



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Inclusión de nanopartículas de oro en microgeles para controlar la liberación de curcumina por radiación electromagnética

PATROCINANTE

Dr. Marcelo Kogan

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

DIRECTOR DE MEMORIA

Dr. Felipe Oyarzún

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

Pablo Alberto Lara Arenas

Santiago, Chile

2015

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto contó con el financiamiento de los proyectos Fondap 15130011, Fondecyt 1130425 y Fondecyt de iniciación 11121481.

Quisiera agradecer a mis padres y hermanos por entregarme valores, apoyo incondicional y enseñanzas gracias a las cuales he podido progresar en lo personal y lo profesional.

A mis tutores de tesis Marcelo Kogan y Felipe Oyarzún quienes realizaron una colaboración que permitió la realización de esta investigación. Les agradezco por su paciencia, constante ayuda, apoyo y enseñanzas que me han permitido desarrollarme durante el transcurso de esta memoria.

A mis compañeros del laboratorio de *Drug Delivery* y del laboratorio de Nanobiotecnología y Nanotoxicología. Les agradezco por todos los momentos compartidos que hicieron esta experiencia muy agradable. También les agradezco por sus enseñanzas, su compañerismo y por ayudarme en todo momento que lo necesité.

A los profesores Cristian Tapia y Javier Morales, quienes tuvieron una excelente disposición para ayudarme durante el transcurso de esta memoria.

A Izaskun Caro Araya quien me ayudó con los experimentos realizados en el texturómetro.

A Leonor del CEPEDQ quien me capacitó para el uso del equipo de difracción laser.

A todos los integrantes del Núcleo de Biotecnología Curauma de la Universidad Católica de Valparaíso, en especial a la Dra. Fanny Guzmán, quienes me ayudaron con la síntesis de los péptidos utilizados en esta investigación.

A Sofía Pailamilla quien me ha aconsejado y apoyado constantemente durante el transcurso de esta tesis.

Finalmente me gustaría agradecer a mis amigos y a todas las personas que de alguna u otra forma aportaron durante este proceso.

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos.
ACN	Acetonitrilo.
AuNPs	Nanopartículas de oro.
DLS	Dispersión dinámica de la luz.
DMF	Dimetil formamida.
EPR	Efecto de aumento de la retención y permeabilidad.
FDA	Agencia del gobierno de los E.E.U.U, responsable de la regulación de alimentos y fármacos.
Fmoc	9-Fluorenilmetoxycarbonilo.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia.
MALDI/TOF-MS	Espectrometría de masa por desorción/ionización mediante laser asistida por matriz, acoplada a un analizador de tiempo de vuelo.
MGs	Microgeles.
NE	Nanoemulsiones.
NeCur	Nanoemulsiones cargadas con curcumina.
NPs	Nanopartículas.
NPMs	Nanopartículas metálicas.
NvO	Nanovarillas de oro.
PDI	Índice de polidispersión.
PVDF	Fluoruro de polivilideno.
PZ	Potencial Zeta.
SEM	Microscopía electrónica de barrido.
Rpm	Revoluciones por minuto.
tBU	Tert-butilo.
TEM	Microscopía electrónica de transmisión.
TFA	Ácido trifluoroacético.
TIS	Triisopropilsilano.
TPP	Tripolifosfato de sodio.
UV-vis	Espectroscopía en rango ultra violeta y visible.

INDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Entrega de fármacos.....	5
1.2. Biopolímeros utilizados en Drug Delivery	6
1.2.1. Alginato.....	6
1.2.2. Quitosano	7
1.3. Microgeles desarrollados con biopolímeros.....	8
1.4. Nanovehículos	11
1.4.1. Nanopartículas de oro.....	12
1.4.2. Nanoemulsiones	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
2.1. Hipótesis	16
2.2. Objetivo general.....	16
2.3. Objetivos específicos	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Desarrollo y caracterización de los nanosistemas AuNPs y aquellos modificados con el péptido seleccionado (AuNPs-CLPFFD) y con rodamina (AuNPs-R- CLPFFD).....	17
3.1.1. Síntesis de las secuencias CLPFFD, rodamina-CLPFFD (R-CLPFFD)	17
3.1.2. Caracterización de los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD.....	18
3.1.3. Síntesis de AuNPs	18
3.1.4. Conjugación de AuNPs a los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD	19
3.1.5. Caracterización de las AuNPs y sus conjugados AuNP-CLPFFD y AuNP-R CLPFFD.....	20

3.2. Desarrollo y caracterización de los nanosistemas de núcleo oleoso cargados con curcumina (NeCur).....	21
3.2.1. Síntesis de NeCur.....	21
3.2.2. Caracterización de las NeCur	21
3.3. Diseño, desarrollo y caracterización de microgeles compuestos por alginato o quitosano utilizando equipamiento automatizado y escalable	22
3.3.1. Diseño y desarrollo de microgeles	22
3.3.2. Caracterización de los microgeles desarrollados	23
3.4. Evaluación de la mucoadhesividad de los microgeles seleccionados.....	23
3.5. Desarrollo y caracterización de microgeles con inclusión de nanosistemas	24
3.5.1. Preparación de microgeles con inclusión de nanosistemas.....	24
3.5.2. Caracterización de nanosistemas contenidos en microgeles	26
3.6. Evaluación de la liberación de las NeCur desde los microgeles mediante el efecto plasmón de las AuNPs.....	26
4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	29
4.1. Síntesis y caracterización de los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD	29
4.1.1. Elaboración y caracterización de nanopartículas de oro	29
4.2. Desarrollo y caracterización de NeCur	32
4.3. Desarrollo y caracterización de microgeles	33
4.4. Caracterización de la mucoadhesividad	39
4.5. Desarrollo y caracterización de microgeles con inclusión de nanosistemas	43
4.6. Evaluación de los perfiles de liberación de los nanosistemas contenidos en microgeles.....	48
5. CONCLUSIONES	53
6. REFERENCIAS	55
7. ANEXOS.....	61

RESUMEN

Uno de los grandes desafíos para mejorar los tratamientos actuales es el desarrollo de sistemas de liberación de fármaco sitio-específico que aumenten la efectividad y reduzcan los efectos adversos de las terapias convencionales. Los microgeles son sistemas atractivos para la entrega de fármacos debido a que permiten proteger a los principios activos del medio externo aumentando su estabilidad y modificando su perfil de liberación en respuesta a diversos estímulos. En esta investigación se propone incluir nanopartículas de oro (AuNPs) en microgeles para evaluar si estos responden a la generación de calor local que se manifiesta al irradiar las AuNPs, promoviendo la liberación de otra molécula co-encapsulada. De esta manera se puede lograr un control espacial y temporal en la liberación del fármaco.

Específicamente, se desarrollaron microgeles de alginato en los que se incluyó AuNPs modificadas con el péptido CLPFFD que permite el reconocimiento selectivo de agregados tóxicos de la proteína amiloide. Asimismo, en los microgeles se incluyó el fármaco lipofílico curcumina vehiculizado en nanosistemas de núcleo oleoso.

Desde el punto de vista galénico, hemos demostrado que utilizando equipamiento automatizado es posible controlar diversas variables de las formulaciones de microgeles (tamaño, polidispersidad y reproducibilidad) que permiten obtener sistemas altamente estables y aplicables a nivel industrial. En los ensayos de liberación se pudo observar que al irradiar (láser a 532 nm) los microgeles en presencia de las AuNPs, se produce una liberación significativa y sostenida en comparación con ensayos sin irradiación o irradiados pero sin las AuNPs.

Estos hallazgos nos permiten concluir que los microgeles con inclusión de AuNPs podrían ser una herramienta promisorio para liberación controlada espacial y temporalmente de fármacos.

SUMMARY

One of the great challenges to improve current treatments is the development of site-specific drug delivery systems that increase effectiveness and reduce side effects of conventional therapies. Microgels are attractive systems for drug delivery because they allow to protect drugs from the external environment improving its stability and modifying their release profile in response to various stimulus. In this research we aim to incorporate gold nanoparticles (AuNPs) in microgels to assess its response to the local heat generation produced by irradiating the AuNPs, promoting the release of another co-incorporated molecule. This way we can obtain spatial and temporally controlled drug release.

Alginate microgels were developed and loaded with AuNPs that were linked to the CLPFFD peptide which allows the selective recognition of toxic amyloid protein. We also incorporate the lipophilic drug curcumin encapsulated in oil-core nanocarriers

From a pharmaceutical point of view, we have shown that by using automated equipment several variables can be controlled in microgels formulations (size, polydispersity and reproducibility), allowing highly stable and applicable to industrial scale systems. In release tests, we observed that upon irradiation (532 nm laser) microgels had a significant and sustained release in presence of AuNPs compared to non-irradiated assays or irradiated without AuNPs. These findings allow us to conclude that microgels loaded with AuNPs could be a promising tool for spatial and temporally controlled drug release.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Entrega de fármacos

La efectividad de un principio activo no solo está determinada por su habilidad para llevar a cabo su acción farmacológica, sino que también depende de su capacidad para llegar al sitio de acción y permanecer en las concentraciones necesarias para producir el efecto terapéutico deseado. Un claro ejemplo de lo anterior es la quimioterapia con medicamentos citotóxicos. Es así que los medicamentos tienen una gran capacidad intrínseca para ejercer su efecto tóxico en las células del cáncer, sin embargo, su potencial se ve altamente limitado por la incapacidad de dichas moléculas para llegar selectivamente a su blanco farmacológico, ejerciendo efectos tóxicos sistémicos.

Los recientes avances en la comunidad científica han permitido el estudio de sistemas de entrega de fármacos sitio-específicos, basándose en la utilización de polímeros que permitan la liberación controlada de principios activos. El manejo de estos sistemas puede mejorar drásticamente la eficiencia terapéutica y reducir los efectos adversos, resultando en una mayor aceptación por los pacientes.

Los sistemas poliméricos pueden ser diseñados para generar perfiles específicos de liberación. El control de estos perfiles va a depender de ciertos factores como las características fisicoquímicas del fármaco, los polímeros utilizados, la morfología de la matriz polimérica y la tendencia del principio activo para interaccionar con las cadenas del polímero (Miro A. y cols., 2011).

En los sistemas poliméricos, la entrega del fármaco puede ser controlada por la difusión de la molécula desde la matriz polimérica, la degradación o erosión del polímero, el hinchamiento del sistema a través del tiempo, o por estímulos externos como cambios de pH o temperatura (Langer R., 1998; Mallika D. y cols., 2007).

1.2 Biopolímeros utilizados en *Drug Delivery*

Los biopolímeros son macromoléculas naturales que poseen una amplia distribución en el reino animal y vegetal. Un interés creciente en estos compuestos ha dado lugar a un gran número de trabajos publicados, no solo por su bajo costo, biocompatibilidad y biodegradabilidad, sino también debido a su uso potencial para desarrollar sistemas de liberación controlada de fármacos. Dentro de estos sistemas destacamos el uso de alginato y quitosano.

1.2.1 Alginato

Alginato es un polisacárido hidrofílico, utilizado en múltiples aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas debido a que es una molécula no tóxica, de fácil preparación y a su capacidad para formar geles (Draget K. y cols., 1997). Este polímero se compone de residuos de los ácidos β -D-manurónico (bloque M) y α -L-gulurónico (bloque G), unidos por enlaces 1-4 glicosídicos y ordenados aleatoriamente (Figura 1). Cada bloque M o G de este polímero posee un grupo funcional carboxilato, lo que hace que el alginato sea un polielectrolito con carga altamente negativa a valores de pH superiores 4,5 (Heng P. y cols., 2003).

En la gelificación del alginato se produce un intercambio iónico entre los iones sodio del ácido α -L-gulurónico y cationes divalentes como Ca^{+2} , Ba^{+2} y Sr^{+2} . Estos cationes se localizan en las cavidades electronegativas de la molécula y se enlazan a dos grupos carboxilos de bloques GG de moléculas de alginato adyacentes, lo que lleva a la formación de un gel entrecruzado iónica o físicamente (Merra G. y cols., 2006; Abang S. y cols., 2012). Esta conformación puede ser explicada por el modelo de “caja de huevo” (Figura 1b). Los geles formados en la gelificación del alginato suelen ser porosos, fuertes y termoestables, lo que hace que este polímero sea atractivo para la encapsulación y liberación controlada de diversas sustancias.

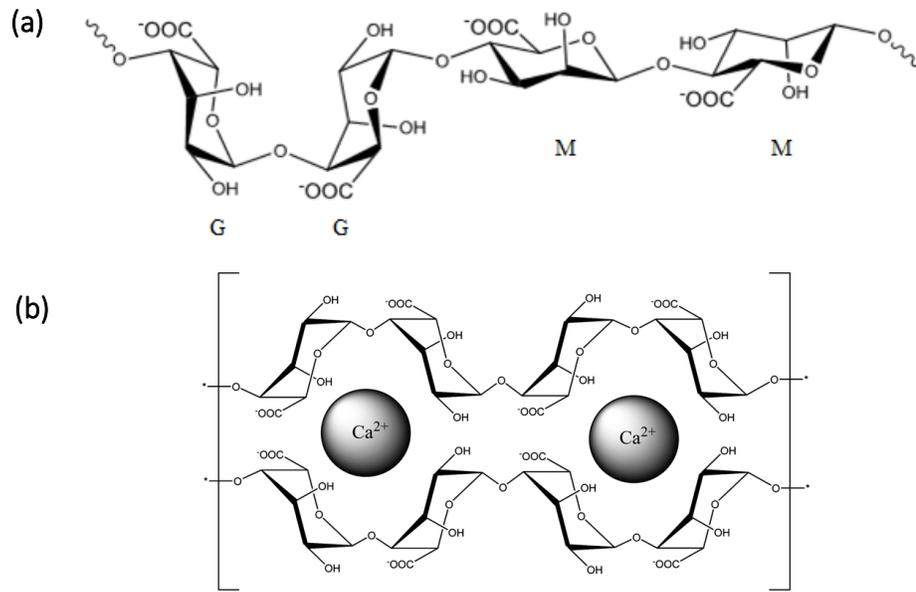


Figura 1. Estructura del alginato (a) y representación del modelo “caja de huevo”, donde el grupo α -L gulurónico del alginato se ordena en forma de bloque con los iones de calcio (b) (Andrew S. y cols., 2013).

Adicionalmente el alginato posee propiedades mucoadhesivas. En presencia de mucosas, este polímero tiene la capacidad de interactuar formando puentes de hidrógeno con glicoproteínas del tipo mucina, a través de interacciones carboxil-hidroxil (Dumitriu S. y cols., 2002). Esto es un factor importante para la entrega de fármacos, debido a que una buena mucoadhesión resulta, por lo general, en un tiempo de contacto más prolongado entre el vehículo y la mucosa, y como consecuencia, en una absorción más efectiva de la droga (Tachaprutinun A. y cols., 2013).

1.2.2 Quitosano

Quitosano es un polímero natural biodegradable, hidrofílico y biocompatible que presenta un gran potencial farmacéutico debido a su controlable densidad de cargas, baja toxicidad y capacidad para abrir uniones estrechas en mucosas (Meera G. y cols., 2006). Se compone por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (D-glucosamina) y 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa (N-acetil-D-glucosamina), enlazadas por uniones β (1, 4) (Figura 2). Su pKa es de $\sim 6,5$; y sus propiedades son frecuentemente dependientes de la proporción relativa de ambos residuos (Shu X. y cols., 2002; Meera G. y cols., 2006).

El quitosano es ampliamente utilizado por sus propiedades mucoadhesivas. Estas propiedades se presentan a pH ácidos y ligeramente ácidos, donde exhibe una mayor densidad de cargas positivas (Gaserod O., 1998). La mucoadhesión de este polímero se puede explicar por la presencia de grupos OH y NH₂ que pueden dar a lugar a enlaces puentes de hidrógenos que influyen en gran medida en su capacidad para interactuar con las mucosas. Además, la naturaleza catiónica del quitosano le podría proporcionar una fuerte interacción electrostática con el mucus o con una superficie mucosa cargada negativamente (Aspden T. y cols., 1996). Estas propiedades se consideran esenciales para la mucoadhesión (Smart J. y cols., 1984; Robinson J. y cols., 1995).

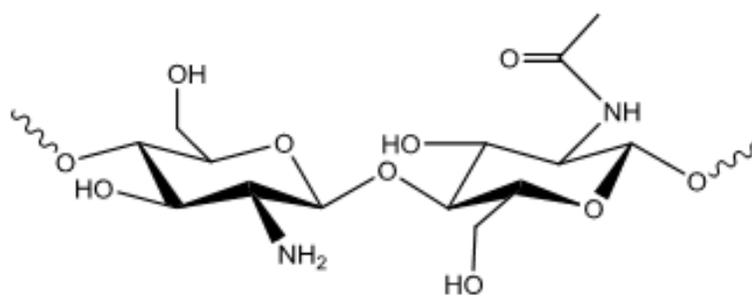


Figura 2: Estructura molecular del quitosano, formado por unidades D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina.

1.3 Microgeles desarrollados con biopolímeros

La microencapsulación de un principio activo nos permite protegerlo del ambiente externo al que puede ser sensible (acidez, alcalinidad, calor, oxidación y la luz, entre otros) (Lam P. y Gambari R., 2014). Por otro lado, los vehículos microparticulados permiten el control de la liberación de los principios activos y, según los componentes de la matriz, estos podrían ser liberados de forma inmediata, moderada o gradual (Lam P. y Gambari R., 2014).

Los microgeles (MGs) son matrices hidrofílicas formadas por polímeros entrecruzados, con la habilidad de cambiar drásticamente su volumen en respuesta a cambios en el ambiente (Ganji F. y cols., 2009). Dependiendo de los materiales utilizados en la formación de los MGs, estos pueden someterse a grandes transiciones de hinchamiento-deshinchamiento en respuesta a factores como cambios de pH, fuerza iónica, temperatura, así como también estímulos biológicos

como la interacción con enzimas y proteínas. Estos cambios son frecuentes en muchos eventos biológicos, y por lo tanto, el diseño de un sistema de liberación de fármacos gatillado por estos eventos, podría mejorar significativamente la entrega del principio activo en el sitio de interés (Figura 3) (Zhang H. y cols., 2006).

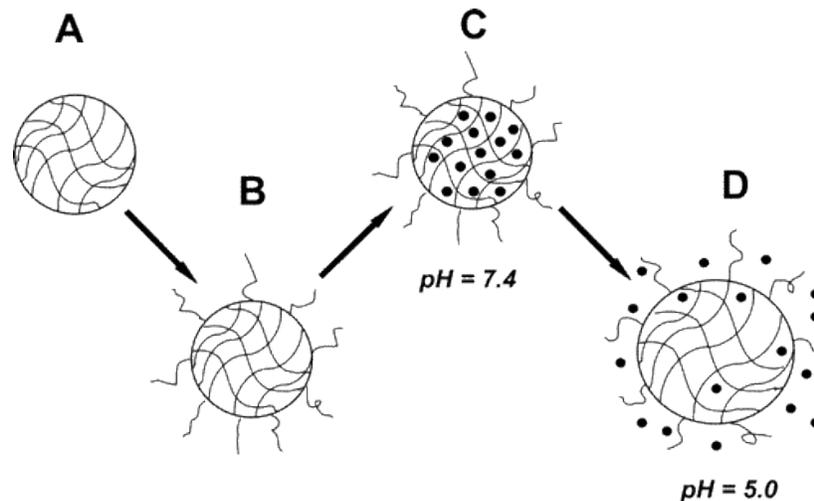


Figura 3. Los MGs pueden someterse a grandes transiciones de hinchamiento-deshinchamiento frente a un estímulo como cambio de pH, esto podría facilitar la liberación de la droga de interés: En la figura se representan microgeles (A) conjugados con un polímero sensible a pH (B). Los microgeles son cargados con la droga activa (C) y posteriormente se produce la liberación dependiente de pH (D). Adaptado de Zhang H. y cols., 2006.

La microencapsulación de fármacos en los microgeles puede ser lograda utilizando distintos tipos de técnicas. Las técnicas más comunes para elaborar MGs son mediante *dripping* (Yeo Y. y cols., 2001) y *spray drying* (Ghosh S., 2006). En el método de *spray drying*, una solución de polímero se aerosoliza para formar microgotas, las que solidifican al tomar contacto con una corta ráfaga de aire caliente; obteniendo así un polvo estable, sin necesidad de aplicar procesos posteriores de deshidratación. La técnica de *dripping* consiste en el goteo/aspersión de una solución polimérica que gelifica al tomar contacto con una solución de moléculas con carga opuesta. Las matrices se elaboran en solución, y se pueden deshidratar para disminuir su peso y mejorar su estabilidad.

Los microsistemas más conocidos elaborados mediante la técnica de *dripping* son microgeles de alginato y quitosano. Los primeros suelen ser formados mediante la extrusión de la solución de alginato (polímero con carga negativa) sobre

una solución de cloruro de calcio (carga positiva); sin embargo, como mencionamos anteriormente, también se pueden realizar microgeles de alginato con otro catión divalente. Por otro lado, en los microgeles de quitosano, el agente más utilizado para este fin es el tripolifosfato (TPP), polianión no tóxico que puede interactuar con el quitosano (polímero con carga positiva) mediante fuerzas electrostáticas para formar redes iónicas reticuladas (Meera G. y cols., 2006).

Las técnicas de microencapsulación automatizadas implementan tecnologías que permiten generar MGs con mayor rendimiento, menor diámetro y una distribución de tamaños más homogénea (Hassan N. y cols., 2014). En estos métodos, la solución polimérica se hace pasar por una boquilla de aspersion (nozzle) de un diámetro determinado. Se utiliza un sistema de vibración para permitir la aspersion de la solución en microgotas y un sistema de voltaje para evitar la coalescencia de éstas. Las gotas formadas son luego recolectadas en una fuente con la solución que contiene iones/moléculas con carga opuesta al polímero utilizado (Figura 4) (Koch S. y cols., 2003).

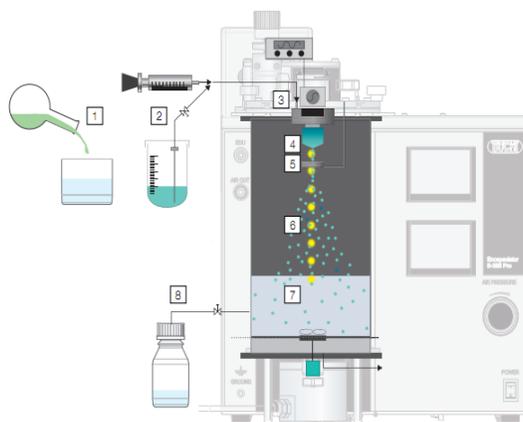


Figura 4. Representación esquemática de un encapsulador automatizado basado en el método de extrusión para la elaboración de MGs por gelación/complejación. Elementos principales del encapsulador 1) mecanismos de inyección para administrar el polímero (con o sin moléculas activas) a la boquilla de aspersion (nozzle), 2) dispositivo de vibración para permitir la aspersion de la solución polimérica 3) nozzle para la administración de la solución polimérica, 4) sistema de voltaje para crear gotas cargadas eléctricamente y prevenir su coalescencia, 5) luz estroboscópica para visualizar el ordenamiento y separación de las gotas, 6) recipiente contenedor de iones/moléculas de carga opuesta (al polímero inyectado) para permitir la gelificación/complejación de las de las gotas formadas, y 7) dispositivo colector (Hassan N. y cols., 2014).

1.4 Nanovehículos

La nanotecnología es una de las disciplinas que ha cobrado más auge en la actualidad, debido a las características físicas y químicas excepcionales que poseen los materiales a nanoescala. Estos nanomateriales pueden ser utilizados para la entrega de fármacos, debido a que poseen un tamaño similar a varias moléculas y estructuras biológicas, permitiendo una interacción efectiva con los sitios de interés.

Dentro de los nanomateriales con aplicaciones farmacéuticas podemos nombrar las nanopartículas (NPs). Estas nanoestructuras se pueden modificar para controlar sus propiedades fisicoquímicas (forma, tamaño, carga superficial, entre otras), además de atribuirles funciones terapéuticas y/o de diagnóstico (Müller R., 1991; Vlerken L. y cols., 2006). Por ejemplo, se pueden sintetizar nanopartículas con incorporación de fármacos, agentes que aumenten la penetración celular, agentes de marcaje, biopolímeros, etc. (Figura 5).

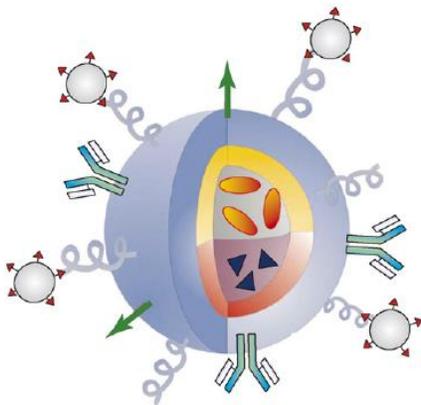


Figura 5. Nanopartícula multifuncional para la entrega de fármacos. Estos nanovehículos pueden ser modificados con fármacos, péptidos, polímeros, anticuerpos, etc. para realizar funciones terapéuticas y de diagnóstico en forma simultánea (Mahapatro A. y cols., 2011)

Existen diversos tipos de NPs que se han desarrollado para la entrega de fármacos. Entre estos, puede mencionarse las NPs formadas por polímeros, dendrímeros, metales o lípidos, que son efectivas para transportar drogas hacia diferentes sitios de acción.

1.4.1 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas metálicas (NPMs) como las de oro y plata tienen características únicas como la absorción de radiación electromagnética y la dispersión de la luz (Kreibig U. y Vollmer M., 1995). Al excitar estas partículas se produce una oscilación colectiva de sus electrones libres, lo que conduce a un campo eléctrico aumentado en forma local, efecto conocido como resonancia de plasmón superficial (RPS) (Figura 6). Esta propiedad les permite a las NPMs absorber energía al interactuar con un campo electromagnético, y posteriormente liberarla en forma local sin afectar otras células cercanas. Esta aplicación ha sido utilizada para la destrucción selectiva de agregados tóxicos de proteínas (Stefani M. y cols., 2003) y en terapias antineoplásicas (Berry C. y cols., 2003). La energía del RPS depende del tamaño, morfología, orientación espacial y constantes ópticas de las partículas (Kreibig U. y Vollmer M., 1995)

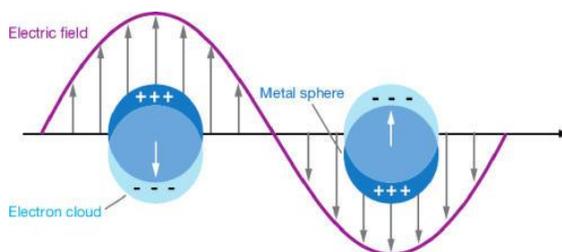


Figura 6. Representación esquemática de la RPS. La excitación colectiva de los electrones libres en una nanopartícula metálica produce un campo eléctrico aumentado cercano a su superficie (Willets K. y cols., 2007).

Las nanopartículas de oro (AuNPs) exhiben un gran potencial terapéutico para la entrega de fármacos, debido a que ellas (i) tienen una gran área superficial que les permite cargar drogas y/o aumentar la solubilidad y estabilidad de los fármacos cargados (Boisselier E. y Astruc D., 2009), (ii) pueden atravesar membranas y penetrar células por diferentes mecanismos (Shukla R. y cols., 2005) y (iii) se acumulan preferentemente en los sitios tumorales (efecto conocido como *enhanced permeability and retention effect*, EPR) (Maeda H., 2001). Las AuNPs pueden ser conjugadas con drogas mediante un grupo tiol que puede ser quimiabsorbido en la superficie de las AuNPs, formando un enlace estable S-Au (Boisselier E. y Astruc D., 2009). Por otro lado estas nanopartículas han sido utilizadas en terapia fototermal para la destrucción de células cancerígenas, en

terapia génica y para la entrega de fármacos (Figura 7) (Guerrero A. y cols., 2014; Chen J. y cols., 2010; Huschka R. y cols., 2012)

Una de las estrategias utilizadas para aumentar la estabilidad de las AuNPs es su funcionalización con péptidos que permitan modificar la carga superficial de la partícula y reducir sus interacciones biológicas con dianas no terapéuticas. Además la funcionalización puede permitir el reconocimiento específico de una diana terapéutica de interés. Se ha descrito que la funcionalización de las AuNPs con el péptido CLPFFD (péptido que reconoce agregados tóxicos de la proteína β -amiloides) resulta en un aumento de la estabilidad coloidal de las nanopartículas en relación a las sin conjugar (Guerrero S. y cols., 2010) (Figura 7).

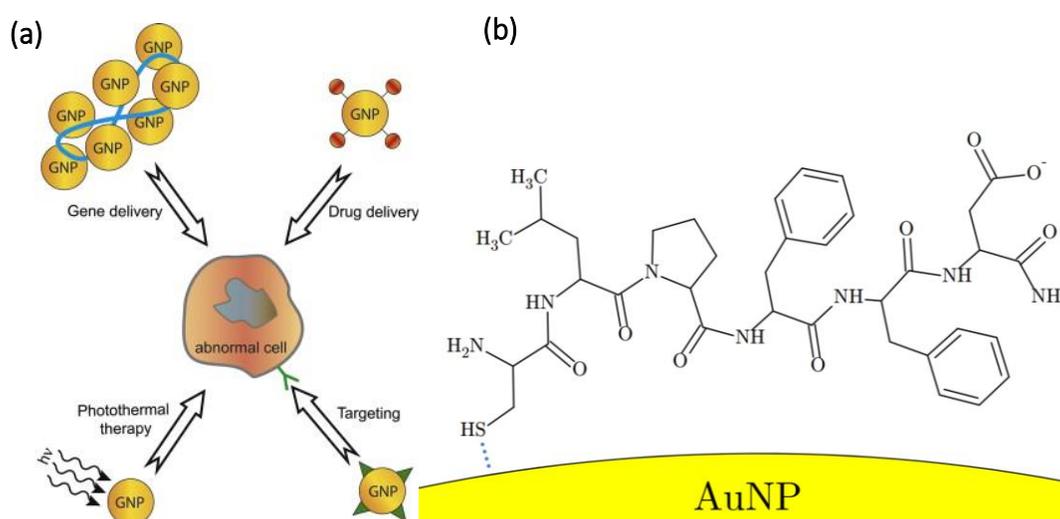


Figura 7. Potenciales aplicaciones de las AuNPs en la entrega de fármaco (Ghosh P. y cols., 2008) (a) y representación esquemática del péptido CLPFFD quimisorbido sobre la superficie de la AuNP (b).

Es importante tener en cuenta el aspecto toxicológico relacionado con el uso de nanopartículas. La toxicidad de las nanopartículas de oro es dependiente del tamaño y de la carga. En un interesante estudio llevado a cabo por Pan Y. y Neuss S., 2007 se demostró que la citotoxicidad de las AuNPs era dependiente preferentemente del tamaño. Las partículas de 1 a 2 nm fueron altamente tóxicas mientras que aquellas de 15 nm fueron significativamente menos tóxicas. Asimismo,

la carga es un factor importante, ya que nanopartículas con altos potenciales zeta positivos son muy citotóxicas (Goodman C. y cols., 2004).

Es de nuestro interés mencionar que las propiedades fototermales de las AuNPs han sido utilizadas para producir cambios reversibles en el volumen de vehículos poliméricos como nanogeles (Mallika D. y cols., 2007). Tales cambios se consiguen mediante la encapsulación de estas partículas al interior de los sistemas y su posterior excitación con estímulos electromagnéticos. Al irradiar las AuNPs, se produce un aumento de la temperatura en forma local, produciendo el hinchamiento de la matriz polimérica. Esta tecnología podría ser una herramienta promisoría para la entrega de fármacos desde microgeles, si el hinchamiento provocado promoviera la liberación de principios activos en la zona de interés.

1.4.2 Nanoemulsiones

Una de las grandes problemáticas en la entrega de fármacos es la administración de moléculas de baja solubilidad. Estos fármacos, aparte de ser más complejos de formular, normalmente poseen una baja llegada al sitio de acción, dificultando su uso en terapéutica (Anand P. y cols., 2007; Yang K. y cols., 2007).

Un ejemplo de esto es la curcumina, polifenol natural procedente de la cúrcuma, que ha mostrado tener actividad antioxidante, antiinflamatoria, anti- β -amiloide, anti-tumoral y propiedades quelantes de metales (Lim G. y cols., 2001; Yang F. y cols., 2005; Goel A. y cols., 2008) (Figura 8). Además, la curcumina es una molécula fluorescente que ha sido empleada para un potencial diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Ryu E. y cols., 2006). Sin embargo, estas propiedades se ven limitadas por la extremadamente baja solubilidad en agua del compuesto y por su corta vida media biológica, lo que se traduce en una baja biodisponibilidad en plasma y tejidos (Anand P. y cols., 2007; Yang K. y cols., 2007).

Una de las estrategias que pueden ser usadas para mejorar la administración de principios activos de baja solubilidad como la curcumina, es la utilización de vehículos de núcleo oleoso como las nanoemulsiones (NE) (Anuchapreeda S. y

cols., 2012). Estos sistemas tienen la ventaja de ser no tóxicos, y debido a su tamaño nanométrico podrían facilitar la llegada del principio activo a la zona de interés. Las NE son sistemas heterogéneos compuestos por una fase oleosa, que es dispersada en forma de gotas dentro de una fase acuosa y estabilizada mediante un agente emulsificante (Figura 8). Además, debido a la posibilidad de incorporar distintos componentes oleosos en la fase interna (también oleosa), son vehículos eficaces para transportar y proteger un gran número de compuestos con actividad biológica (Subhashis D. y cols., 2010).

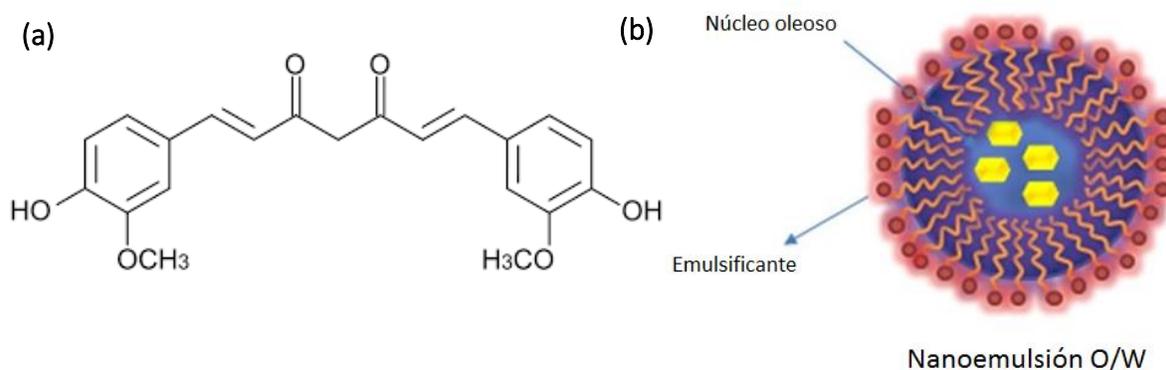


Figura 8. Estructura molecular de la curcumina (a) y modelo esquemático de una nanoemulsión, en que se observan las moléculas hidrofóbicas (en amarillo), que son estabilizadas por agentes emulsificantes (rojo) (b).

Debido al potencial terapéutico que presenta la curcumina, y a su facilidad para ser visualizada por fluorescencia, en este proyecto se propone estabilizarla en nanoemulsiones. El objetivo de esta tesis es la incorporación de nanopartículas de oro modificadas superficialmente y nanoemulsiones cargadas con curcumina en microvehículos compuestos por biopolímeros y desarrollados mediante tecnología automatizada. Lo que se busca es demostrar que la estimulación externa (irradiación) de las AuNPs permite, mediante calor local, promover la liberación de la curcumina contenida en los microgeles.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Nanopartículas de oro funcionalizadas con el péptido CLPFFD encapsuladas en microgeles permiten la liberación controlada de curcumina por irradiación con láser.

2.2 Objetivo general

Encapsular nanopartículas de oro funcionalizadas con el péptido CLPFFD y curcumina en microgeles y producir la liberación de esta última mediante irradiación con láser.

2.3 Objetivos específicos

Desarrollar y caracterizar los nanosistemas AuNPs y aquellos modificados con el péptido seleccionado (AuNPs-CLPFFD) y modificados con rodamina (AuNPs-R-CLPFFD).

Desarrollar y caracterizar los nanosistemas de núcleo oleoso cargados con curcumina (NeCur).

Diseñar, desarrollar y caracterizar microgeles compuestos por alginato o quitosano utilizando equipamiento automatizado y escalable.

Analizar la mucoadhesividad de las formulaciones de microgeles seleccionadas.

Desarrollar y caracterizar los microgeles conteniendo ambos tipos de nanosistemas.

Controlar la liberación de las NeCur desde los microgeles mediante el efecto plasmón de las AuNPs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Desarrollo y caracterización de los nanosistemas AuNPs y aquellos modificados con el péptido seleccionado (AuNPs-CLPFFD) y con rodamina (AuNPs-R-CLPFFD)

3.1.1. Síntesis de las secuencias CLPFFD, rodamina-CLPFFD (R-CLPFFD)

La síntesis de los péptidos CLPFFD y su conjugado fluorescente con rodamina (R-CLPFFD), se llevó a cabo mediante la estrategia de síntesis en fase sólida (Dirscherl G. y cols., 2007). Todos los aminoácidos utilizados fueron protegidos con Fmoc (Fmoc-aminoácido) y se utilizó como soporte polimérico la resina MBHA AM Fmoc Rink amida (Iris Biotech GmbH).

Las reacciones de acoplamiento de cada aminoácido (aa) se llevaron a cabo con Fmoc-aminoácido (Iris Biotech GmbH), los cuales fueron secuencialmente agregados a la resina y disueltos en 1 mL de dimetilformamida (DMF), dejándose reaccionar por 60 minutos. Luego de verificar que el acoplamiento del aa correspondiente fue realizado de forma efectiva, se continuó con la desprotección correspondiente utilizando piperidina-DMF al 20%. Una vez desprotegido se realiza el acoplamiento con el siguiente Fmoc-aminoácido. Los lavados entre desprotección, acoplamientos de aa y los subsecuentes pasos de desprotección, se llevaron a cabo con DMF (3 veces x 1 minuto) y CH₂Cl₂ (3 veces x 1 minuto), usando 5 mL de solvente por cada lavado (Dirscherl G. y cols., 2007).

Finalmente una vez acoplados todos los aminoácidos, se agregó la solución de clivaje (TFA 95%:H₂O 2,5%:TIS 2,5%) (TFA:Aldrich. Pureza 99%, P.M. 114,02; TIS: Fluka. Pureza 98%. P.M. 158,36) sobre la resina y se dejó reaccionar por 60 minutos para producir la escisión del péptido desde la resina. Luego de evaporar el solvente con un rotavapor, fueron realizadas sucesivas precipitaciones con ter-butilmetil-eter (Fluka. Pureza 99%. P.M. 88,15) y subsecuentes centrifugaciones. Se eliminó el éter por evaporación con un flujo de nitrógeno gaseoso (N₂). Luego el péptido obtenido se resuspendió en una mezcla acetonitrilo:H₂O (1:1) (acetonitrilo

(ACN):Merck. Pureza grado HPLC. P.M. 41,05). Posteriormente se procedió a congelar y a liofilizar.

3.1.2. Caracterización de los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD

Los péptidos sintetizados fueron enviados al laboratorio de unidad de masa (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile) para su caracterización por espectroscopia de masa. Para la obtención de espectros, los péptidos se mezclaron con la matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) preparada a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% v/v 1:1) y se depositó 2 μ L de cada mezcla en una placa porta muestra micro scout (Bruker Daltonics Inc., MA-USA).

La adquisición de espectros de masas se realizó en un equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ión positivo mediante detección por reflexión. Previo a la obtención de los espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de péptidos (Bruker Daltonics Inc., MA-USA). Para el control del espectrómetro se utilizó el programa flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Los espectros finales corresponden a la suma de 10 barridos de 30 impactos de láser (300 impactos de láser en total) aplicados en diferentes puntos tomados al azar de cada muestra depositada en la placa porta muestra.

Adicionalmente, el péptido R-CLPFFD fue caracterizado por espectroscopía en rango ultra violeta y visible (UV-vis), utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV. Previamente 1 mg del péptido se disolvió en 1 mL de DMF. Posteriormente 100 μ L de la solución resultante se diluyeron en 900 μ L de agua y finalmente se midió la absorbancia en una cubeta de plástico de 1 cm.

3.1.3. Síntesis de AuNPs

Las AuNPs se prepararon por reducción de una sal de oro (HAuCl_4) con citrato de sodio, de acuerdo con el protocolo descrito por Levy R. y cols., 2004. Para esto, una solución de 100 mL de HAuCl_4 1 mM (Aldrich, pureza 99,9%, P.M. 339,79)

se colocó en un balón de dos cuellos de 250 ml. El balón se dejó sobre una manta calefactora y se calentó a reflujo constante por unos 5 a 10 minutos.

Posteriormente se agregó rápidamente por el cuello lateral del balón, la solución de citrato de sodio dihidratado 38,8 mM, calentada previamente por baño maría a 50 – 60 °C. La mezcla se dejó con agitación constante, manteniendo el reflujo por 30 minutos exactos desde que se agrega el citrato. La solución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente las AuNPs obtenidas fueron filtradas con un filtro de PVDF de 0,45 µm y almacenadas a 4 °C.

3.1.4. Conjugación de AuNPs a los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD

Con el fin de estabilizar las AuNPs y reducir su toxicidad, éstas fueron conjugadas al péptido CLPFFD y R-CLPFFD. Los conjugados AuNPs-péptido se obtuvieron empleando protocolos descritos por Levy R. y cols., 2004. Previamente se colocaron 20 mL de las AuNPs a conjugar en un vaso de precipitado con agitador magnético. El coloide se llevó a pH 8 con NaOH 0,2 M con el fin de estabilizar las AuNP y prevenir la precipitación durante el proceso de conjugación. Se pesó 1 mg del péptido R-CLPFFD y se disolvió en 1 mL de DMF.

Para la conjugación se añadió 1 mg del péptido (CLPFFD o solución de R-CLPFFD en DMF) a la solución que contenía las AuNPs y se mantuvo el coloide bajo agitación constante durante 24 horas. Luego de transcurrido el tiempo, con el fin de eliminar todo el péptido libre, el coloide resultante fue depositado dentro de una membrana de diálisis (Spectrum Lab de diámetro 32mm, MWCO 6.000-8.000). La muestra fue dializada por 3 días utilizando dos litros de una solución de citrato de sodio dihidratado 1,2 mM para sumergir la membrana. La diálisis se realizó a temperatura ambiente manteniendo la bolsa sumergida bajo agitación constante. La solución de citrato fue cambiada cada 24 horas hasta que finalizó la diálisis. Todo el proceso fue realizado protegiendo continuamente la solución de la luz.

3.1.5. Caracterización de las AuNPs y sus conjugados AuNP-CLPFFD y AuNP-R-CLPFFD

Para observar la banda correspondiente al plasmón de las AuNPs y sus conjugados, se realizó su caracterización por espectroscopía UV-vis. Un volumen aproximado de 500 μL de cada muestra fue traspasado a una cubeta plástica de 1 cm y posteriormente analizado en el espectrofotómetro de doble haz, Perkin Elmer modelo Lambda 25 UV. Por cada muestra se realizó un mínimo de 3 análisis, utilizando como blanco una solución de citrato de sodio dihidratado 1,2 mM.

Posteriormente, se determinó el diámetro hidrodinámico y la estabilidad coloidal de las nanopartículas por dispersión dinámica de la luz (DLS), utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern). Se colocaron 500 μL de cada muestra en cubetas plásticas de 1 cm. Por cada muestra se realizaron como mínimo 3 mediciones. Los resultados muestran el promedio de todas las mediciones, indicando la distribución de tamaños (índice de polidispersión, PDI) y el diámetro hidrodinámico promedio (nm).

Con el fin de determinar la carga de repulsión/atracción aparente entre los nanosistemas utilizados, se determinó el potencial zeta de las AuNPs, AuNP-CLPFFD y AuNP-R-CLPFFD, utilizando el Zetasizer Nano ZS. Para ello, se colocó una cantidad aproximada de 800 μL de muestra en cubetas plásticas de 1 cm. Para cada muestra se tomaron al menos 6 mediciones. Cada resultado se indica en términos del valor promedio de las mediciones, expresado en términos de carga aparente superficial.

Para poder observar la morfología y dispersión de las partículas, se realizó un análisis por microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las AuNPs sintetizadas. Previamente se depositó una gota de 20 μL de la muestra sobre una rejilla de cobre de 200 mesh recubierta con el polímero formvar que se dejó secar por al menos 1 hora. La muestra se observó en un microscopio Inspect F50 (FEI) empleando una aceleración de los electrones desde 120keV utilizando el modo STEM.

3.2. Desarrollo y caracterización de los nanosistemas de núcleo oleoso cargados con curcumina (NeCur)

3.2.1. Síntesis de NeCur

Con el fin de vehiculizar la curcumina se realizó su inclusión en el núcleo oleoso de nanoemulsiones. Para ello 5 mg de curcumina (Sigma, C1386-10G) fueron colocados en un vial, al cual se le adicionaron 30 mg de lecitina. La mezcla resultante se disolvió en 500 μ L de EtOH y se agitó en un vortex hasta la completa disolución de la lecitina. Posteriormente se le añadieron 125 μ L de miglyol y se volvió a agitar. A la solución obtenida se le agregaron 9,5 mL de acetona y rápidamente fue traspasada a un vaso precipitado con 20 mL de agua en agitación. Finalmente el solvente de la mezcla se evaporó utilizando un rotavapor (R-210, Büchi) con baño termoregulado (B-491, Büchi) y bomba de vacío (V-700, Büchi). Las nanoemulsiones de curcumina (NeCur) resultantes fueron almacenadas a 4 °C hasta su posterior caracterización.

3.2.2. Caracterización de las NeCur

Se identificó el diámetro hidrodinámico, el índice de polidispersión y el potencial zeta de NeCur utilizando el Zetasizer Nano ZS (Malvern). Aproximadamente 500 μ L de NeCur fueron diluidas en agua Mili-Q utilizando un factor de dilución 2. Las NeCur fueron posteriormente traspasadas a cubetas plásticas de potencial zeta de 1 cm. Posteriormente se realizaron 3 mediciones para determinar el diámetro hidrodinámico y la estabilidad coloidal. Finalmente se realizaron otras 6 mediciones para determinar el potencial zeta de las nanoemulsiones.

3.3. Diseño, desarrollo y caracterización de microgeles compuestos por alginato o quitosano utilizando equipamiento automatizado y escalable

3.3.1 Diseño y desarrollo de microgeles

En esta tesis se generaron microgeles mediante el método de *dripping*. Se prepararon microgeles compuestos de alginato, mediante la aspersion del alginato sobre una solución de cloruro de calcio. Además se elaboraron microgeles de quitosano, mediante el goteo de este polímero sobre una solución tripolifosfato de sodio (TPP). Para ambos casos, los microgeles fueron generados de manera automatizada utilizando un microencapsulador (Büchi B-395 Pro).

Para la elaboración de MGs de alginato, se utilizó alginato de viscosidad media (A2033, Sigma) y baja viscosidad (A2158, Sigma). Previamente se prepararon soluciones de alginato de concentración 1,5, 1 y 0,5%. El polímero correspondiente fue añadido a una jeringa de plástico de 60 mL, cuya boquilla se conecta al microencapsulador, el que cuenta con una boquilla de un diámetro específico (nozzle) por la cual finalmente difunde la solución. Las variables utilizadas para la formación de los MGs se muestran en la Tabla 2 en la sección de resultados. Finalmente las gotas generadas se dejan caer sobre una solución en agitación de cloruro de calcio al 2%. Adicionalmente se elaboraron microgeles al 1,5% de alginato de viscosidad media bajo las condiciones indicadas en la Tabla 3. Los microsistemas obtenidos fueron guardados a 4 °C hasta su próxima utilización.

Para la elaboración de MGs de quitosano, se utilizó quitosano de viscosidad baja (Sigma, MKBD3830, 75-85% deacetilación, 50-190 KDa). Se prepararon soluciones de quitosano al 2%. El polímero fue posteriormente traspasado a una jeringa plástica de 60 mL e inyectado al microencapsulador. Finalmente las gotas generadas se depositaron en una solución de TPP al 1% y los microsistemas obtenidos fueron guardados a 4 °C hasta su posterior caracterización. Los parámetros utilizados se encuentran en la Tabla 4 de la sección resultados.

3.3.2. Caracterización de los microgeles desarrollados

Con el fin de evaluar y comparar el diámetro de los microsistemas obtenidos, los microgeles fueron evaluados utilizando un analizador de tamaño de partículas por difracción láser (Mastersizer x, Malvern Instruments). Se tomaron aproximadamente 40 mL de los microgeles seleccionados, los cuales se encontraban en medio de CaCl₂ al 2%. La suspensión de MGs fue traspasada al dispositivo colector de muestra del equipo y analizada por difracción láser, realizándose un total de 40 mediciones por muestra. Mediante esta técnica pudieron ser analizados los MGs cuyos diámetros se encontraban en el rango entre 10 y 600 μm.

Para observar la morfología y distribución de los microsistemas, se utilizó un microscopio óptico Olympus CKX41 (Arquimed). Para esto, se añadió una pequeña muestra de microsistemas a un portaobjetos, y se observó en el microscopio utilizando principalmente el aumento 4x. Para determinar el tamaño mediante esta técnica, se registró el diámetro de 40 microgeles, utilizando el software Micrometrics SE Premium, y luego se calculó un valor promedio los sistemas. Finalmente con los diámetros registrados se calcula la amplitud de distribución de tamaño de las 40 mediciones realizadas a cada muestra de acuerdo a la fórmula $(D90-D10)/D50$.

3.4. Evaluación de la mucoadhesividad de los microgeles seleccionados

Con el fin de comparar la capacidad mucoadhesiva de los microgeles, se realizó un ensayo de interacción con mucina. Para ello, se tomaron 5 mL de un concentrado de microgeles de alginato o quitosano en suspensión, los cuales fueron agregados a tubos falcón de 50 mL. Posteriormente los microsistemas fueron mezclados con una solución de mucina (Sigma, mucina de estómago de porcino tipo III, unida a ácido siálico 0,5-1,5%, SLBG1065V) de concentración 0,25 mg/mL dejándose interaccionar por 12 horas. Finalmente los MGs fueron caracterizados por microscopía óptica (Olympus CKX41, Arquimed) y difracción láser (Mastersizer x, Malvern Instruments) bajo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Adicionalmente, se realizó un análisis de texturometría, para evaluar la fuerza y el trabajo de desprendimiento de los microsistemas luego de haber interactuado con una solución de mucina al 30%. Para ello se utilizó un texturómetro (Ametek Lloyd TA1). Los microgeles en solución fueron previamente liofilizados con el fin de tener exactamente la misma cantidad de muestra para cada repetición del ensayo. Cada liofilizado de micropartículas fue depositada sobre el cuño superior de teflón (diámetro 8 mm) utilizando cinta adhesiva (cinta de doble contacto, 3M) hasta cubrirlo de forma completa.

Posteriormente, la muestra se humectó con 15 μ L de agua destilada, y se esperó 1 minuto, antes de ponerla en contacto con la capa de mucina. El tiempo de contacto con la capa de mucina fue de 3 minutos, y al finalizar, se procede al desprendimiento de la muestra con una velocidad de 1 mm/seg, durante 20 mm. Cada ensayo se realizó en sextuplicado, se pesaron $4,1 \pm 2$ mg de microgeles de alginato y 3 ± 2 mg de quitosano, cantidades necesarias para que cada muestra cubriera el cuño del texturómetro por completo. Los ensayos se realizaron a una temperatura entre 20-25 °C.

3.5. Desarrollo y caracterización de microgeles con inclusión de nanosistemas

3.5.1 Preparación de microgeles con inclusión de nanosistemas

La incorporación de las partículas de tamaño nanométrico en los microsistemas fue llevada a cabo a través de la mezcla física de los nanosistemas con la fase polimérica (alginato) que se usó para la preparación de los microgeles. Así se generaron MGs conteniendo AuNPs, MGs conteniendo NeCur y MGs conteniendo AuNPs y NeCur.

Adicionalmente se decidió incorporar nanopartículas de oro en forma de varillas (nanovarillas de oro, NvO) las cuales fueron otorgadas por Carolina Velasco y Francisco Morales del laboratorio de nanobiotecnología (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile)

Para la incorporación de AuNP-CLPFFD, AuNP-R-CLPFFD y NvO en los sistemas, se prepararon 4 mL de una solución de alginato de viscosidad media al 3%, la cual fue mezclada con la ayuda de un agitador magnético con 4 mL de la suspensión de nanopartículas correspondiente (para obtener una concentración de alginato al 1,5%), hasta obtener una mezcla de aspecto homogéneo. La mezcla física obtenida fue traspasada a una jeringa de 10 mL, que posteriormente fue inyectada en el microencapsulador. Las microgotas obtenidas fueron luego depositadas sobre la solución de CaCl₂ al 2%. Los microgeles generados fueron almacenados a 4 °C hasta su posterior caracterización.

Para la incorporación de las NeCur se prepararon 7,6 mL de alginato de viscosidad media al 1,58%, los cuales fueron mezclados con 400 µL de nanoemulsiones (para obtener una concentración de alginato al 1,5%) y se mantuvo en agitación hasta lograr una mezcla de apariencia homogénea. Posteriormente se inyectó la solución al microencapsulador y se depositaron las gotas sobre una solución de CaCl₂ 2%. Los microgeles generados fueron almacenados a 4 °C hasta su posterior caracterización.

Para la incorporación simultánea de NeCur y AuNP-R-CLPFFD, se prepararon 3,6 mL de una solución de alginato al 3,3%. A la solución resultante se le agregaron 4 mL de las nanopartículas AuNP-R-CLPFFD, manteniéndose en agitación constante. Una vez homogénea se procedió a agregar 400 µL de nanoemulsiones (para obtener una concentración de alginato al 1,5%), manteniendo la agitación hasta obtener una mezcla totalmente homogénea. Finalmente, se inyectó la solución y se realizó su aspersion sobre la solución de CaCl₂. Los microgeles generados fueron almacenados a 4 °C hasta su posterior caracterización.

Para todas las formulaciones mencionadas se utilizaron los mismos parámetros de encapsulación, utilizando un nozzle de 120 µm, una frecuencia de 1400 Hz, un flujo de 2,4 mL/min y un campo eléctrico de 2200 V.

3.5.2. Caracterización de nanosistemas contenidos en microgeles.

Una vez que los microsistemas son elaborados de forma automatizada, se realizó una observación visual de los MGs para verificar su formación. Se utiliza como parámetro el color de los microgeles, ya que adoptan el tono característico de los nanosistemas incorporados. Posteriormente se realizó la caracterización por microscopía confocal y difracción laser, para observar diferencias en la morfología, tamaño y dispersión. Para esto se realizó la misma metodología mencionada para los microgeles sin nanosistemas (ver punto 3.3.2).

Con el fin de visualizar si la morfología de los microgeles después de liofilizar es alterada por la presencia de nanosistemas, los microsistemas fueron analizados por microscopía electrónica de barrido (SEM). Previamente estos fueron liofilizados (FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System, Labconco) hasta la completa eliminación de agua y recubiertos con oro (marca y tiempo de recubrimiento). Posteriormente, los sistemas fueron montados en el equipo y analizados por SEM utilizando el microscopio Inspect F50 (FEI).

Con el fin de dilucidar la distribución de los nanosistemas contenidos en los microgeles, los microsistemas conteniendo AuNP-R-CLPFFD y NeCur fueron analizados en el microscopio confocal Zeiss, LSM 700. Para este ensayo se depositó una gota de microsistemas conteniendo los nanosistemas de interés en un portaobjetos y posteriormente se dejaron secar en oscuridad total por 12 horas. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por microscopía confocal, utilizando las longitudes de onda de 405 nm para las NeCur y 555 nm para las AuNP-R-CLPFFD. Estos sistemas fueron analizados en distintos planos focales y finalmente usando el software ZEN fueron reconstruidas las imágenes para observar la distribución y colocalización de los sistemas.

3.6. Evaluación de la liberación de las NeCur desde los microgeles mediante el efecto plasmón de las AuNPs

Con el fin de evaluar la liberación de las NeCur desde los microgeles, se sometió a los sistemas a un ambiente de temperatura y agitación. Para ello se utilizó

un agitador mecánico (Thermomixer comfort, Eppendorf) para someter a los sistemas a 80 °C y 1000 revoluciones por minuto (rpm). El ensayo se realizó para microsistemas en suspensión y liofilizados. En el caso de los sistemas en suspensión, se tomaron 150 µL de microgeles y se vertieron sobre tubos Eppendorf® de 1,5 mL, mientras que para los liofilizados se pesaron 4 mg de microgeles y se resuspendieron en 150 µL de agua. Posteriormente, los microgeles fueron trasladados al agitador en donde se sometieron a la temperatura y agitación mencionadas durante 60 minutos. Durante el ensayo, se tomaron muestras de 20 µL del sobrenadante a los 5, 15, 30 y 60 minutos y luego se analizó la liberación de NeCur por fluorescencia utilizando un espectrofluorímetro (Perkin Elmer Luminicence Espectroscope LS50B).

Con el fin de evaluar si la liberación de las NeCur se ve influenciada por el efecto plasmón de las AuNPs, los MGs conteniendo ambos nanosistemas fueron irradiados. Se utilizó un láser de 532 nm (LDCU5/9020, Powertechology, INC) para excitar las AuNPs, con el fin que estas disipen la energía en forma de temperatura en los microgeles, y que ello promueva la liberación de las demás moléculas contenidas en su interior. Los ensayos se realizaron con microsistemas en solución y liofilizados.

Para los microsistemas en solución se vertieron 150 µL de concentrado de microgeles sobre una cubeta de cuarzo, mientras que en el caso de los liofilizados se pesó exactamente 4 mg de microgeles, los cuales fueron depositados sobre la cubeta y luego resuspendidos en 150 µL de agua. La cubeta de cuarzo fue instalada en un cuarto con oscuridad total, en donde posteriormente fue irradiada en la zona que estaban los microsistemas por un total de una hora. Finalizando el ensayo se tomaron 20 µL del sobrenadante que se diluyeron en 210 µL de agua. La solución resultante se depositó en una microplaca y se midió su fluorescencia con un espectrofluorímetro (Perkin Elmer Luminicence Espectroscope LS50B). Este ensayo se realizó también en microgeles conteniendo NvO utilizando un láser de 808 nm (IQ1A350, Powertechology, INC) utilizando el mismo procedimiento que para las AuNPs.

Para medir la liberación a distintos tiempos, se tomaron 150 μL de una suspensión concentrada de microgeles, los cuales fueron depositados sobre una cubeta de plástico de 1 cm. De la misma forma anterior se procedió a irradiar la zona donde se encontraban depositados los microgeles. Se tomaron alícuotas de 20 μL del sobrenadante a los 5, 15, 30 y 60 minutos. Cada vez que se tomó una alícuota, el volumen fue repuesto con 20 μL de solución de CaCl_2 al 2%. Cada alícuota se disolvió en 210 μL de agua y fue analizada por fluorescencia de la misma forma anterior. Para todos los ensayos de liberación se utilizó como control microgeles con inclusión de NeCur sin AuNPs.

4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

4.1. Síntesis y caracterización de los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD

Los péptidos se sintetizaron en fase sólida siguiendo un esquema Fmoc/tBu. Los mismos fueron caracterizados por espectrometría de masas MALDI-TOF obteniéndose los peaks correspondientes a los iones quasimoleculares (Anexos, Figura A1)

4.1.1. Elaboración y caracterización de nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan un gran potencial para aplicaciones en *drug delivery*, por sus propiedades excepcionales relacionadas con su tamaño nanométrico y sus propiedades metálicas que se mencionaron en la sección 1.4.1. En este proyecto se propone utilizar la capacidad que tienen estas partículas para liberar energía en forma local luego de ser excitadas y así promover la liberación de nanoemulsiones que contienen la curcumina desde un microsistema.

La síntesis de las AuNPs fue llevada a cabo por el método de Levy R. y cols., 2004 de acuerdo al protocolo descrito en la sección 3.1.2. Se utilizó como estrategia para mejorar la estabilidad de estas partículas su funcionalización con el péptido CLPFFD. La funcionalización se realiza a través de un proceso de quimisorción del azufre contenido en la cisteína sobre el oro. Este péptido ha mostrado mejorar la estabilidad coloidal de las AuNPs y es de interés farmacológico debido a que posee afinidad por los agregados tóxicos de la proteína β -amiloide involucrados en la enfermedad de Alzheimer (Guerrero S. y cols., 2010). Además las partículas de oro fueron conjugadas con el péptido R-CLPFFD, el cual corresponde al péptido CLPFFD unido a una molécula de rodamina. La rodamina es una molécula fluorescente, lo que hace a este péptido útil para marcar las nanopartículas y facilitar posteriormente su identificación por fluorescencia dentro de los microsistemas por microscopía.

Las AuNPs y sus conjugados con los péptidos CLPFFD (AuNP-CLPFFD) y R-CLPFFD (AuNP-R-CLPFFD) presentaron un color rojizo, el cual es característico

de las nanopartículas de oro en suspensión (Figura 9a). Estas partículas fueron caracterizadas por DLS, obteniendo un diámetro de alrededor de 20 nm para las AuNPs sin conjugar y un diámetro de ~22 y ~27 nm para las conjugadas a los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD respectivamente (Tabla 1, Figura A2). El aumento de tamaño observado al conjugar las AuNPs, nos puede servir como indicador de la presencia de los péptidos quemisorbidos sobre la superficie de las nanopartículas.

Para evaluar la carga superficial de los nanosistemas, se midió el potencial zeta de las partículas sintetizadas. Como resultado se puede observar que todas las partículas tienen valores de potencial zeta negativos (Tabla 1, Figura A3). Esto se debe a que el citrato utilizado en el proceso de síntesis se adsorbe en la superficie de la nanopartícula, contrarrestando las cargas superficiales positivas de algunos átomos de oro presentes y dejando finalmente a estas partículas con carga negativa (Li G. y cols., 2003). Además, se observa que las AuNPs conjugadas con los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD presentan valores menos negativos que las sin conjugar (Tabla 1). Esta diferencia se explica porque al conjugar las AuNPs con los péptidos, al menos una molécula de citrato es desplazada por una de péptido, lo que provoca que el potencial zeta aumente debido a la pérdida del citrato adsorbido. Es importante mencionar que una molécula de citrato contiene tres cargas negativas a pH=7 mientras que una de péptido contiene solo una.

Nanosistema	Tamaño (nm)	Polidispersión	Potencial Zeta (mV)
AuNP	21 (± 1)	0,39 ($\pm 0,02$)	-48 (± 2)
AuNP-CLPFFD	23 (± 1)	0,30 ($\pm 0,02$)	-40 (± 1)
AuNP-R-CLPFFD	27 (± 1)	0,39 ($\pm 0,01$)	-42 (± 1)

Tabla 1. Caracterización de los nanosistemas desarrollados por tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta.

Las AuNPs sin conjugar presentaron, además, una longitud de absorción máxima cercana a los 520 nm, al ser analizadas por espectrofotometría UV-vis

(Figura 9b). Este valor de longitud de onda es característico de las AuNPs de tamaños entre 10 y 20 nm y se relaciona con el plasmón de resonancia de la partícula (Daniel M. y Astruc D., 2004). Al conjugar estas partículas con los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD se puede observar un leve desplazamiento del máximo de absorción (Figura 9b). Este desplazamiento se relaciona con un cambio en el índice de refracción de las nanopartículas, debido a la modificación en la superficie metálica por el reemplazo de moléculas de citrato por moléculas de péptido (Kelly K. y cols., 2003).

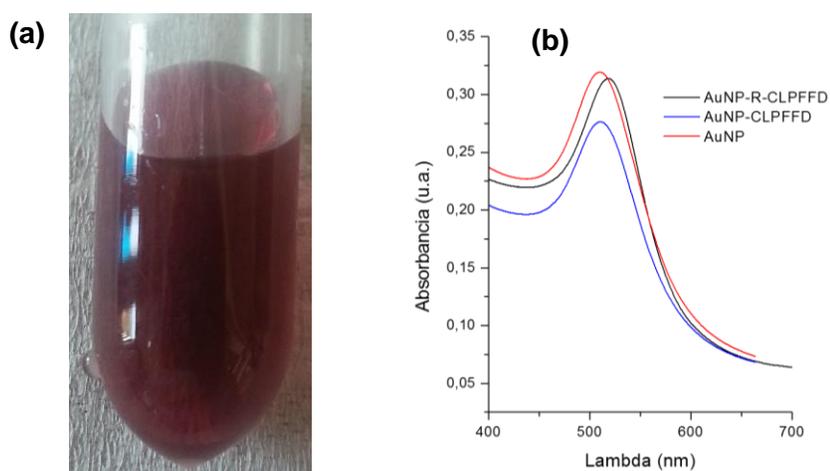


Figura 9. Imagen de nanopartículas de oro generadas en esta investigación (a) y espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs y sus conjugados con CLPFFD, R-CLPFFD (b).

Las AuNPs generadas fueron caracterizadas adicionalmente por TEM para analizar visualmente su distribución de tamaño y morfología. Podemos observar en la Figura 10 nanopartículas con un diámetro promedio de aproximadamente 13 nm, las cuales presentan un tamaño homogéneo y baja agregación. Es interesante observar que los tamaños obtenidos por DLS (Tabla 3, Figura A2) son mayores que los obtenidos por TEM (Figura 10). Este fenómeno se explica porque en la técnica DLS el diámetro medido de la partícula se conoce como hidrodinámico y considera la capa de hidratación y la presencia de iones adherida a la superficie de la partícula. El diámetro hidrodinámico suele ser superior al diámetro que se mide por TEM que no considera esta capa de agua.

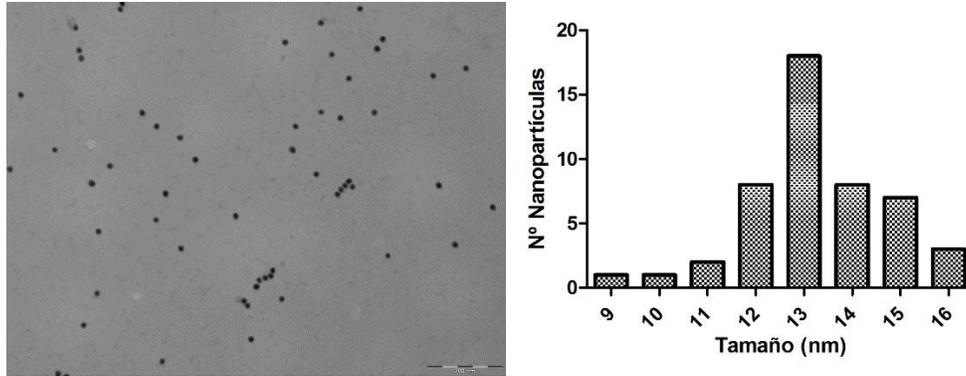


Figura 10. TEM, donde se observan AuNPs de 13 nm de diámetro (se incluye un histograma para indicar la dispersión de tamaño). La escala es de 200 nm.

4.2. Desarrollo y caracterización de NeCur

La curcumina es una molécula que posee una amplia actividad biológica y que además tiene propiedades que la hacen atractiva para su encapsulación en microgeles, como su color característico y su fluorescencia. Estas propiedades, podrían facilitar la visualización de la curcumina al interior de los microsistemas y permitir su cuantificación por fluorescencia al ser liberada desde estos. Esta molécula, sin embargo, posee una baja solubilidad lo cual limita su potencial terapéutico y su encapsulación en matrices acuosas como los microgeles. Para superar este problema se propone la vehiculización de la curcumina utilizando sistemas de tamaño nanométrico donde puedan ser encapsuladas y estabilizadas en medio acuoso.

Debido a que la curcumina es una molécula liposoluble, se realiza su vehiculización en un sistema de núcleo oleoso utilizando el método de desplazamiento de solvente obteniendo así nanoemulsiones de núcleo oleoso. A partir de este método, se obtienen nanoemulsiones de curcumina (NeCur) en suspensión de color amarillento (Figura 11a).

Las NeCur fueron caracterizadas por DLS presentando un tamaño promedio de 202 (± 7) nm y un índice de polidispersión de 0,16 ($\pm 0,07$) (Figura A4, Anexos). El potencial zeta obtenido para la formulación es de -77 (± 2) mV, este valor negativo se debe a la lecitina utilizada en la síntesis, la cual actúa como emulgente y le da

carga negativa a la formulación (Figura 11b). La carga superficial obtenida nos sirve de indicador de una alta repulsión entre las nanoemulsiones generadas, lo que confiere estabilidad electrostática y además es un factor importante al momento de microencapsular como se verá más adelante. Estos resultados nos indican que el método utilizado es apto para generar nanoemulsiones de forma reproducible, de tamaño nanométrico, con carga superficial negativa y bajos índices de polidispersión.

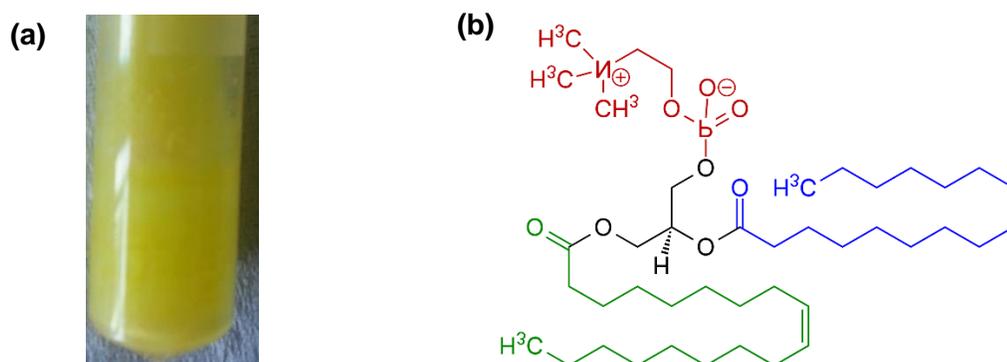


Figura 11. Imagen de nanoemulsiones con curcumina generadas en esta investigación (a) y estructura molecular de la lecitina (b)

4.3. Desarrollo y caracterización de microgeles

De acuerdo con lo propuesto, debemos desarrollar sistemas capaces de encapsular los nanosistemas seleccionados para protegerlos del medio ambiente externo y promover su liberación controlada. Los microgeles (MGs) son una alternativa atractiva para lograr este fin, debido a que además de proteger y promover la estabilidad de los compuestos encapsulados, pueden promover la entrega de fármacos por estímulos externos como cambios de temperatura (ver sección 1.3). Adicionalmente, dependiendo de las características del polímero utilizado en su formación, pueden promover una mejor interacción con las mucosas de interés mejorando así la entrega de fármaco en el sitio de acción farmacológica.

Debido a la necesidad de contar con un método que permita generar microgeles de distinta composición (alginato o quitosano) con bajos índices de polidispersión y altamente reproducibles, se utilizó un sistema automatizado de encapsulación. La utilización de un microencapsulador permite manejar una serie

de variables que van a influir en la morfología y dispersión de tamaño de los MGs generados (Hassan N. y cols., 2014). Además nos permite generar rápidamente una gran cantidad de microsistemas en condiciones de esterilidad, lo que facilitaría un escalamiento a nivel industrial.

En esta investigación se utilizó un microencapsulador similar al del esquema mostrado en la Figura 4. Como se menciona en este esquema, para formar los sistemas de forma automatizada se debe inyectar el polímero, el cual va a pasar por una boquilla de diámetro determinado (nozzle) y finalmente caer sobre la solución contraión correspondiente bajo condiciones previamente seleccionadas. El tamaño de los sistemas va estar dado en gran medida por el diámetro de la boquilla seleccionada, sin embargo, existen otras variables que pueden ser modificadas para controlar la formación de los microgeles.

Es por esto que se trabajó con microgeles blanco (sin inclusión de nanosistemas), para estudiar cómo las variables de concentración de polímero, flujo, frecuencia vibracional y voltaje influyen en la formación de los microgeles. En una primera etapa, se modificaron estos parámetros para la obtención de un goteo continuo que llamaremos flujo lineal (Figura 12a) o la obtención de un goteo en cual se produce la separación de la gota que nombraremos como flujo atomizado (Figura 12b). La diferencia entre estos flujos está en su mayoría condicionada por el voltaje aplicado, pero como se observa en la Tabla 2 también influye el resto de las variables.

Los microgeles formados fueron caracterizados por microscopia óptica y difracción láser para evaluar su tamaño, morfología y polidispersión. Podemos observar que los sistemas formados al 1,5% de alginato se observan más estables y con una morfología más homogénea y menos dispersa que los formados al 0,5% (Figura 13). Además, el tamaño de estos sistemas tiende a disminuir a medida que disminuye la concentración de polímero utilizado (Figura 14)

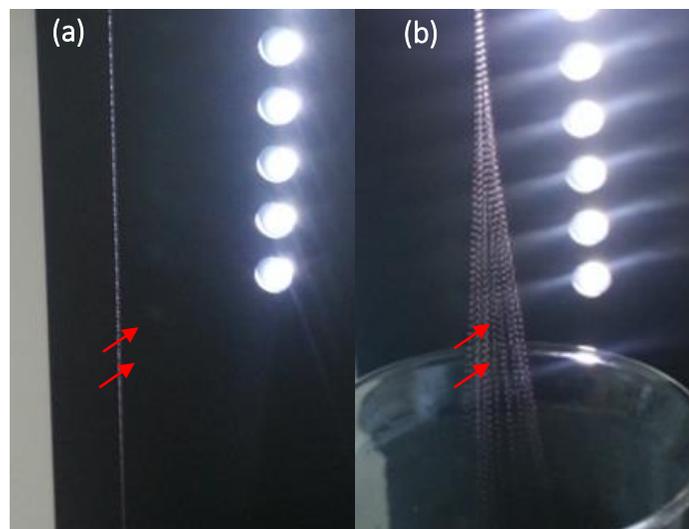


Figura 12. Tipos de goteo generados por el microencapsulador. A voltajes bajos la gota cae de forma continua (flujo lineal) (a). A medida que aumenta el voltaje se produce la separación de la gota debido a una repulsión electrostática entre las partículas (flujo atomizado) (b).

Nozzle (μm)	Goteo	Alginato [1,5%]			Alginato [1,0%]			Alginato [0,5%]		
		Frecuencia (Hz)	Voltaje (V)	Flujo (mL/min)	Frecuencia (Hz)	Voltaje (v)	Flujo (mL/min)	Frecuencia (Hz)	Voltaje (V)	Flujo (mL/min)
80	L	650	0	1,1	200	0	1,1	300	0	0,91
	A	1400	2000	1,4	1400	600	1,7	1400	570	1,81
120	L	600	1000	2,7	200	1000	2	900	1000	2,17
	A	1200	2200	2,5	2200	600	2,2	1000	600	2,1
150	L	800	1500	5	900	400	2,8	700	250	3
	A	1700	2500	3,6	2100	1400	4	2500	920	4
200	L	500	2200	6	800	400	3,5	800	550	3,9
	A	1400	2200	5	1400	900	4,5	2700	750	4,5

Tabla 2. Condiciones utilizadas para la obtención microgeles mediante la utilización de un flujo lineal (L) o atomizado (A).

Esta diferencia se puede explicar porque a mayores concentraciones de polímero, existe una mayor cantidad de moléculas de alginato que pueden interactuar con los átomos de Ca^{+2} en el proceso de gelación, generando un sistema más estable (ver Figura 1). Al utilizar mayores concentraciones de alginato (>2,0%), el polímero se hace muy viscoso, lo que complica su salida por las boquillas más pequeñas (nozzle 80 μm y 120 μm). Por otro lado, a la menor concentración de polímero utilizada (0,5%), se observa coalescencia entre algunos sistemas y la aparición de microgeles deformes (ver Figura 13, flechas negras).

De las figuras 13 y 14 podemos apreciar también que los MGs formados por un goteo lineal presentan un tamaño mayor a los formados por un goteo atomizado. Como mencionamos anteriormente, este proceso está directamente relacionado con el campo eléctrico generado al aplicar el voltaje (ver Figura 4). A mayor voltaje aplicado, existe una mayor repulsión electrostática entre las gotas, previniendo la coalescencia de éstas. Por este motivo las gotas formadas por un flujo atomizado tienden a ser de menor tamaño, con morfologías más uniformes y menos polidispersas que las formadas por un flujo lineal (Figuras 13 y 14).

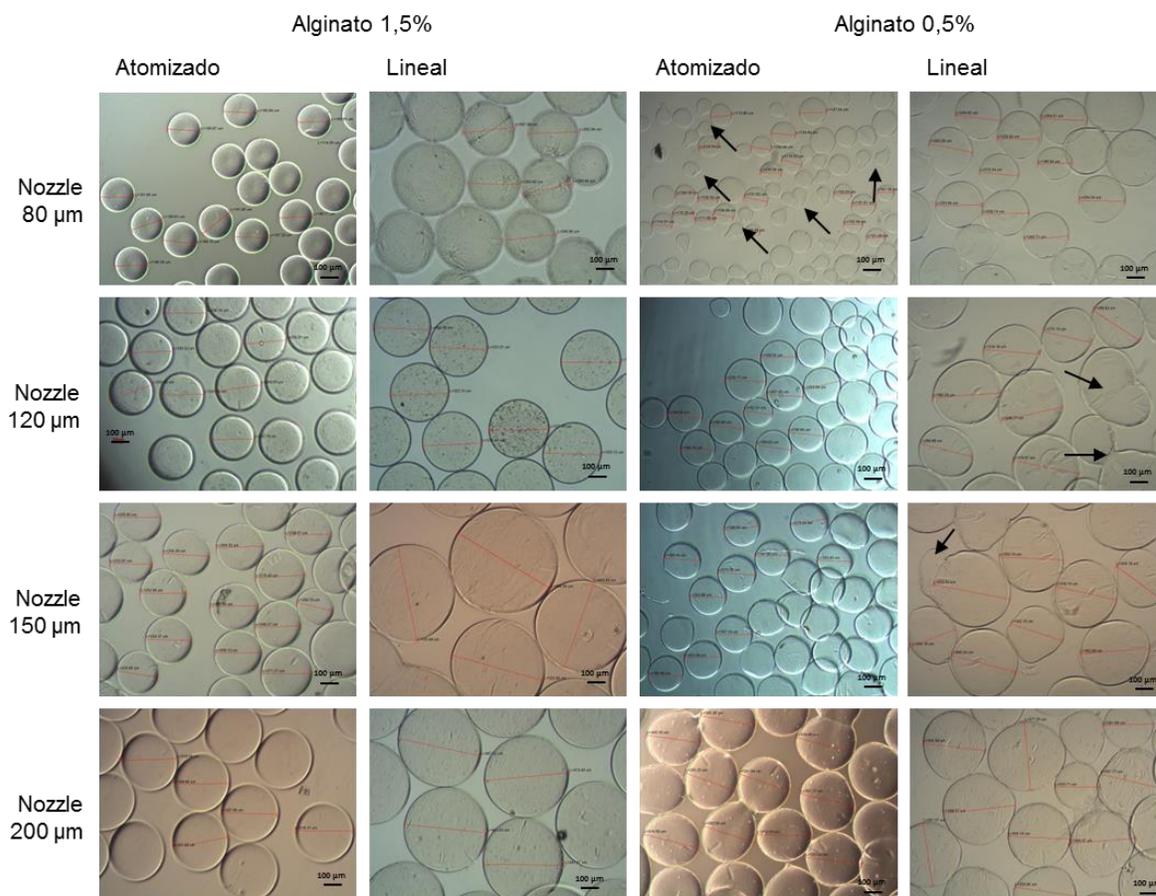


Figura 13. Influencia del tipo de goteo lineal y atomizado, y de la concentración del polímero sobre el diámetro final de los microsistemas, utilizando nozzle de 80, 120, 150 y 200 μm . Las flechas negras indican microgeles formados incompletamente. La escala es de 100 μm .

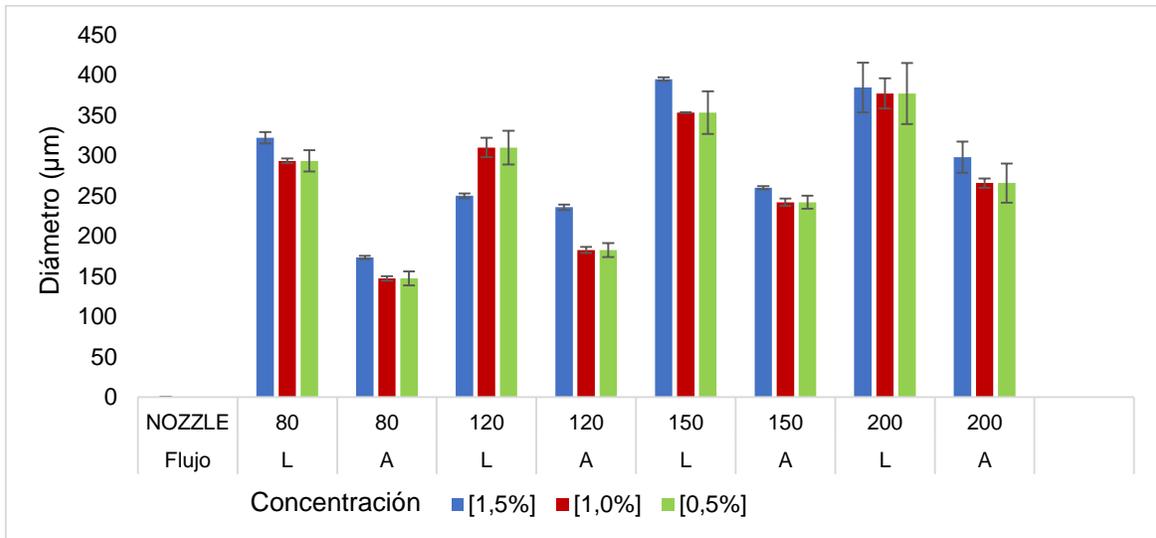


Figura 14. Influencia del tipo de goteo lineal (L) y atomizado (A) y de la concentración del polímero (1.5, 1.0 y 0.5%) sobre el diámetro final de los microsistemas, utilizando nozzle de 80, 120, 150 y 200 µm.

Luego de caracterizar los sistemas de acuerdo a la concentración del polímero y tipo de goteo, se estudió cómo la frecuencia y la velocidad de flujo influyen en el diámetro obtenido. Los parámetros utilizados se encuentran en la siguiente tabla:

Nozzle (um)	Frecuencia (Hz)	Velocidad (m/seg)
80, 150, 300	1400	3, 4, 5 ,6
80, 200, 450	200, 1800, 3000, 4500, 6000	3,58

Tabla 3. Variables utilizadas para estudiar la influencia de la frecuencia y velocidad de flujo en la elaboración de microgeles de alginato.

De acuerdo con la Figura 15, es posible observar que a medida que se aumenta la frecuencia, el diámetro disminuye, mientras que al aumentar la velocidad de flujo, el tamaño aumenta. Estos resultados se explican porque las vibraciones producidas por la frecuencia aplicada permiten el rompimiento del polímero, resultando en la obtención de gotas más pequeñas. Por otro lado, una mayor velocidad de flujo significa un mayor volumen de polímero utilizado para la formación de la gota.

Es importante considerar que utilizar una boquilla de mayor diámetro implica la utilización de más reactivo inyectado, lo que resulta en gotas de mayor tamaño y por lo tanto microgeles de mayor diámetro. En estos tamaños, se hace más difícil producir la atomización de la solución de aspersión, lo que resulta en un aumento de la coalescencia de las gotas. Esto por lo general resulta en una mayor polidispersión de los microsistemas. Además, diámetros superiores dificultan su caracterización por microscopía óptica debido a que el sistema no puede verse completamente por el lente más pequeño (4x). Por este motivo no se caracterizaron microgeles con boquillas superiores a las de 450 μm .

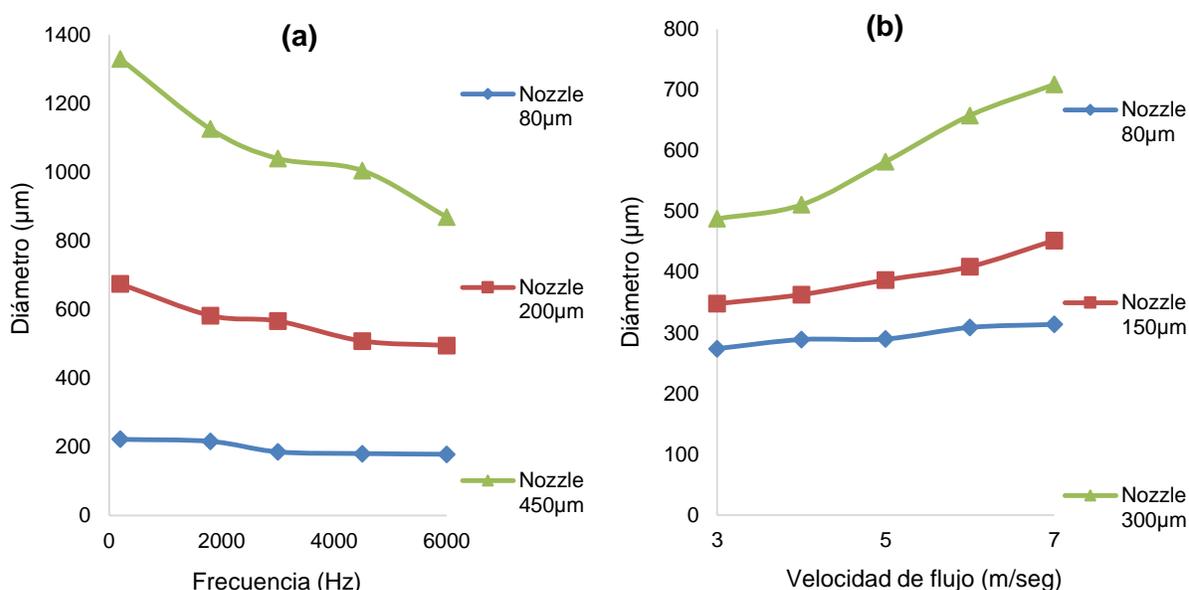


Figura 15. Influencia del tamaño de boquilla de aspersión (nozzle), y las variables: (a) frecuencia (Hz) y (b) velocidad de flujo (m/seg) sobre el diámetro final de los microsistemas.

De acuerdo a la experiencia obtenida con los microgeles de alginato, decidimos utilizar condiciones similares para obtener microgeles de quitosano de tamaños similares a los obtenidos utilizando alginato al 1,5%. Se escogieron los nozzle de 120 y 200 μm como boquillas y un quitosano de bajo peso molecular al 2%. Como parámetros de encapsulación se utilizó un flujo atomizado y las condiciones mencionadas en la Tabla 4.

Nozzle (μm)	Quitosano [2,0%]		
	Frecuencia (Hz)	Voltaje (v)	Flujo (mL/min)
120	1400	700	2,7
200	1400	1400	3,5

Tabla 4. Parámetros utilizados para la obtención de microgeles de quitosano.

Los microgeles de quitosano-TPP formados presentaron un tamaño promedio de $224 (\pm 6) \mu\text{m}$ para el nozzle de $120 \mu\text{m}$ y $332 (\pm 7) \mu\text{m}$ para el nozzle de $200 \mu\text{m}$, mostrando físicamente un color más oscuro y una dispersión de tamaño ligeramente mayor a la de los microgeles de alginato (Figura 16).

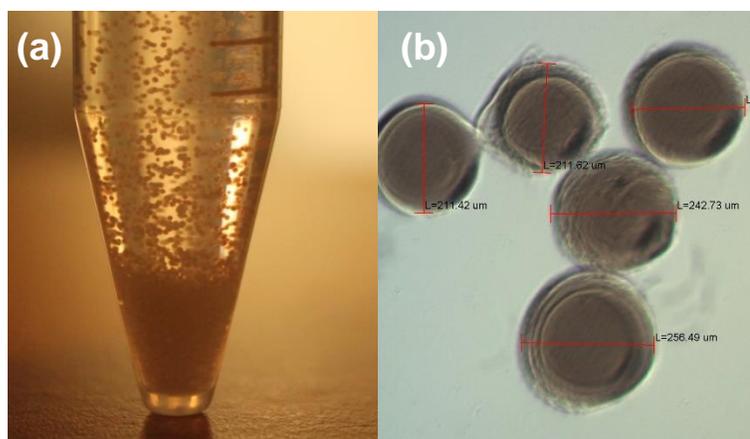


Figura 16. Microgeles de quitosano en solución de TPP, observados a simple vista (a) y por microscopía óptica (b).

4.4. Caracterización de la mucoadhesividad

Hemos mencionado anteriormente que tanto el polímero alginato como el quitosano, son conocidos por sus características mucoadhesivas, estas propiedades podrían ayudar a mejorar la entrega de fármacos desde los microgeles al permitir un mayor tiempo de interacción en el sitio de interés. Para comparar las propiedades mucoadhesivas de los microgeles de alginato y quitosano, se realizó un ensayo de interacción con mucina. En este ensayo, los microgeles seleccionados se dejan interaccionar con una solución de mucina y posteriormente se evalúa la adsorción de la mucina en el sistema midiendo el aumento del diámetro. Los microgeles seleccionados para el ensayo fueron los de alginato y quitosano

generados con los nozzle de 120 y 200 μm bajo un flujo atomizado y las siguientes condiciones de elaboración:

Nozzle (μm)	Quitosano [2,0%]			Alginato [1,5%]		
	Frecuencia (Hz)	Voltaje (V)	Flujo (mL/min)	Frecuencia (Hz)	Voltaje (V)	Flujo (mL/min)
120	1400	700	2,7	1200	2200	2,5
200	1400	1400	3,5	1400	2200	5

Tabla 5. Condiciones seleccionadas para comparar la mucoadhesión de microgeles de alginato y quitosano utilizado un flujo atomizado.

Podemos observar en la Tabla 6 que luego de interaccionar con la solución de mucina, el diámetro de los MGs de alginato aumentó de un diámetro promedio de 228 μm a 246 μm (18 μm de aumento) y de 319 a 354 μm (35 μm de aumento). Por otro lado los MGs de quitosano presentaron un aumento de tamaño más significativo de 224 a 297 μm (73 μm de aumento) y de 332 a 403 (71 μm de aumento). Este cambio de tamaño se podría relacionar con la adsorción de mucina en la superficie de los MGs. En las imágenes de microscopía óptica, se puede visualizar que este aumento de tamaño es muy notorio en los MGs de quitosano, en donde es posible identificar la formación de una posible corona de mucina en su superficie (Figura 17).

De acuerdo a estos resultados, el quitosano presenta una mayor afinidad con la mucina que el alginato. Esto se podría relacionar con que algunos componentes como las glicoproteínas, presentes en la capa de *mucus*, tienen carga negativa en su superficie, lo que puede generar una mayor fuerza de atracción electrostática con moléculas cargadas positivamente como el quitosano y favorecer el contacto íntimo con la capa de mucosa. El alginato, en cambio, presenta carga negativa, por lo que no se favorece por este tipo de interacción, sin embargo, este polímero puede generar interacciones de tipo puentes de hidrógeno con las mucosas, lo que podría explicar el aumento de tamaño observado (Tabla 6).

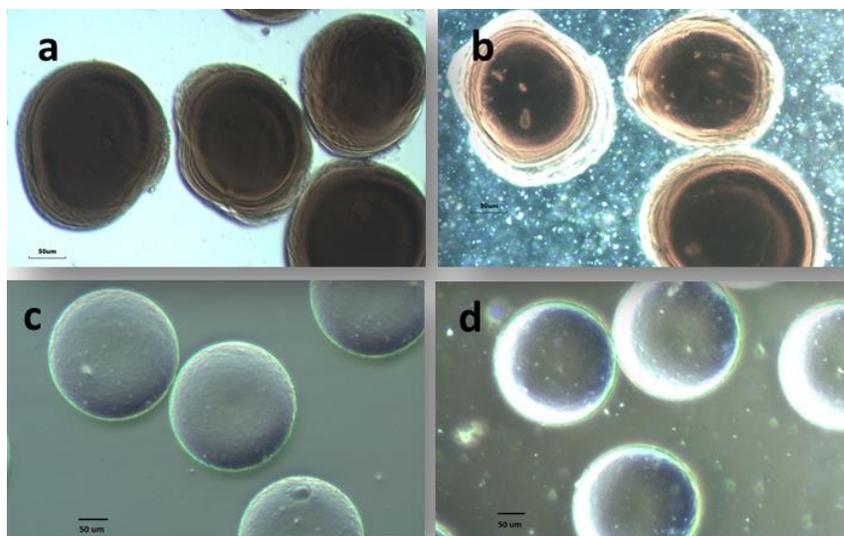


Figura 17. Imágenes de microscopía óptica de MGs de quitosano, (a) sin interacción y (b) luego de interaccionar con solución de mucina. MGs de alginato sin interacción (c) y luego de interaccionar con solución de mucina (d). La escala es de 50 μm .

Composición microgeles	Tamaño sin mucina (μm)	Tamaño con mucina (μm)
Alginato	228 (± 2)	246 (± 4)
Quitosano	224 (± 3)	297 (± 4)
Alginato	319 (± 3)	354 (± 4)
Quitosano	332 (± 4)	403 (± 6)

Tabla 6. Tamaño de MGs de alginato y quitosano, evaluado sin y con la presencia de mucina en solución (0.25 mg/mL). El tamaño fue evaluado por dispersión de luz dinámica (DLS).

Adicionalmente, se realizó un segundo experimento para evaluar la bioadhesión de microgeles liofilizados utilizando un texturómetro. En este ensayo los microgeles liofilizados se dejan interaccionar con una capa de mucina al 30% por un tiempo determinado. Posteriormente se mide la fuerza y el trabajo que deben ser aplicados para desprender a los sistemas de la mucina (Figura 18).

Como podemos observar en la Figura 19, la fuerza máxima obtenida y el trabajo de desprendimiento que deben ser aplicados para desprender a los microgeles de quitosano son, en ambos casos, superiores a los del alginato. Estos resultados avalan a los obtenidos en el ensayo anterior y nos permiten concluir que los MGs desarrollados de quitosano tienen una mayor bioadhesión que los de alginato.

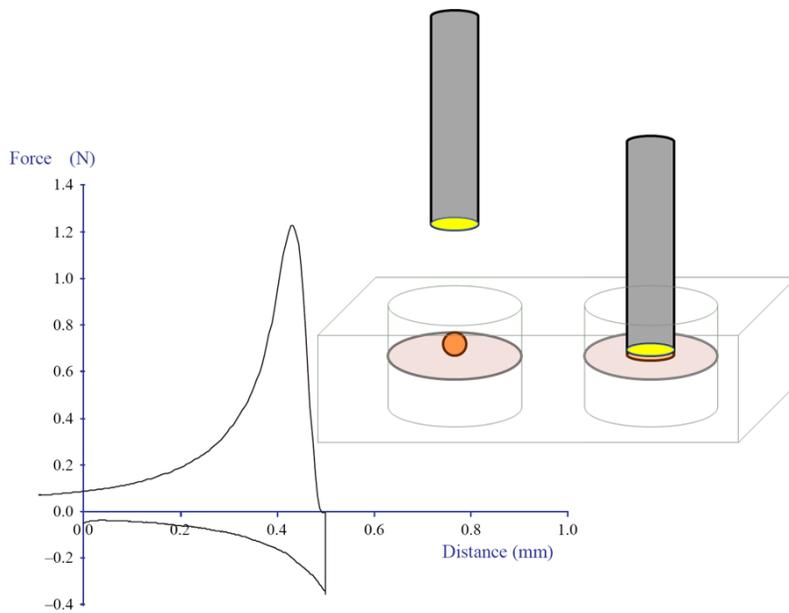


Figura 18. Ensayo de interacción con mucina. Los microgeles ubicados en la parte superior del cuño (amarillo) se dejan interaccionar con una capa de mucina (naranja) por un tiempo determinado. La mucoadhesión se establece graficando fuerza vs distancia al momento de desprender los microgeles de la mucina. Se utilizan como parámetros de medición la fuerza máxima (fuerza de mucoadhesión) y el área bajo la curva (trabajo de mucoadhesión).

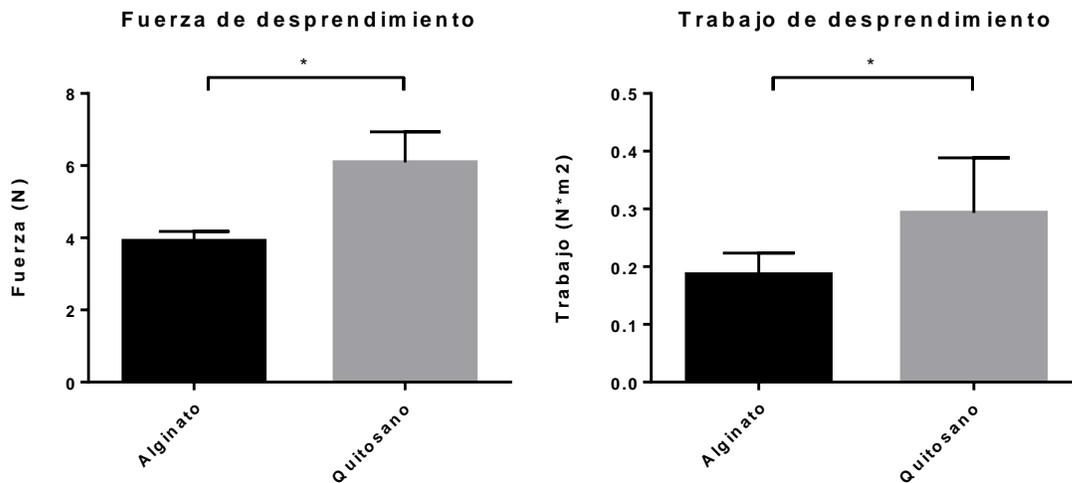


Figura 19. Trabajo y fuerza de desprendimiento obtenida por texturometría al analizar MGs de alginato y quitosano liofilizados. Para ambos casos, se determinó un nivel de significancia de $p < 0,05$ (Unpaired T test, dos colas)

4.5. Desarrollo y caracterización de microgeles con inclusión de nanosistemas

Un punto importante para esta investigación, es incluir los nanosistemas en los microgeles desarrollados. La estrategia utilizada para lograr este objetivo fue realizar una mezcla física de los nanosistemas con el polímero y posteriormente inyectarla en el microencapsulador de la misma forma que se realizó con los microgeles anteriormente desarrollados.

Para que el sistema obtenido sea estable, es importante que los nanosistemas utilizados no interaccionen entre ellos, ni alteren la formación del microgel. Bajo este concepto, se decidió utilizar, solamente, los microgeles de alginato, ya que este polímero tiene carga negativa al igual que las AuNPs y NeCur. Debido a que el quitosano tiene carga positiva, podría existir una fuerza de atracción electrostática entre este polímero y los nanosistemas, esta interacción podría alterar la formación del microgel y la estabilidad de los sistemas.

Se utilizaron como condiciones de elaboración, un nozzle de 120 μm con un flujo atomizado, una frecuencia de 1200 Hz, un voltaje de 2200 V y un flujo de 2,5 mL/min. Los microsistemas generados mantuvieron el tamaño y la morfología de los microgeles en ausencia de nanopartículas (Figura 20, Tabla 7). Además, los MGs formados adoptaron el color característico de las dispersiones coloidales utilizadas (NeCur, AuNP-R-CLPFFD y AuNP-R-CLPFFD + NeCur) indicándonos a simple vista que la incorporación de los sistemas se realizó de forma efectiva (Figura 20). El color observado es estable y se distribuye en forma pareja en los microgeles, lo que es indicativo de que los nanosistemas se distribuyeron de forma homogénea. La presencia de los nanosistemas no pudo ser corroborada por microscopía óptica debido a los límites de resolución, sin embargo, se puede apreciar por esta técnica que los microgeles presentan una morfología similar a la presente en ausencia de nanosistemas (Figura 21).

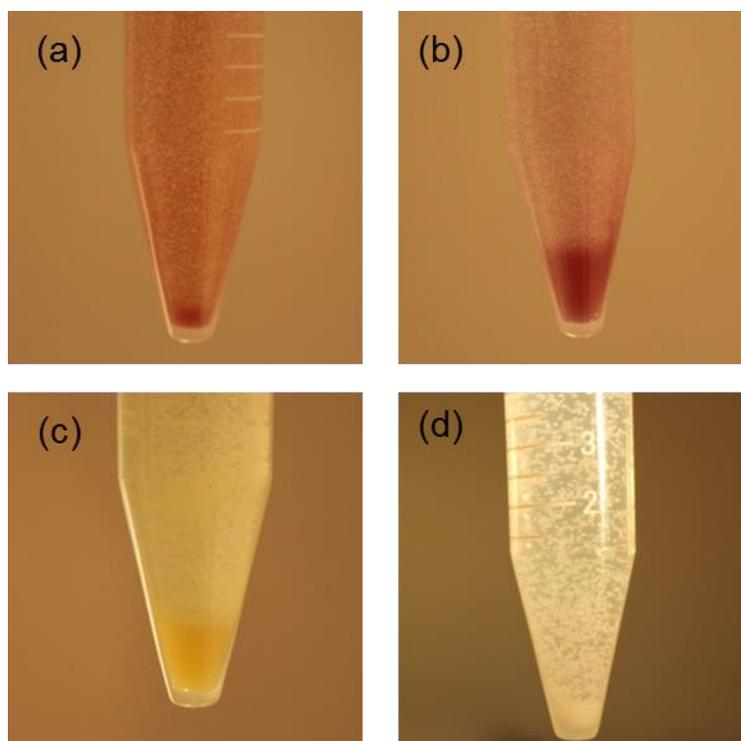


Figura 20. Imagen representativa de MGs conteniendo AuNP-R-CLPFFD + NeCur (a), AuNP-R-CLPFFD (b), NeCur (c) y sin nanosistemas (d).

Microgeles	Diámetro
Sin nanosistemas	230 (± 3)
AuNP-CLPFFD	228 (± 2)
AuNP-R-CLPFFD + NeCur	232 (± 4)
NeCur	232 (± 4)

Tabla 7. Diámetro hidrodinámico de los microsistemas generados en esta investigación.

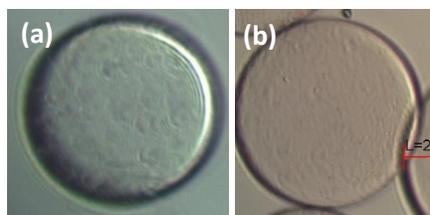


Figura 21. Imagen representativa de microgeles obtenidos sin inclusión de nanosistemas (a) y con nanosistemas (b).

Los microsistemas fueron posteriormente analizados por microscopía confocal, con el fin de identificar la distribución de los nanosistemas contenidos en su interior. Las muestras se dejaron secar para permitir su fijación a un portabjetos y posteriormente fueron excitadas a 555 nm para la visualización de la rodamina unida a las AuNP-R-CLPFFD y a 404 nm para las NeCur. Para la visualización de ambos nanomateriales de forma simultánea se excitó simultáneamente a 404 y 555 nm.

De la Figura 22 podemos identificar la presencia de las AuNPs (rojo) y las NeCur (amarillo), observándose su distribución alrededor de todo el sistema. Existen zonas donde se puede apreciar una mayor acumulación de las partículas, sin embargo, debemos considerar que esto puede deberse a una agregación producida al momento de realizar el secado de la muestra y la posterior fijación al portaobjetos. Además, el secado de los sistemas provoca que los microsistemas que eran originalmente de aproximadamente 230 μm , se observen de un tamaño bastante inferior debido a la pérdida de agua.

Con el fin de corroborar que los nanosistemas se distribuyen homogéneamente alrededor de todo el sistema, se realizaron cortes de 15 μm en el eje z. Posteriormente se realizó una reconstrucción, sumando los cortes y eliminando las interferencias para observar si existe colocalización entre los sistemas (Figuras 23 y 24). Podemos apreciar la presencia de los nanosistemas en todos los cortes, lo que nos permite tener una mayor seguridad de que estas nanopartículas se distribuyen homogéneamente en todo el microgel (Figura 23). Además, si observamos la sumatoria de las señales en los ejes x, y, z (Figura 24b) no se observa una colocalización de los sistemas, lo que podría estar indicándonos que la presencia de un sistema no afecta al otro. El hecho de que ambas partículas no coexistan en un mismo lugar es importante ya que estos sistemas podrían interactuar y alterar su estabilidad, formando agregados que dificultarían la liberación de los nanosistemas desde el microgel.

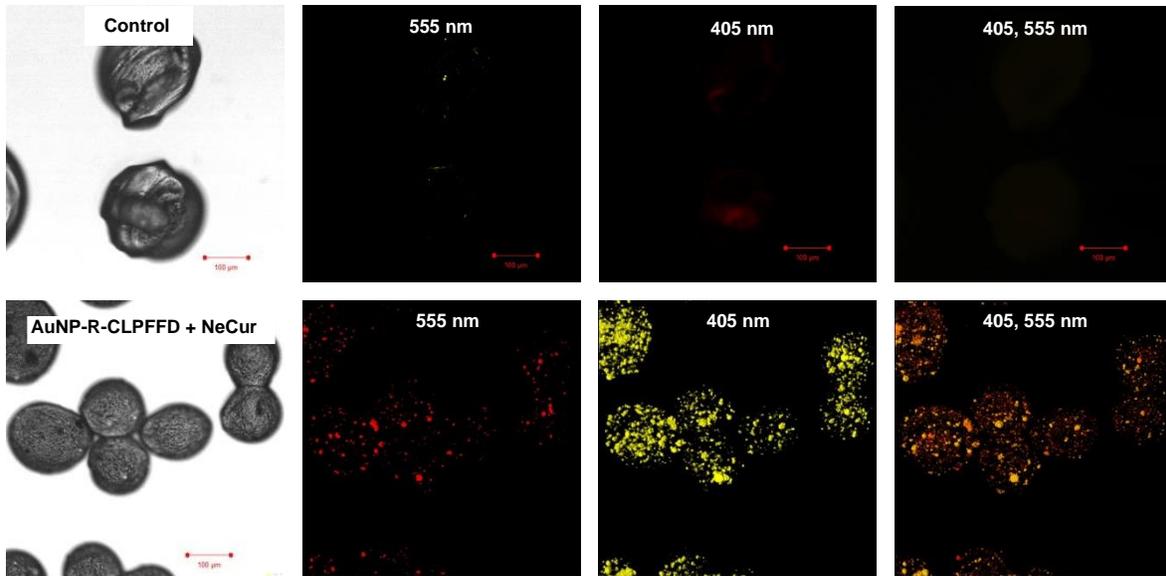


Figura 22. Imagen de microscopía confocal de MGs de alginato conteniendo AuNP-R-CLPFFD y NeCur excitados a 405 nm amarillo, 555 nm (rojo) y ambas 405, 555 nm (rojo, amarillo). La escala es de 100 µm.

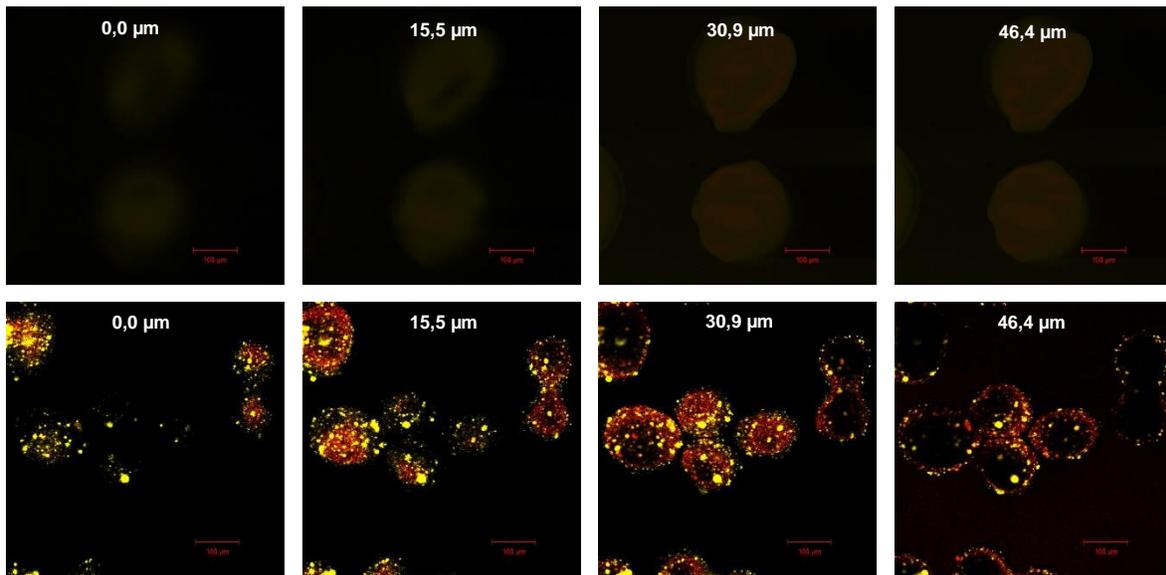


Figura 23. Imagen de microscopía confocal en distintos planos focales de MGs conteniendo AuNP-R-CLPFFD y NeCur. La escala es de 100 µm.

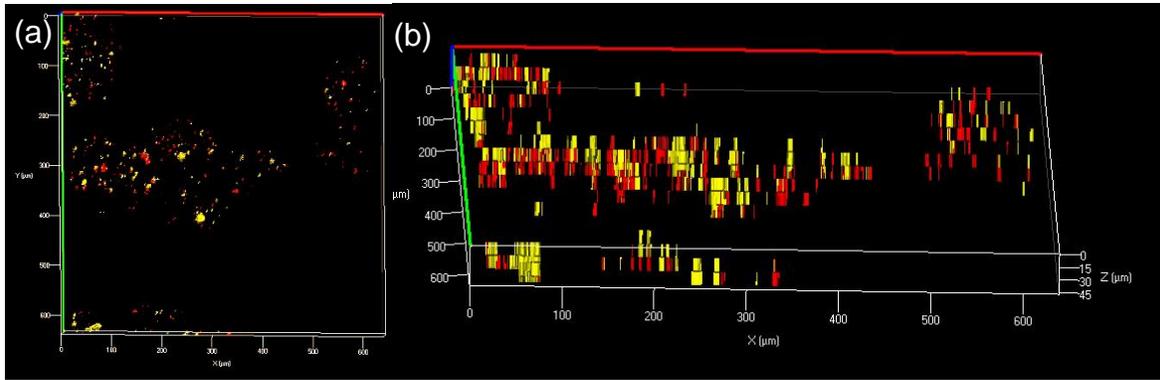


Figura 24. Imagen confocal reconstruida según los cortes en el eje z. Se observa la imagen inicial (2D) (a) y su visualización en los planos x, y, z (b).

Los resultados obtenidos, nos indican que la metodología utilizada para realizar la inclusión de los nanosistemas en los microgeles es adecuada, ya que nos permite obtener una distribución homogénea de los nanosistemas al interior sin observarse interacciones entre ellos. Además se mantienen las características de los microgeles blancos y nos permiten identificar rápidamente su inclusión por el color presentado.

Adicionalmente, los microsistemas fueron liofilizados y se observó por microscopía electrónica de barrido (SEM) si la presencia de las nanopartículas produce cambios importantes en su morfología. Las imágenes de SEM muestran estructuras de tamaño homogéneo, más bien esferoides, en cuya superficie se aprecian socavones irregulares (Figura 25). Estos socavones pueden representar canales por los cuales se eliminó el agua (sublimación) durante el proceso de liofilización (previo al montaje de la muestra para SEM). Una interesante excepción la constituyen los MGs de alginato que contienen NeCur y nanopartículas de oro, los que no presentan estos socavones y que poseen una superficie más regular (Figura 25d).

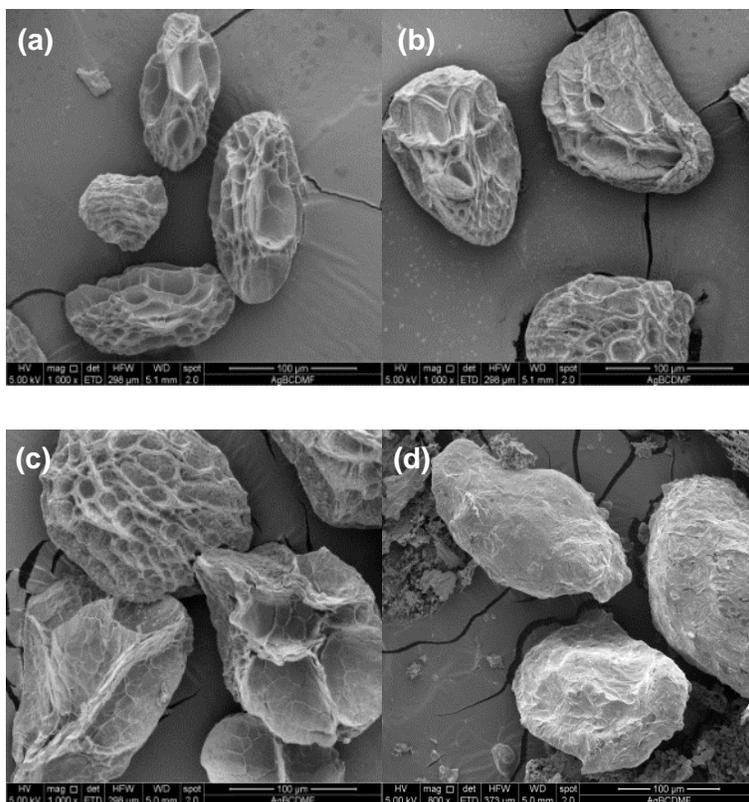


Figura 25. Imágenes SEM de MGs de alginato sin nanovehículos (a); MGs de alginato con AuNPs (b); MGs de alginato con NeCur (c); MGs de alginato con NeCur y AuNPs (d).

4.6. Evaluación de los perfiles de liberación de los nanosistemas contenidos en microgeles

Hemos logrado efectivamente la coencapsulación de AuNPs y NeCur en nuestros microsistemas. De acuerdo con lo planteado en esta investigación, al irradiar estos microgeles, el aumento del calor local producido por AuNPs debería promover la liberación de las NeCur. Esta hipótesis se fundamenta en que los microgeles son sensibles a estímulos externos como cambios de temperatura. Se utilizó como estrategia para observar la liberación de las NeCur, una evaluación directa de la fluorescencia de la suspensión sin disolverla en un solvente orgánico. Para validar este método se hizo una curva de calibración de fluorescencia vs concentración obteniendo una correlación lineal con un coeficiente igual a 0,9978 (Figura A5, Anexos).

En primer lugar se evaluó si la temperatura tiene efecto sobre la liberación de las NeCur desde los microgeles. Para esto, los microgeles fueron calentados a 80 °C y agitados a 1000 rpm durante 60 minutos. En la Figura 26 podemos observar que la concentración de nanoemulsiones liberada se tiende a mantener en el tiempo, mostrando una leve disminución a los 30 minutos. Esta disminución podría deberse a la precipitación o pérdida de la fluorescencia de algunas nanoemulsiones por la temperatura utilizada. Los leves cambios en la liberación producidos por condiciones extremas (alta temperatura y agitación) observados nos están indicando que el sistema es estable y que la temperatura utilizada no tiene un efecto significativo sobre la liberación de NeCur desde los microgeles.

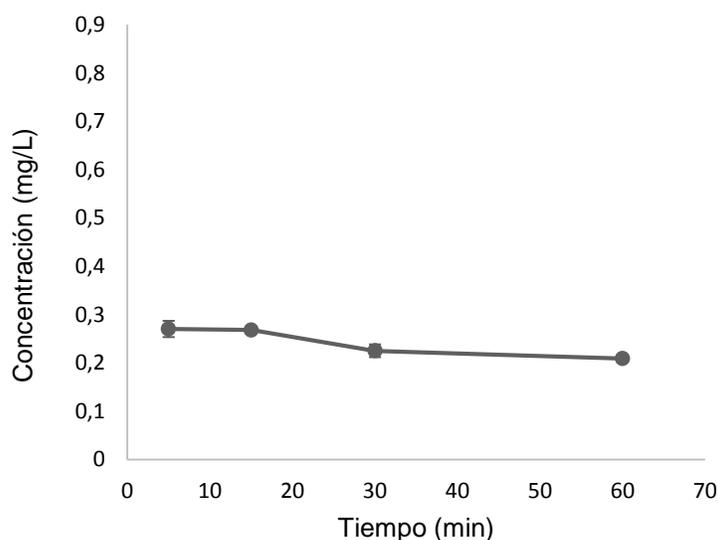


Figura 26. Liberación de las NeCur desde MGs sometidos a 80°C y 1000 rpm.

Con el fin de evaluar el efecto de la irradiación de las AuNPs sobre los microgeles, los sistemas fueron irradiados por 60 minutos utilizando un láser de 532 nm para excitar a las AuNPs contenidas dentro de los microgeles (Figura 27). Se estudiaron microgeles en solución de CaCl₂ y microgeles liofilizados, utilizando como control microgeles con NeCur y sin AuNPs.

En primer lugar, se observa que tanto los microgeles en suspensión como los liofilizados presentan una liberación de NeCur significativamente superior en presencia de AuNPs (Figura 27), lo que nos estaría indicando que las AuNPs están favoreciendo la liberación de las nanoemulsiones de curcumina por la energía

disipada al ser irradiadas. El calor local producido al excitar estas partículas puede promover un rompimiento de los enlaces entre el alginato y el calcio, por lo tanto se podrían generar canales o provocar hinchamiento del sistema que en ambos casos, favorecería la liberación de las nanoemulsiones.

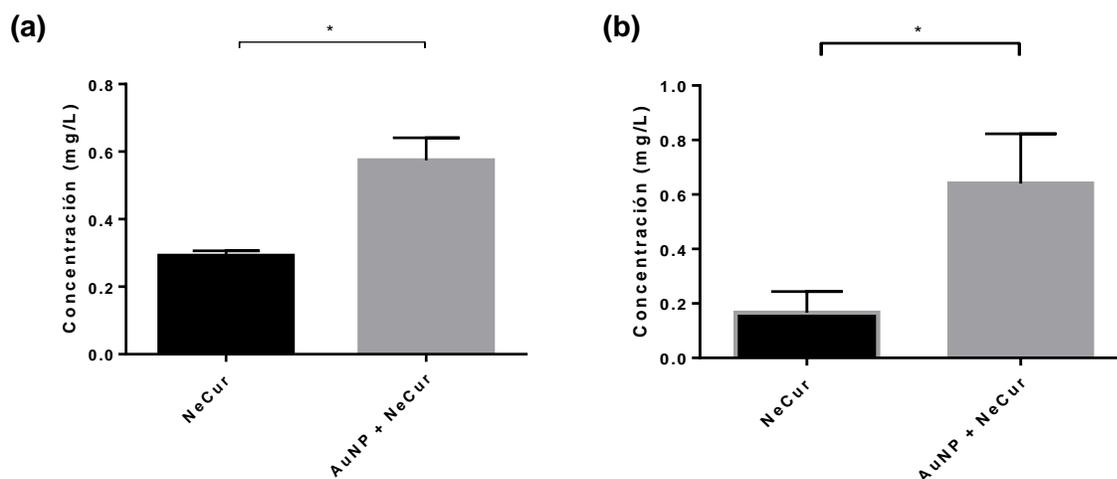


Figura 27. Liberación de NeCur luego de irradiar por 60 minutos en MGs conteniendo NeCur y AuNP-CLPFFD + NeCur. Se muestran microgeles liofilizados (a) y en suspensión (b). En ambos casos se determinó un índice de significancia $p < 0,05$ (Two-way ANOVA).

Es interesante mencionar, que el error estándar de los microgeles liofilizados es inferior a la de los sistemas en suspensión (Figura 27). Esto se debe probablemente a que al utilizar sistemas liofilizados podemos tener una mayor certeza de que va a existir exactamente la misma cantidad de microsistemas por cada ensayo realizado ($n = 3$). Además, si comparamos los controles de la Figura 27 (muestras sin AuNPs) se puede observar que existe una tendencia a una mayor liberación en los sistemas liofilizados. Podemos atribuir esto a que los conductos por donde se elimina el agua al momento de liofilizar los microsistemas (ver Figura 25) pueden facilitar la difusión de las NeCur al resuspender los microgeles en solución de CaCl_2 .

Otra observación interesante, es que los microgeles sin AuNPs en suspensión tuvieron una liberación similar a la observada a los 60 minutos en el experimento anterior al calentar los sistemas a $80\text{ }^\circ\text{C}$ (comparar Figuras 26 y 27b). Esto nos permite corroborar que los sistemas son estables en este rango de

temperatura. Es importante destacar que la descomposición del alginato ocurre entre los 240 y 260 °C (Soaresl J. y cols., 2004), por lo que podemos hipotetizar que la liberación observada en estos casos corresponde a la simple difusión de las NeCur desde los sistemas sin descomposición del polímero.

Es importante tener en consideración que en términos prácticos las longitudes de onda utilizadas para la irradiación de estas AuNPs (532 nm) pueden ser poco efectivas debido a que la piel, los tejidos y la hemoglobina absorben energía cerca de este mismo rango (ventana terapéutica) (Smith A. y cols., 2009). Como solución a este problema pueden emplearse alternativamente nanopartículas de oro en forma de varillas (NvO), las cuales absorben energía lejos de la ventana terapéutica, lo que aumenta la efectividad y disminuye potenciales efectos tóxicos.

Entonces, se encapsularon estas nanovarillas para evaluar si se podía obtener resultados similares a los anteriores utilizando el mismo procedimiento. Podemos observar en la Figura 28 que aunque existe un aumento en la liberación de NeCur por la presencia de NvO, este aumento no fue tan significativo como el observado en las AuNPs. Es importante tener en consideración que la concentración de oro utilizada en las NvO fue inferior a la utilizada en los sistemas anteriores (aproximadamente 117,8 µg/g para las AuNPs y 38,9 µg/g para las NvO)

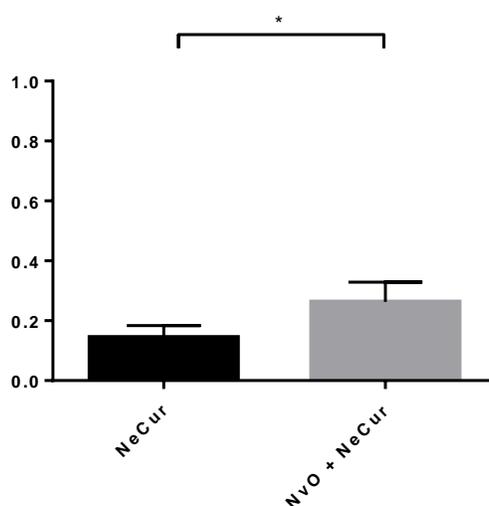


Figura 28. Liberación de las NeCur luego de irradiar por 60 minutos MGs conteniendo NeCur y NvO + NeCur. $p < 0,05$ (Two-way ANOVA).

Finalmente, se evaluó si la liberación observada al irradiar los microgeles con AuNPs y NeCur es sostenida en el tiempo. Para ello, se extrajeron muestras analíticas del sobrenadante a los 5, 15, 30 y 60 minutos del transcurso de la irradiación utilizando como control los microgeles sin AuNPs. En la Figura 29 se puede observar que los sistemas conteniendo AuNP y NeCur, tienen un aumento en su liberación a través del tiempo, mostrando una tendencia lineal. Por el contrario los microgeles sin AuNPs no muestran una liberación significativa a través del tiempo. Estos resultados nos indican que los sistemas generados permiten una liberación sostenida en el tiempo, lo que podría ser relevante si quisiéramos mantener una concentración continua en el tiempo.

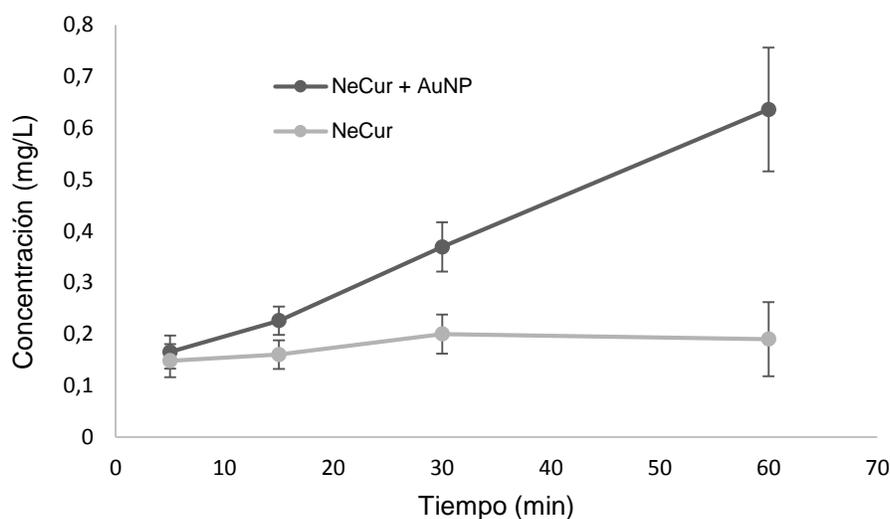


Figura 29. Liberación de las NeCur desde MGs conteniendo AuNP-CLPFFD + NeCur. Se midió la liberación al irradiar a los 5, 15, 30 y 60 minutos.

5. CONCLUSIONES

Se elaboraron nanopartículas de oro, con inclusión de los péptidos CLPFFD y R-CLPFFD. Las nanopartículas obtenidas presentaron una banda del plasmón correspondiente con las de las partículas oro en suspensión. Además, presentaron cargas superficiales negativas y estrechos márgenes de dispersión. Luego de la conjugación con el péptido CLPFFD, se observó un ligero aumento de tamaño, una disminución del potencial zeta y una disminución de la polidispersión de los sistemas.

La inclusión de curcumina en nanoemulsiones fue realizada de forma efectiva, observándose una formulación de color amarillento, tamaño nanométrico y bajos índices de polidispersión. Las nanoemulsiones de curcumina presentaron además potenciales zeta negativos y fueron estables durante el transcurso de la investigación.

Se estudió una metodología para generar microgeles de alginato y quitosano mediante un sistema automatizado. El control de las variables estudiadas permitió generar microgeles de alginato con tamaños entre aproximadamente 100 y 1500 μm , de forma altamente reproducible y con estrechos márgenes de dispersión de tamaño.

Se estudió la capacidad de interacción con mucina de los microgeles de alginato y quitosano seleccionados. Ambos sistemas presentaron un aumento de diámetro luego de interaccionar con la mucina, sin embargo, los sistemas formados con quitosano presentaron un aumento más significativo. Además, se requirió un mayor trabajo para desprender los geles de quitosano de una capa de mucina, lo que nos permite concluir que las interacciones son más fuertes con este polímero que con alginato. Esto puede atribuirse a la interacción electrostática entre el quitosano (carga positiva) y la mucina (carga negativa).

La inclusión de las AuNPs y NeCur en microgeles fue realizada de forma exitosa. Los sistemas desarrollados mantuvieron el tamaño, forma y dispersión de tamaño de los microgeles sin inclusión de nanosistemas. Además, presentaron el

color característico de los nanosistemas incluidos, el cual se mantuvo durante el tiempo, observándose una distribución homogénea.

La presencia de los nanosistemas contenidos en los microgeles fue comprobada por microscopia confocal. Se observó que los sistemas se distribuyeron de forma homogénea en los microgeles. Además, en los sistemas formados por AuNPs y NeCur, no se observó colocalización, lo que nos permite concluir que no hay interacciones significativas entre ambos sistemas al interior de los microgeles.

La liberación de NeCur desde los microgeles fue baja al aplicar solamente calor y agitación, manteniéndose constante la mayor parte del tiempo. Al irradiar los microgeles en presencia de AuNPs, se observó una liberación considerable en relación a los sistemas sin partículas de oro. Esta liberación ocurrió tanto en los microgeles en solución como en los liofilizados, sin embargo, no fue tan significativa en los sistemas formados por nanovarillas de oro y NeCur. Además, al evaluar la liberación a distintos tiempos de los sistemas sin AuNPs, se observó un perfil similar al obtenido al aplicar calor y agitación, mientras que se obtuvo una liberación sostenida en el tiempo cuando se irradió en presencia de AuNPs.

Analizando todos los datos obtenidos, podemos concluir que los microgeles generados con inclusión de AuNPs podrían brindar una herramienta para la liberación controlada de fármacos. Debido a que la liberación ocurre en la zona de irradiación, los sistemas generados podrían ser una gran alternativa a futuro para disminuir los efectos secundarios de fármacos tóxicos como los utilizados en quimioterapia.

En estudios posteriores, es necesario explorar la efectividad de los sistemas en cultivos o modelos *in vivo*. Además, se puede explorar con distintos polímeros y nanopartículas metálicas que permitan potenciar la liberación de los fármacos y reducir la toxicidad asociada.

6. REFERENCIAS

- Abang S, Chan E, Poncelet D. Effects of process variables on the encapsulation of oil in ca-alcinate capsules using an inverse gelation technique. *J Microencapsul.* 5:417-428 (2012).
- Anuchapreeda S, Fukumori Y, Okonogi S, Ichikawa H. Preparation of lipid nanoemulsions incorporating curcumin for cancer therapy. *J. Nanotechnol.*41:1-11 (2012).
- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharmacol.* 4:807-825 (2007).
- Aspden T, Illum I, Skaugrud O. Chitosan as a nasal delivery system-evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. *Eur. J. Pharm. Sci.* 4:23-31 (1996).
- Babak N, Mostafa A. El-Sayed. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* 15:1957–1962 (2003).
- Begum A, Jones M, Lim G, Morihara T, Kim P, Heath D. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J of Pharma and Exp Therap.* 326:196–208 (2008).
- Berry C, Curtis A. Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physycs D.* 36:198-206 (2003).
- Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev* 38:1759–1782 (2009).
- Caminade A, Régis Laurent, Jean-Pierre Majoral. Characterization of dendrimers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 57: 2130–2146 (2005).
- Chen J, Glaus C, Laforest R, Zhang Q, Yang M, Gidding M, Welch MJ, Xia Y. Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment. *Small.* 7:811–817 (2010).

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

Dirscherl G, Knape R, Hanson P, König B. Solid-phase synthesis of metal-complex containing peptides. *Tetrahedron.* 63:4918-4928 (2007).

Draget K, Skjak-Braek G, Smidsroed O. Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol.* 21: 47–551 (1997).

Dumitriu S, Dekker M. Mucoadhesive polymers. *Polymer Biomaterial.* 147–165 (2002).

Ganji F, Vasheghani-Farahani E. Hydrogels in controlled drug delivery systems. *Iranian Polymer Journal.* 1:63-88. (2009).

Gaserod O, Smidsrod O, Skjak-Braek G. Microcapsules of alginate-chitosan-I: A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials.* 20:1815–1825 (1998).

Ghosh P, Han G, Mrinmoy D, Kim C, Rotello V. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 11:1307-1315 (2008).

Ghosh S. Functional coatings and microencapsulation: a general perspective. *Weinheim.* 1–28 (2006).

Goel A, Kunnumakkara A, Aggarwal B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 75:787– 809 (2008).

Goodman C, McCusker C, Yilmaz T, Rotello V. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem.* 15:987-900. (2004).

Guerrero A, Hassan N, Escobar C, Albericio F, Kogan M, Araya E. Gold nanoparticles for photothermally controlled drug release. *Nanomedicine.* 9:2023-39. (2014).

Guerrero S, Araya E, Fiedler J, Arias J, Adura C, Albericio F. Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphipathic peptide. *Nanomedicine*. 6: 897–913 (2010).

Guerrero S, Herance JR, Rojas S, Mena JF, Gispert JD, Acosta GA, Albericio F, Kogan MJ. Synthesis and in vivo evaluation of the biodistribution of a ¹⁸F-labeled conjugate gold-nanoparticle-peptide with potential biomedical application. *Bioconjug Chem*. 23:399-408 (2012).

Hassan N, Oyarzun-Ampuero F, Lara P, Guerrero S, Cabuil V, Abou-Hassan A, Kogan MJ. Flow chemistry to control the synthesis of nano and microparticles for biomedical applications. *Curr Top Med Chem*. 5:676-689 (2014).

Heng P, Chan L, Wong T. Formation of alginate microspheres produced using emulsification technique. *J Microencapsul*. 3:401-413 (2003).

Huang X, Xiao Y, Lang M. Micelles/sodium-alginate composite gel beads: A new matrix for oral drug delivery of indomethacin. *Carbohydrate Polymers*. 87:790–798. (2012).

Huschka R, Barhoumi A, Liu Q, Roth JA, Ji L, Halas NJ. Gene silencing by gold nanoshell-mediated delivery and laser-triggered release of antisense oligonucleotide and siRNA. *ACS Nano*. 9:7681–7691 (2012).

Kreibig U, Vollmer M. *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer. 25: 50-60 (1995).

Kelly K, Coronado E, Zhao L, Schatz C. The optical properties of metal nanoparticles. The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B*. 3:668-677 (2003).

Kogan MJ, Amigo R, Grillo-Bosch D, Araya E, Turiel A, Labarta A, Puntès VF. Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett*. 6: 1010-1015. (2006).

Koch S, Schwinger C, Kressler J, Heinzen C, Rainov N. Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells: Comparison of production devices, methods and microcapsule characteristics. *J of Microencap.* 3:303-316 (2003).

Lam P, Gambari R. Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. *J. Control Release.* 178:25-45 (2014).

Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature:* 5-10 (1998).

Levy R, Thanh N, Doty R, Hussain I, Nichols R, Schiffrin D, Brust M, Fernig D. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J Am Chem Soc,* 2004. 126(32): p. 10076-10084.

Li G, Lauer M, Schulz M, Boettcher C, Li FT, Fuhrhop JH. Spherical and planar gold(0) nanoparticles with a rigid gold(I)-anion or a fluid gold(0)-acetone surface. *Langmuir.* 19:6483–6491 (2003).

Lim G, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21:8370–8377 (2001).

Mahapatro A, Singh D. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology.* 28:9-55 (2011).

Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul.* 41:189-207 (2001).

Mallika D, Nicolas S, Daniele F, and Eugenia K. Microgels Loaded with Gold Nanorods: Photothermally Triggered Volume Transitions under Physiological Conditions. *Langmuir* 23:196-201 (2007).

Meera G, Abraham E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review. *J Control Release.* 1:1-14 (2006).

Miro A, Ungaro F, Bilensoy E, Quaglia F. Cyclodextrins as Smart Excipients in Polymeric Drug Delivery Systems. *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine*. 65-89 (2011).

Müller R. *Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting*. CRC Press, Boca Raton 61-65 (1991).

Pan Y, Neuss S. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*. 3:1941-1949. (2007).

Robinson J, Mlynek G. Bioadhesive and phase-change polymers for ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 16:45-50 (1995).

Ryu E, Choe Y, Lee K, Choi Y, Kim B. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: synthesis, radiolabeling, and evaluation for-amyloid plaque imaging. *J Med Chem*. 49:6111– 6119 (2006).

Shu X, Zhu K. The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect. *Eur J Pharm Biopharm*. 2:192-201 (2002).

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhone RR. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir*. 21:10644–10654 (2005).

Smart J, Kellaway I, Worthington H. An in-vitro investigation of mucosaadhesive materials for use in controlled drug delivery. *J Pharm Pharmacol*. 36:295-9 (1984).

Smith A, Mancini M, Michael C.; Nie, Shuming. Bioimaging: Second window for in vivo imaging. *Nature Nanotechnology*. 4:710–711(2009)

Soaresl J, Santosl J, Chiericelll G, Cavalheiroll E. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclet. Quím*. 29: 1678-4618 (2004)

Stefani M, Dobson C. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med*. 81: 678-699 (2003).

Subhashis D, Satayanarayana D, Gampa V. Nanoemulsion a method to improve the solubility of lipophilic drugs. *Int. J. Rev. Pharm.* 2231–2541 (2010).

Tachaprutinun A, Pan-In P, Wanichwecharungruang S. Mucosa-plate for direct evaluation of mucoadhesion of drug carriers. *Int J Pharm.* 441:801-808 (2013).

Turkevich J. Nucleation and growth process in synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Society.* 11: 55-75 (1951).

Vlerken L, Amiji M. Multi-functional polymeric nanoparticles for tumour-targeted drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 3:205–216 (2006).

Willems K, Van Duyne R. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58:267-97 (2007).

Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol.* 4: 316-317 (2001).

Yang F, Lim G, Begum A, Ubeda O, Simmons M, Ambegaokar S, Chen P, Kaye R, Glabe C, Frautsch S, Cole G. Curcumin inhibits formation of amyloid oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem.* 280:5892-5901 (2005).

Yang K, Lin L, Tseng T, Wang S, Tsai T. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longaby* LC-MS/MS. *J Chromatogr B.* 853:183-202 (2007).

Yeo Y, Baek N, Park K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6: 213–230 (2001).

Yurdasiper A, Sevgi F. An overview of modified release chitosan, alginate and eudragit RS microparticles. *Chem. Pharm. Res.* 2:704-721 (2010).

Zhang H, Mardiyani S, Chan W, Kumacheva E. Design of biocompatible chitosan microgels for targeted pH-mediated intracellular release of cancer therapeutics. *Biomacromolecules.* 7:1568–1572 (2006).

Zhang L, Sun X, Song Y, Jiang X, Dong S, Wang E. Didodecyldimethylammonium bromide lipid bilayer-protected gold nanoparticles: synthesis, characterization, and self-assembly. Langmuir. 6:2838–2843 (2006).

7. ANEXOS

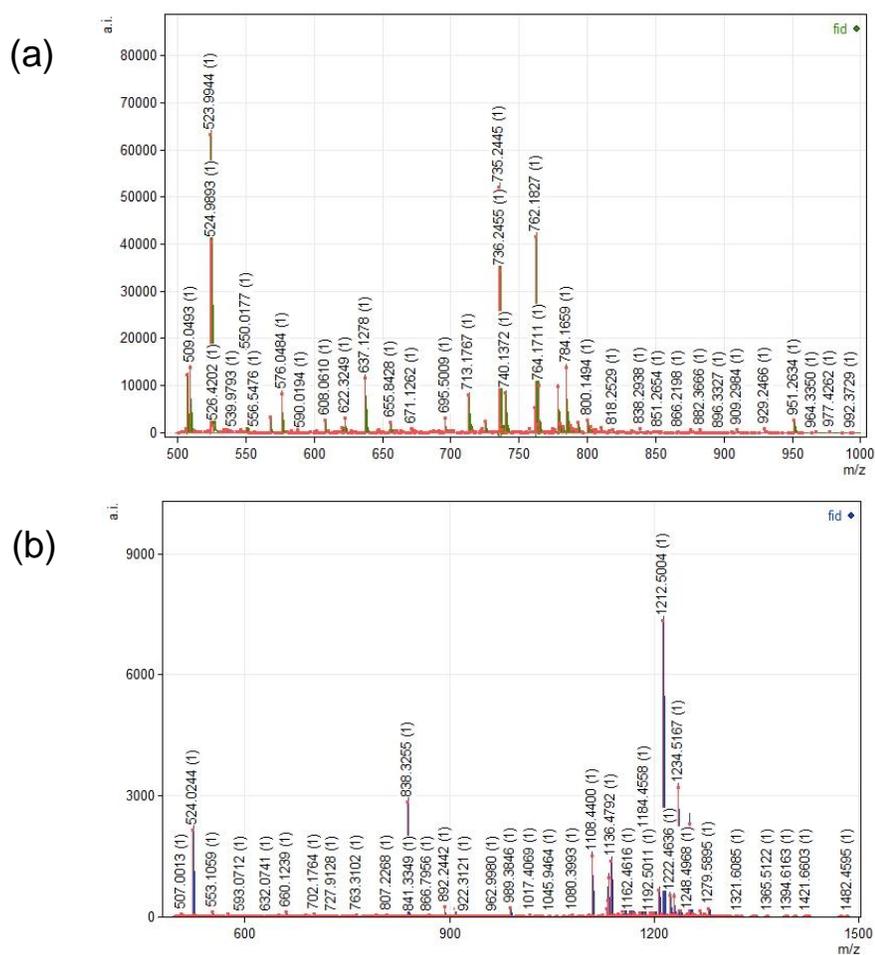


Figura A1. Espectro MALDI-TOF del péptido CLPFFD peso molecular teórico 739,873g/mol (a) y del péptido CLPFFD-R, peso molecular teórico 1201 g/mol (b). Matriz de ácido 2,5-dihidrobencóico (DHB) a una concentración de 10 mg/mL en ACN/ácido fórmico 0,1% v/v (1:2).

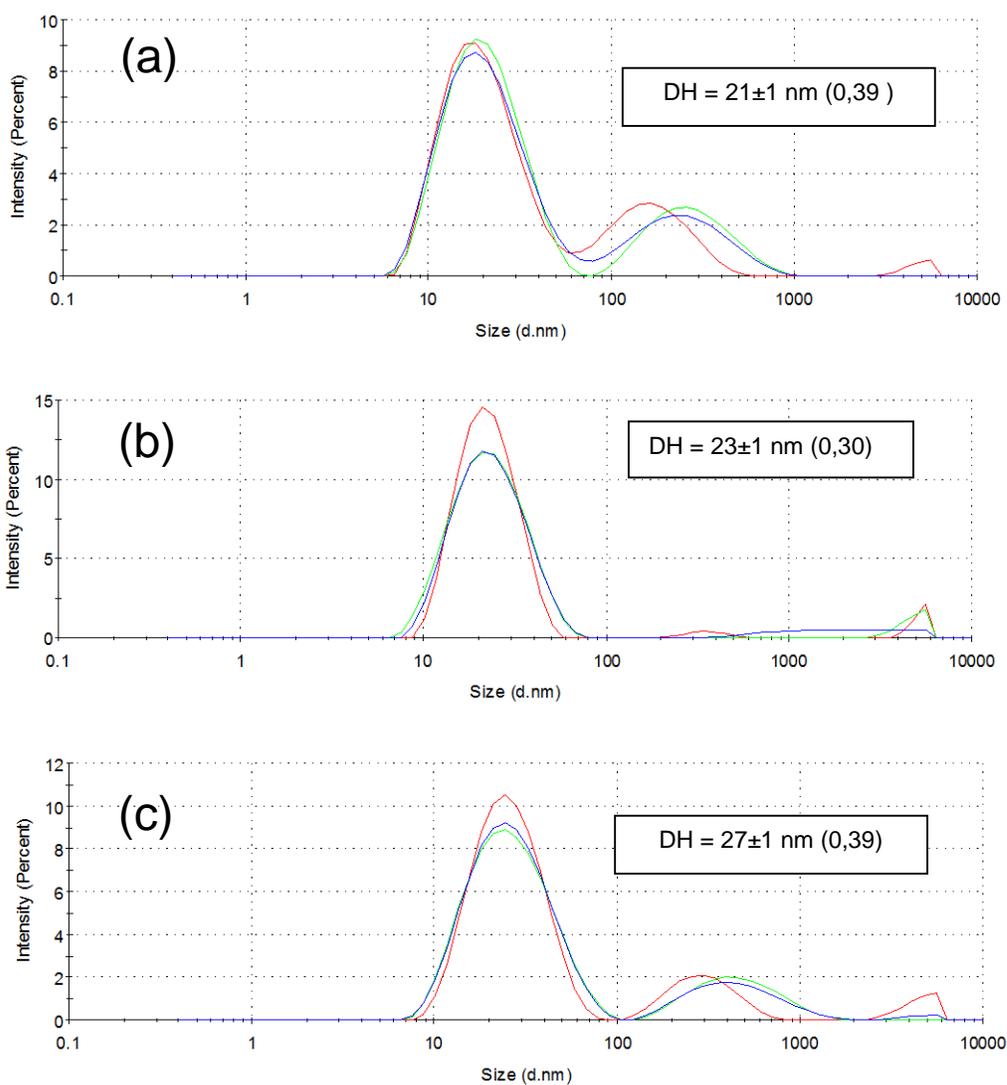


Figura A2. Gráficos de la distribución de tamaño de AuNPs (a) y sus conjugados: AuNP-CLPFFD (b) y AuNP-R-CLPFFD (c). DH: diámetro hidrodinámico. Entre paréntesis el valor del PDI. $n=3 \pm DS$.

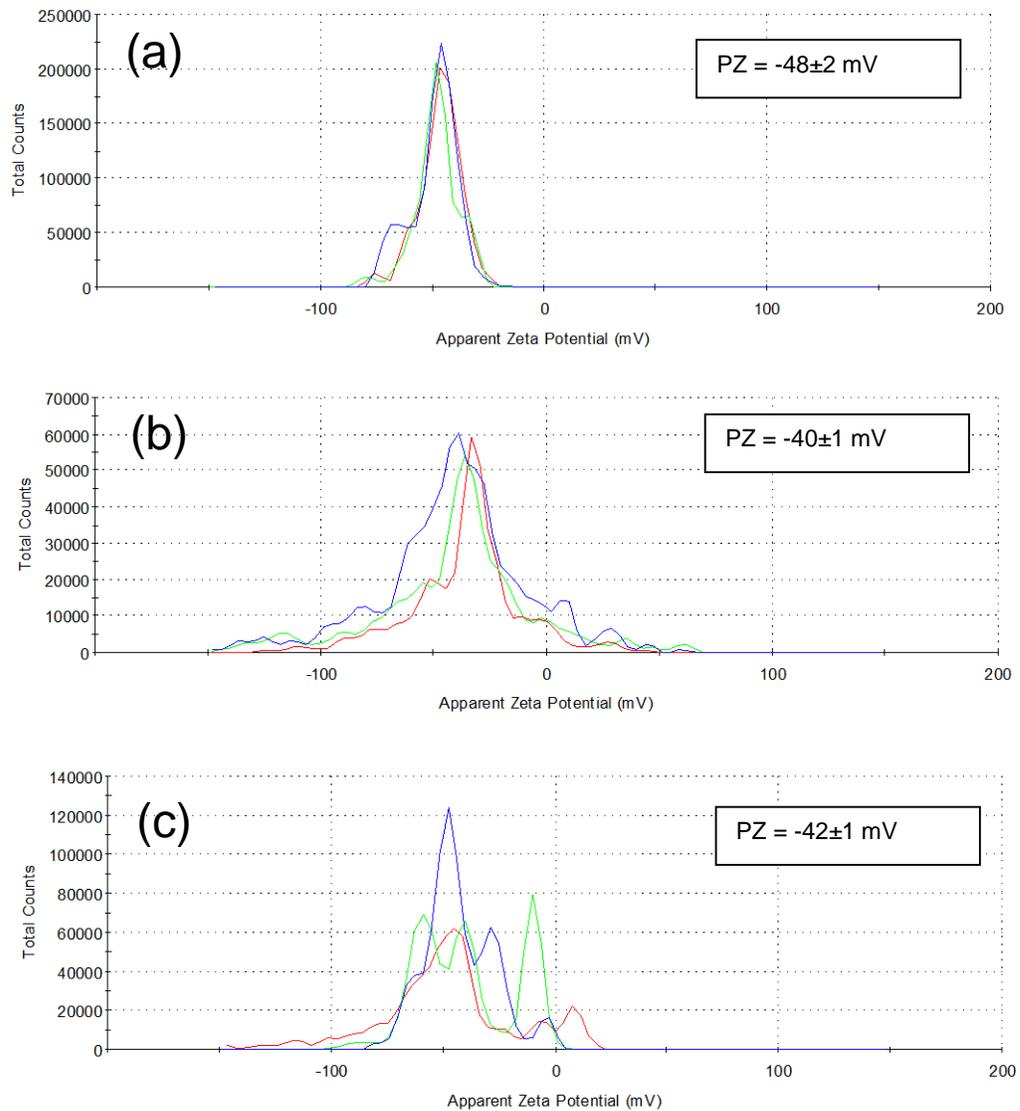


Figura A3. Gráficos del potencial zeta del conjugado tamaño de AuNPs (a) y sus conjugados: AuNP-CLPFFD (b) y AuNP-R-CLPFFD (c). PZ: potencial zeta. $n=3 \pm DS$.

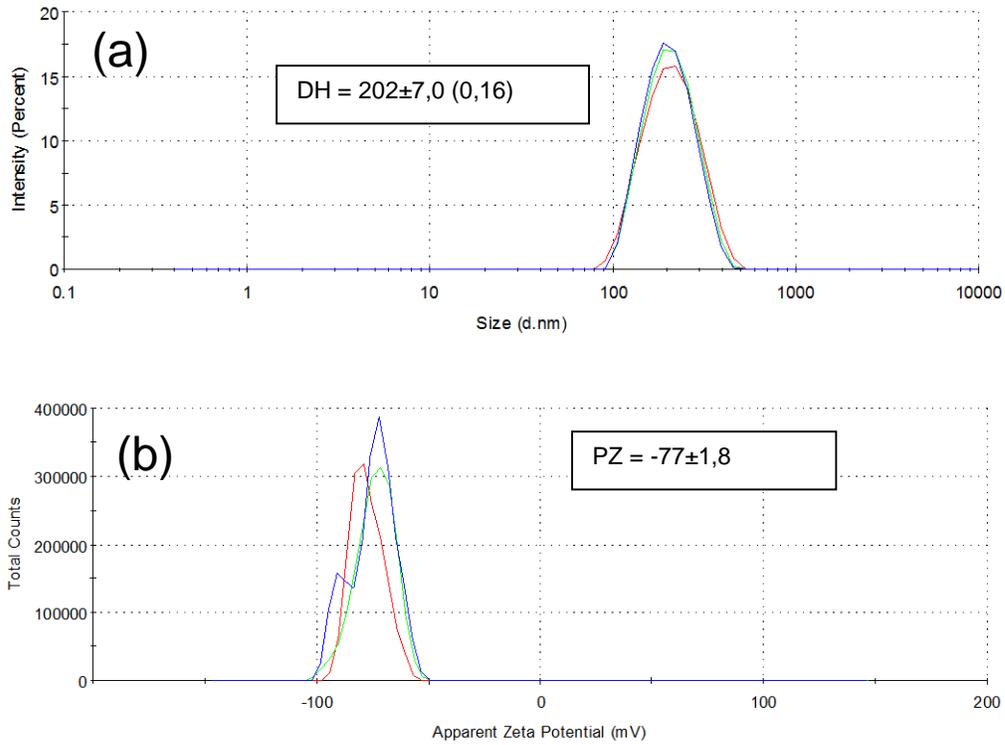


Figura A4. Gráficos de la distribución de tamaño de las NeCur (a) y su potencial zeta (b). PZ: potencial zeta. DH: diámetro hidrodinámico. Entre paréntesis el valor del PDI. $n=3 \pm DS$.

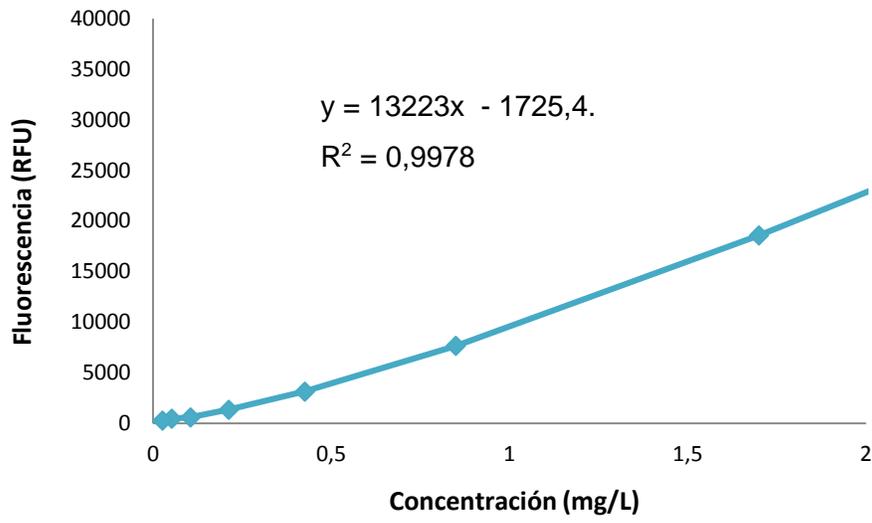


Figura A5. Curva de calibración de NeCur, concentración (mg/L) vs unidades relativas de fluorescencia (RFU).