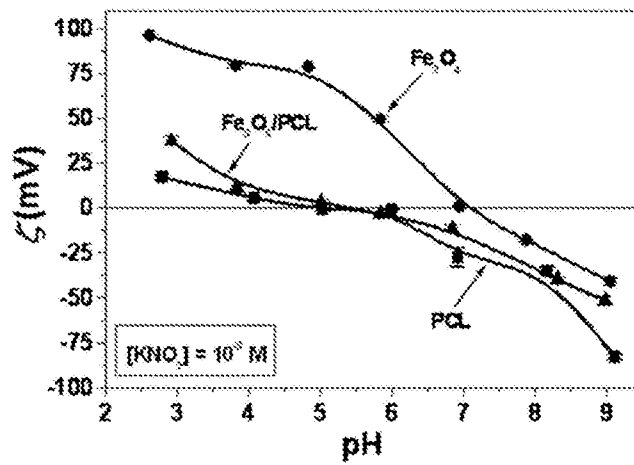


Figura 9

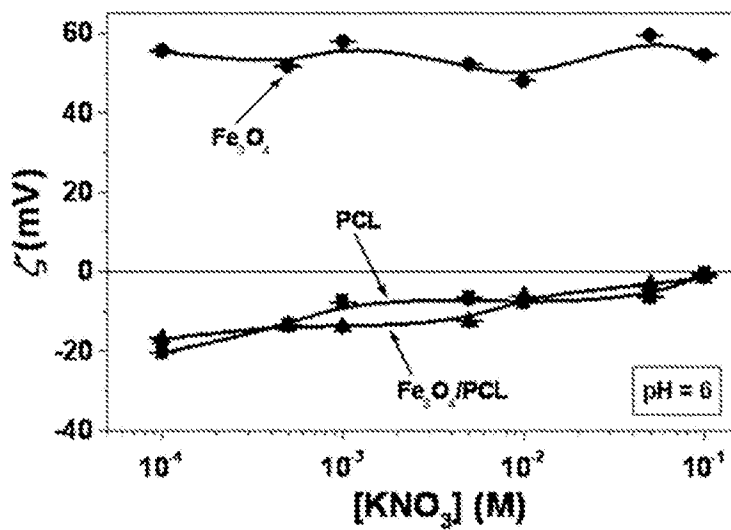


Figura 10

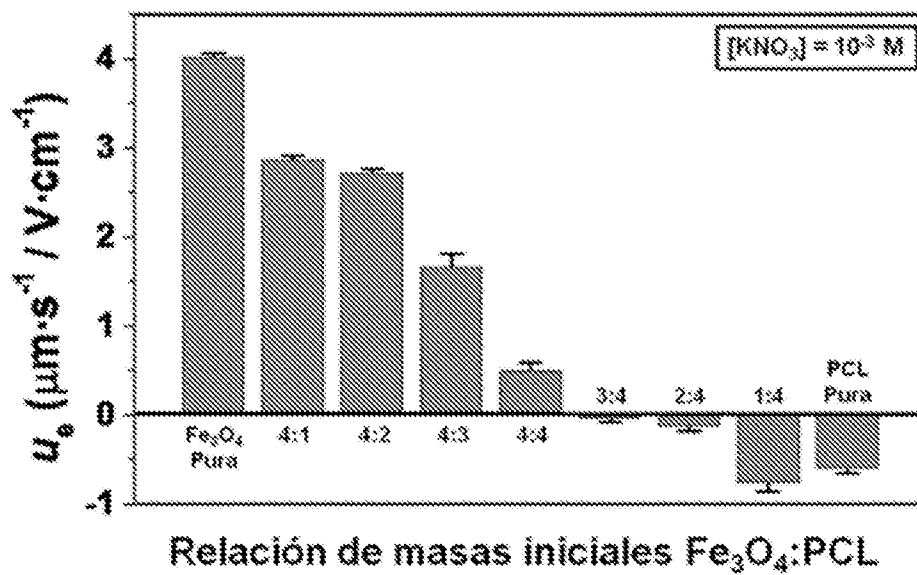


Figura 11

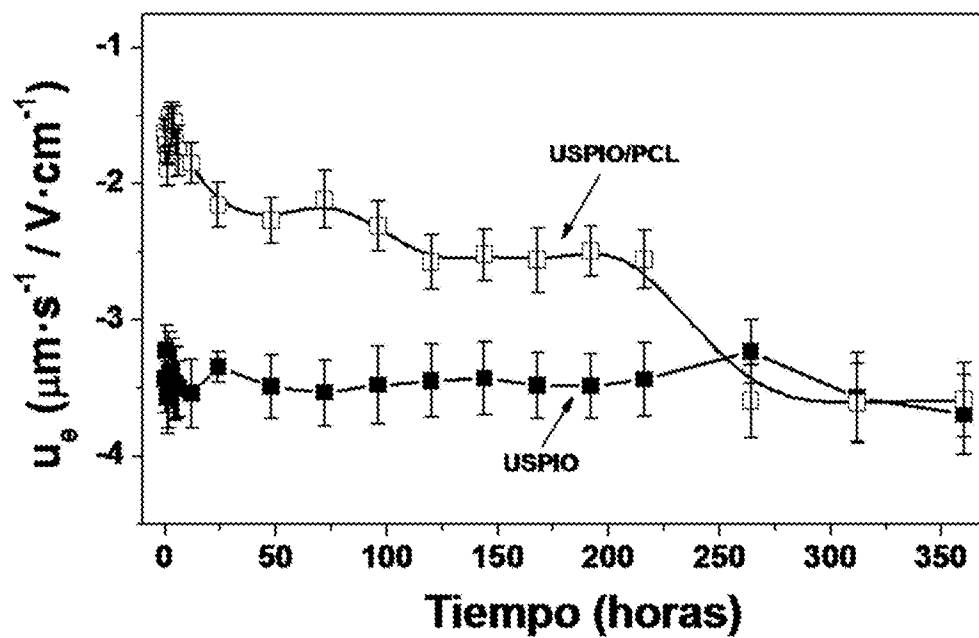


Figura 12

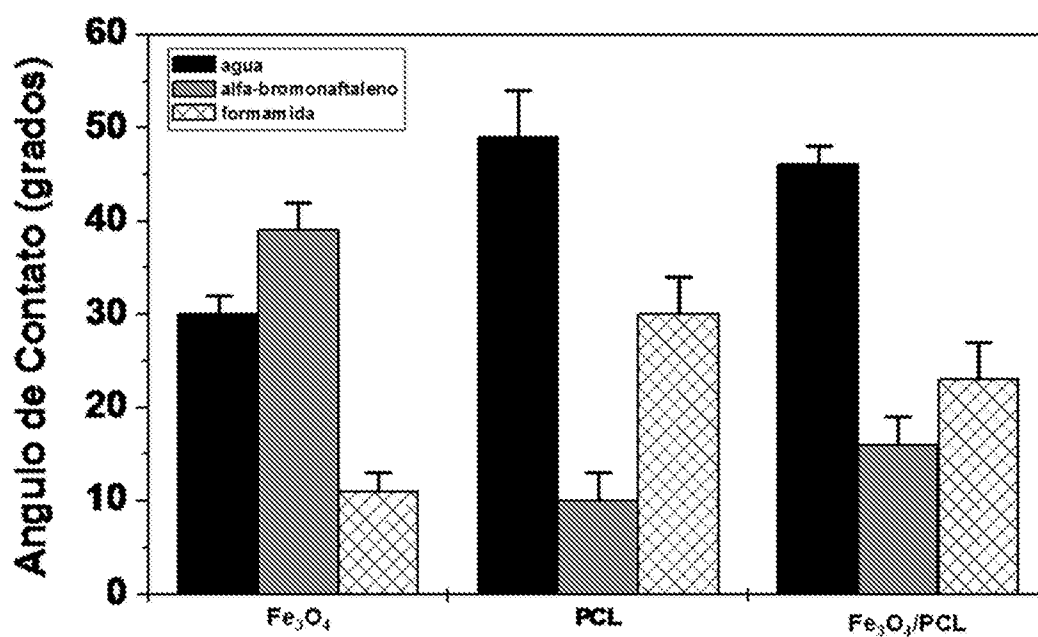


Figura 13

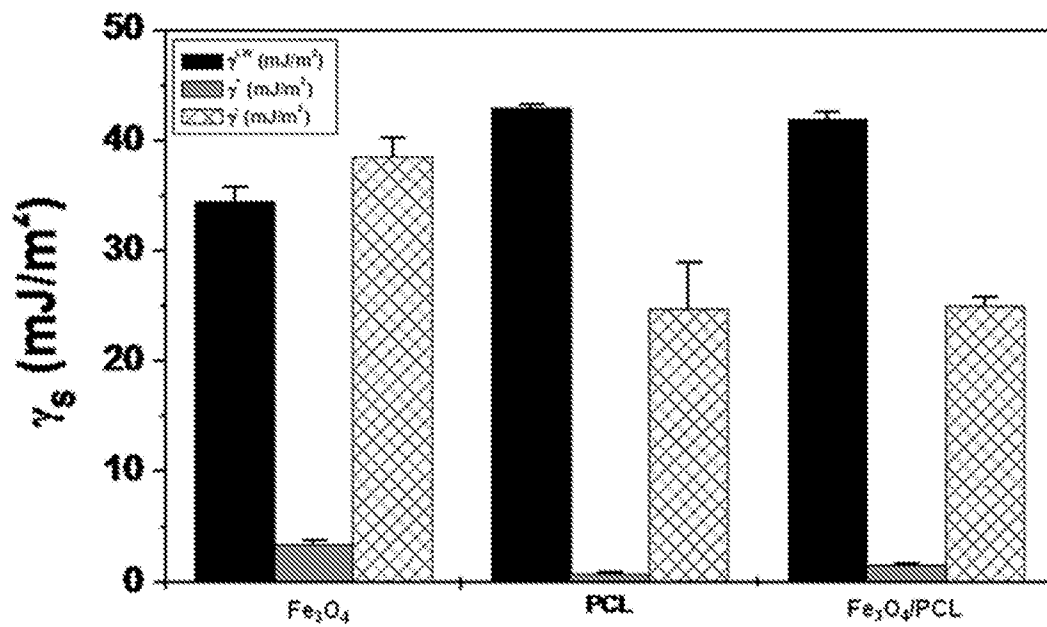


Figura 14

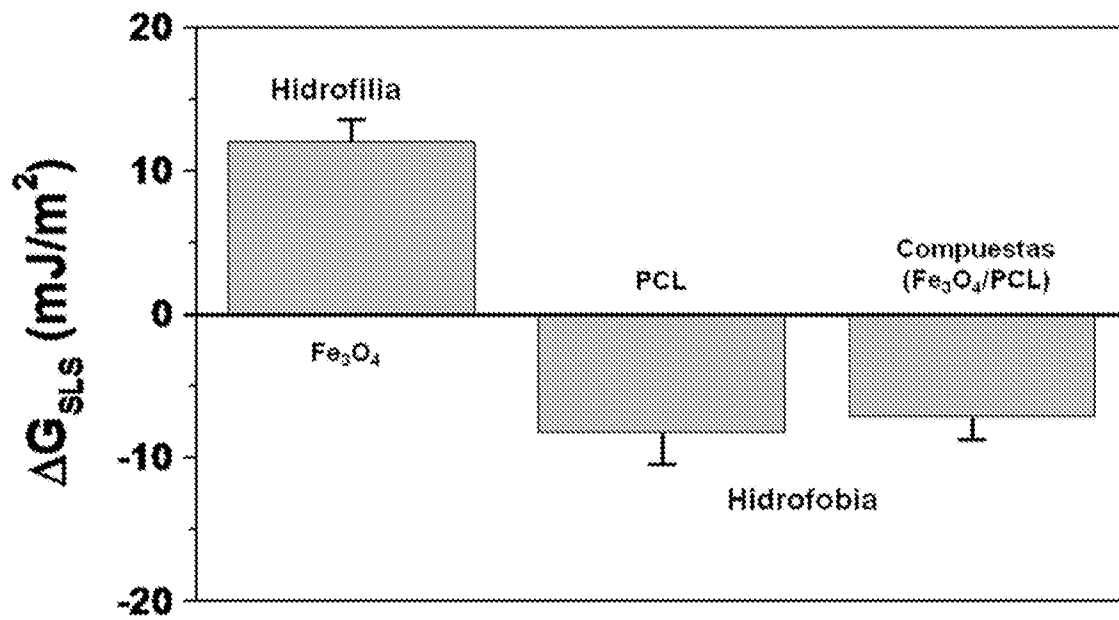


Figura 15

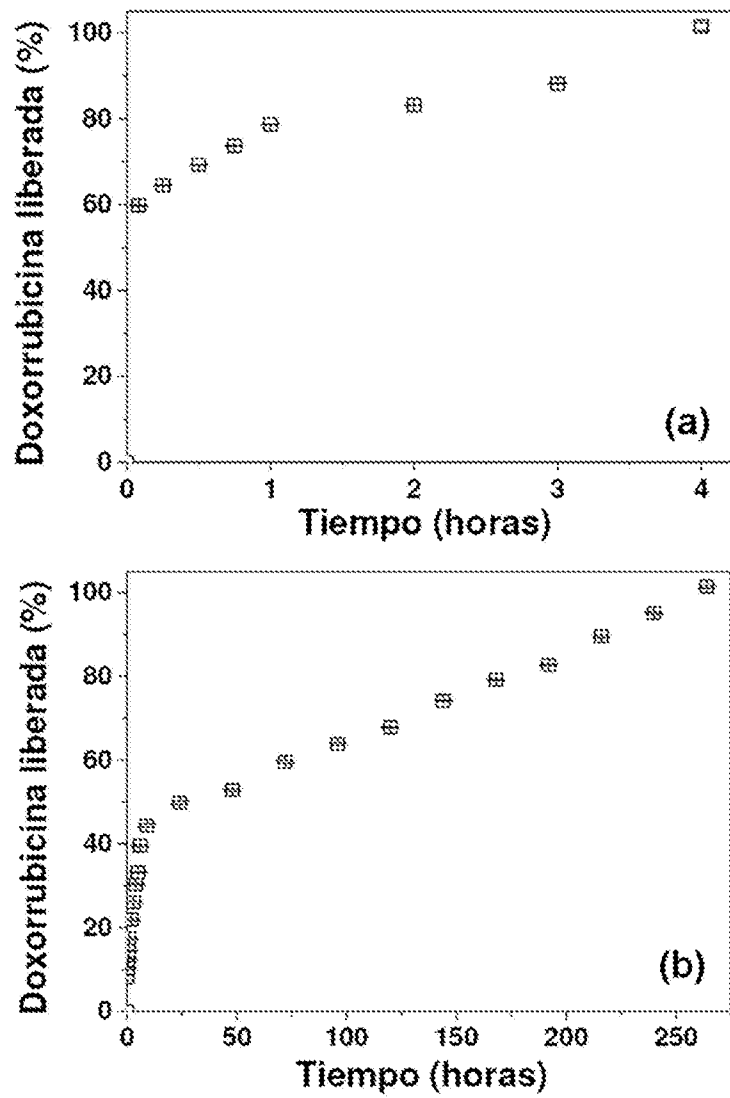


Figura 16

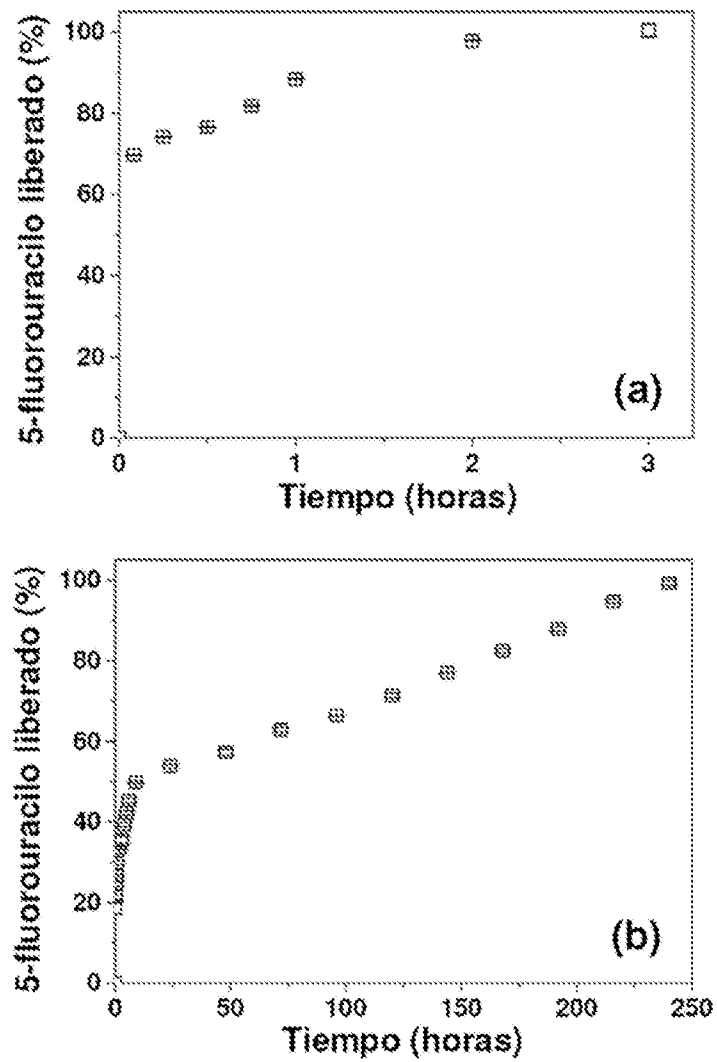


Figura 17

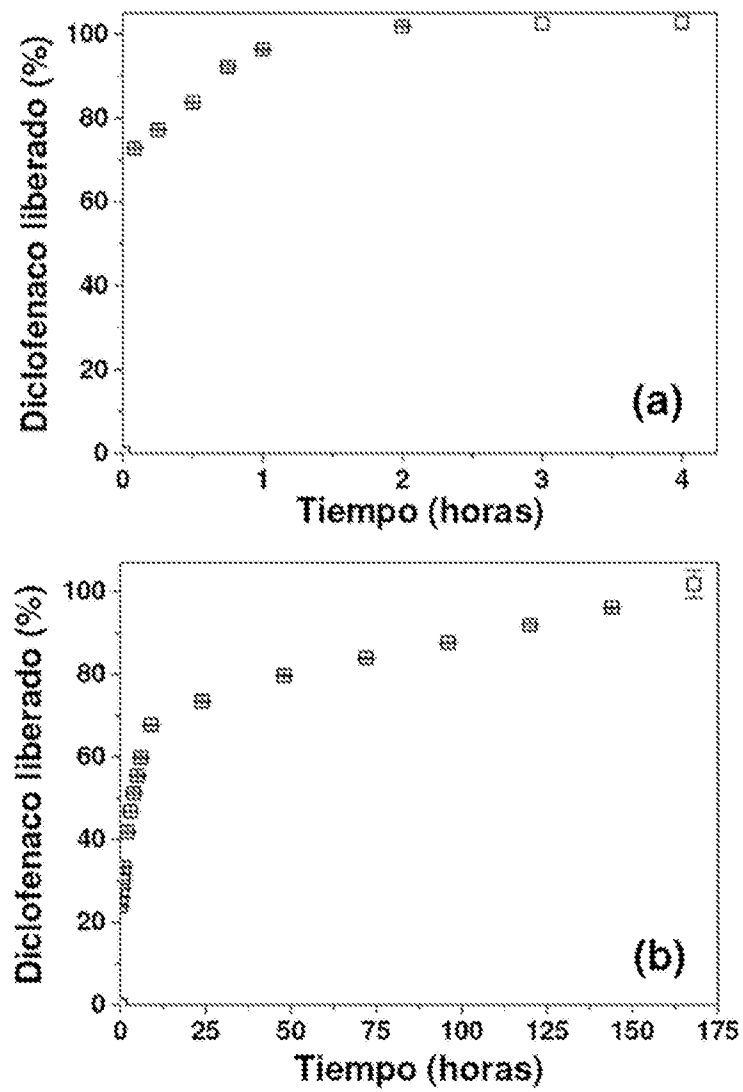


Figura 18

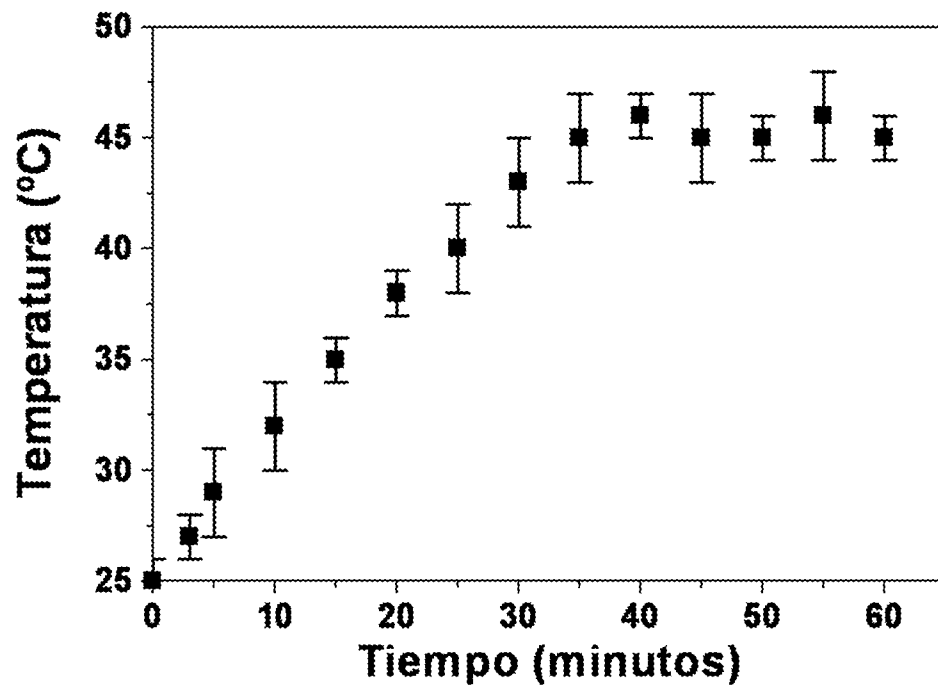


Figura 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070799

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B82Y5/00 (2011.01)

A61K9/51 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B82Y, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Gang J. et al. Magnetic poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing Fe_3O_4 and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model. Journal of Drug Targeting. 07.2007, Vol. 15, N° 6, pages 445-453 (the whole document)	1-21
X	Hamoudeh M. et al. Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. Journal of Colloid and Interface Science. 06.06.2006, Vol. 300, pages 584-590 (the whole document)	1-21
X	Yang J. et al. Preparation of poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. International Journal of Pharmaceutics. 23.06.2006, Vol. 324, pages 185-190 (the whole document)	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31/01/2013

Date of mailing of the international search report
(06/02/2013)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Cumbreño Galindo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3496880

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070799

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/096190 A1 (YONSEI UNIVERSITY) 11.11.2004, (the whole document)	1-21
A	Sinha V. R. et al. Poly ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. International Journal of Pharmaceutics. 27.04.2004, Vol. 278, pages 1-23 (the whole document)	1-21
A	Arias J. L. et al. Formulation and physicochemical characterization of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with fitorafur and diclofenac sodium. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 26.08.2009, Vol.75, pages 204-208 (the whole document)	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070799

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2004096190 A1	11.11.2004	KR20040092969 A KR100612734B B1	04.11.2004 18.08.2006
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070799

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

B82Y5/00 (2011.01)

A61K9/51 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

B82Y, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, WPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	Gang J. et al. Magnetic poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing Fe_3O_4 and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model. Journal of Drug Targeting. 07.2007, Vol. 15, Nº 6, páginas 445-453 (todo el documento)	1-21
X	Hamoudeh M. et al. Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. Journal of Colloid and Interface Science. 06.06.2006, Vol. 300, páginas 584-590 (todo el documento)	1-21
X	Yang J. et al. Preparation of poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. International Journal of Pharmaceutics. 23.06.2006, Vol. 324, páginas 185-190 (todo el documento)	1-21

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
31/01/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
06 de febrero de 2013 (06/02/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Cumbreño Galindo
Nº de teléfono 91 3496880

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070799

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 2004/096190 A1 (YONSEI UNIVERSITY) 11.11.2004, (todo el documento)	1-21
A	Sinha V. R. et al. Poly ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. International Journal of Pharmaceutics. 27.04.2004, Vol. 278, páginas 1-23 (todo el documento)	1-21
A	Arias J. L. et al. Formulation and physicochemical characterization of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with flutamide and diclofenac sodium. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 26.08.2009, Vol. 75, Páginas 204-208 (todo el documento)	1-21

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070799

Informaciónes relativas a los miembros de familias de patentes			
Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2004096190 A1	11.11.2004	KR20040092969 A	04.11.2004
-----	-----	KR100612734B B1	18.08.2006
-----	-----	-----	-----