

Capítulo 7

NANOTECNOLOGÍA EN APLICACIONES FARMACÉUTICAS

Sonia Koteich Khatib^{1*}, Edith Goncálves² y Johnny Bullón³

¹Laboratorio de Productos Naturales y Resonancia Magnética Nuclear
Departamento de Química. Facultad de Ciencias
Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

²Departamento de Toxicología y Farmacología, Cátedra de Farmacología
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

³Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos (FIRP)
Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería
Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

CONTENIDO

7.1. Introducción	185
7.2. Formulaciones de sistemas nanodispersos	187
7.3. Productos nanotecnológicos aprobados	191
7.3.1. <i>Aplicaciones de los liposomas</i>	
7.3.2. <i>Aplicaciones de las micelas poliméricas.</i>	
7.3.3. <i>Aplicaciones de las nanopartículas.</i>	
7.3.4. <i>Aplicaciones de dendrímeros</i>	
7.4. Caracterización de las nanopartículas	196
7.4.1. <i>Tamaño de las nanopartículas</i>	
7.4.2. <i>Morfología</i>	
7.4.3. <i>Estructuras</i>	
7.4.4. <i>Propiedades de las superficies</i>	
7.5. Forma de liberación del fármaco	198
Referencias	199

*sonia@ula.ve

7.1. Introducción

La detección temprana y/o el diagnóstico precoz son, y han sido, las metas primordiales en el adecuado tratamiento de las enfermedades, para lo cual, la medicina y la tecnología farmacéutica se han valido de un sinnúmero de herramientas con la necesidad, cada vez más creciente, de encontrar medicamentos más precisos, efectivos, rápidos, pero sobre todo menos tóxicos. Por otro lado, la humanidad está pasando por un momento histórico en el desarrollo de la ciencia. En los últimos años, se ha producido un enorme crecimiento de la nanotecnología y recientemente comienza su aplicación en las ciencias de la salud.

Desde que Feynman¹ en diciembre de 1959, en el Instituto Tecnológico de California (CalTech), impartiera su visionaria conferencia “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” (“Hay bastante espacio abajo”), introduciendo la posibilidad de una ingeniería a nivel atómico, hasta el día de hoy, se han recorrido diversos aspectos que nos hacen pensar que la nanotecnología, en este siglo XXI, está viviendo su mejor momento, cumpliendo las predicciones de Feynman de un control total de la nanoescala en diferentes ámbitos de nuestra vida diaria. Sin embargo, no fue sino hasta 1974 que Norio Taniguchi² de la Universidad de Tokio acuñara el término “Nanotecnología” para poder distinguir las investigaciones llevadas a cabo a nivel micro con la creciente escala nano que estaba desarrollándose, al crear objetos y/o dispositivos con una precisión de 1nm.

En 1981 Gerd Binnig y Heinrich Rohrer³ diseñaron el *Scanning Tunnel Microscope* (STM) el cual permite ver la imagen de los átomos, convirtiéndose en un hecho trascendental que influyó en el desarrollo de los fullerenos⁴, cuyas formas estables de carbono permiten crear nanotubos y nanoesferas, elementos fundamentales para la creación de estructuras más complejas. Este descubrimiento fue reconocido cuando Harry Kroto, Richard Smalley y Robert Curl recibieron el Premio Nobel de Química en 1996.

La aproximación *top-down* (de arriba hacia abajo, de lo grande a lo pequeño), fue establecida por Taniguchi, desarrollada sobre los conceptos de Feynman, donde se parte de grandes sistemas y, mediante técnicas de corte, pulido, entre otras, se llegan a obtener sistemas en escala nanométrica. No obstante, cuando en 1986 Eric Drexler, un alumno del MIT, propone construir objetos más grandes a partir de sus componentes atómicos y moleculares, revoluciona la nanotecnología introduciendo el término *bottom-up* (de abajo hacia arriba), para desarrollar los objetos a partir de un proceso de auto-ensamblado, afianzando así el término de Nanotecnología Molecular⁵. Aunque ambas concepciones coexisten, existe una mayor tendencia hacia la filosofía de ensamblar dispositivos a partir de sus componentes. El proceso *top-down* rige la física del estado sólido, donde estructuras semiconductoras se hacen más y más pequeñas. En tanto que, la formación de estructuras mayores, a partir de los átomos y las moléculas (*bottom-up*), es la tecnología empleada por los químicos y biólogos moleculares. Las estructuras biológicas, y sus mecanismos de funcionamiento, son ejemplos a seguir en el diseño de la tecnología *bottom-up*.

La nanomedicina⁶ ensambla materiales nanométricos para el transporte y liberación controlada de fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades. Requiere de los conocimientos de la física en estado sólido, química y ciencia de los materiales, biología molecular, bioquímica e ingeniería y formulación entre otros, lo que la convierte en una de las

tecnologías más prometedoras para un crecimiento sostenible. La administración de fármacos a través de la ingeniería a nanoescala precisa, permitirá el diseño y fabricación de productos que pueden ser entregados a nivel molecular alrededor o incluso dentro de una célula enferma. Sin embargo, la disminución del tamaño molecular, aumenta la superficie de contacto, y por tanto su reactividad, pudiendo generar daños o efectos colaterales que incluso no existían a escala normal⁷.

Luego de la década de los años 80 se han desarrollado nuevas estrategias y sistemas, que tienen por finalidad optimizar la liberación del principio activo, por medio de lo que se conoce como liberación controlada de medicamentos; posteriormente, ha aumentado la administración de fármacos a través de nuevas vías como la nasal, colónica, transdérmica, entre otros, y que actualmente sigue siendo objeto de estudio y perfeccionamiento.

Para hacer frente a este reto, la Tecnología Farmacéutica ha incursionado en el desarrollo de sistemas nanométricos, que contienen el principio activo incluido en un vehículo que lo transporta. Estos sistemas nanométricos permiten que el fármaco que llevan asociados pueda pasar a través de las diferentes barreras biológicas del organismo, lo cual no se podría realizar con los convencionales sistemas de liberación, ya que en éstos son, fundamentalmente, las propiedades fisicoquímicas las que condicionan su absorción y biodistribución⁸.

Siendo el objetivo de la Farmacia Galénica la resolución de un problema terapéutico, aplicando los conocimientos de la Biofarmacia, la Farmacocinética y la Tecnología Farmacéutica, es indudable que la Nanomedicina plantea una nueva orientación hacia los sistemas que se diseñan.

La Tecnología Farmacéutica clásica poco tiene que ver con los retos que plantea la Nanomedicina, es por ello que se ha introducido el término de Nanotecnología Farmacéutica. Ésta, como ciencia y tecnología de los sistemas nanoparticulares farmacéuticos, tiene una base científica fundamentada en los nuevos aspectos biofarmacéuticos, como son la fusión con la membrana celular, proteínas transportadoras de membrana, tráfico de los sistemas y moléculas a través del citosol, y el paso a través de la membrana nuclear.

A continuación, se presentan las formulaciones de sistemas nanodispersos, desde soluciones micelares hasta liposomas, los cuales pretenden vehicular principios activos de una manera más eficiente. Se desarrollarán los conceptos de formulación y algunas aplicaciones particulares, así como se mencionarán algunos productos registrados comercialmente. La figura 7.1 describe como se abordarán los conceptos de las nanoestructuras estudiadas en el presente capítulo. Se discutirán en orden de complejidad de sus formulaciones.

7.2 Formulaciones de sistemas nanodispersos

La *formulación* puede ser definida como el conjunto de conocimientos y operaciones empleados cuando se mezclan, asocian o condicionan ingredientes de origen natural o sintético, a menudo incompatibles entre sí, para obtener un producto comercial caracterizado por su función de uso y su aptitud para satisfacer las especificaciones pre-establecidas⁹. El desarrollo de estos conocimientos ha pasado por 3 etapas. Un período natural, donde se mezclaban ingredientes por ensayo y error. Una edad de oro basada en la química de síntesis y un último período que comenzó con la crisis petrolera de los años 70,

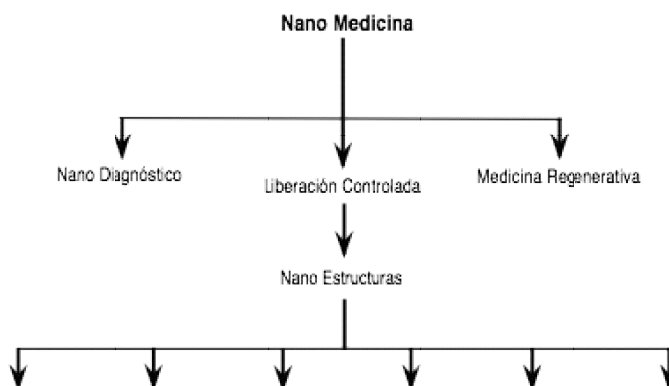


Fig. 7.1: Clasificación de las nanoestructuras aplicadas en la industria farmacéutica.

el cual se basa en la aplicación de los conocimientos generados en los últimos 40 años, con fórmulas más elaboradas científicamente, que atienden a una necesidad.

Actualmente, la formulación permite obtener ciertos sistemas líquido-líquido, no miscibles, estabilizados por un surfactante, los cuales son llamados emulsiones. Generalmente, este término está precedido por prefijos tales como macro, micro, mini o nano, de acuerdo a unos criterios no definidos de tamaños. Por debajo de los 100 nm hablamos de mini o nanoemulsiones, los cuales son sistemas bifásicos preparados por métodos no convencionales^{10,11}, dando sistemas termodinámicamente inestables que se separan en dos fases. Su estabilidad puede ser ajustada a un largo período de tiempo.

El término microemulsión fue utilizado inicialmente por Schulman en 1959¹², pensando que se tenían microgotas. Pero resultó ser un sistema monofásico termodinámicamente estable. En la actualidad, se pueden formular sistemas microemulsionados por el método HLD (Diferencia Hidrofílica Lipofílica) desarrollado por Salager *et al.*^{13,14}

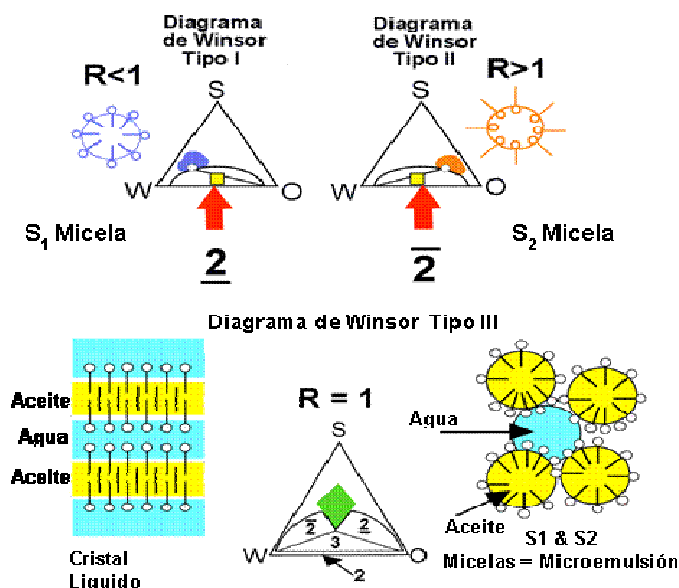


Fig. 7.2: Comportamiento de fases de los sistemas surfactantes-agua-aceite según Winsor¹⁵.

Basado en la descripción de Winsor¹⁵ para el comportamiento de los sistemas surfactante-agua-aceite, en un sistema con $R = 1$, el surfactante tiene la misma afinidad por el agua que por el aceite. Para aplicaciones petroleras a este sistema se le llamó formulación óptima¹⁶. Estos sistemas presentan tensiones interfaciales mínimas (10^{-3} , 10^{-4} mN/m) y la máxima solubilidad entre el agua y el aceite, lo que además permite solubilizar principios activos (ver figura 7.2).

EL HLD es un número adimensional que representa la suma algebraica de las diferentes contribuciones energéticas que aporta cada componente y las variables de formulación. Este concepto fue desarrollado para los distintos surfactantes como se indica en las siguientes expresiones:

$$\text{HLD} = \ln S - k \text{ ACN} - f(A) + \sigma - a\Delta T, \quad \text{para sistemas aniónicos}$$

$$\text{HLD} = \alpha - \text{EON} + b S - k \text{ ACN} - \phi(A) + c\Delta T, \quad \text{para sistemas noiónicos}$$

donde: EON = número de grupos “óxidos de etileno” por molécula de surfactante no iónico,
 S = salinidad del agua en porcentaje másico de NaCl dentro de la fase acuosa,
 ACN = número de átomos de carbono de la molécula de *n*-alcano,
 ΔT = diferencia de temperatura respecto a la temperatura de referencia (25°C),
 A = porcentaje ponderado de alcohol eventualmente añadido,
 σ, α = parámetros característicos del surfactante considerado,
 a = constante característica del alcohol y del tipo de surfactante
 b = constante característica de la sal eventualmente añadida

El HLD es una expresión numérica que permite realizar cálculos y predecir compensaciones de las diferentes variables que la componen. A partir del concepto de HLD hoy se pueden formular microemulsiones a la carta.

Las microemulsiones pueden ser utilizadas como método para obtención de NPs. También, en ellas se pueden solubilizar principios activos ya sean hidrosolubles o liposolubles. Se conocen experiencias de preparaciones comerciales para administrar microemulsiones en aplicaciones parenterales, vía pulmonar en sistemas aerosoles, vía transdérmica y vía oftálmica.

Los surfactantes presentan dos propiedades fundamentales, la adsorción en las interfases y la asociación. La asociación permite el agregado molecular llamado micela (figura 7.3). La micela es un coloide de agregación que puede agrupar en solución acuosa entre unas 50 a 100 moléculas de surfactantes con tamaños entre 20 a 50 Å. En aceite estas moléculas pueden formar las micelas inversas con un número menor de moléculas de surfactantes.

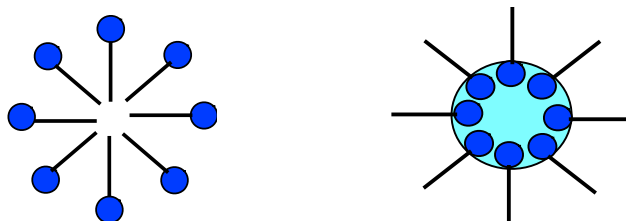


Fig. 7.3: Micelas. A la izquierda micela formada en solución acuosa, a la derecha micela en aceite.

Los liposomas son vesículas microscópicas conteniendo una o múltiples bicapas fosfolípicas, los cuales son usados primariamente para proveer humectación y para transportar vitaminas liposolubles dentro de la piel, ellos penetran la piel y refuerzan la barrera del estrato córneo. Por otro lado, las nanoemulsiones son emulsiones con gotas de tamaños sub-micrométrico, transparentes o traslúcidas, con un color blanco-gris. Las gotas pequeñas de gran área superficial permiten el transporte eficiente en la piel ya que también la cubren y penetran rápidamente la piel.

Los fosfolípidos son los componentes básicos de las membranas celulares humanas. Tienen la propiedad de adoptar espontáneamente la configuración en bicapas cuando se encuentran en un medio acuoso. Esta propiedad de los fosfolípidos se debe a que son moléculas anfífilas, es decir, poseen un extremo polar o hidrofílico que se orienta hacia la fase acuosa y un extremo no polar o hidrofóbico que rechaza la fase acuosa y se orienta hacia el interior de la bicapa.

Los liposomas fueron descritos por primera vez en 1965 y se utilizaron inicialmente como modelos en el estudio de las membranas biológicas. Fue Alex Bangham¹⁷ quien descubrió cómo determinadas moléculas susceptibles de formar membranas, como los fosfolípidos, interaccionan con el agua para formar estructuras aisladas, que hoy en día llamamos liposomas¹⁸.

Los liposomas se comenzaron a emplear con fines cosméticos en la década de los 80, cuando la casa Dior sacó al mercado un producto antienvjecimiento. Posteriormente, a finales de esta década y comienzo de los 90, la industria farmacéutica comenzó a comercializar productos a base de liposomas, como el tensioactivo pulmonar sintético Alveofact®, Epi-Pevaryl®, que contiene Econazol para uso tópico y Doxil® inyectable que contiene doxorubicina para el tratamiento del cáncer, entre otros.

7.3. Productos nanotecnológicos aprobados y futuro de los productos farmacoterapéuticos

Es el momento de considerar cual es la situación actual de los sistemas nanométricos que pueden ser usados en lo que se ha denominado Nanotecnología Farmacéutica. Si bien algunos de estos sistemas ya cuentan con una larga trayectoria como vehículos portadores de fármacos, ha sido en los últimos años cuando se han producido las innovaciones y aplicaciones más interesantes¹⁹.

Hoy en día, existen numerosos sistemas nanotecnológicos de entrega de fármacos, desde los que se encuentran en una etapa de investigación hasta productos consolidados en el mercado. Entre los sistemas pioneros pueden mencionarse los liposomas y las microemulsiones, ambos sistemas coloidales, que han dado origen a productos que mejoran la terapéutica de diversas patologías, como por ejemplo, algunos tipos de cáncer, la *Leishmaniasis* y la enfermedad degenerativa de la mácula. También debe mencionarse el desarrollo de los virosomas, sistemas que combinan lípidos con proteínas virales con acción adyuvante, lo cual ha permitido la comercialización de vacunas para la gripe y la hepatitis. Otros sistemas promisorios son las nanopartículas (NPs) a partir de polímeros naturales, con un especial interés en el quitosano y sus derivados, por sus propiedades

mucoadhesivas²⁰. También existen numerosos grupos dedicados al estudio de los dendrímeros y sus aplicaciones en la liberación de drogas.

7.3.1 Aplicaciones de los liposomas.

El empleo de los liposomas, como vehículos para contener fármacos antineoplásicos, ha sido ampliamente estudiado, tanto para fármacos de bajo peso molecular como para péptidos y proteínas, así como citoquinas y otros inmunomoduladores con objeto de activar macrófagos y convertirlos en tumorocidas. De igual manera, el material genético como ADN, oligonucleótidos y ribosomas han sido incluidos en liposomas, tal como se recoge en la tabla 7.1.

Tabla 7.1: Principios activos incluidos en liposomas aprobados para utilización clínica o en fase de investigación.

Principio Activo	Indicación
Daunorubicina	Sarkoma de Kaposi
Doxorubicina	Terapia combinatoria en cáncer de mama
Doxorubicina en Liposomas pegilados	Sarcoma de Kaposi refractario; cáncer de ovario; cáncer de mama refractario
Citarabina	Meningitis linfomatosa
Vincristina	Linfoma no Hodgkin
Lurloctecan	Cáncer de ovario
ácido <i>trans</i> -retinoico	Leucemia promielocítica aguda; Linfoma no Hodgkin; Sarcoma de Kaposi; carcinoma de células renales
Derivados de platino	Diversos tumores
Annamicina	Tumores resistentes a doxorubicina
Plásmido ADN codificando HLA-B7 Alovectina 7 y β -2 micro-hemoglobina	Melanoma metastásico
Elagen	Diversos tumores

Como se puede ver, una diversidad de fármacos son administrados en forma de liposomas, aunque en algunos casos se ha encontrado un incremento de la toxicidad pero en otros ésta se ha visto disminuida.

Los liposomas se han usado ampliamente en sistemas de liberación de fármacos para tratar procesos infecciosos producidos por bacterias, hongos, virus y parásitos. El proceso de fagocitosis de microorganismos y su desarrollo en las células huésped supone una dificultad en el tratamiento con fármacos anti-infecciosos, debido a su baja penetración. Esta misma actividad fagocitaria puede ser utilizada para la captación de liposomas y que éstos liberen el principio activo en el interior de las células. Estudios realizados inicialmente con liposomas conteniendo derivados de antimonio para el tratamiento de la *Leishmaniasis* mostraron un incremento del índice terapéutico como consecuencia del aumento de la actividad y reducción de los efectos tóxicos. Recientemente, se han observado efectos similares en una amplia variedad de infecciones producidas por bacterias hongos y virus²¹.

Actualmente se llevan a cabo investigaciones con Amikacina vehiculizada en liposomas,

que tienen por finalidad conseguir una mayor concentración intracelular y una menor toxicidad en el tratamiento de la tuberculosis multi-resistente y la endocarditis.

Muchas de las preparaciones de antígenos necesitan el complemento de adyuvantes para reforzar la respuesta inmune frente a antígenos específicos. En este sentido, la tecnología virosomal representa un importante avance ya que mejora la presentación de antígenos específicos a las células inmunes.

Los virosomas están formados por liposomas que contienen proteínas virales en su membrana. Estas proteínas permiten a las membranas de los virosomas unirse con las células del sistema inmune y así liberar su contenido en las células diana específicas. Un aspecto interesante para la aplicación de los virosomas es su utilización como vehículos de liberación de genes en vacunas de ADN y RNA. Las vacunas basadas en genes presentan ventajas potenciales puesto que el antígeno es obtenido de las células del huésped, pudiendo inducir tanto la respuesta inmune humoral como la mediada por células.

La tecnología de los virosomas se aplicó enseguida a una nueva generación de vacunas de la influenza basados en el hecho que los ancianos, las personas enfermas y los niños pequeños se encuentran en un mayor riesgo de complicaciones asociadas con la influenza. Laboratorios Berna demostró que la vacuna virosómica de la influenza es más segura, más inmunogénica y mejor tolerada que las existentes en el mercado.

Actualmente, se cuenta con vacunas incluidas en virosomas, para la fiebre amarilla, la *Pseudomona aeruginosa*, con antígenos como toxoide tetánico, toxoide diftérico, Hepatitis B y polivacunas que combinan estos antígenos, además de la Hepatitis A.

La utilización de liposomas como vehículos para radioisótopos (escintigrafía) y agentes de contraste (TAC y RMN) ha recibido particular atención. El empleo de estos nanosistemas tiene como fundamento que las células tumorales poseen una actividad fagocitaria menor que los tejidos normales por lo que hay una acumulación del contraste en éstos. Por otra parte, en áreas que pueden sufrir procesos de inflamación, por ejemplo en artritis, dan también señal positiva que puede ser incrementada con el empleo del contraste incluido en liposomas.

Los liposomas tienden a ser captados por el sistema retículo-endotelial, por lo que también pueden ser empleados en la detección de tumores hepato-esplénicos y metástasis mediante TAC o RMN.

Los liposomas de larga semivida plasmática presentan gran interés como vehículos de contrastes vasculares para detectar lesiones ateroscleróticas, *shunts* intravasculares, entre otros. De igual manera, los llamados inmuno-liposomas específicos para el citoesqueleto conteniendo anticuerpos anti-miosina son de interés experimental de estudios en infarto de miocardio²². Estos inmuno-liposomas se fusionan con las células dañadas y constituyen un excelente vehículo para la liberación de fármacos o ADN a células hipóxicas.

Es de destacar, las buenas perspectivas que ofrecen los resultados de fijar en liposomas cadenas de ADN con copias sanas del gen CFTR (*Cystic Fibrosis Trans-membrane conductance Regulator*) y realizar su administración en forma de aerosol nasal en el tratamiento de la fibrosis quística pulmonar. Aunque los resultados obtenidos proceden de ensayos

clínicos cortos, resultan esperanzadores ya que son tan buenos como los obtenidos con vectores virales.

7.3.2. Aplicaciones de las micelas poliméricas.

Las micelas poliméricas pueden ser utilizados para la solubilización, estabilización y liberación de numerosos fármacos de mayor o menor complejidad estructural. Sus propiedades funcionales formadas a partir de bloques de copolímeros anfífilicos las convierten en sistemas ideales para la encapsulación y liberación de fármacos de carácter hidrófobo.

Existe un gran interés en el uso de las micelas poliméricas como portadoras de fármacos como lo demuestran Adams²³ y Duncan²⁴ en sus excelentes revisiones en las que señalan los tres grandes grupos de copolímeros que forman el núcleo hidrofóbico: polímeros de polioxietileno con poli L-aminoácidos, con poliésteres o con polioxipropileno. Las micelas poliméricas basadas en bloques poliméricos de polióxido de etileno y poli-L-aminoácidos son bastante versátiles porque permiten realizar modificaciones químicas en el polímero que forma el núcleo y con ello facilitar la carga del fármaco, bien por un procedimiento físico o uno químico. Dentro de éste tipo de polímeros, han sido ampliamente utilizados aquellos que contienen poli-L-aspártico ya que, a través del grupo carboxilo, es posible realizar una conjugación con el fármaco el cual queda en forma de profármaco, que va siendo liberado por hidrólisis inespecífica o enzimática. Este procedimiento ha sido utilizado para la liberación de fármacos citostáticos de elevada toxicidad como doxo-rubicina²⁵, metotrexato²⁶ y camptotecina²⁷.

7.3.3. Aplicaciones de las NPs

El 60% de las drogas que provienen de las síntesis son pobremente solubles en agua. Se requieren entonces iniciativas de formulaciones innovadoras para que alcancen una biodisponibilidad oral aceptable o para formular inyectables endovenosos. Para tal fin, se han desarrollado los nanocristales, NPs compuestas de un 100% de droga, sin material extra alguno, y cuyo tamaño medio de partículas oscila entre 200 y 500 nm.

A través de distintos procedimientos, estas NPs se formulan en otras formas farmacéuticas de mayor aceptación como comprimidos, granulados o cápsulas, y también se pueden preparar para administración endovenosa. Esta última vía de administración, se ha visto beneficiada con la utilización de NPs debido a que se pueden suministrar mayores dosis en un volumen menor, y sin la necesidad de recurrir a solventes orgánicos o a pH extremos.

A partir del 2000, varios productos alcanzaron el mercado bajo la modalidad de Nanocrystal[®], ya sea como primera formulación disponible comercialmente o como una reformulación de una existente. Dentro de los ejemplos, se pueden mencionar al inmunosupresor Sirolimus y al principio activo utilizado en la terapia antiemética asociada a la administración de quimioterapia, llamado Aprepitant. También está disponible, en esta forma, una nueva presentación comercial del Megestrol, un agente terapéutico usado en la anorexia en pacientes neoplásicos y con SIDA. Es líquida, al igual que su precursora, pero en este tipo de formulación la dosis está contenida en un volumen cuatro veces menor y su viscosidad disminuyó 16 veces. Existe otra diversidad de productos nanoparticulados comercializados actualmente, algunos aprobados hace más de una década (ver tabla 7.2).

Tabla 7.2: Medicamentos y productos farmacéuticos nanotecnológicos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA).

PRODUCTO/FABRICANTE	Año de aprobación	PROPÓSITO
<i>Albraxane</i> American BioScience, Inc.	2005	NPs que contienen paclitaxel, que aumenta la cantidad medicamento anticancerosa disponible, para matar células cancerígenas en la mama.
<i>Daxil</i> Ortho Biotech Products	1999	Sistemas de suministro de NPs basado en lipomas recubiertos con polímeros, conocido como " <i>Stealth</i> " (el furtivo). Daxil es el primer producto que incorpora esta tecnología para el tratamiento de cáncer de ovarios.
<i>Emend</i> Merck —tecnología bajo licencia de Elan	2003	Versión nanoparticulada del medicamento <i>Aprepitant</i> , un antiemético, utilizado para prevenir la náusea en los pacientes de cáncer que reciben quimioterapia
<i>Rapamune</i> Wyeth —tecnología bajo licencia de Elan	2000	Formulación nanoparticulada de Sirolimus (<i>Rapamune</i>) para prevenir el rechazo en pacientes que reciben trasplantes de órganos.
<i>Silcryst</i> Nucryst Pharmaceuticals/ producto distribuido por Smith & Nephew como <i>Asticoat</i>	Comercialmente disponible desde 1998 (aprobado por FDA sin prescripción en 2001)	Plata nanocristalina incorporada en los recubrimientos de las heridas por sus propiedades antimicrobianas.
<i>Silva Gard</i> AcryMed, Inc.	2005	Catéter recubierto con NPs antimicrobianas de plata para el uso interno en el cuerpo.
<i>Tri Cor</i> Abbott Laboratories	2004	Formulación nanoparticulada del <i>TriCor</i> (una droga para tratar el colesterol alto).
<i>Verigene</i> Nanosphere, Inc.	2006	Plataforma <i>in vitro</i> para probar muestras desangre o saliva en la detección de ácidos nucleicos y proteínas que tengan concentraciones extremadamente bajas.

Fuente: ETC GOUP²⁸.

7.3.4. Aplicaciones de dendrímeros

Los polímeros dendríticos componen una nueva generación de nanosistemas que han despertado un gran interés en los últimos años entre otras cosas, por su alto potencial como agentes formadores de vehículos de fármacos. Desde un punto de vista químico, los dendrímeros son macromoléculas poliméricas sintéticas que pueden ser de distinta naturaleza (peptídicos, lipídicos, polisacarídicos, entre otros). Un dendrímero típico está formado por una molécula central de la que salen varias “ramas”, que a su vez se ramifican, originando así una estructura tridimensional globular de capas concéntricas. La presencia de grupos funcionales (tipo amino, carboxilo, hidroxilo, entre otros), en la superficie de los dendrímeros, confiere a estos agentes gran parte de su utilidad en terapéutica²⁹. Los grupos funcionales conceden a los dendrímeros una carga determinada a pH fisiológico (aniónico o catiónico). En concreto, los dendrímeros catiónicos resultan especialmente interesantes para su aplicación en la vía tópica ocular, ya que presentan una alta interacción con las mucinas del epitelio de la córnea que se encuentran cargadas negativamente en condiciones fisiológicas por la presencia de grupos siálicos. Esta

interacción electrostática convierte a estos dendrímeros en compuestos mucoadhesivos capaces de generar un aumento en el tiempo de contacto de la forma farmacéutica (y del principio activo que contenga) sobre la superficie del ojo. Además, su naturaleza catiónica también induce interacción electrostática con las proteínas de las uniones intercelulares epiteliales, generando así, una reorganización temporal de dichas estructuras y un aumento de la permeabilidad paracelular^{30,31}. Estas propiedades resultan atractivas para su empleo como agentes promotores de la penetración de sustancias activas a través de la córnea. En el caso de la vía oftálmica aparecen publicados contados trabajos, sin embargo, los resultados obtenidos resultan altamente prometedores, como el caso de la co-administración tópica de Pilocarpina y Tropicarpina con dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), estudio en el que se observó un efecto farmacológico sostenido y duradero en animales de experimentación, en contraposición al tratamiento convencional (principio activo en solución).

En lo concerniente a la encapsulación del fármaco, las moléculas activas hidrofóbicas pueden encapsularse en el interior del dendrímero, aumentando así su hidrosolubilidad³². Por el contrario, las moléculas hidrofílicas se pueden unir a la superficie del dendrímero gracias a sus características superficiales, ya sea por uniones covalentes, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, entre otros. En este sentido, los dendrímeros catiónicos presentan la enorme ventaja de poder encapsular oligonucleótidos, que son de naturaleza polianiónica, lo que los convierte además en excepcionales candidatos para el desarrollo de formulaciones en terapia génica³³. Otros autores han comenzado también a explorar el uso de dendrímeros para terapia génica en oftalmología. Los primeros estudios han ido encaminados a combatir la neovascularización en pacientes con retinopatía diabética o con degeneración macular asociada a la edad. En este caso, la administración intraocular de dendrímeros lipídicos asociados a un oligonucleótido capaz de reducir la transcripción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), uno de los principales factores angiogénicos asociados a la neovascularización, demostró una protección contra la neovascularización en animales de experimentación de más de un mes de duración³⁴.

Otra aplicación es la administración de dendrímeros como fármacos antivirales, que se caracteriza porque poseen restos aniónicos en su superficie como grupos sulfonato o de ácido siálico, siendo capaces de competir en el proceso de fijación de los virus a la superficie celular. Estudios realizados con dendrímeros de polilisina modificada con restos naftil o con grupos sulfonato en la superficie, han demostrado su utilidad como inhibidores *in vitro* del virus herpes simplex³⁵ al inhibir la entrada del virus en la célula y su posterior replicación. Dendrímeros PAMAM (de poliamidas) con grupos naftil-sulfonato en su superficie han revelado actividad frente al virus VIH compitiendo, en una primera etapa, con la fijación del virus a la superficie celular y, posteriormente, impidiendo su replicación a través de la transcriptasa reversa y/o integrasa^{25,36}.

La firma australiana Starpharma³⁷ ha desarrollado un gel (VivaGel) cuyo componente activo es un dendrímero de polilisina (SPL7013) que se fija a proteínas de glucosilfosfatidil-inositol (gpI 20) del virus lo que impide su fijación a los receptores CD4 (cúmulo de diferenciación 4 o clúster of cuádruple diferenciación). A mediados del año 2004 este producto, de aplicación vaginal o anal, fue aprobado por la FDA para iniciar el

ensayo clínico Fase I, constituyendo el primer dendrímero aplicado a humanos. El mismo, ha demostrado actividad frente al virus herpes simplex, de la hepatitis B, Chlamydia, entre otros. La misma firma está desarrollando otros dendrímeros activos por vía inhalatoria frente al virus sincitial respiratorio y patógenos emergentes como el coronavirus que produce el síndrome respiratorio severo agudo (SARS).

7.4. Caracterización de las NPs

En los últimos años, se ha desarrollado un inmenso número de diseños experimentales dirigido a la síntesis de NPs magnéticas de tamaño controlado y poca distribución de tamaño de partícula, con la finalidad de obtener nuevas propiedades de los nanomateriales. La forma, el tamaño y las propiedades superficiales de las NPs supeditan el comportamiento magnético y se cree que definen el comportamiento, así como las propiedades magnéticas de la misma.

En el diseño racional de una formulación es primordial el entendimiento de todos los aspectos fisicoquímicos de la misma, así como una buena interpretación de los resultados. La caracterización morfológica y estructural de las partículas, su tamaño, características superficiales, y la forma de liberación del fármaco, son todos aspectos relevantes que deben ser considerados en dicho proceso. Este acelerado avance ha obligado al desarrollo de nuevas técnicas de caracterización adecuadas, surgiendo así la nanometrología, ciencia que se encarga de la medida de materiales en nanoescala (< 100 nm), incluyendo técnicas, herramientas y teorías para la cuantificación en esta dimensión^{38,39}. Al trabajar en escala nanométrica, se emplean técnicas especiales, tales como la microscopía de fuerza atómica (AFM), la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la dispersión dinámica de luz (DLS), la espectroscopia de fotoelectrones con rayos X (XPS), entre otras. La técnica de dispersión de luz ha sido muy utilizada para caracterizar forma, tamaño y dinámica de NPs de naturaleza química muy diversa. La microscopía SEM permite el estudio de la morfología y composición de materiales físicos y biológicos, mientras que la de transmisión (TEM) permite determinar la estructura interna de los materiales, incluyendo los biológicos, produciendo imágenes precisas de nanomateriales, nanotubos y NPs. Sin embargo, estas técnicas siguen complementándose con técnicas convencionales de caracterización como la espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS), infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) 1D y 2D. En el caso de estructuras cristalinas y polvos amorfos, se usa la dispersión por rayos X (DRX) en polvo y calorimetría de barrido diferencial^{40,41}.

7.4.1. Tamaño de las NPs

Un parámetro importante de cualquier nanopartícula es su tamaño; el mismo gobierna la interacción de la nanopartícula con los sistemas biológicos, incluyendo la absorción, distribución, metabolismo y excreción. En este sentido, la Resonancia Magnética Nuclear se ha convertido en una herramienta útil para determinar este parámetro, a través de la medida del radio hidrodinámico de NPs metálicas. La RMN usa técnicas de gradientes de pulso (PFG) para determinar el coeficiente de difusión de partículas dispersas en solución y que

difunden mediante movimiento Browniano. Bajos estas condiciones, el radio hidrodinámico se calcula reordenando la ecuación de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

donde D es el coeficiente de difusión, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η es la viscosidad del solvente y R_H es el radio hidrodinámico de la especie en difusión.

Utilizando como núcleo el protón, DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) es un experimento bidimensional que permite discriminar las señales de RMN de acuerdo a su coeficiente de difusión. El trabajo de Terrill *et al.*⁴², en 1995, fue pionero en su campo, siendo uno de los primeros en reportar el uso del experimento ^1H -DOSY para medir el radio hidrodinámico de partículas coloidales de Au, e incluso el método recién propuesto de "RMN quimiosensores" para la identificación y cuantificación de analitos en mezclas complejas, basado en el uso de los receptores basados en NPs^{43,44}.

Igualmente, el diámetro medio puede ser estimado por medio de métodos altamente sensibles como lo es la difracción láser. Existen otras técnicas que, además de entregar información con respecto al diámetro medio, aportan datos relacionados con la forma de las partículas, dentro de ellas se encuentra la microscopía electrónica de transmisión (TEM), de barrido (SEM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM). En ciertas ocasiones, partículas mayores de 100 nm pueden ser analizadas con un contador Coulter o por difracción de rayos láser.

El tamaño de partícula ejerce un importante papel en la velocidad de disolución de los fármacos. La reducción del tamaño de partícula puede aumentar la velocidad de disolución y con ello generar una mayor biodisponibilidad del fármaco^{45,46}.

7.4.2. Morfología:

El método de preparación o síntesis influye en la morfología de las NPs y, por ende, en las propiedades estructurales y magnéticas de las mismas, e incluso su toxicidad; por ejemplo, se ha comprobado que las NPs de plata de forma triangular truncada, son más tóxicas que las esféricas y alargadas ya que su mayor número de caras las hace más reactivas, siendo las esféricas las que presentan menor toxicidad⁴⁷. Es por ello que la caracterización estructural y morfológica de las mismas es de gran importancia para interpretar sus propiedades, tanto físicas como químicas, así como para explorar las diferentes aplicaciones que se puedan proponer. La dispersión dinámica de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*), es una técnica fisicoquímica empleada en la determinación de la distribución de tamaños de partículas en solución⁴⁸ o el caso de macromoléculas tipo proteínas o polímeros en solución. A finales del siglo pasado, la DLS se convirtió además en una técnica ideal para optimizar el conocimiento sobre el crecimiento cristalino y la agregación de macromoléculas, así como para determinar la formación de agregados en solución^{49,50}.

Un ejemplo importante es la formación de micelas, útiles en liberación de fármacos y cosméticos^{51,52}, y en donde la DLS se utiliza como herramienta de diagnóstico para analizar la forma de cristalización del solvente en la misma.

7.4.3. Estructuras

La disposición de los componentes en la nanopartícula, puede determinar su comportamiento y estabilidad. Diversas técnicas de microscopía se emplean en la determinación semicuantitativa de la estructura de materiales nanoestructurados, como la microscopía electrónica de barrido y la microscopía electrónica de transmisión. En el caso de estructuras cristalinas y polvos amorfos, se usa la difracción por rayos X (DRX) para determinar cuantitativamente las propiedades estructurales de los sólidos. En algunos casos, para poder establecer la orientación de las moléculas, se requiere métodos de dispersión de alta energía, tales como la dispersión por rayos X y dispersión de neutrones. Si la nanopartícula posee componentes fluidos o se requiere medir el nivel de droga libre, la RMN es una buena técnica ya que la magnitud de la respuesta instrumental depende del movimiento molecular. En este caso, las medidas de difusión por RMN 2D con gradientes es, también, una técnica de elección¹⁹.

7.4.4. Propiedades de las superficies:

El potencial zeta aporta información sobre la carga superficial de las NPs, lo cual condiciona las interacciones entre las mismas, así como entre estos sistemas y la membrana celular. También, ayuda a describir la estabilidad de las dispersiones coloidales¹⁹. El potencial zeta también se puede utilizar para determinar si un material cargado es encapsulado en el centro de la nanopartícula o en la superficie⁵³. Para su cuantificación, se emplean técnicas electroforéticas.

7.5. Forma de liberación del fármaco

La nanotecnología ha permitido diseñar sistemas de liberación de fármacos, que pueden transportar las drogas de manera más efectiva y dirigir, con mayor selectividad, la liberación del fármaco en la diana deseada^{54,55}. El sistema selectivo de suministro de fármacos, a través de nanoestructuras, permite mejorar la penetración celular y la distribución, aumentar la absorción del fármaco al facilitar su absorción a través de la capa epitelial, modificar la farmacocinética y, en particular, proteger al principio activo de una posible degradación antes de ejercer su acción, por ende, tendremos tratamientos más efectivos, menos costosos y con menores efectos colaterales. Los mismos pueden desarrollarse a partir de nanoestructuras muy diversas tales como, nanoestructuras unimoleculares tipo dendrímeros, nanotubos de carbono y polímeros, o nanoestructuras múltiples como sistemas lipídicos tipo emulsiones y liposomas, NPs poliméricas sólidas, micelas y nanocápsulas. Estas múltiples capas se ensamblan entre sí a través de interacciones débiles tipo fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, interacciones π - π , e incluso enlaces de hidrógeno. Para que estos nanofármacos, puedan ejercer su acción con éxito, es indispensable que las nanoestructuras que constituyen el sistema, estén ensambladas de manera homogénea, en términos de tamaño de partícula, organización supramolecular y morfología. Además, es necesario ejercer un eficiente control de calidad, teniendo en cuenta que la mayoría de sus propiedades físicas, químicas y biológicas, son diferentes de sus similares de mayor escala. Es por ello que, es muy importante establecer los parámetros de los nanomateriales que podrían afectar el comportamiento de los productos nanotecnológicos alcanzados. En este sentido, podríamos citar: proceso de fabricación (seguridad del proceso y posible impacto

ambiental), tamaño de partícula y su distribución, área superficial, características química de esa superficie y el tipo de recubrimiento que posee, densidad de carga superficial, hidrofiliidad, pureza, esterilidad, estabilidad y además debe comprobarse que su comportamiento *in vivo*, es concordante con la actividad demostrada *in vitro*. En el producto terminado es indispensable pruebas de liberación del fármaco y consideraciones sobre su bioequivalencia. La cantidad de fármaco encapsulado puede ser establecido mediante diversas metodologías analíticas como HPLC, HPTLC o espectrofotometría UV-VIS.

Referencias

1. RP Feynman. There's Plenty of Room at the Bottom. **Caltech Engineering and Science**, **23(5)**, 22-36 (1960).
2. N Taniguchi. On the basic concept of 'nano-technology. Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering (1974).
3. G Binning, H Rohrer. Scanning Tunneling Microscopy-From Birth to Adolescence. En: G Eksping (Ed.). Nobel Lectures Physics 1981-1990, World Scientific, Singapore, 389-409 (1986).
4. HW Kroto, JR Heath, SC O'Brien, RF Curl, RE Smalley. C60: Buckminsterfullerene. **Nature**, **318(6042)**, 162-163 (1985).
5. KE Drexler. Molecular Engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **78(9)**, 5275-5278 (1981).
6. R Freitas. What is Nanomedicine? **Nanomed. Nanotechn. Biol. Med.**, **1(1)**, 2-9 (2005).
7. European Science Foundation Policy Briefing. ESF Scientific Forward Look on Nanomedicine (2005).
Disponible en: <http://www.esf.org>.
8. CSSR Kumar. Nanotechnology tools in pharmaceutical R&D. **Material Today**, **12(1)**, 24-30 (2010).
9. JM Aubry, G Schorsch. Formulation in *Traité de Génie des Procédés*. **Techniques de l'Ingénieur**, **J2-110**, 1-20 (1999).
10. A Forgiarini, J Esquena, C Solans. Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. **Prog. Coll. Polym. Sci.**, **115**, 36-39 (2000).
11. A Forgiarini, J Esquena, C González, C Solans. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. **Langmuir**, **17**, 2076-2083 (2001).
12. JH Schulman, WStoekenius, LM Prince. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **J. Phys. Chem.**, **63(10)**, 1677-1680 (1959).
13. JL Salager. Microemulsions. En: G Broze (Ed.). *Handbook of Detergents-Part A: Properties*, Marcel Dekker, New York pp. 253-302 (1999).
14. JL Salager, RE Anton, JM Anderez, JMAubry. Formulation des micro-émulsions par la méthode HLD, **Techniques de l'Ingénieur**, **Vol. Génie des Procédés**, **J2-157**, 1-20 (2001).
15. PA Winsor. *Solvent properties of amphiphilic compounds*. Butterworth Scientific Publications, London, (1954).
16. DO Shah, RS Schechter (Eds.). *Improved Oil Recovery by Surfactant and Polymer Flooding*. Academic Press (1977).
17. AD Bangham, MM Standish, JC Watkins. Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids. **J. Mol. Biol.**, **13**, 238-252 (1965).

18. D Lasic, N Weiner, M Riaz, F Martin. Liposomes. En: Pharmaceutical dosage forms: disperse systems. Vol. 3. A Lieberman, MRieger, G Banker (Eds.). Marcel Dekker, New York, p. 43-86 (1998).
19. RRPutheti, RN Okigbo, MS Advanapu, S Chavanpatil. Nanotechnology importance in the pharmaceutical industry. **Afr. J. Pure Appl. Chem.**, **2(3)**, 027-031 (2008).
20. NA Tabar, MR Saboktakin, A Maharramov, MA Ramazanov. Intelligent Drug Delivery Systems Based on Modified Chitosan Nanoparticles. **Letters in Organic Chemistry**, **9(1)**, 56-70 (2012).
21. MG Meijer (Ed.). Targeting Organ Specific Strategies. Wiley-VCH, Weingheim (2001).
22. T Khudairi, BA Khaw. Preservation of ischemic myocardial function and integrity with targeted cytoskeleton-specific immunoliposomes. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **43**, 1683-1689 (2004).
23. ML Adams, AY Lavasanifar, GS Kwon. Amphiphilic block copolymers for Drug Delivery. **J. Pharm. Sci.**, **92**, 1343-1354 (2003).
24. R Duncan. The dawning era of polymer therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, **2**, 347-360 (2003).
25. GS Kwon, S Suwa, YM Okano, Y Sakurai, K Kataoka. Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly (ethylene oxide-aspartate) block copolymer doxorubicin conjugates: **J. Control Release.**, **29**, 17-23 (1994).
26. Y Li, GS Kwon. Methotrexate esters of poly(ethyleneoxide) block-poly(2hydroxyethyl-L-aspartamide).I. Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug release. **Pharm. Res.**, **17**, 607-611 (2000).
27. M Yokoyama, P Opanasopit, T Okano, K Kawano, Y Maitani. Polymer design and incorporation methods for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin. **J. Drug Targeting**, **12**, 373-384 (2004).
28. ETC GOUP. Medicina Nanológica p. 14.
Disponible en: www.etcgroup.org/files/publication/598/02/nanomedicinespanishfin.pdf
Consultado: junio 2015
29. H Yang, WJ Kao. Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications. **J. Biomater. Sci. Polym.**, **17**, 3-19 (2006).
30. KM Kitchens, RB Kolhatkar, PW Swaan, ND Eddington, H Ghandehari. Transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers: Influence of size, charge and fluorescent labelling. **Pharm. Res.**, **23**, 2818-2826 (2006).
31. M Najlah, S Freeman, D Attwood, A D'Emanuele. *In vitro* evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery. **Int. J. Pharm.**, **336(1)**, 183-90 (2007).
32. U Gupta, H BAgashe, A Asthana, N KJain. A review of *in vitro-in vivo* investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers. **Nanomed. Nanotechn. Biol. Med.**, **2**, 66-73 (2006).
33. GA Pietersz, CK Tang, V Apostolopoulos. Structure and design of polycationic carriers for gene delivery. **Min. Rev. Med. Chem.**, **6**, 1285-1298 (2006).
34. RJ Marano, N Wimmer, PS Kearns, BG Thomas, I Toth, M Brankov. Inhibition of *in vitro* VEGF expression and choroidal neovascularization by synthetic dendrimer peptide mediated delivery of a sense oligonucleotide. **Exp. Eye Res.**, **79**, 525-535 (2004).
35. N Bourne, LR Stanberry, ER Kern, G Holan, B Mattheus, DI Bernstein. Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against Herpes Simplex virus infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **44**, 2471-2474 (2000).
36. M Witvrouw, H Weigold, C Pannecouque, D Schols, E De Clercq, G Holan. Potent anti-HIV (Type 1 and Type 2) activity of polyoxometalates: Structure-Activity relationship and mechanism of action. **J. Med. Chem.**, **43**, 778-783 (2000).

37. <http://www.starpharma.com>
Consultado: junio 2015.
38. L Koenders, F Meli, G Wilkening. Editorial: Nanoscale Metrology. **Measur. Sci. Technol.**, **18(2)**, 1 pag. (2007).
39. http://www.phantomsnet.net/files/E_NANO_Newsletter_Issue07.pdf
Consultado: junio 2015.
40. W Zhang, XQiao, J Chen, H Wang. Preparation of silver nanoparticles in water-in-oil AOT reverse micelles. **J. Colloid Interface Sci.**, **302(1)**, 370-373 (2006).
41. Y Choi, N Ho, C Tung. Sensing Phosphatase Activity by Using Gold Nanoparticles. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **46(5)**, 707-709 (2007).
42. RH Terrill, TA Postlethwaite, CH Chen, CD Poon, A Terzis, A Chen, JE Hutchison, MR Clark, G Wignall, JD Londono, R Superfine, M Falvo, CS Jr. Johnson, ET Samulski, RW Murray. Monolayers in Three Dimensions: NMR, SAXS, Thermal, and Electron Hopping Studies of Alkanethiol Stabilized Gold Clusters. **J. Am. Chem. Soc.**, **117(50)**, 12537-12548 (1995).
43. B Perrone, S Springhetti, F Ramadori, F Rastrelli, F Mancin. "NMR Chemosensing" Using Monolayer-Protected Nanoparticles as Receptors. **J. Am. Chem. Soc.**, **135(32)**, 11768-11771 (2013)
44. MV Salvia, F Ramadori, S Springhetti, M Diez-Castellnou, B Perrone, F Rastrelli, F Mancin. Nanoparticle-Assisted NMR Detection of Organic Anions: From Chemosensing to Chromatography. **J. Am. Chem. Soc.**, **137(2)**, 886-892 (2015).
45. N Bawarski, E Chidlow, DJ Bharali, SA Mousa. Emerging nanopharmaceuticals. **Nanomed. Nanotech. Biol. Med.**, **4(4)**, 273-282 (2008)
46. M Moddarese, MB Brown, Y Zhao, S Tamburic, SA Jones. The role of vehicle nanoparticle interactions in topical drug delivery. **Intern. J. Pharmac.** **400(1-2)**, 176-182 (2010).
47. S Pal, YK Tak, JM Song. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **73**, 1712-1720 (2007).
48. R Foord, E Jakeman, CJ Oliver, ER Pike, RJ Blagrove, E Wood, AR Peacocke. Determination of diffusion coefficients of haemocyanin at low concentration by intensity fluctuation spectroscopy of scattered laser light. **Nature**, **227**, 242-245 (1970).
49. W Kadima, A McPherson, MF Dunn, F Jurnak. Precrystallization aggregation of insulin by dynamic light scattering and comparison with canavalin. **J. Crystal Growth**, **110**, 188-194 (1990).
50. JB Bishop, JC Martin, WM Rosenblum. A light scattering method for qualitatively monitoring aggregation rates in macromolecular systems. **J. Crystal Growth**, **110**, 164-170 (1991).
51. S Forster, T Plantenberg. From self-organizing polymers to nanohybrid and biomaterials. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, **41**, 689-714 (2002).
52. J Rodríguez-Hernández, F Checot, Y Gnanou, S Lecommandoux. Toward 'smart' nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution. **Prog. Polym. Sci.**, **30**, 691-724 (2005).
53. M Goldberg, R Langer, X Jia. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. **J. Biomat. Sci.**, **18**, 241-68 (2007).
54. VP Torchilin. Multifunctional nanocarriers. **Adv. DrugDeliv. Rev.**, **58(14)**, 1532-1555 (2006).
55. E Soussan, S Cassel, M Blanzat, I Rico-Lattes. Drug delivery by soft matter: Matrix and vesicular carriers. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **48**, 274-288 (2009).